

Charakterisierung der SUMO-Isopeptidasen SENP3 und SENP6

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

**vorgelegt von
Diplom-Biologe
Markus Haindl**

September 2008

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 10. 09. 2008

Promotionsgesuch eingereicht am	September 2008
Tag der mündlichen Prüfung	05. November 2008
Erster Gutachter	Prof. Dr. Stefan Jentsch
Zweiter Gutachter	PD Dr. Angelika Böttger

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen November 2004 und September 2008 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:

Klein, U.R., **Haindl, M.**, Nigg, E.A., Muller, S. RanBP2 and SENP3 function in a mitotic SUMO2/3 conjugation-deconjugation cycle on Borealin, zur Veröffentlichung eingereicht

Haindl, M., Harasim, T., Eick, D., 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

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 Posttranslationale Modifikation	2
2.2 Die Proteine der Ubiquitin-Familie	2
2.3 Das SUMO-System	4
2.3.1 Die enzymatische Kaskade der Sumoylierung	6
2.3.2 SUMO-Proteasen katalysieren die Dekonjugation von SUMO	8
2.3.3 Funktionelle Konsequenzen einer Modifikation mit SUMO	13
2.4 Nukleolus und Ribosomenbiogenese	15
2.5 Der Zellzyklus	19
2.6 Mitose	21
2.6.1 Mitotische Kinasen	22
2.6.2 Kohäsion von Schwesterchromatiden	23
2.6.3 Regulation der Mitose und Trennung von Schwesterchromatiden	24
2.6.4 Funktion des SUMO-Systems in der Mitose	26
2.7 Zielsetzung der Arbeit	28
3 Ergebnisse	29
3.1 Die Rolle von SENP3 in der Interphase	29
3.1.1 NPM1 ist ein Haupt-Bindungspartner von SENP3	29
3.1.2 SENP3 katalysiert die Desumoylierung von NPM1	31
3.1.3 Depletion von SENP3 inhibiert die Reifung der 28S rRNA	37
3.1.4 SENP3 und NPM1 sind epistatisch	38
3.1.5 Sumoylierung von NPM1 beeinträchtigt die Reifung der 28S rRNA	40
3.1.5.1 Lysin263 ist nicht die Hauptakzeptorstelle in NPM1 für SUMO2	40
3.1.5.2 Eine lineare Fusion zwischen NPM1 und SUMO2 inhibiert die Reifung der 28S rRNA	42
3.2 Die Rolle von SENP3 in der Mitose	46
3.2.1 SENP3 wird während der Mitose reguliert	46
3.2.2 SENP3 wird während der Mitose an mehreren Stellen phosphoryliert	48
3.2.3 SENP3 interagiert mit Plk1	50
3.2.3.1 SENP3 interagiert mit Plk1 im <i>yeast two hybrid</i> System	50
3.2.3.2 Die Interaktion mit Plk1 ist abhängig vom Phosphorylierungsstatus von SENP3	50
3.2.3.3 Phosphoryliertes Serin26 dient als Andockstelle für Plk1 an SENP3	52
3.2.4 SENP3 interagiert mit Borealin und katalysiert dessen Desumoylierung	53
3.2.5 Depletion von SENP3 verzögert den Beginn der Anaphase	55
3.2.6 SENP3 beeinflusst den <i>spindle assembly checkpoint</i>	56
3.2.7 Lokalisierung von SAC-Proteinen nach Depletion von SENP3	57

Inhaltsverzeichnis

3.2.8 Cdc20 wird <i>in vitro</i> mit SUMO modifiziert	60
3.3 Die Rolle von SENP6 in der Mitose	60
3.3.1 Depletion von SENP6 verhindert den Arrest von Zellen mit Nocodazol	60
3.3.2 Depletion von SENP6 führt zu einer verfrühten Initiation der Anaphase	63
3.3.3 Depletion von SENP6 führt zu einer selektiven Mislokalisierung von Mad2	65
4 Diskussion	67
4.1 SENP3 kontrolliert die Reifung ribosomaler RNA	67
4.1.1 Desumoylierung von NPM1 ist ein kritischer Schritt bei der Ribosomenbiogenese	67
4.1.2 Modell für die dynamischen Sumoylierung von NPM1	68
4.1.3 Wie beeinflusst die Sumoylierung von NPM1 die Ribosomenbiogenese auf molekularer Ebene?	69
4.2 SENP3 wird in der Mitose reguliert und beeinflusst mitotische Vorgänge	71
4.2.1 SENP3 wird während der Mitose reguliert und interagiert mit Plk1	72
4.2.2 SENP3 desumoyliert Borealin	73
4.2.3 SENP3 kontrolliert die Dauer der Mitose	74
4.2.4 SENP3 beeinflusst den SAC	75
4.2.5 Wie lassen sich verlängerte Mitose und Kompromittierung des SAC vereinbaren?	77
4.3 SENP6 kontrolliert den SAC	78
4.3.1 SENP6 kontrolliert die Mitose und den SAC in Mad2-ähnlicher Weise	78
4.3.2 Depletion von SENP6 führt zu einer selektiven Mislokalisierung von Mad2	79
4.3.3 Wie beeinflusst SENP6 den SAC auf molekularer Ebene?	80
5 Material und Methoden	81
5.1 Computeranalysen	81
5.2 Mikrobiologische Methoden	81
5.2.1 Methoden für <i>E. coli</i>	81
5.2.1.1 <i>E. coli</i> Stämme	81
5.2.1.2 Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i>	82
5.2.1.3 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien	82
5.2.1.4 Herstellung „ultra-kompetenter“ Bakterien	82
5.2.1.5 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen	83
5.2.2 Methoden für <i>S. cerevisiae</i>	83
5.2.2.1 <i>S. cerevisiae</i> Stamm	83
5.2.2.2 <i>S. cerevisiae</i> Vektoren	83
5.2.2.3 <i>S. cerevisiae</i> Plasmidkonstrukte	83
5.2.2.4 Kultivierung und Lagerung von <i>S. cerevisiae</i>	84
5.2.2.5 Herstellung kompetenter Zellen von <i>S. cerevisiae</i>	84
5.2.2.6 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	84
5.2.2.7 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit dem <i>two hybrid</i> System	84

Inhaltsverzeichnis

5.3 Zellbiologische Methoden	85
5.3.1 Zelllinien	85
5.3.2 Expressionsvektoren für die Zellkultur	85
5.3.3 Kultivierung von Säugerzellen	85
5.3.4 Lagerung von Säugerzellen	85
5.3.5 Transfektion von Säugerzellen mit Plasmid-DNA	86
5.3.6 Transfektion von Säugerzellen mit siRNA-Oligonukleotiden	86
5.3.7 Expression von Proteinen über das pRTS-1-System	87
5.3.8 FACS-Analyse	87
5.3.9 Immunfluoreszenzmikroskopie	88
5.3.10 Zeitraffer-Mikroskopie	89
5.3.11 <i>In vivo</i> Markierung ribosomaler RNA	90
5.3.12 Synchronisierung und Anreicherung mitotischer Zellen	90
5.4 Molekularbiologische Methoden	91
5.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	91
5.4.2 Restriktionsverdau von DNA	91
5.4.3 Dephosphorylierung von DNA	91
5.4.4 Phosphorylierung von DNA	91
5.4.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	91
5.4.6 Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen	92
5.4.7 Ligation von DNA	92
5.4.8 Einfügen von kurzen Oligonukleotid-Sequenzen	92
5.4.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	93
5.4.10 Sequenzieren von DNA	93
5.4.11 Zielgerichtete <i>in vitro</i> Punktmutagenese	94
5.4.12 Isolierung von RNA aus Säugerzellen	94
5.4.13 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA	94
5.4.14 Reverse Transkription	95
5.4.15 Realtime RT-PCR	95
5.5 Proteinbiochemische Methoden	96
5.5.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	96
5.5.2 Coomassiefärbung von Proteingelen	97
5.5.3 Western Blot	97
5.5.4 Farwestern-Analyse	98
5.5.5 Lyse und Präparation von Zelllysaten	99
5.5.6 Identifikation von SENP3-Interaktoren	99
5.5.7 Immunpräzipitation und Anreicherung von Flag-SENP3	100
5.5.8 Anreicherung His ₆ -markierter Proteine über eine Ni-NTA-Matrix	100
5.5.9 <i>In vitro</i> -Modifikation mit SUMO und Demodifikation	101
5.5.10 Herstellung und Aufreinigung eines SENP3 Antikörpers	101

Inhaltsverzeichnis

6	Literaturverzeichnis	102
7	Anhang	111
7.1	Abbildungen	111
7.2	Abkürzungsverzeichnis	116
7.3	Danksagung	118
7.4	Lebenslauf	119

1 Zusammenfassung

Die posttranslationale Modifikation mit dem Ubiquitin-ähnlichen SUMO Protein reguliert eine Reihe wichtiger zellulärer Prozesse. Das SUMO-System übt seine Funktion dabei durch einen zyklischen Prozess von Modifikation und Demodifikation aus, wobei die Desumoylierung durch SUMO-spezifische Proteasen der Ulp/SENPFamilie katalysiert wird. Die humane SENP Familie setzt sich aus sechs Mitgliedern zusammen, die distinkte subzelluläre Lokalisierungen aufweisen. Die jeweiligen Substrate und Funktionen einzelner SENPs sind jedoch bisher weithin unbekannt.

Um ein besseres Verständnis der Funktion des SUMO Systems im Nukleolus zu gewinnen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die nukleoläre SUMO-Isopeptidase SENP3 charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass SENP3 als kritischer Faktor in der Ribosomenbiogenese fungiert und hierbei für die nukleoläre Reifung der 28S rRNA aus seiner 32S Vorläuferform erforderlich ist. Nucleophosmin (NPM1), das als wichtiger Regulator bei der Prozessierung der 32S rRNA gilt, wurde als ein Hauptinteraktionspartner von SENP3 identifiziert und SENP3 konnte als Dekonjugationsenzym für sumoyliertes NPM1 charakterisiert werden. Da eine konstitutive SUMO-Modifikation die Funktion von NPM1 bei der Prozessierung der 32S rRNA inhibiert, scheint die SENP3-vermittelte Desumoylierung von NPM1 kritisch für dessen Funktion zu sein.

Interessanterweise konnte SENP3 auch eine zentrale Rolle in mitotischen Regulationsprozessen zugewiesen werden. So unterliegt SENP3 einer ausgeprägten mitotischen Phosphorylierung und bindet in Abhängigkeit einer spezifischen Phosphorylierungsstelle an die mitotische Kinase Plk1. Die siRNA-vermittelte Depletion von SENP3 verzögert die Initiation der Anaphase und beeinträchtigt die Aktivierung des *spindle assembly checkpoints* (SAC), der sicherstellt, dass Chromosomensegregation erst nach korrekter Anheftung von Mikrotubuli an Kinetochore erfolgt.

Bei einer systematischen Analyse konnte SENP6 als weitere Komponente des SAC identifiziert werden. SENP6 reguliert dabei vermutlich den *spindle assembly checkpoint* über die Kontrolle der Lokalisierung des SAC-Proteins Mad2 und ist auf diese Weise für die zeitliche Koordination der Initiation der Anaphase und die ordnungsgemäße Verteilung von Schwesterchromatiden verantwortlich.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse somit eine wichtige Funktionen des nukleolären SUMO Systems in der Ribosomenbiogenese auf und unterstreichen die Bedeutung der Desumoylierung für den korrekten Verlauf der Mitose.

2 Einleitung

2.1 Posttranslationale Modifikation

Die Entschlüsselung des humanen Genoms zeigte, dass die Anzahl an Genen weitaus geringer ist als ursprünglich angenommen wurde. Dies macht offensichtlich, dass die Komplexität des menschlichen Organismus durch das Zusammenspiel der Proteine als Produkte der Gene als vielmehr die reine Anzahl an Genen definiert wird. Das Proteom einer Zelle ist im Gegensatz zum eher statischen Genom nämlich hochdynamisch und kann sich daher in seiner qualitativen und quantitativen Zusammensetzung aufgrund veränderter Bedingungen wie etwa Umweltfaktoren, Nahrungsangebot oder Stress verändern. So wurde herausgefunden, dass Prozesse wie etwa das alternative Spleißen die Komplexität des Proteoms relativ zum Genom enorm erhöhen. Nimmt man weitere Möglichkeiten der Regulation während der Transkription, der Translation oder durch micro-RNAs noch hinzu, so wird deutlich, wie flexibel und dynamisch das Proteom eines Organismus gegenüber seines Genoms moduliert werden kann. Es ergeben sich also schon bevor ein reifes Protein überhaupt entsteht äußerst vielfältige Mechanismen für eine Zelle, auf Funktion und Menge von Genprodukten Einfluss zu nehmen. Ein weiterer entscheidender Schritt der Regulation erfolgt jedoch erst nach der Translation und wird demzufolge als posttranslationale Modifikation bezeichnet. Bei diesem Prozess werden Proteine kovalent mit anderen Molekülen verknüpft, die sehr heterogen in ihrer Größe und Komplexität sein können. Ein Beispiel für eine vergleichsweise kleine Modifikation stellt die Phosphorylierung von Proteinen dar, deren Rolle in der Signaltransduktion bisher wohl am besten verstanden und charakterisiert ist. Weiterhin können Proteine beispielsweise auch acetyliert, methyliert, hydroxyliert, durch Lipidreste, Zuckerketten oder aber auch durch andere Proteine modifiziert werden.

2.2 Die Proteine der Ubiquitin-Familie

Die Modifikation mit Proteinen nimmt schon allein aufgrund der Gleichartigkeit von Substrat und Modifikator eine Sonderstellung unter den posttranslationalen Modifikationen ein. Ein solches modifizierendes Protein wurde erstmals von der Arbeitsgruppe um A. Hershko in den ausgehenden siebziger Jahren beschrieben (Ciehanover et al., 1978; Hershko et al., 1980) und später als das Protein Ubiquitin identifiziert (Wilkinson et al., 1980). Es handelt sich hierbei um ein 8kDa großes Polypeptid, das sich in nur drei Aminosäuren zwischen Mensch und Hefe

Einleitung

unterscheidet und damit eines der evolutionär am höchsten konservierten Proteine ist. Da es allerdings auf Eukaryoten beschränkt zu sein scheint, hat sich das Ubiquitin-System offenbar erst relativ spät in der Evolution entwickelt.

Ubiquitin wird mit Hilfe einer komplexen, und konservierten enzymatischen Konjugationsmaschinerie über seinen C-Terminus zunächst in der Regel an die ϵ -Aminogruppe eines internen Lysins im Zielprotein angeheftet. Hierbei wird das C-terminale Glycin von Ubiquitin ATP-abhängig aktiviert und anschließend in Form einer Thioesterbindung mit einem Cystein des Ubiquitin-aktivierenden E1-Enzyms (Uba1) verknüpft. Das so aktivierte Ubiquitin wird im Folgenden auf ein Ubiquitin-konjugierendes E2-Enzym transferiert, mit dem es wiederum eine Thioesterbindung eingeht, bevor es meist mit Hilfe einer E3-Ubiquitin-Ligase oder eines Ligasekomplexes kovalent an die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes im Zielprotein gebunden wird. E3-Ubiquitin-Ligasen lassen sich dabei in zwei Klassen einteilen: HECT (*homologous to E6-AP C-terminus*) Ubiquitin-Ligasen übernehmen Ubiquitin zuerst kovalent über ein internes Cystein vom E2-konjugierenden Enzym, bevor sie es dann auf das Substrat übertragen, wohingegen monomere RING-Finger-Ubiquitin-Ligasen oder RING-Finger-enthaltende Ligasekomplexe keine kovalente Bindung zu Ubiquitin eingehen sondern vielmehr als eine Art Adapter fungieren, um Ubiquitin vom E2-Enzym auf das Substrat zu übertragen.

Lysinreste eines bereits konjugierten Ubiquitins können wiederum selbst als Akzeptorstellen für weitere Ubiquitinmoleküle dienen, wodurch Poly-Ubiquitin-Ketten verschiedener Länge an einem Substrat entstehen können. Abhängig davon, welches der sieben Lysine in Ubiquitin verwendet wird, entstehen verschiedene Typen von Poly-Ubiquitin-Ketten, die durch spezifische Bindeproteine erkannt werden und so unterschiedliche Funktionen vermitteln. Erfolgt dabei die Verknüpfung solcher Ketten beispielsweise über Lysin48 des Ubiquitins so hat dies die Degradation des modifizierten Substrates durch das 26S-Proteasom zur Folge. Dieser Ubiquitin vermittelte Abbau des modifizierten Proteins, der über den sogenannten *escort pathway* (Richly et al., 2005) abläuft, wird auch als die klassische Funktion von Ubiquitin bezeichnet.

Neben dieser klassischen Aufgabe konnten einer Modifikation mit Ubiquitin aber noch weitere, sogenannte nicht-klassische Funktionen zugeordnet werden. Dazu gehören Prozesse wie Endozytose (Hicke und Dunn, 2003), Transkription (Muratani und Tansey, 2003) und DNA-Reparatur (Hoegel et al., 2002), bei denen Ubiquitin beispielsweise als Monomer bzw. als über Lysin63 konjugiertes Polymer an das jeweilige Substrat gebunden wird.

Da Ubiquitinierung ein reversibler Prozess ist, ergeben sich durch die Ubiquitinabspaltung, die durch DUBs (*deubiquitinating enzymes*) oder USPs (*ubiquitin-specific proteases*) katalysiert wird, weitere Möglichkeiten der Regulation (Amerik und Hochstrasser, 2004). Zudem wird durch eine Assoziation von DUBs mit dem Proteasom sichergestellt, dass Ubiquitin vor der Hydrolyse des Substrates entfernt wird und so vor proteasomaler Degradation geschützt bleibt. Eine weitere Aufgabe von DUBs liegt in der Reifung von Ubiquitin, das zunächst in seiner Vorläuferform als Proteinfusion von Ubiquitin mit sich selbst oder ribosomalen Proteinen synthetisiert wird. DUBs katalysieren dabei die Freilegung des für die Konjugation notwendigen Doppel-Glycin-Motivs am C-Terminus von Ubiquitin durch hydrolytische Spaltung dieser Fusionsproteine.

Nach der Identifizierung von Ubiquitin konnte in der Folgezeit eine ganze Reihe von Ubiquitin-ähnlichen Proteinen beschrieben werden, die in ihrer Aminosäuresequenz und vor allem ihrer Struktur ähnlich zu Ubiquitin sind. Diese Ubiquitin-ähnlichen Proteine unterteilen sich dabei weiter in UBLs (*ubiquitin-like proteins*) und UDPs (*ubiquitin-domain proteins*) (Jentsch und Pyrowolakis, 2000). Während UDPs eine sehr heterogene Gruppe von Proteinen darstellen und nicht an Substratproteine geknüpft werden können, fungieren UBLs (z.B. SUMO, Nedd8, APG12, Fat10, ISG15) in der Regel als Modifikator-Proteine und werden - wie Ubiquitin selbst - kovalent an ihre jeweiligen Substrate gebunden (Jentsch und Pyrowolakis, 2000). UBLs sind dabei an einer Vielzahl fundamentaler zellulärer Prozesse wie Proteinsortierung, Proteinabbau, DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle, Autophagie oder Apoptose beteiligt.

2.3 Das SUMO-System

Das wohl bekannteste und am besten beschriebene dieser UBLs wird als SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) bezeichnet. Da es in mehreren unabhängigen Untersuchungen gefunden wurde, taucht es unter vielen verschiedenen Namen, wie Pic1, Ubl1, Gmp1, Sentrin, Smt3, Pmt3 und Dap1 in der Literatur auf. In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* existiert ein SUMO-Gen, *SMT3*, dessen Gegenstück aus *S. pombe* als *PMT3* bezeichnet wird. Etwas komplexer gestaltet sich die Situation beim Menschen. Hier sind drei SUMO-Isoformen bekannt, die jeweils unabhängig voneinander von verschiedenen Genloci exprimiert werden. SUMO2 und -3 sind zu 95% identisch und unterscheiden sich lediglich an ihrem C-Terminus merklich voneinander (Abb. 1A). Sie weisen eine Sequenzidentität von 50% zu SUMO1 auf

Einleitung

und scheinen interessanterweise auch auf funktionaler Ebene Unterschiede zu SUMO1 zu offenbaren. Im Gegensatz zu Ubiquitin hat SUMO wohl keine direkte Funktion in der Adressierung zum Proteasom, es ist jedoch bekannt, dass eine Modifikation mit SUMO sowohl die subzelluläre Lokalisierung als auch die Funktion des jeweiligen Proteins beeinflussen kann (siehe 2.3.3). Im Gegensatz zu SUMO1 besitzen SUMO2 und -3 jeweils ein internes Lysin, das in einer SUMO-Konsensussequenz (siehe 2.3.1) liegt und es ihnen ermöglicht Poly-SUMO-Ketten zu bilden. Damit einhergehend sind Poly-SUMO-Ketten *in vivo* auch nur für SUMO2/3 und nicht für SUMO1 beschrieben (Tatham et al., 2001).

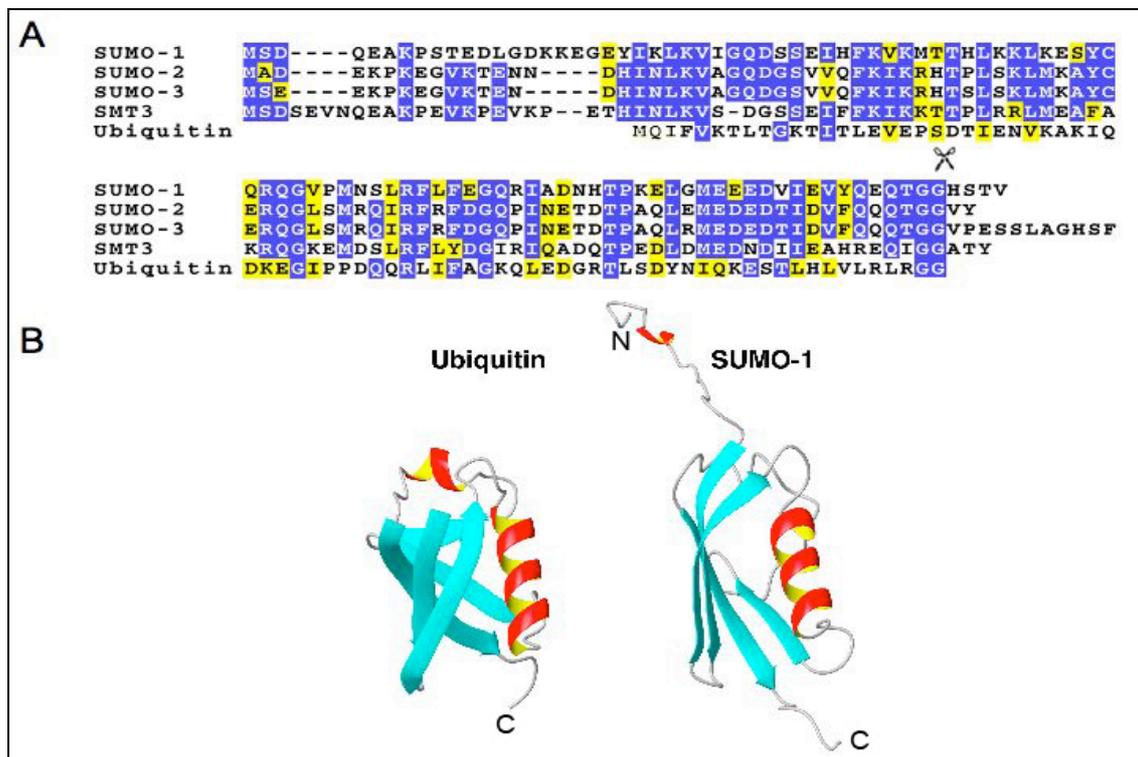


Abb. 1: Sequenz- und Strukturvergleich von Ubiquitin und SUMO

(A) Sequenzvergleich von humanem SUMO1 (P63165), SUMO2 (P61956), SUMO3 (P55854), mit Smt3 (Q12306) aus Hefe und humanem Ubiquitin (P02248). Prozessiertes Ubiquitin besteht aus 76, prozessiertes SUMO1 aus 97 Aminosäuren. **(B)** Die Struktur von Ubiquitin wurde durch Röntgenstrukturanalyse ermittelt (Vijay-Kumar et al. 1987), die zum Vergleich gezeigte Struktur von SUMO1 durch NMR (Bayer et al. 1998). SUMO1 weist eine klassische Ubiquitin-Faltung auf, besitzt jedoch zusätzlich eine N-terminale Extension.

Obwohl SUMO auf der Ebene der Aminosäuresequenz nur eine Identität von etwa 18% zu Ubiquitin aufweist, zeigt seine Struktur gleichwohl die klassische globuläre Ubiquitin-faltung (Abb. 1B), die typisch für alle UBLs ist und als *ubiquitin fold* bezeichnet wird. Allerdings hat SUMO im Vergleich zu Ubiquitin eine flexible N-terminale Extension und die Verteilung der Oberflächenladung ist erheblich andersgeartet, was zur Erkennung durch jeweils unterschiedliche, spezifische Enzyme und Bindungspartner beiträgt.

2.3.1 Die enzymatische Kaskade der Sumoylierung

Die Konjugation von SUMO an Zielproteine verläuft mechanistisch analog zur Ubiquitinierung, wobei spezifische enzymatische Komponenten benutzt werden (Abb. 2). Alle SUMO-Formen entstehen zunächst als inaktive Vorläuferform und werden erst durch endoproteolytische Spaltung in ihre gereiften, konjugierbaren Formen überführt. SUMO-Proteasen (siehe 2.3.2) katalysieren mittels ihrer Hydrolase-Aktivität die Freilegung des Doppelglycinmotivs am C-Terminus von SUMO, das entscheidend für die Aktivierung und die Konjugation an Substrate ist. Dieses nun gereifte, konjugierbare SUMO wird zunächst in einem ATP-verbrauchenden Schritt aktiviert. Das Heterodimer Aos1/Uba2, das E1-aktivierende Enzym in der SUMO-Kaskade, nutzt dabei die Bindungsenergie aus ATP, um SUMO mit seinem C-terminalen Ende über ein ADP-Intermediat kovalent an ein Cystein in seinem aktiven Zentrum zu binden (Johnson et al., 1997). Durch diesen Schritt wird die Bindungsenergie der β - und γ -Phosphatgruppe des ATP in einem reaktiven Thioester zwischen E1 und SUMO gespeichert. Das Aos1/Uba2-Heterodimer stellt dabei eine geteilte Version des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms Uba1 dar, was auch durch die Sequenzhomologie widerspiegelt wird. Während Aos1 homolog zum Aminoterminus von Uba1 ist, zeigt Uba2 Homologie zum Carboxyterminus von Uba1 und enthält auch das katalytische Cystein, durch das ein Thioester mit SUMO ausgebildet wird (Johnson und Blobel, 1997). Im Gegensatz zur Ubiquitinierung, bei der die Übertragung auf ein Mitglied einer Gruppe der Ubc-Proteine erfolgt, ist für die Sumoylierung nur ein einziges konjugierendes Enzym (Ubc9) beschrieben (Desterro et al., 1997; Johnson und Blobel, 1997). Obwohl Ubc9 eine UBC-Domäne (*ubiquitin conjugating domain*) besitzt und dementsprechend homolog zu Ubiquitin-konjugierenden Enzymen ist, zeigt es Spezifität für SUMO. Dabei wird die Spezifität für SUMO möglicherweise durch eine positive Oberflächenladung von Ubc9 bewirkt, die komplementär zur negativen Ladung von SUMO ist (Johnson und Blobel, 1997; Schwarz et al., 1998). Ein genereller Unterschied zwischen den E2-Enzymen des SUMO- und des Ubiquitin-Systems besteht in der Substratbindung. Im Gegensatz zu den Ubiquitin-E2-Enzymen interagiert Ubc9 direkt mit den meisten Substraten. Dies erklärt auch warum Ubc9 zumindest *in vitro* für die Sumoylierung vieler Proteine ausreichend ist, ohne zwingend eine SUMO-Ligase zu benötigen. Dabei bindet Ubc9 häufig direkt an ein Konsensusmotiv mit der Sequenz ψ KxE/D, in der sich auch das modifizierte Lysin befindet (ψ steht hier für eine aliphatische und x für eine beliebige Aminosäure). Diese Konsensussequenz ist oft Teil einer Schleifen-Struktur, die leicht von der katalytisch aktiven Tasche von Ubc9 gebunden werden kann (Bernier-

Einleitung

Villamor et al., 2002). Da eine Konjugation von SUMO auch an Lysinen stattfindet, die nicht in dieser Konsensussequenz liegen, müssen weitere Kriterien für die Substraterkennung existieren.

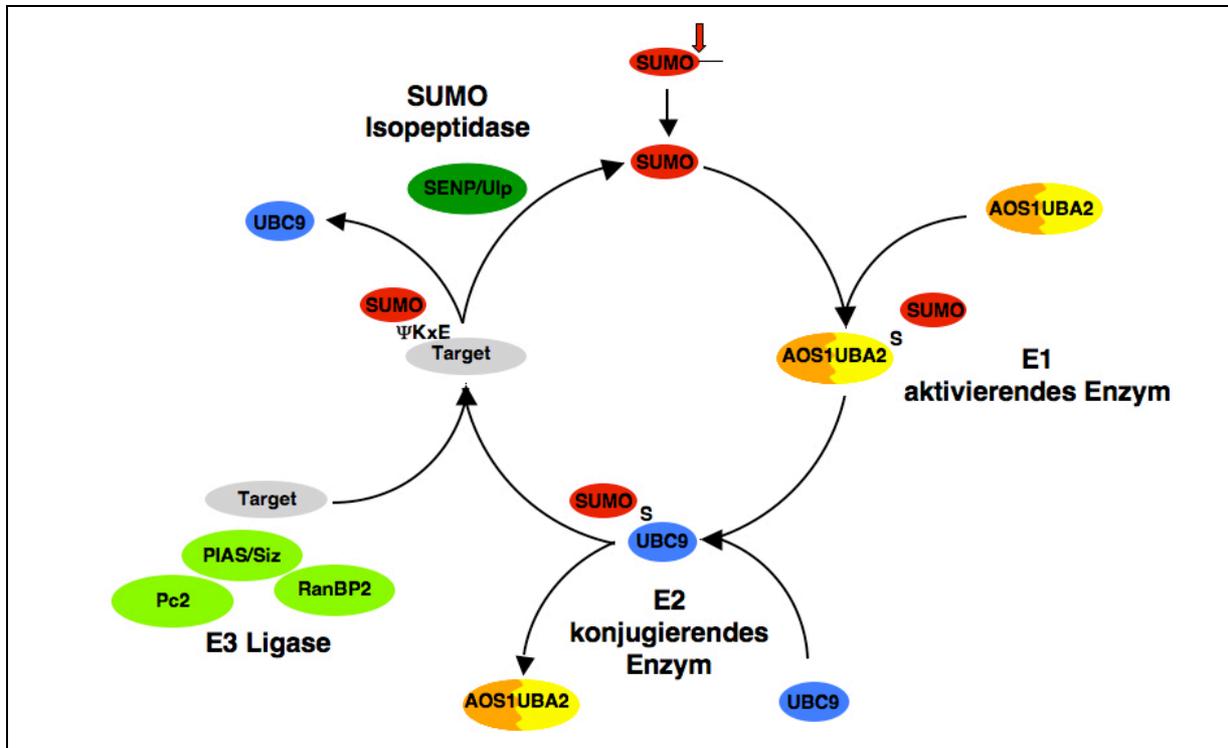


Abb. 2: Der Ablauf der SUMO-Konjugation (nach Muller et al. 2004)

Analog zum Ubiquitin-Konjugationsweg muss SUMO durch spezifische Proteasen erst in eine reife Form überführt werden. Anschließend wird es durch das Heterodimer AOS1/Uba2 aktiviert und durch ein konjugierendes Enzym Ubc9 eventuell zusammen mit einer E3 Ligase auf das Zielprotein übertragen. Durch die Aktivität von spezifischen SUMO-Isopeptidasen ist die Konjugation reversibel.

Wie im Ubiquitinsystem, so existieren auch im SUMO-System E3-Ligasen, die *in vivo* für eine weitere Substratspezifität zuständig sind. Die drei beim Menschen bislang am besten charakterisierten SUMO-E3-Ligasen scheinen dabei keine eigene katalytische Aktivität zu besitzen, wie etwa die Ubiquitin-Ligasen der HECT-Familie. Es wird angenommen, dass sie mehr als eine Art Adapter fungieren und auf diese Weise Ubc9, SUMO und das Substrat in eine für die Konjugation von SUMO optimale Ausrichtung bringen. So fördern sie durch eine Interaktion mit Ubc9 und dem Substrat eine spezifische Konjugation von SUMO. Mit dieser Wirkungsweise ähneln SUMO-E3-Ligasen mehr den Ubiquitin-Ligasen des RING-Finger Typs. Dies gilt insbesondere für die Mitglieder der PIAS-Familie, die eine der RING-Domäne ähnliche SP-Ring-Domäne besitzen (Schmidt und Muller, 2002). Neben den Proteinen der PIAS-Familie wurden in höheren Eukaryoten mit RanBP2 (Pichler et al., 2002) und Pc2 (Abb. 2) (Kagey et al., 2003), einem Mitglied der Polycombproteine zwei weitere Subklassen von SUMO-E3-Ligasen näher

charakterisiert. Diese weisen allerdings keine augenscheinliche Homologie zu den PIAS-Proteinen oder Ubiquitin-E3-Ligasen auf.

2.3.2 SUMO-Proteasen katalysieren die Dekonjugation von SUMO

Da die Sumoylierung ebenso wie die Ubiquitinierung ein reversibler Prozess ist, existieren auch im SUMO-System Enzyme, die für die Dekonjugation verantwortlich sind und auf diese Weise den Status der SUMO-Modifikation einzelner Substrate kontrollieren. Diese dekonjugierenden Enzyme werden auch als SUMO-Proteasen oder Isopeptidasen bezeichnet, da sie eine Isopeptidbindung zwischen dem C-Terminus von SUMO und der ϵ -Aminogruppe eines internen Lysins des Substrat-Proteins hydrolysieren (Abb. 3). In niederen Eukaryoten wie der Bäckerhefe *S. cerevisiae* werden sie als Ulp (*Ubiquitin-like-protein specific proteases*) und in Säugern als SENPs (*Sentrin-specific proteases*) bezeichnet.

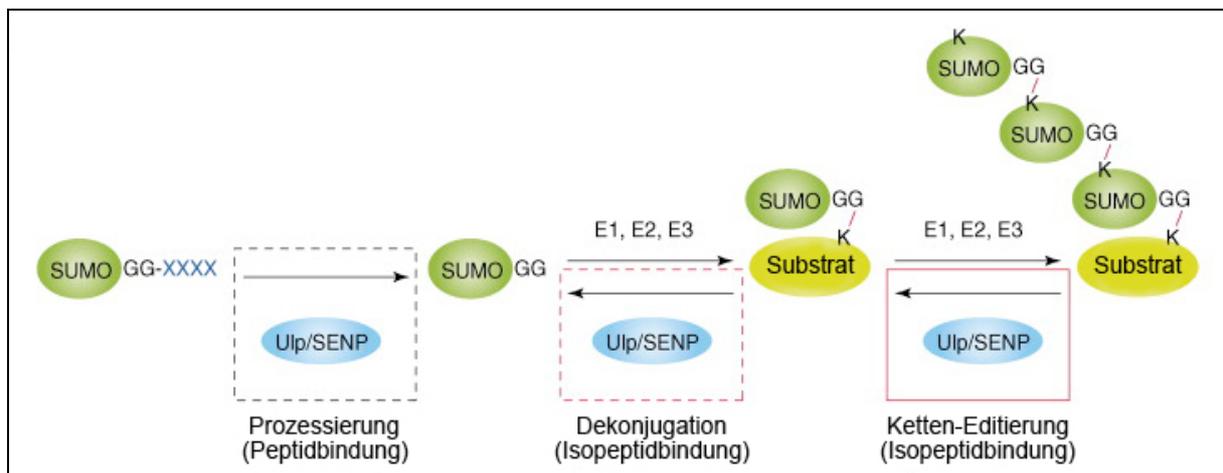


Abb. 3: Die drei Aktivitäten von SUMO-Isopeptidasen

Die Prozessierung beinhaltet das Abspalten C-terminaler Aminosäuren des SUMO Pro-Peptids, um das Doppelglycin-Motiv am C-Terminus freizulegen. Dies erfordert die Hydrolyse einer Peptidbindung. Bei der Dekonjugation wird eine Isopeptidbindung zwischen dem C-terminus von SUMO und der ϵ -Aminogruppe eines Lysins des Substrat-Proteins gespalten. Die Ketten-Editierung ist in chemischer Hinsicht identisch zur Dekonjugations-Reaktion. Allerdings werden hier ein oder mehrere SUMO-Proteine von einer Poly-SUMO-Kette und nicht von einem Substrat-Protein abgeschnitten.

Da sie neben ihrer Isopeptidase-Aktivität zumindest zum Teil auch noch eine Prozessierungs-Aktivität besitzen, d.h. die Reifung von SUMO aus seiner unkonjugierbaren Vorläuferform katalysieren, fanden sie bereits weiter oben im Zusammenhang mit diesem Prozess Erwähnung (siehe 2.3.1). Ferner wird manchen SUMO-Proteasen noch als dritte Funktion eine Depolymerisierung von Poly-SUMO-Ketten zugeschrieben, die auch als SUMO-Ketten-Editierung bezeichnet wird. Diesem Prozess wird neueren Daten zufolge eine immer wichtiger werdende Bedeutung beigemessen (Dawlaty et al., 2008; Zhang et al., 2008). Ulp/SENPs

regulieren durch diese Aktivitäten direkt die Menge an freiem, konjugierbarem SUMO und die Halbwertszeit der konjugierten Form.

SUMO-Isopeptidasen wurden ursprünglich in einem *screen* der Hochstrasser-Gruppe identifiziert. Dabei wurde sich eines SUMO-Modell-Substrates bedient und Extrakte von Bakterien-Transformanten, die Hefe-Proteine exprimierten, auf Desumoylierungs-Aktivität getestet (Li und Hochstrasser, 1999). Mit diesem Ansatz wurde ein vorher noch uncharakterisiertes, 72kDa großes Protein als SUMO-Protease identifiziert, das Ulp1 genannt wurde. Interessanterweise weist Ulp1 zu dekonjugierenden Enzymen des Ubiquitin-Systems weder auf Sequenz- noch Strukturebene Homologien auf, sondern scheint vielmehr viralen Proteasen ähnlich zu sein. Diese sind der sogenannten C48-Cystein Protease-Familie zuzuordnen und durch eine etwa 200 Aminosäuren lange Protease-Domäne (C48-Domäne) charakterisiert, die eine typische katalytische Triade bestehend aus Histidin, Aspartat und Cystein einschließt. Eine solche Domäne findet sich auch am C-Terminus von Ulp1 wieder. Über Datenbank-Analysen wurden schließlich eine weitere SUMO-Protease in *S. cerevisiae* (Ulp2) und acht humane Isopeptidasen (SEN1-8) des C48-Protease-Typs identifiziert. Da jedoch später entdeckt wurde, dass SEN3 und SEN4 demselben Protein entsprechen und SEN8 als Isopeptidase für NEDD8, einem anderen UBL, agiert (Mendoza et al., 2003), entstand eine gewisse Diskontinuität in der Nomenklatur der SENP-Familie, die nunmehr aus fünf Mitgliedern besteht (SEN1, 2, 3, 5, 6), für die bislang eine SUMO-spezifische Aktivität gezeigt werden konnte (Abb. 4). Für SEN7 ist aufgrund der Sequenzhomologie anzunehmen, dass es ebenfalls in die Reihe der SUMO-spezifischen Proteasen gezählt werden muss. In Sequenzdatenbanken finden sich zudem Spleißvarianten dieser bekannten SENPs, so dass eine weitere Diversität dieser Enzymklasse angenommen werden kann.

Die Existenz mehrerer Isopeptidasen in einem Organismus legt die Vermutung nahe, dass diese Proteasen distinkte SUMO-bezogene Aufgaben erfüllen. In der Hefe *S. cerevisiae* zum Beispiel ist die Funktion von Ulp1 und Ulp2 nicht redundant, da eine genetische Inaktivierung von jeweils einem der beiden Proteine zur Akkumulation einer unterschiedlichen Fraktion von SUMO-Substraten führt. Ulp1 lokalisiert als essentielles Gen am Kernporenkomplex (NPC, *nuclear pore complex*) und besitzt neben der charakteristischen Isopeptidase-Aktivität auch Prozessierungs-Aktivität. Es hat wichtige Funktionen in der G2/M-Phase des Zellzyklus und beim nukleären Export, wobei v.a. der Export von 60S präribosomalen Partikeln Ulp1-abhängig zu sein scheint. Ulp2 hingegen ist nicht essentiell und befindet sich im

Einleitung

Zellkern. Es scheint keine Prozessierungs-Aktivität zu haben, sondern besitzt vielmehr die Fähigkeit, Isopeptidbindungen zu hydrolysieren (Li und Hochstrasser, 1999; Li und Hochstrasser, 2000) und Poly-SUMO-Ketten zu editieren (Bylebyl et al., 2003). Ulp2 ist bedeutend für den Verlauf der Meiose, die Wiederaufnahme des Zellzyklus nach Arrest im Replikationskontrollpunkt oder dem *spindle assembly checkpoint* (SAC) und eine exakte Chromosomen-Segregation. Im Speziellen zeigen *ulp2* Mutanten fehlerhafte DNA-Kondensation im Bereich der rDNA-Loci (Strunnikov et al., 2001) und einen frühzeitigen Verlust von centromerischem Cohesin (Bachant et al., 2002) hervorgerufen durch einen veränderten Sumoylierungsstatus von DNA-Topoisomerase II.

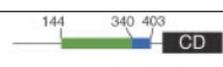
Name	Domänen Architektur	Länge (AS)	subzelluläre Lokalisation	SUMO-Paralog Spezifität	Prozessierung	Dekonjugation	Ketten-Editierung
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>							
Ulp1		621	nukleäre Peripherie	-	+	+	-
Ulp2		1034	Nukleoplasma	-	-	-	+
<i>Homo sapiens</i>							
SEN1 (SuPr-2)		643	NPC, subnukleäre Strukturen	SUMO1 SUMO2/3	+	+	-
SEN2 (AXAM2, SMT3IP2)		89	NPC	SUMO1 SUMO2/3	+	+	-
SEN3 (SSP3, SMT3IP1)		574	Nukleolus	SUMO2/3	unbekannt	+	-
SEN5		55	Nukleolus	SUMO2/3	unbekannt	+	-
SEN6 (SUSP1, SSP1)		1112	Nukleoplasma	SUMO2/3	-	-	+
SEN7		984	Nukleoplasma	unbekannt	unbekannt	unbekannt	unbekannt

Abb. 4: Domänenstruktur, Lokalisierung und Aktivität von Ulp/SENPs

Datenbanknummern einzelner Ulp/SENPs: Ulp1 (Q02724), Ulp2 (P40537), SEN1 (Q9POU3), SEN2 (Q9HC62), SEN3 (Q9H4L4), SEN5 (Q96HIO), SEN6 (Q9GZR1), SEN7 (Q9BQF6), rote Ellipse: SIM nach (Song et al., 2004); grüne Box: Domäne für nukleäre Lokalisierung; blaue Box: nukleäres Exportsignal, CD: konservierte katalytische Domäne; Abkürzungen: AXAM2: Axin-assoziiertes Molekül 2, SMT3IP1 und 2: Smt3-spezifische Isopeptidase 1 und 2, SSP1: SUMO1-spezifische Protease, SuPr-2: SUMO Protease 2, SUSP1: SUMO-spezifische Protease 1.

Während sich die C48-katalytische Domäne, die auch als Ulp-Domäne bezeichnet wird, typischerweise am C-Terminus der Ulp/SENPs befindet, scheint der N-Terminus für die subzelluläre Lokalisierung bzw. die Substratspezifität verantwortlich zu sein (Li und Hochstrasser, 2003; Mukhopadhyay et al., 2006). Von dieser Systematik gibt es zwei größere Abweichungen. So befindet sich die Ulp-Domäne im Falle von Ulp2 in der Mitte des Proteins und ist bei SENP6 und SENP7 durch eine Insertion in zwei Hälften gespalten (Abb. 4).

Bei einem phylogenetischen Vergleich der C48-Peptidasen wird ersichtlich, dass sich SENP8/Deneddylase1 früh in der Evolution von den SUMO-spezifischen Proteasen getrennt hat (Abb. 5). Echte SUMO-Proteasen hingegen zweigen sich weiter in einen Ulp1 und einen Ulp2 enthaltenden Ast auf. Von den sechs humanen SUMO-Isopeptidasen weisen SENP1, SENP2, SENP3 und SENP5 eine größere Sequenzhomologie zu Ulp1 auf, während SENP6 und SENP7 Ulp2 ähnlicher sind. Jedoch nicht nur in der reinen Aminosäuresequenz, sondern auch in Bezug auf Substratspezifität und subzelluläre Lokalisierung zeigen sich Verwandtschaften in den eben genannten Untergruppen. SENP1 besitzt zum Beispiel wie Ulp1 sowohl Prozessierungs- als auch Dekonjugations-Aktivität. Es zeigt eine starke Spezifität für SUMO1 bezüglich dessen Prozessierung (Shen et al., 2006b; Xu und Au, 2005) und lokalisiert im Nukleus bzw. distinkten subnukleären Domänen (Bailey und O'Hare, 2004; Gong et al., 2000). SENP2, das am nächsten verwandte Protein innerhalb der humanen SENP-Familie, zeigt wie SENP1 keine Paralog-Spezifität bei der Dekonjugation, allerdings im Unterschied zu SENP1 eine starke Präferenz für die Prozessierung von SUMO2. Es lokalisiert vor allem an Filamenten des NPC (Hang und Dasso, 2002; Zhang et al., 2002) und in diskreten nukleären Domänen (*nuclear bodies*, NBs) (Girdwood et al., 2003; Ross et al., 2002). Beide Proteine besitzen sowohl eine nukleäre Lokalisationssignal-Sequenz (NLS) als auch eine nukleäre Exportsignal-Sequenz (NES) und können sich somit zwischen Cytoplasma und Nukleus hin- und herbewegen. Im Falle von SENP2 hat der cytoplasmatische Export den Ubiquitin-abhängigen Abbau des Proteins zur Folge (Itahana et al., 2006).

Eine weitere Homologiegruppe innerhalb der Ulp1-Verzweigung bilden SENP3 und SENP5. Beide Proteine lokalisieren abhängig von Sequenzen an ihrem N-Terminus im Nukleolus und zeigen eine starke Präferenz für die Dekonjugation SUMO2/3-modifizierter Substrate und - zumindest im Falle von SENP5 - auch für die Prozessierung von SUMO3 (Di Bacco et al., 2006; Gong und Yeh, 2006; Nishida et al., 2000). Diese Konzentration von SENP3 und SENP5 im Nukleolus verhindert vermutlich die Akkumulation von SUMO2/3-Konjugaten in diesem Kompartiment (Ayaydin und Dasso, 2004).

SENP6 und SENP7 hingegen weisen eine größere Homologie zu Ulp2 auf. Die Wirkungsweise und die Lokalisierung von SENP7 blieben dabei bisher noch unaufgeklärt. SENP6 wurde ursprünglich Prozessierungs-Aktivität und eine cytoplasmatische Lokalisierung zugeordnet (Kim et al., 2000), neuere Daten sprechen allerdings eher für eine nukleäre Lokalisierung und die Depolymerisation

von SUMO2/3-Ketten. Zudem scheint SENP6 eine wichtige Rolle bei der Dynamik von PML-NBs (siehe 2.3.3) zu spielen (Mukhopadhyay et al., 2006).

SUMO-Isopeptidasen weisen also distinkte subzelluläre Lokalisierungen auf, und da eine Expression des katalytisch aktiven C-Terminus bestimmter Ulp/SENPs in einer veränderten Substratspezifität resultiert, scheint die variable N-terminale Domäne für diese distinkte Lokalisierung verantwortlich zu sein (Hang und Dasso, 2002; Mossessova und Lima, 2000; Panse et al., 2003). Die Beschränkung der Aktivität bestimmter SUMO-Isopeptidasen auf diskrete subzelluläre Bereiche ist also ein wichtiges Prinzip, um die Desumoylierung bestimmter Substrate zu steuern.

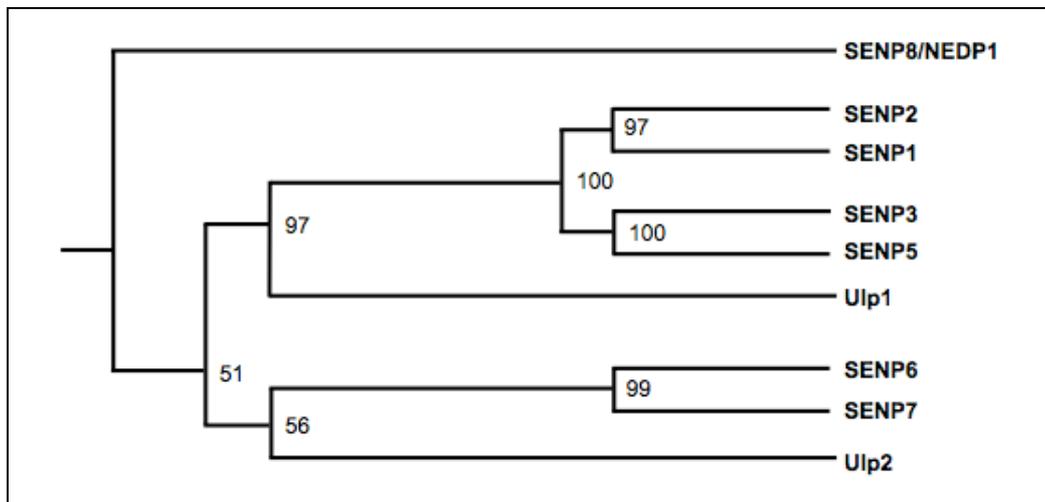


Abb. 5: Phylogenetische Verwandtschaften innerhalb der Ulp/SENPFamilie (nach Hay, 2007)

Ein phylogenetischer Baum zeigt die Beziehungen zwischen SUMO-Proteasen aus *S. cerevisiae* (Ulp1 und 2) und *H. sapiens* (SENP1, 2, 3, 5, 6 und 7). NEDP1 ist strukturell zwar verwandt zu SENPs, aber spezifisch für NEDD8 und wirkt nicht auf SUMO. Die Zahlen bezeichnen Bootstrapp-Werte (in Prozent) und zeigen die Verlässlichkeit der hier gezeigten phylogenetischen Beziehungen an. NEDP1 zweigt ab dem Ursprungspunkt des Baumes von den restlichen Ulp/SENPs ab. Dies deutet auf eine divergierende Entwicklung in einer frühen Phase eukaryotischer Evolution hin.

Ein gewisses Maß an Substrat- und SUMO-Paralogspezifität wird möglicherweise auch durch die C-terminale Ulp-Domäne selbst erreicht. Sequenzunterschiede in dieser konservierten Domäne lassen vermuten, dass SUMO-Isopeptidasen im Laufe der Evolution die Fähigkeit erlangt haben, sich auf Prozessierung bzw. Dekonjugation zu spezialisieren und zwischen verschiedenen Substraten oder in höheren Eukaryoten auch verschiedenen SUMO-Paralogen zu unterscheiden. SENPs besitzen eine gemeinsame Faltungsdomäne, die, bestehend aus einem fünffachen β -Faltblatt und zwei α -Helices, eine flache, enge Spalte bildet und auf diese Weise das Doppelglycin-Motiv von SUMO umschließen kann (Mossessova und Lima, 2000; Reverter und Lima, 2004; Reverter et al., 2005). Da diese Spalte in ihrer Tiefe in etwa der Größenordnung einer Lysin-Seitenkette entspricht, ermöglicht sie einem SUMO-modifizierten Substrat, sich dem katalytisch aktiven Zentrum der Isopeptidase zu

nähern. Strukturanalysen von SENP1 und SENP2, die an das SUMO-modifizierte Modell-Substrat RanGAP1 bzw. SUMO-Vorläuferformen gebunden sind, zeigen, wie das Substrat durch die Isopeptidase in eine geeignete Konformation für die Hydrolyse gebracht wird (Reverter und Lima, 2006; Shen et al., 2006a). Dabei wird sowohl die Isopeptidbindung als auch die Peptidbindung der SUMO-Vorläuferform infolge einer *cis*-Stellung der Amidbindung in einem 90°-Winkel relativ zum C-Terminus von SUMO geknickt und so die Carboxylgruppe optimal für den Angriff des katalytisch aktiven Zentrums der SUMO-Isopeptidase ausgerichtet. In Kombination mit Messungen zur Kinetik der Substratbindung und der Hydrolyse der Amidbindung liefern diese Strukturen eine Erklärung für die SUMO-Paralog-Spezifität und die relativen Aktivitäten der SUMO-Proteasen als Isopeptidasen oder Prozessierungs-Enzyme.

2.3.3 Funktionelle Konsequenzen einer Modifikation mit SUMO

Eine allgemeingültige Aussage über die funktionellen Konsequenzen der Modifikation eines Proteins mit SUMO ist nur schwerlich zu treffen. Da eine Sumoylierung im Einzelfall sehr unterschiedliche Auswirkungen haben kann, ist sie, wie andere posttranslationale Modifikationen auch, stets im Kontext der Funktion des jeweiligen Substrates zu betrachten. Eine generelle Funktion der Sumoylierung liegt jedoch in der Regulation spezifischer Protein-Protein Wechselwirkungen, die dann wiederum verschiedene Auswirkungen auf das jeweilige Protein hat.

Grundsätzlich kann eine Modifikation mit SUMO Protein-Protein Interaktionen sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Die Markierung eines Proteins mit SUMO kann zum einen eine Assoziation mit SUMO-bindenden Interaktionspartnern vermitteln. In verschiedenen SUMO-bindenden Proteinen konnte dementsprechend ein kurzes Sequenzmotiv charakterisiert werden, dass die Interaktion mit SUMO vermittelt. Dieses Sequenzmotiv wird als SUMO Interaktionsmotiv (SIM) bezeichnet (Hannich et al., 2005; Hecker et al., 2006; Minty et al., 2000) und weist in der Konsensussequenz eine Variante der Motive V/I-x-V/I-V/I oder V/I-V/I-x-V/I auf, wobei V für Valin, I für Isoleucin und x für eine beliebige Aminosäure stehen. In manchen Fällen wird anstelle von Valin oder Isoleucin auch Leucin als Bestandteil des SIMs gefunden. Im Folgenden sollen SIM/SUMO-abhängige Protein-Protein Wechselwirkungen anhand ausgewählter Beispiele näher betrachtet werden.

Ein SIM liegt beispielsweise im Kernporenprotein RanBP2 vor (Song et al., 2004), das auch als SUMO-E3-Ligase identifiziert worden ist (Pichler et al., 2002). RanGAP1, das GTP aktivierende Enzym des Kernimport-Faktors Ran, bindet in

seiner sumoylierten Form an RanBP2, und wird dadurch an die cytosolische Seite des NPC (*nuclear pore complex*) rekrutiert (Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1996). Nach Auflösung der Kernmembran in der Mitose scheint die Sumoylierung für die korrekte Rekrutierung des RanGAP1/RanBP2 Komplexes am Kinetochor verantwortlich zu sein (Joseph et al., 2002).

Ein weiteres Beispiel für eine SUMO-abhängige Entstehung eines Proteinkomplexes stellt die Assemblierung der sogenannten PML-*nuclear bodies* (PML-NBs), eines subnukleärer Proteinkomplexes, dar. PML, die konstituierende Komponente dieser Struktur, enthält selbst ein SIM und wird an mehreren Stellen mit SUMO modifiziert. Die SUMO/SIM-abhängige Entstehung von PML-PML-Multimeren stellt dabei den ersten Schritt für die Assemblierung der PML-NBs dar (Shen et al., 2006c). Anschließend erfolgt wiederum in Abhängigkeit von SUMO-SIM-Interaktionen die Rekrutierung weiterer Komponenten, wie etwa des transkriptionellen Repressorprotein Daxx (Ishov et al., 1999; Muller et al., 1998; Zhong et al., 2000). Interessanterweise zeigen neue Daten, dass die Entstehung von SUMO2/3 Ketten an PML auch dessen Ubiquitin-abhängigen Abbau induziert. Poly-SUMO Ketten induzieren hierbei die Rekrutierung der Ubiquitin-Ligase RNF4 über deren SIM. Diese Daten zeigen auch exemplarisch die Vernetzung des SUMO Systems mit dem klassischen Ubiquitin System.

Das Protein PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) liefert ein weiteres Beispiel wie eine Modifikation mit SUMO spezifische Protein-Protein Wechselwirkungen vermittelt. Zudem konnte an PCNA in eleganter Weise das Zusammenspiel des SUMO- und des Ubiquitin-Systems bei DNA Reparaturprozessen entschlüsselt werden. PCNA ist für die Replikation essentiell und umfasst die DNA dabei als Homotrimer wie eine Klammer. So ist es in der Lage, als Bindeplattform für DNA-Polymerasen zu dienen und deren Prozessivität zu erhöhen oder aber auch je nach Bedarf verschiedene Polymerasen an die Replikationsgabel zu rekrutieren. Bei DNA-Schäden kommt die Replikationsgabel zum Stehen und PCNA wird am konservierten Lysin164 ubiquitiniert. Im Falle einer Mono-Ubiquitinierung werden gezielt fehlertolerante Polymerasen rekrutiert und so der *error-prone* Reparaturweg eingeleitet, wohingegen eine Poly-Ubiquitinierung des Lysin63-Typs die fehlerfreie Replikation einleitet. Die Sumoylierung von PCNA erfolgt unabhängig von DNA Schäden während der S-Phase an Lysin127 und Lysin164 und hat die Sequestrierung der Helikase Srs2 über eine SIM-SUMO-Interaktion an die Replikationsgabel zur Folge. Srs2 ist eine Helikase, die die Reparatur von DNA über homologe Rekombination verhindert, und mittels der Rekrutierung durch

sumoyliertes PCNA werden so ungewollte Rekombinationsereignisse während der DNA-Replikation verhindert (Pfander et al., 2005).

Die Sumoylierung von PCNA liefert aber auch ein wichtiges Beispiel für eine SUMO-bedingte negative Regulation von Protein-Protein Wechselwirkungen. So verhindert die Modifikation von PCNA dessen Interaktion mit Eco1 und dies ist von entscheidender Bedeutung für die Kohäsion von Schwesterchromatiden in der S-Phase.

Obwohl die Anheftung von SUMO üblicherweise nicht zu einer Konformationsänderung des Zielproteins führt, ist ein spezielles Szenario beschrieben bei dem Sumoylierung eine Konformationsänderung des Substrates nach sich zieht. Mechanistisch erklärt sich dieses Phänomen durch das gemeinsame Vorkommen von Sumoylierung und SUMO-bindenden Motiven in einem Protein. Dies ist bei dem DNA-Reparatur-Enzym TDG (Thymin-DNA-Glycosylase) der Fall, das im Zuge des BER (*base excission repair*) das Entfernen falsch gepaarter TG- bzw. UG-Basenpaarungen katalysiert. Dabei hat das Enzym eine sehr hohe Affinität für das Hydrolyseprodukt und schirmt damit die ansonsten sehr reaktive basenfreie Stelle an der DNA ab, bis die nachgeschaltete AP Endonuklease 1 weitere Schritte einleitet, um die korrekte Basenpaarung wiederherzustellen. Das Eintreffen der AP Endonuklease 1 führt zu einer Sumoylierung im N-terminalen Bereich der TDG. Dies zieht eine erhebliche Konformationsänderung des N-Terminus nach sich und führt schließlich zur Dissoziation der TDG von der abasischen Stelle. Die anschließende Desumoylierung resultiert in der Wiederherstellung der ursprünglichen Konformation der TDG und macht sie wieder für eine neue Runde mit hoher Bindungsaffinität bereit (Baba et al., 2005; Hardeland et al., 2002; Steinacher und Schar, 2005). So wird in diesem speziellen Beispiel also durch Sumoylierung und Desumoylierung eine zyklische Konformationsänderung des Substrates erreicht, um die Affinität des Proteins zu seinem Bindungspartner je nach Bedarf zu variieren.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass eine Modifikation mit SUMO durch das Schaffen einer neuen Bindedomäne oder im Einzelfall einer Konformationsänderung Auswirkungen auf spezifische Interaktionen des betreffenden Substrates hat. Zu beachten ist aber auch, dass SUMO Modifikation in Einzelfällen auch Proteinwechselwirkungen verhindern kann.

2.4 Nukleolus und Ribosomenbiogenese

Wie bereits erwähnt zeigen sowohl SUMO-Paraloga als auch die übrigen enzymatischen Komponenten der Sumoylierungsmaschinerie eine definierte Lokalisierung in spezifischen subzellulären Bereichen (Ayaydin und Dasso, 2004).

Einleitung

Neuere Daten weisen dabei dem Nukleolus eine wichtige Rolle in dynamischen Sumoylierungs-/Desumoylierungszyklen zu (Di Bacco und Gill, 2006; Nishida et al., 2000; Woods et al., 2004).

Der Nukleolus ist die unter dem Mikroskop am besten sichtbare Struktur innerhalb des Zellkerns und konnte deshalb auch schon in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts anhand lichtmikroskopischer Studien beschrieben werden (Valentin, 1836). Mit dem heutigen Stand der Forschung ist bekannt, dass der Nukleolus der Ort der Prozessierung ribosomaler RNAs und deren Einlagerung in Ribosomen ist. Die Synthese von Ribosomen im Nukleolus ist dabei ein hochkonservierter und enorm energieaufwändiger Prozess. Proliferierende Säugerzellen beispielsweise benötigen etwa 10 Millionen Ribosomen pro Zelle, um den immensen Bedarf für die zelluläre Translationsmaschinerie zu decken. Damit stellt die Verfügbarkeit von Ribosomen einen wichtigen Regulationsmechanismus für die Zellproliferation dar. Die Bedeutung der Ribosomenbiogenese für das Zellwachstum zeigt sich auch darin, dass in schnell wachsenden Tumorzellen die Ribosomenbiogenese stark erhöht ist. Diskutiert wird auch, ob eine Fehlregulation der Ribosomenbiogenese selbst zur Tumorigenese beiträgt.

Ein gereiftes eukaryotisches Ribosom besteht aus zwei Untereinheiten, einer großen 60S- und einer kleineren 40S-Untereinheit und wird gemäß seines Sedimentationskoeffizienten als 80S-Ribosom bezeichnet (Fatica und Tollervey, 2002; Leary und Huang, 2001). Es setzt sich aus mehr als 80 ribosomalen Proteinen zusammen, die wiederum um hochgradig modifizierte und konservierte ribosomale RNAs (rRNAs) angeordnet sind. Diese rRNAs werden als 28S, 18S und 5,8S rRNA bezeichnet und haben einen Anteil von etwa 80% an der gesamten zellulären RNA. Eine Zelle kann solche Mengen an rRNA nur herstellen, indem sie mehrere Transkriptionseinheiten dafür zur Verfügung stellt. Folglich liegen in humanen Zellen rDNA-Gene auch in insgesamt ca. 400 Kopien auf den Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 vor. Diese auch als *rDNA-repeats* bezeichneten DNA-Abschnitte sind zudem für die Assemblierung des Nukleolus essentiell und stellen somit auch einen strukturellen Bestandteil dieser subnukleären Struktur dar (Boisvert et al., 2007).

Bei der Herstellung eines gereiften 80S-Ribosoms sind alle drei RNA-Polymerasen beteiligt. So transkribiert die RNA-Polymerase I von einer rDNA-Transkriptionseinheit einen 47S rRNA-Vorläufer (prä-rRNA), der direkt im Anschluss von ribosomalen und nicht-ribosomalen Proteinen zum 90S präribosomalen Partikel (90S Prozessom) verpackt wird (Abb. 6A). Die mRNAs für ribosomale und nichtribosomale Proteine werden von der RNA-Polymerase II transkribiert. Die RNA Polymerase III sorgt schließlich für die Synthese der 5S rRNA und verschiedener kleiner nukleolärer

Einleitung

RNAs (*small nucleolar RNAs*, snoRNAs), die ihrerseits eine wichtige Rolle während der Prozessierung spielen.

Der erste Schritt nach Synthese der 47S prä-rRNA stellt eine chemische Modifikationen des Transkripts an einer Vielzahl von Basen dar. So werden etwa 100 Uridine des mehr als 13kb großen rRNA-Vorläufers in einem Prozess, den man als Pseudouridinylierung bezeichnet, zu Pseudo-Uridinen isomerisiert und ungefähr genauso viele Nukleotide an der 2'-OH-Position methyliert (Eichler und Craig, 1994). Die snoRNAs, die mit RNA-modifizierenden Enzymen in sogenannte snoRNPs (*small nucleolar ribonucleoprotein particles*) verpackt sind, tragen dabei entscheidend zu diesen Modifikationen bei. Von diesen Modifikationen werden auch die externen und internen transkribierten *spacer* 5'-ETS, 3'-ETS, ITS1 und ITS2 (Abb. 6 B), die mehr als die Hälfte der prä-rRNA ausmachen und während der Prozessierung abgebaut werden, nicht ausgenommen (Lafontaine und Tollervey, 2001). Obwohl die Funktionen dieser Modifikationen noch nicht im Detail verstanden sind, nimmt man aber doch an, dass sie die korrekte Faltung reifer rRNAs unterstützen und auf diese Weise die Funktion der Ribosomen beeinflussen.

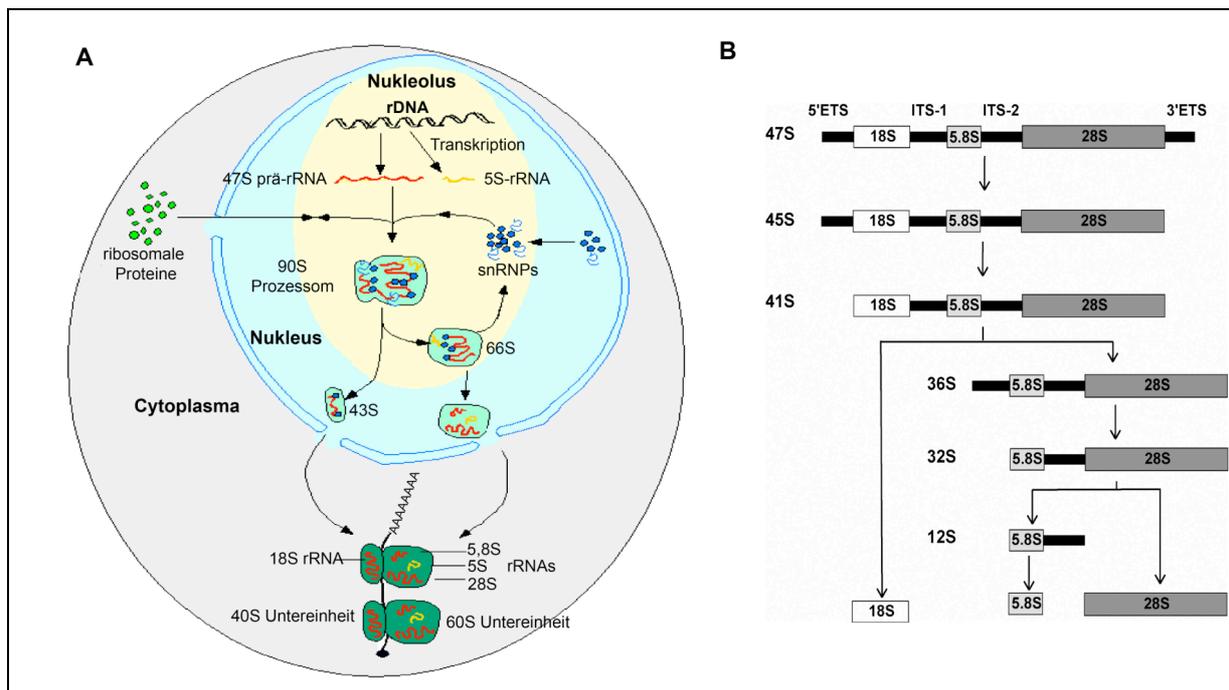


Abb. 6: Überblick über die Schritte der Ribosomenbiogenese und der rRNA-Prozessierung

(A) Der 47S rRNA-Vorläufer (prä-rRNA) wird im Nukleolus von der rDNA transkribiert und anschließend in vielfältigen Modifizierungsschritten in die 18S, 28S und 5,8S rRNA prozessiert. Die modifizierten rRNAs werden mit den ribosomalen Proteinen und der 5S rRNA schrittweise zu Ribosomen zusammengesetzt und in das Zytoplasma transportiert. **(B)** Übersicht über die wichtigsten Schritte der Prozessierung ribosomaler RNA, ETS = externer transkribierter Spacer, ITS = interner transkribierter Spacer

In einem mehrstufigen Prozess, bei dem das 90S Prozessom relativ schnell in die 43S und 66S präribosomalen Partikel zerfällt und schließlich zu den 40S und 60S

Einleitung

ribosomalen Untereinheiten heranreift (Abb. 6A), werden aus dieser so modifizierten prä-rRNA die reifen Formen der 18S, 5,8S und 28S rRNA durch die Aktivität von Exo- und Endonukleasen an hochkonservierten Schnittstellen prozessiert (Abb. 6B). Dieser Reifungsprozess geht dabei mit einem Transport der verschiedenen präribosomalen Partikel durch die einzelnen funktionellen Bereiche des Nukleolus über das Nukleoplasma in das Zytoplasma einher. Dort finden die letzten Schritte zur Reifung der 40S und 60S Untereinheit und die Assemblierung reifer Ribosomen statt (Abb. 6A).

Da eine Vielzahl von nichtribosomalen Proteinen mit mehreren prä-rRNA-Spezies und snoRNAs mit unterschiedlicher Intensität assoziieren, kann wohl nicht von einer einfachen Korrespondenz zwischen individuellen Protein-Faktoren und spezifischen Schritten in der Reifung ribosomaler RNA ausgegangen werden. Aus diesem Grund postulieren Dez und Tollervey, dass die Reifung von Ribosomen nicht entlang eines einfachen linearen Weges verläuft, sondern mehrere Reifungsschritte parallel ablaufen müssen. Sollte dies zutreffen, so wäre eine Art Qualitätskontrolle für wichtige Reifungsschritte erforderlich, die verhindert dass irreversible Vorgänge zu früh ablaufen. Eine derartige Qualitätskontrolle konnte bisher nicht belegt werden, allerdings deutet der Abbau verschiedener prä-rRNA-Spezies in aberranten präribosomalen Partikeln durch einen Multi-Protein-Komplex, der als Exosom bezeichnet wird, auf die Existenz eines Kontrollmechanismus hin (Dez und Tollervey, 2004).

Zusätzlich zur Ribosomenbiogenese deuten neuere Daten auf eine Rolle des Nukleolus in der Kontrolle des Zellzyklus und dynamischen Sumoylierungs-/Desumoylierungs-Zyklen hin. Der Tumorsuppressor p14^{ARF} (p19^{ARF} in Mäusen) beispielsweise, der die Sumoylierung einer ganzen Reihe von nukleolären Proteinen induziert, lokalisiert als maßgeblicher Regulator des Zellzyklus im Nukleolus (Itahana et al., 2003; Melese und Xue, 1995). p14^{ARF} wird durch onkogene Stimuli, wie beispielsweise Mutationen im Ras-Gen oder Überexpression von c-Myc, transkriptionell aktiviert, um aberrante Zellproliferation zu verhindern. Dabei inhibiert p14^{ARF} das Voranschreiten im Zellzyklus über zwei unterschiedliche Wege. Zum einen vermittelt es seine Effekte über einen p53-abhängigen Signalweg. Dabei interferiert p14^{ARF} mit der E3-Ubiquitin-Ligase Aktivität von Mdm2 und sorgt dadurch für eine Stabilisierung des Tumorsuppressors p53, der normalerweise Mdm2-abhängig ubiquitiniert und abgebaut wird. Diese Inhibition von Mdm2 führt zur Induktion eines komplexen transkriptionellen Programmes, das die Aktivierung einer Vielzahl von Genen durch p53 beinhaltet und schließlich zu einem Zellzyklusarrest oder zu Apoptose führt. Experimente mit p53^{-/-} und Mdm2^{-/-}-MEF-Zellen zeigen aber

auch, dass p14^{ARF} zumindest einen Teil seiner antiproliferativen Wirkung auch über p53/Mdm2-unabhängige Mechanismen entfaltet. So interagiert p14^{ARF} mit den Transkriptionsfaktoren E2F1 und Myc, deren Aktivität für das Fortschreiten im Zellzyklus benötigt wird. Diese Interaktionen scheinen in beiden Fällen, wenn auch über verschiedene Mechanismen, zu einer Attenuierung der transaktivierenden Aktivitäten der beiden Transkriptionsfaktoren zu führen (Qi et al., 2004) (Martelli et al., 2001). Eine weitere p53-unabhängige Funktion von p14^{ARF} ist die Inhibition der Reifung der 28S rRNA (Sugimoto et al., 2003). Damit scheint p14^{ARF} seine antiproliferative Wirkung auch über die Inhibition der Ribosomenbiogenese zu entfalten. Dies scheint einem Modell von Itahana et al. zufolge über eine p14^{ARF}-vermittelte Ubiquitinierung und anschließenden Abbau des Proteins Nucleophosmin (NPM1), dem ebenfalls eine Funktion bei der Reifung der 28S rRNA zugeschrieben wird (Apicelli et al., 2008; Itahana et al., 2003; Savkur und Olson, 1998), vermittelt zu werden. NPM1 ist ein multifunktionales Protein, das zusätzlich zur Ribosomenbiogenese noch in eine Vielzahl weiterer zellulärer Prozesse wie etwa Centrosomen Duplikation, die Antwort auf DNA-Schäden, transkriptionelle Regulation, sowie Proteinfaltung involviert ist (Grisendi et al., 2006). Die Bedeutung von NPM1 für kritische Zellfunktionen zeigt sich auch darin, dass es in Tumorzellen häufig fehlreguliert ist. So ist die Expression von NPM1 in vielen Tumorzellen stark erhöht und dies korreliert wiederum mit erhöhter Ribosomensynthese. NPM1 gilt deshalb als Tumormarker und putatives proto-Onkogen. Interessanterweise konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass p14^{ARF} die Sumoylierung mehrerer seiner nukleolären Interaktions-partner, darunter auch NPM1, stimuliert (Tago et al., 2005). Allerdings sind weder der Mechanismus noch die funktionelle Konsequenz dieses Prozesses verstanden. Die Beobachtung, dass mit p14^{ARF} ein nukleoläres Protein die Sumoylierung einer ganzen Reihe von nukleolären Proteinen stimuliert und gleichzeitig auch die beiden SUMO-Isopeptidasen SENP3 und SENP5 im Nukleolus lokalisieren (Di Bacco und Gill, 2006; Nishida et al., 2000), weist auf eine besondere Rolle des SUMO-Systems im Nukleolus hin. Die spezifischen Funktionen des SUMO-Systems und insbesondere der humanen SUMO-Isopeptidasen in diesem subzellulären Kompartiment sind allerdings noch nicht bekannt.

2.5 Der Zellzyklus

Die oben beschriebenen Funktionen von p14^{ARF} stellen ein Beispiel für die Koordination von Ribosomenbiogenese und Zellzykluskontrolle dar. Auch Daten aus der Hefe *S. cerevisiae* deuten darauf hin, dass die Ribosomenbiogenese direkt mit dem Fortschreiten des Zellzyklus und der Mitose gekoppelt ist (Dez und Tollervey,

Einleitung

2004). Da weiterhin Komponenten des SUMO-Systems, wie etwa die SUMO-Isopeptidase Ulp1, das E2-Konjugierende Enzym Ubc9 und SUMO selbst sowohl Funktionen in der Ribosomenbiogenese (Panse et al., 2006) als auch zellzyklusspezifischen bzw. mitotischen Prozessen (Dasso, 2008) zu haben scheinen, könnte auch das SUMO-System eine Rolle in der Koordination von Ribosomenbiogenese und der Kontrolle des Zellzyklus spielen. Aus diesem Grund soll im Folgenden nach einer allgemeinen Einführung in den Zellzyklus und die Mitose auf die bisher bekannten Funktionen des SUMO-Systems in der Mitose eingegangen werden.

Allgemein versteht man unter dem Terminus Zellzyklus den zyklischen Ablauf von Ereignissen von einer Zellteilung zur nächsten. Ein typischer Zellzyklus besteht dabei im Regelfall aus zwei Phasen, die die Verdoppelung der Zellinhalte (Interphase) und deren Verteilung auf zwei sich bildende Tochterzellen (Mitose) sicherstellen (Abb. 7).

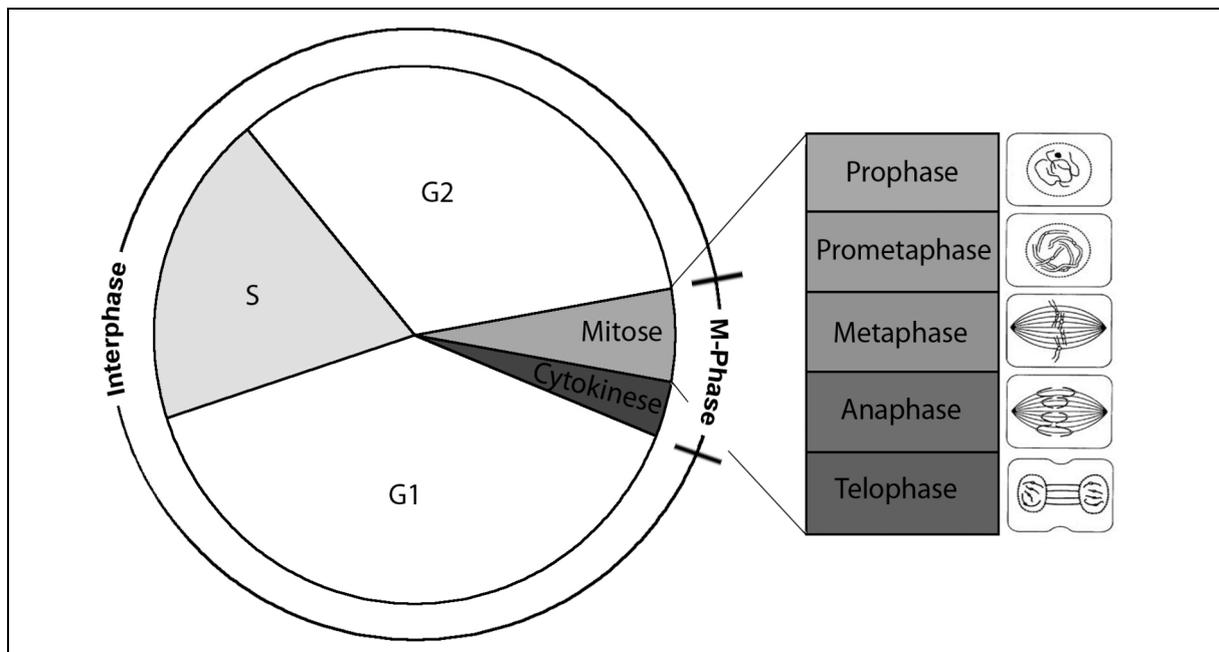


Abb. 7: Schematische Darstellung des eukaryotischen Zellzyklus und der Phasen der Mitose

Während der Interphase erfolgt kontinuierliches Wachstum der Zelle, wohingegen in der M-Phase die Zellteilung abläuft. Die Replikation der DNA ist innerhalb der Interphase auf einen als S-Phase bezeichneten Abschnitt beschränkt. G1 und G2 stellen jeweils Wachstums- und Vorbereitungsphasen auf die jeweils folgende S- bzw. M-Phase dar. Die M-Phase lässt sich weiter in die zwei Phasen Mitose und Cytokinese unterteilen. Während in der Mitose die Trennung der DNA in den einzelnen Stufen Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase erfolgt, stellt die Cytokinese die Teilung des Cytoplasmas durch Einschnürung der Zelle und schließlich die Trennung in zwei Tochterzellen dar.

Von zentraler Bedeutung ist hierbei, dass beide Tochterzellen zu gleichen Teilen die gesamte genetische Information der Mutterzelle erhalten. Dazu muss die DNA zunächst durch einen Replikation genannten Prozess fehlerlos verdoppelt werden (S-Phase). In der anschließenden G2-Phase wird durch den sogenannten G2-

Kontrollpunkt (*DNA-damage checkpoint*) überprüft, ob die DNA-Replikation vollständig abgelaufen ist oder etwaige DNA-Schäden aufgetreten sind, bevor das genetische Material schließlich in der darauffolgenden M-Phase auf beide Tochterzellen aufgeteilt wird. In der eben erwähnten M-Phase erfolgt zunächst die Separation des genetischen Materials in einem komplizierten Prozess, der als Mitose bezeichnet wird. Diese lässt sich in fünf mikroskopisch unterscheidbare Stadien unterteilen, die bereits 1882 von Walther Flemming in ihren Grundzügen beschrieben wurden: Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase (Abb. 7). Die Kondensation der Chromosomen und der Zerfall der Kernmembran in der Prophase gehen dabei mit der Bildung einer mitotischen Spindel ausgehend von den Centrosomen, die auch als Mikrotubuli-Organisationszentren (MTOCs) bezeichnet werden, einher. In der Prometaphase wandern die Chromosomen nach Zerfall der Kernmembran durch Einwirkung der mitotischen Spindel in die Mitte der Zelle, die auch als Äquatorialebene oder Metaphasenplatte bezeichnet wird. Sobald sie dort angekommen sind, befindet sich die Zelle in der Metaphase. In der nun folgenden Anaphase werden die Schwesterchromatiden durch Verkürzung der mitotischen Spindel voneinander getrennt und bewegen sich auf die gegenüberliegenden Zellpole zu. Anschließend depolymerisiert in der Telophase die mitotische Spindel während die Chromosomen dekontensieren und sich die Kernmembran neu bildet. Abgeschlossen wird die M-Phase mit der Zytokinese, in der die gesamte Zelle schließlich physikalisch durch Einschnürung geteilt wird.

Die jeweiligen Tochterzellen treten danach in die G_1 -Phase ein, in der sie sich auf eine erneute S-Phase und somit eine weitere Runde im Zellzyklus vorbereiten. In Vielzellern verlassen die meisten postmitotischen Zellen den Zellzyklus in der G_1 -Phase und treten in die sogenannte G_0 -Phase ein, um ihre spezielle Aufgabe im Körper zu verrichten.

2.6 Die Mitose

Für den korrekten Ablauf der Mitose fungieren vor allem Phosphorylierung und Proteindegredation als bestimmende Mechanismen. Ein Abbau bestimmter Proteine sorgt dabei dafür, dass das Überschreiten bestimmter Schlüsselereignisse irreversibel ist und so der Zellzyklus gerichtet ablaufen kann, während durch Phosphorylierung für Zellzyklus-spezifische Modulation von Proteinaktivitäten und -interaktionen gesorgt wird. Wie diese Prinzipien den korrekten Ablauf der Mitose sicherstellen, soll im Folgenden näher betrachtet werden.

2.6.1 Mitotische Kinasen

Mitotische Kinasen, allen voran Cdk1 in Verbindung mit CyclinA oder B, Polo-Kinasen und Aurora B als Komponente des *chromosomal passenger complex* (CPC) steuern die Vorgänge in der Mitose (Nigg, 2001).

Die Aktivität von Cdk1 ist essentiell für den Eintritt der Zelle in die Mitose und muss abnehmen, um den Beginn der Anaphase sicherzustellen. Cdk1 phosphoryliert Proteine dabei bevorzugt an Serin-Prolin Sequenzen und wird durch Assoziation mit den mitotischen Cyclinen A und B aktiviert. Zusätzlich kann die Aktivität von Cdk1 noch durch Phosphorylierung an Threonin161 positiv sowie durch Phosphorylierung an Threonin14 und Tyrosin15 oder die Bindung eines Cdk-inhibitorischen Proteins (CKI) negativ beeinflusst werden. Ein vollständig aktivierter Komplex aus Cdk1 und CyclinB wird auch als MPF (*mitosis promoting factor*) bezeichnet.

Polo-Kinasen hingegen werden über die gesamte M-Phase hinweg benötigt und beeinflussen alle wesentlichen Vorgänge in der Mitose. Sie sind nicht nur für die Ausbildung einer bipolaren Spindel (Habadanck et al., 2005; Kleylein-Sohn et al., 2007; Lane und Nigg, 1996), den mitotischen Eintritt und die Chromosomen-Segregation, sondern auch für den mitotischen Austritt inklusive Zytokinese wichtig (Barr et al., 2004). In Säugern existieren vier Polo-Kinasen (Plk1-4), wobei mitotische Funktionen vor allem durch Plk1 übernommen werden (Barr et al., 2004). Plk1-3 sind dabei durch eine N-terminale Kinase-Domäne und eine sogenannte Polo-Box-Domäne (PBD), die aus zwei C-terminalen Polo-Boxen besteht, gekennzeichnet (Barr et al., 2004). Diese PBD bindet an Sequenzen des Typs S-pS/pT-P, wobei pS/pT ein Serin/Threonin darstellt, das durch eine sogenannte *priming kinase* phosphoryliert wurde. Da die Erkennungssequenz für die PBD-Bindung exakt der Konsensussequenz für eine Cdk1-vermittelte Phosphorylierung entspricht, fungiert dementsprechend auch zumeist Cdk1 als *priming kinase* für eine PBD-vermittelte Bindung von Plk1 an seine Substrate. Diese Bindung aktiviert in Kombination mit einer Phosphorylierung in der sogenannten T-Schleife die Kinase-Aktivität, und versetzt die Polo-Kinase in die Lage, weitere Phosphorylierungen am gebundenen Substrat oder Proteinen in der Nähe durchzuführen. Plk1 phosphoryliert bevorzugt (E/D/Q)-x-(S/T)- ψ Sequenzen (Barr et al., 2004). Dabei steht x für eine beliebige und ψ für eine hydrophobe Aminosäure. Dieser Mechanismus ermöglicht eine komplexe Regulation der Polo-Kinasen, da ihre Aktivität einerseits zeitlich über die Aktivierung der *priming kinase*, andererseits räumlich über die Lokalisierung an bestimmten subzellulären Strukturen kontrolliert wird. Die Bedeutung dieser Regulation zeigt sich *in vivo* in der dynamischen, und komplexen zellulären Lokalisierung an Centrosomen, Kinetochoren und der mitotischen Spindel (Nigg, 1998).

Die Aktivität der mitotischen Kinase Aurora B ist wichtig für die Anordnung der Chromosomen in der Metaphasenplatte, den *spindle assembly checkpoint* und die Vollendung der Zytokinese (Giet et al., 2005; Meraldi et al., 2004b; Ruchaud et al., 2007). Aurora B ist Teil eines Multiprotein-Komplexes, der als CPC (*chromosomal passenger complex*) bezeichnet wird. Er besteht zusätzlich zu Aurora B aus INCENP, Borealin und Survivin und zeigt eine dynamische Lokalisierung während der Mitose. Der CPC lokalisiert in der Prophase am Chromatin und akkumuliert in der Prometaphase und Metaphase am Centromer. Während der Anaphase findet ein Lokalisierungswechsel an die zentrale Spindel statt bevor eine Akkumulation des CPC an der noch verbleibenden Verbindung der zwei neu entstandenen Zellen, dem sogenannten *midbody*, während Telophase und Cytokinese erfolgt. Demzufolge wurden an jeder dieser Stellen auch Substrate von Aurora B gefunden (Andrews et al., 2004; Neef et al., 2006; Ohi et al., 2004; Zeitlin et al., 2001). Die einzelnen Komponenten des CPC sind sowohl funktionell als auch physikalisch voneinander abhängig, da eine Depletion einer Untereinheit die korrekte Lokalisierung der anderen verhindert und die Funktion des CPC inhibiert (Gassmann et al., 2004; Honda et al., 2003; Jeyaprakash et al., 2007).

2.6.2 Kohäsion von Schwesterchromatiden

Das Ziel der Mitose ist es, die in der S-Phase durch Replikation entstandenen Schwesterchromatiden zu trennen und auf die Tochterzellen zu verteilen. Um diesen Prozess zu erleichtern, bleiben Schwesterchromatiden, von der S-Phase bis zur Metaphase durch Cohesin gepaart (Schwesterchromatiden-Kohäsion) (Nasmyth et al., 2001). Auf diese Weise müssen Schwesterchromatiden in der Mitose nicht neu identifiziert werden und können als Einheit durch Cohesin-Dissoziation von den Chromatiden in der Mitose voneinander getrennt werden. Cohesin ist ein Multiprotein-Komplex bestehend aus Smc1, Smc3, Scc1 und Scc3 (Uhlmann, 2004), der ringförmig beide Schwesterchromatiden einschließt und so zusammenhält (Gruber et al., 2003; Ivanov und Nasmyth, 2005). Für eine Trennung der Schwesterchromatiden ist in der Hefe *S. cerevisiae* die Protease Separase zuständig. Sie vermittelt die Spaltung des Cohesin-Rings an der Scc1-Untereinheit und setzt so in der Anaphase die Schwesterchromatiden frei. Dieses Modell trifft höchstwahrscheinlich im Wesentlichen auch auf Säugerzellen zu (Hauf et al., 2001; Waizenegger et al., 2000), allerdings läuft das Entfernen von Cohesin von den Chromosomen in Säugern im Gegensatz zu *S. cerevisiae* in zwei Phasen ab. Zuerst erfolgt eine Separase-unabhängige Entfernung von Cohesin von den Chromosomen-Armen in der Prophase (*prophase-pathway*) (Waizenegger et al., 2000), die ohne

Cohesin-Spaltung vonstatten geht. Stattdessen ist dafür die Phosphorylierung der Scc3-Untereinheit in Abhängigkeit von Aurora B sowie vermutlich Plk1 notwendig (Gimenez-Abian et al., 2004; Hauf et al., 2005; Sumara et al., 2002). Lediglich an der Centromer-Region der Chromosomen bleibt Cohesin erhalten (Waizenegger et al., 2000), das vermutlich unter Mitwirkung von Shugoshin und der Protein-Phosphatase 2A (PP2A) durch einen noch unbekanntem Mechanismus vor Abbau geschützt bleibt (McGuinness et al., 2005). Zusätzlich wird Separase durch seinen Inhibitor Securin in einem inaktiven Komplex gehalten. In einer zweiten Phase erfolgt schließlich durch proteolytischen Abbau von Securin (siehe 2.6.3) eine Freisetzung von Separase, was zur Entfernung des restlichen Cohesins von den Chromosomen führt. Dies hat die endgültige Aufhebung der Kohäsion zu Beginn der Anaphase zur Folge und die Schwesterchromatiden können durch das Einwirken von Spindelkräften nun getrennt polwärts gezogen werden.

2.6.3 Regulation der Mitose und Trennung von Schwesterchromatiden

Genauso wie der Eintritt in die Mitose abhängig von der Aktivierung des MPF ist, so ist das weitere Voranschreiten der Mitose ab der Metaphase in allen untersuchten Organismen abhängig von dessen Inaktivierung. Der dominante Mechanismus für diese Inaktivierung ist eine regulierte, Ubiquitin-abhängige Degradation von CyclinB über das 26S-Proteasom. Dieser Abbau sowie der Abbau von Securin wird am Ende der Metaphase durch einen E3-Ubiquitinligase-Komplex vermittelt, den sogenannten *anaphase promoting complex/cyclosome* (APC/C) (Clute und Pines, 1999). In Assoziation mit Cdc20, einem seiner Kofaktoren beim Übergang von der Meta- in die Anaphase (Hagting et al., 2002) erkennt dieser Komplex ein als D-Box (*destruction box*) bezeichnetes kurzes Sequenzmotiv im abzubauenden Protein (Glotzer et al., 1991; Peters, 2002) und vermittelt die Übertragung von Ubiquitin. Der APC/C^{Cdc20}-abhängige Abbau und die damit verbundene Initiation der Anaphase sind dabei streng an eine bipolare Anheftung der Chromosomen an die mitotische Spindel gebunden, da erst dann gewährleistet ist, dass Schwesterchromatiden gleichmäßig auf beide Tochterzellen verteilt werden (Musacchio und Salmon, 2007). Die Kontrolle über diese Kopplung obliegt dem sogenannten *spindle assembly checkpoint* (SAC) (Gardner und Burke, 2000; Nasmyth, 2005) (Abb. 8A). Solange noch nicht alle Kinetochore der Chromosomen in korrekter Weise mit Kinetochor-Mikrotubuli verbunden sind, ist der SAC aktiv und verhindert durch ein diffundierbares Wartesignal eine Aktivierung des APC/C^{Cdc20}. Er reagiert dabei auf Kinetochore, die keinen Kontakt zu Mikrotubuli haben und auf nicht vorhandene Spannungskräfte an Centromeren. Diese können nämlich erst nach bipolarer Anheftung der mitotischen

Einleitung

Spindel an die Chromosomen entstehen, da nur dann je ein Kinetochor eines Schwesterchromatidenpaares mit einem Mikrotubulus des jeweils entgegengesetzten Spindelpols verbunden ist. Für die Ablösung falsch angehefteter Mikrotubuli vom Kinetochor ist dabei die Aktivität von Aurora B und eine Lokalisierung des CPC an das Kinetochor von Bedeutung (Ruchaud et al., 2007). Ebenso scheint auch die Aktivität von Plk1 für eine korrekte bipolare Anheftung von Mikrotubuli an das Kinetochor ausschlaggebend zu sein (Petronczki et al., 2008).

Ein aktiver SAC inhibiert die Aktivierung von APC/C^{Cdc20} über Mediator-Proteine am Kinetochor, zu denen u. a. die Mad- und Bub-Proteine, gehören. Dabei scheint Mad2 als der direkteste Inhibitor von Cdc20 zu fungieren. Während der strukturellen Konversion von Mad2 von der offenen (oMad2) in die geschlossene Konformation (cMad2) an unbesetzten Kinetochoren nach dem *template* Modell (De Antoni et al., 2005)(Abb. 8B) erfolgt eine Assoziation mit Cdc20. Dieser cMad2-Cdc20-Komplex bildet nach Assoziation mit BubR1 und Bub3 den sogenannten MCC (*mitotic checkpoint complex*), der als inhibitorischer Komplex die Aktivierung des APC/C durch Cdc20 verhindert (Peters, 2002; Sudakin et al., 2001) (Abb. 8B).

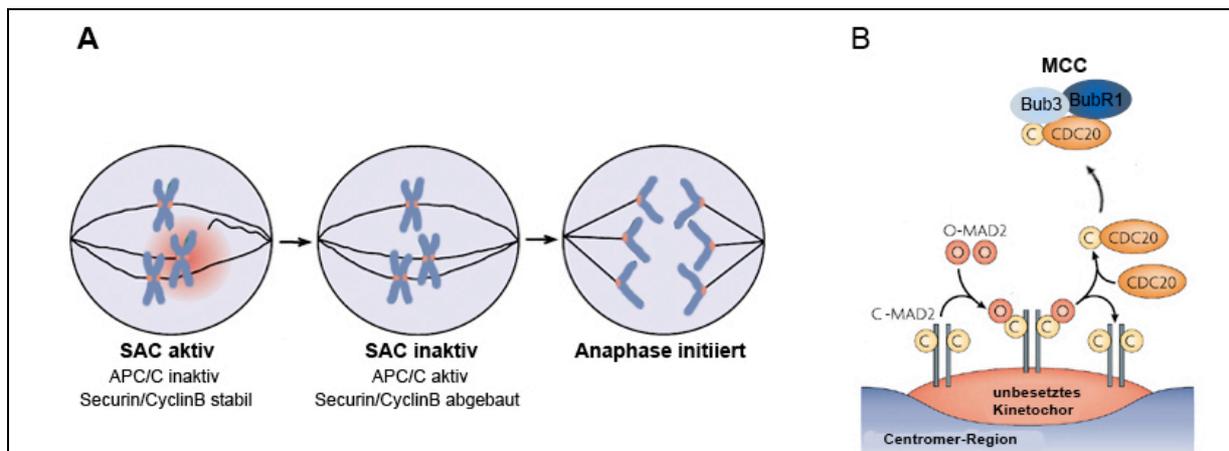


Abb. 8: Der spindle assembly checkpoint (SAC)

(A) Schema der Funktionsweise des SAC: so lange nicht jedes einzelne Kinetochor (orange) ordnungsgemäß an Mikrotubuli der mitotischen Spindel angeheftet ist, wird die Anaphase nicht initiiert. Das Wartesignal für den Beginn der Anaphase geht von unbesetzten Kinetochoren aus und ist durch die rote Fläche gekennzeichnet. Sobald alle Kinetochore an Mikrotubuli der mitotischen Spindel angeheftet sind, wird der SAC inaktiviert. Dies hat zur Folge, dass Securin und CyclinB durch den nun aktiven APC/C abgebaut werden und die Anaphase initiiert werden kann. (B) Das Mad2-*template*-Modell und die Bildung des MCC-Komplexes: unbesetzte Kinetochore binden Mad1-cMad2. Mad1-cMad2 rekrutiert oMad2 zu den Kinetochoren und begünstigt dessen strukturelle Konversion zu cMad2. Nach Bindung von Cdc20 erfolgt die Bildung des inhibitorischen MCC-Komplexes durch Assoziation von cMad2-Cdc20 mit BubR1-Bub3

Eine Abschaltung des SAC und somit Aktivierung von APC/C^{Cdc20} – an der Plk1 durch Phosphorylierung einzelner Untereinheiten ebenfalls beteiligt ist (Barr et al., 2004) - erfolgt erst wenn alle Chromosomen korrekt mit der mitotischen Spindel verbunden sind. Später in der Mitose wird Cdc20 abgebaut und im APC/C durch das

Protein Cdh1 ersetzt. Dieses vermittelt wie Cdc20 die Degradation von D-Box enthaltenden Proteinen, allerdings kann es zusätzlich die Ubiquitinierung von Proteinen mit einer sogenannten KEN-Box induzieren (Peters, 2002). APC/C^{Cdh1} ist bis in die G1-Phase aktiv (Hagting et al., 2002) und trägt zum mitotischen Austritt in *S. cerevisiae* bei, scheint aber dafür nicht essentiell zu sein (Archambault et al., 2003).

2.6.4 Funktion des SUMO-Systems in der Mitose

Eine Beteiligung des SUMO-Systems in der Mitose wurde bereits sehr früh über genetische Studien in der Hefe *S. cerevisiae* erkannt. Noch bevor SUMO selbst überhaupt entdeckt wurde, war bekannt, dass Ubc9 für den G2/M-Übertritt essentiell ist (Seufert et al., 1995). Genetische Studien in Zebrafischen und Mäusen lassen dabei auf eine ähnliche Bedeutung von Ubc9 für die Mitose in höheren Eukaryoten schließen (Nacerddine et al., 2005; Nowak und Hammerschmidt, 2006). Darüberhinaus deuten diverse genetische Studien in niederen sowie höheren Eukaryoten auf eine Rolle weiterer Komponenten des SUMO-Konjugationssystems wie etwa PIASy und SUMO selbst für den Eintritt und das Fortschreiten der Mitose hin (Diaz-Martinez et al., 2006; Muller et al., 2001; Tanaka et al., 1999). Aber auch die Dekonjugation von SUMO scheint für mitotische Prozesse von Bedeutung zu sein. So zeigt sich zum Beispiel bei *ulp1* Mutanten neben erhöhter Chromosomen-Missegregation eine Verzögerung am G2/M-Übergang (Li und Hochstrasser, 1999), was darauf hindeutet, dass ein Gleichgewicht von SUMO-Konjugation und Dekonjugation kritisch für den korrekten Ablauf der Mitose ist. Eine Inaktivierung von Ulp2 hingegen, führt zu einem vorzeitigem Verlust centromerischen Cohesins und Defekten in der rDNA Kondensation (Bachant et al., 2002; Strunnikov et al., 2001). Dementsprechend wurden auch mehrere Untereinheiten sowohl des Cohesin- als auch des Condensin-Komplexes, der eine wichtige Rolle in der Assemblierung von Chromosomen und deren Segregation spielt, als Substrate für eine Modifikation mit SUMO identifiziert (Denison et al., 2005; Wohlschlegel et al., 2004).

Ferner deutet eine Summe weiterer Daten auf eine wichtige Rolle von SUMO für die Funktion des Kinetochors und Centromers hin. So wurde SUMO (Smt3) in der Bäckerhefe ursprünglich in einem genetischen *screen* als ein *high copy suppressor* von Mutationen im *MIF2*-Gen isoliert, das als Komponente eines centromerischen Multiprotein-Komplexes wichtig für eine geordnete Chromosomen-Segregation und die Integrität der mitotischen Spindel ist (Dieckhoff et al., 2004; Meluh und Koshland, 1995). Weiterhin ist bekannt, dass die Organisation centromerischen Chromatins in Hefe durch die Sumoylierung von Topoisomerase II beeinflusst wird und in Säuger

Zellen eine RanBP2 vermittelte Sumoylierung von Topoisomerase II essentiell für dessen Lokalisierung an das Centromer ist (Dawlaty et al., 2008). Massenspektrometrische Untersuchungen deuten auf eine Reihe weiterer SUMO-Substrate am Centromer aber auch am Kinetochor hin und unterstreichen dadurch die Bedeutung des SUMO-Systems an diesen Strukturen (Denison et al., 2005; Montpetit et al., 2006; Wohlschlegel et al., 2004).

Interessanterweise zeigt sich auch eine charakteristische und distinkte Lokalisierung humaner SUMO-Paraloge in mitotischen Zellen. (Ayaydin und Dasso, 2004). Während SUMO1 an der mitotischen Spindel akkumuliert, lokalisiert SUMO2/3 in frühen mitotischen Stadien am Centromer/Kinetochor (Azuma et al., 2005). Passend dazu wird postuliert, dass eine Poly-Sumoylierung mit SUMO2/3 des SAC-Proteins BubRI und eventuell noch anderer SAC-Proteine für die Rekrutierung des Mikrotubulus-Motorproteins CENP-E zum Kinetochor und somit die Funktionsfähigkeit des SAC verantwortlich ist (Zhang et al., 2008). Zudem befindet sich die SUMO-E3-Ligase RanBP2 im Komplex mit sumoyliertem RanGAP1 nach Eintritt in die Mitose ebenfalls am Kinetochor und der mitotischen Spindel und trägt dadurch zur Stabilität der Interaktion zwischen Kinetochor und Mikrutubuli bei (Arnaoutov und Dasso, 2005; Joseph et al., 2004).

Das SUMO-System scheint also in eine ganze Reihe von mitotischen Prozessen eingebunden zu sein. Obwohl bereits verschiedene Proteinen als Substrate für eine Mitose-spezifische Modifikation mit SUMO beschrieben wurden, ist nur für die wenigsten bekannt, welche Auswirkungen diese Modifikation auf ihre Funktionen hat. Ein besseres Verständnis der Rolle des SUMO-Systems in der Mitose würde dabei helfen, die Abläufe einzelner mitotischer Prozesse besser zu verstehen und die Funktion der Sumoylierung als Regulationsprozess in das Netzwerk aus Proteinphosphorylierung und Ubiquitin-abhängiger Degradation in der Mitose einzuordnen.

2.7 Zielsetzung der Arbeit

Das SUMO-System reguliert eine Vielzahl wichtiger zellulärer Prozesse. Da neuere Daten dabei speziell dem Nukleolus eine zentrale Funktion in dynamischen Sumoylierungs-/Desumoylierungszyklen zuweisen konnten und das SUMO-System Einfluss auf wichtige nukleoläre Funktionen wie etwa die Ribosomenbiogenese zu nehmen scheint, sollte die zu Beginn der Arbeit noch weithin uncharakterisierte Funktion der nukleolären humanen SUMO-Isopeptidase SENP3 untersucht werden. Hierzu sollten zunächst über die Identifikation von Interaktionspartnern von SENP3 erste Hinweise gewonnen werden, wie das humane SUMO-System die generellen Funktionen des Nukleolus beeinflusst.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, sind wichtige nukleoläre Funktionen an die Kontrolle des Zellzyklus gebunden und zumindest in niederen Eukaryoten wie der Hefe *S. cerevisiae* scheinen auch Komponenten des SUMO-Systems wie etwa Ubc9, Ulp1 oder SUMO selbst neben ihrer Funktion in der Ribosomenbiogenese wichtige Aufgaben in der Mitose zu haben. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit zusätzlich auch eine mögliche Funktion von SENP3 und anderer SUMO-Isopeptidasen in der Regulation des Zellzyklus und spezifisch der Mitose untersucht werden.

3 Ergebnisse

3.1 Die Rolle von SENP3 in der Interphase

3.1.1 NPM1 ist ein Haupt-Bindungspartner von SENP3

Eine Reihe von Daten deuten auf eine wichtige Aufgabe des SUMO-Systems im Nukleolus hin, wobei die Rolle von SUMO bei der Kontrolle nukleolärer Prozesse jedoch bisher im Detail unverstanden blieb. Um einen Einblick in die spezifische Funktion des SUMO-Systems im Nukleolus zu gewinnen, sollte die nukleoläre SUMO-Isopeptidase SENP3 charakterisiert werden.

Hierfür sollten zunächst Interaktionspartner von SENP3 identifiziert werden. Dafür wurde eine enzymatisch inaktive Variante von SENP3, bei der das katalytisch aktive Cystein an Position 532 gegen ein Serin ausgetauscht wurde (SENP3^{C532S}), mit einem N-terminalen Flag-*tag* versehen und in HEK293T Zellen exprimiert. Flag-SENP3 und mit SENP3 assoziierte Proteine wurden mittels Agarose *beads*, an die kovalent ein anti-Flag M2 Antikörper gekoppelt war (anti-Flag M2 Agarose), aufgereinigt, über SDS-PAGE aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert (Abb. 9A). Neben SENP3, das erwartungsgemäß in der stärksten Bande bei etwa 70kDa detektiert wurde, konnten dabei mehrere ribosomale Proteine, die vorwiegend Bestandteile der 40S Untereinheit darstellen, identifiziert werden. In einer intensiv angefärbten Bande bei etwa 37kDa konnte zudem NPM1 als potentieller Interaktionspartner von SENP3 identifiziert werden (Abb. 9A, Anhang Abb. 1).

Da NPM1 bereits als sumoyliertes Protein beschrieben war (Tago et al., 2005), sollte die potentielle Interaktion mit SENP3 zunächst verifiziert und anschließend weiter untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden anti-Flag Immunpräzipitate von Zellen, die SENP3 mit einem N-terminalen Flag-Epitop exprimierten, über SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot mit einem NPM1-Antikörper getestet. In Übereinstimmung mit den Daten der massenspektrometrischen Analyse wurde ein anti-NPM1-reaktives Protein von 37kDa in den Flag-SENP3-, nicht aber den Kontroll-Immunpräzipitaten detektiert (Abb. 9B).

Um die Interaktion zwischen SENP3 und NPM1 schließlich auch unter physiologischen Bedingungen bei endogenem Expressionsniveau zu untersuchen, wurde SENP3 aus HeLa S3 Zellen mit einem in dieser Arbeit gewonnenen polyklonalen SENP3-Antikörper immunpräzipitiert und diese Präzipitate anschließend mit einem NPM1-Antikörper in einem Western Blot untersucht. Auch auf endogener

Ergebnisse

Ebene zeigte sich dabei eine Anreicherung von NPM1 in Präzipitaten mit dem SENP3-Antikörper gegenüber einer Kontrolle mit IgG-beads (Abb. 9C).

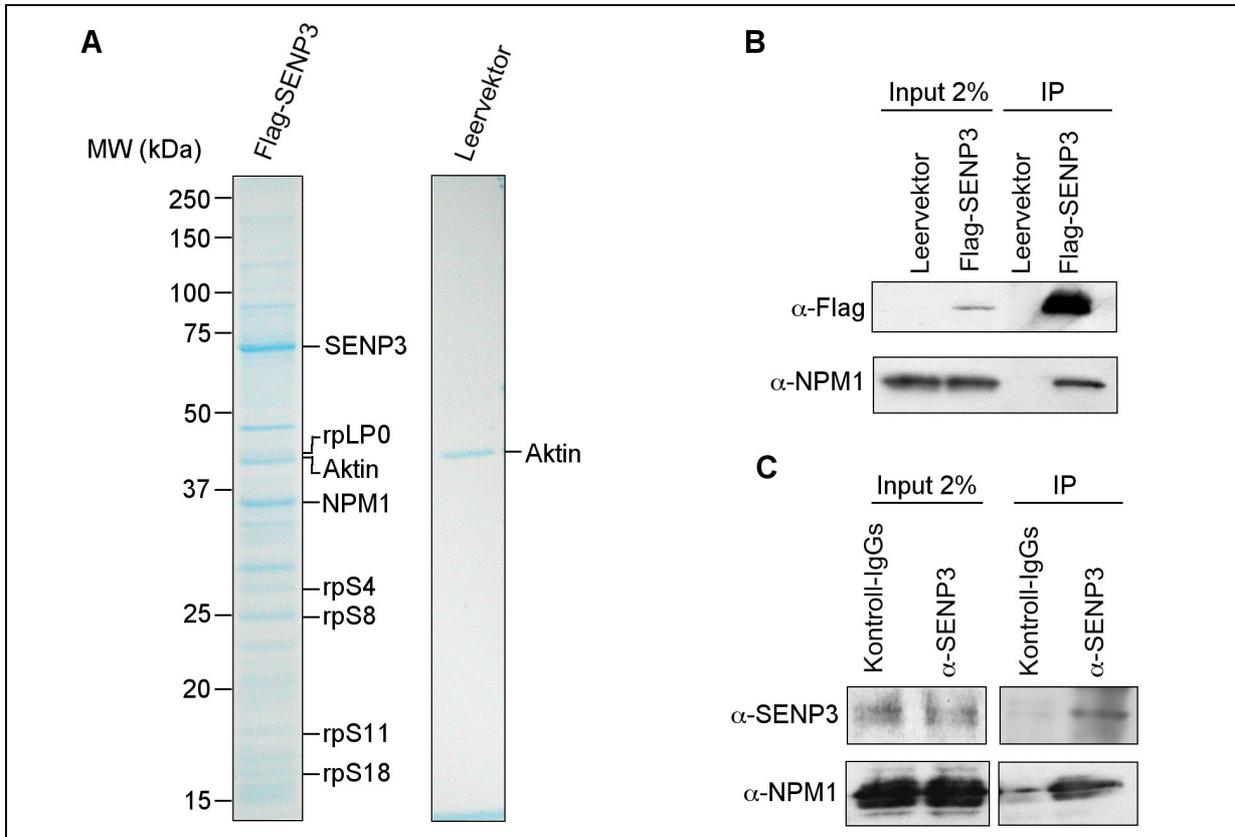


Abb. 9: Nucleophosmin ist ein Hauptinteraktionspartner von SENP3

(A) Flag-SENP3^{C532S} wurde in humanen HEK293T Zellen exprimiert und über eine anti-Flag M2 Agarose-Säule affinitätsgereinigt. Flag-SENP3 und assoziierte Proteine wurden mit Flag-Peptid eluiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. (B) Flag-SENP3 wurde in HEK293T Zellen exprimiert und mit anti-Flag M2 Agarose immunpräzipitiert. Gebundene Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit den angegebenen Antikörpern in einem Western Blot getestet. (C) Endogenes SENP3 wurde aus HeLa S3 Zellen immunpräzipitiert. Gebundenes Material wurde über SDS-PAGE getrennt und mit den angegebenen Antikörpern in einem Western Blot getestet.

Zur weiteren Bestätigung dieser Ergebnisse sollte die Interaktion zwischen SENP3 und NPM1 in einem anderen experimentellen System getestet werden und darüber hinaus überprüft werden, ob NPM1 auch mit anderen Mitgliedern der SENP-Familie von SUMO-Isopeptidasen interagiert. Dies wurde in einem *yeast two hybrid* Ansatz untersucht, bei dem NPM1 mit der DNA-Bindedomäne und das jeweilige SENP mit der Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsaktivators fusioniert wurden. Hierbei stellte sich heraus, dass SENP3 mit NPM1 physikalisch interagiert und andere SUMO Isopeptidasen wie SENP1, SENP2 und das mit SENP3 verwandte, ebenfalls nukleoläre SENP5 zumindest in diesem experimentellen System dazu nicht in der Lage sind (Abb. 10A). Weitere Experimente mit NPM1-Fragmenten, die die funktionellen Domänen von NPM1 in verschiedenen Kombinationen überspannen,

Ergebnisse

zeigten, dass die Homodimerisierungsdomäne und die angrenzende Domäne mit der NLS (Aminosäuren 1-186) ausreichend für eine Bindung an SENP3 sind (Abb. 10B).

In Übereinstimmung mit diesen Daten zur physikalischen Interaktion zwischen SENP3 und NPM1 zeigte sich in einer Immunfluoreszenz auch eine Kolokalisierung beider Proteine im Nukleolus (Abb. 10C).

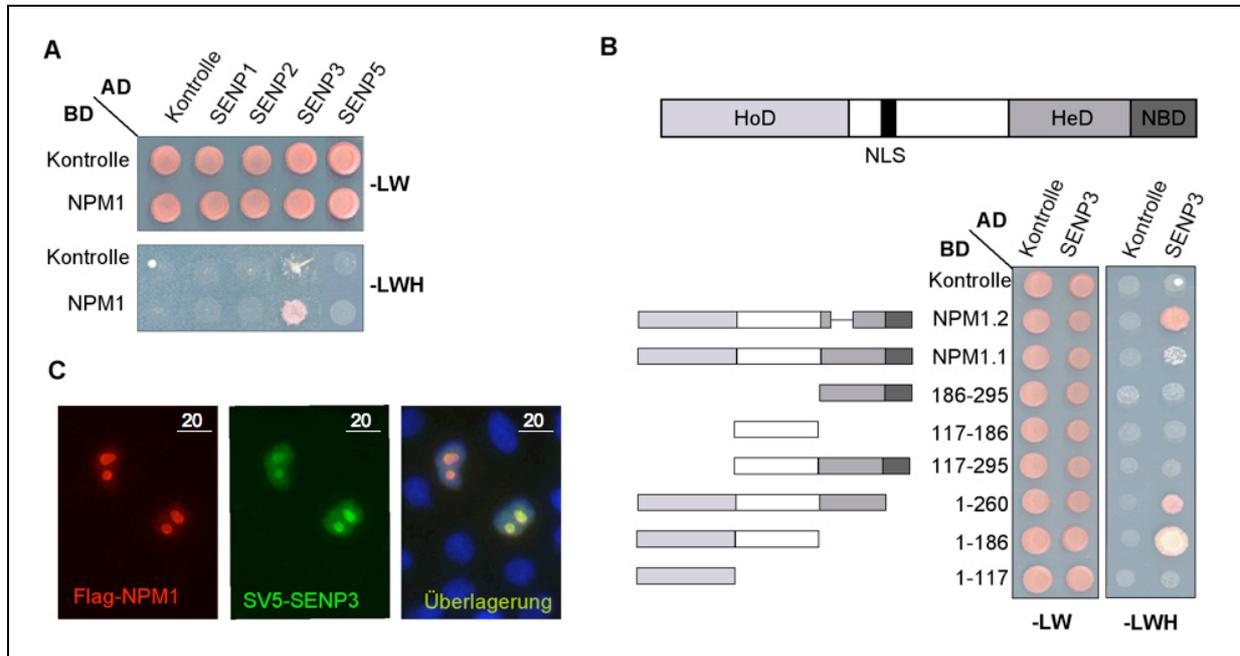


Abb. 10: Interaktion von NPM1 und SENP3 und deren Kolokalisation im Nukleolus

(A) NPM1 wurde in einem *yeast two hybrid* Ansatz auf eine physikalische Interaktion mit den angegebenen SUMO-Proteasen untersucht. (B) NPM1-Fragmente, die die angegebenen Domänen überspannen, wurden in einem *yeast two hybrid* Versuch auf Interaktion mit SENP3 getestet. NPM1.2 ist eine Spleiß-Variante von NPM1, der ein C-terminales Exon fehlt. HoD=Homodimerisierungs-Domäne, NLS=nukleäres Lokalisierungssignal, HeD=Heterodimerisierungs-Domäne, NBD=Nucleotid-bindende Domäne. (C) HeLa S3 Zellen wurden mit SV5-SENP3 und Flag-NPM1 transfiziert. Die Lokalisierung beider Proteine wurde anhand einer indirekten Immunfluoreszenz mit anti-SV5 und anti-Flag Antikörpern bestimmt. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt, Maßstab: 20µm.

3.1.2 SENP3 katalysiert die Desumoylierung von NPM1

Wie bereits erwähnt, wurde eine Sumoylierung von NPM1 bereits in früheren Arbeiten beschrieben, allerdings konnte die funktionelle Konsequenz der Modifikation nicht aufgeklärt werden (Tago et al., 2005). Basierend auf obigen Interaktionsexperimenten sollte eine mögliche Rolle von SENP3 bei der Desumoylierung von NPM1 untersucht werden. Um zunächst die Modifikation von NPM1 mit SUMO zu bestätigen, wurden mit einem His₆-Epitop versehenes SUMO1 bzw. SUMO2 in HEK293T Zellen exprimiert und His₆-SUMO-Konjugate unter denaturierenden Bedingungen über Ni-NTA-beads aufgereinigt. In Übereinstimmung mit den Literaturdaten konnten dabei sowohl His₆-SUMO1 als auch His₆-SUMO2 modifizierte Formen von endogenem NPM1 angereichert werden (Abb. 11). Als Spezifitätskontrolle diente hierbei jeweils die Transfektion von Hämagglutinin (HA)-

Ergebnisse

Epitop getaggtten SUMO Formen, bei denen keine Anreicherung von SUMO Konjugaten an Ni-NTA-beads erfolgt.

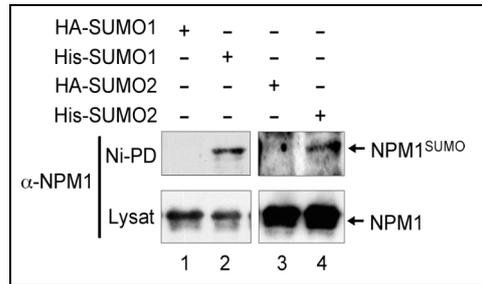


Abb. 11: Endogenes NPM1 wird mit SUMO modifiziert

HEK293T-Zellen wurden mit HA- bzw. His₆-Epitop-markiertem SUMO1 bzw. SUMO2 transfiziert und unter denaturierenden Bedingungen lysiert. His₆-SUMO Konjugate wurden über magnetische Ni-NTA *beads* aufgereinigt und in einem Western Blot mit anti-NPM1 Antikörper untersucht.

Interessanterweise zeigen diese früheren Arbeiten der Sherr-Arbeitsgruppe auch, dass p14^{ARF} die Sumoylierung von NPM1 stimulieren und vor allem dessen Mehrfachsumoylierung induzieren kann. Entsprechend resultiert die zusätzliche Expression von Flag-p14^{ARF} zu HA-NPM1 und SUMO1 bzw. SUMO2 in der Entstehung zweier höhermolekularer anti-HA reaktiver NPM1-Formen bei etwa 50kDa bzw. 65kDa, die zusätzlich zur Hauptbande von HA-NPM1 bei etwa 37kDa auftreten (Abb. 12A, Spuren 3 und 7). Um nun zu testen, ob SENP3 als desumoylierendes Enzym für SUMO-modifiziertes NPM1 agiert, wurde unter diesen experimentellen Bedingungen mit dem SV5-Epitop markiertes SENP3 exprimiert. Die Expression von SV5-SENP3 zeigte dabei nur einen sehr schwachen Effekt auf SUMO1-modifiziertes NPM1, wohingegen NPM1-SUMO2-Formen vollständig verloren gingen. Diese Spezifität von SENP3 für SUMO2 ist dabei im Einklang mit publizierten Daten, die SENP3 eine Präferenz für SUMO2/3-modifizierte Substrate zuschreiben (Gong und Yeh, 2006; Nishida et al., 2000).

Da p14^{ARF} auch die Ubiquitinierung von NPM1 induziert (Itahana et al., 2003), musste formal noch gezeigt werden, dass es sich bei den höhermolekularen NPM1-Formen, die nach Expression von SV5-SENP3 verloren gehen, tatsächlich um SUMO-Konjugate und nicht um Ubiquitin-modifizierte Spezies von NPM1 handelt. Zu diesem Zweck wurde HA-NPM1 mit His₆-Ubiquitin bzw. His₆-SUMO2 exprimiert, um Ubiquitin- bzw. SUMO2-Konjugate über Ni-NTA *beads* anreichern zu können. Bei Expression von Flag-p14^{ARF} zeigte sich dabei eine Anreicherung der 50kDa- und der 65kDa-Konjugate in His₆-SUMO2 exprimierenden Zellen. Zusätzlich traten noch weitere höhermolekulare Banden auf, die vermutlich Poly-SUMO-Ketten an NPM1 entsprechen. Bei His₆-Ubiquitin exprimierenden Zellen hingegen zeigte sich zwar ebenfalls eine Anreicherung höhermolekularer Spezies nach p14^{ARF}-Expression,

Ergebnisse

allerdings waren diese in distinkten Banden bei etwa 45kDa, und 55kDa, sowie einem hochmolekularem Schmier, der typisch für ubiquitinierte Spezies ist, sichtbar. Diese angereicherten Ubiquitin-modifizierten Formen blieben nach Expression von SV5-SEN3 vollständig erhalten (Abb. 12B, Spur 6), wohingegen sämtliche SUMO-modifizierten NPM1-Spezies bei gleichem Expressionsniveau von SV5-SEN3 demodifiziert wurden (Abb. 12B, Spur 3). Dieses Ergebnis spricht eindeutig für die Funktion von SENP3 als demodifizierendes Enzym für SUMO-modifiziertes und nicht ubiquitiniertes NPM1.

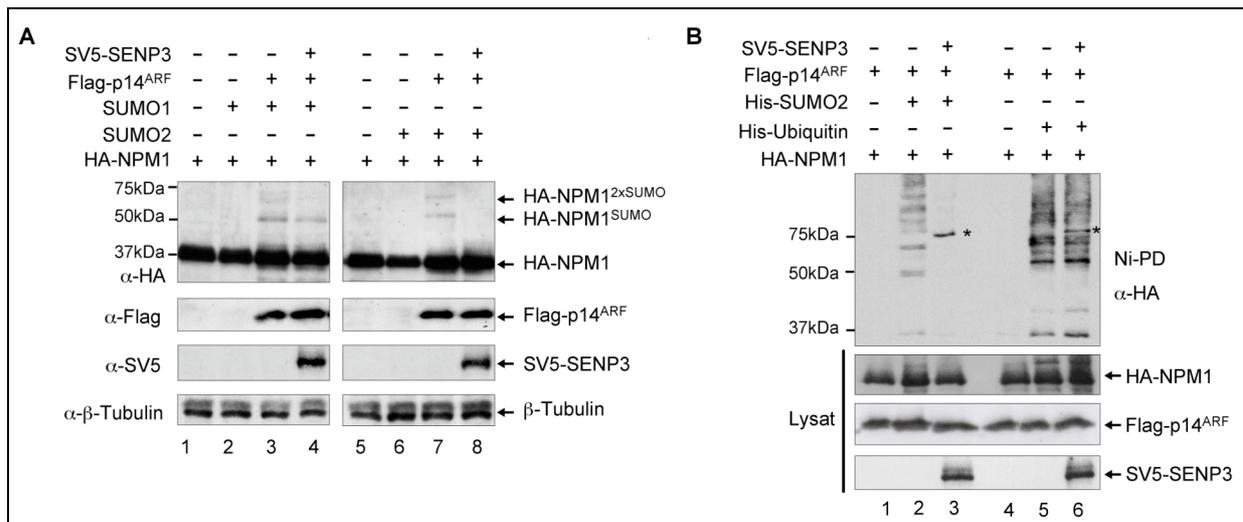


Abb. 12: SENP3 demodifiziert SUMO2-NPM1 Konjugate

(A) HA-NPM1 wurde in den angegebenen Kombinationen mit Flag-p14^{ARF}, SUMO1, SUMO2, und SV5-SEN3 in HEK293T-Zellen exprimiert. Die Expression der jeweiligen Proteine wurde in Western Blots mit den entsprechenden Antikörpern überprüft. Der Immunoblot mit Tubulin diente als Ladekontrolle. (B) HA-NPM1 und His₆-SUMO2 bzw. His₆-Ubiquitin wurden in den angegebenen Kombinationen mit Flag-p14^{ARF} und SV5-SEN3 in HEK293T-Zellen exprimiert. His₆-SUMO Konjugate wurden über magnetische Ni-NTA *beads* aufgereinigt und in einem Western Blot mit anti-HA Antikörper untersucht. Die Expression der jeweiligen Proteine wurde in Western Blots mit den entsprechenden Antikörpern überprüft. Sterne deuten eine Kreuzreaktion des HA-Antikörpers mit überexprimiertem SV5-SEN3 an.

Der Mechanismus p14^{ARF}-induzierter Sumoylierung ist bislang unklar. p14^{ARF} zeigt zwar *in vivo* eine stimulierende Wirkung auf die Sumoylierung vieler Substrate, allerdings konnte dem Protein *in vitro* keine direkte SUMO-Ligase-Aktivität zugewiesen werden (den Besten et al., 2006; Tago et al., 2005). In Anbetracht obiger Ergebnisse wäre deshalb ein denkbarer Mechanismus, dass p14^{ARF} die Interaktion zwischen NPM1 und SENP3 unterbindet und so für eine persistierende Sumoylierung von NPM1 sorgt. Um dies zu überprüfen, wurde SENP3 mit einem Flag-Epitop versehen und in An- oder Abwesenheit von HA-p14^{ARF} exprimiert (Abb. 13A). Anschließende Immunpräzipitation von Flag-SEN3 mit anti-Flag M2 Agarose und Detektion der über SDS-PAGE aufgetrennten Proben in einem Western Blot zeigten, dass eine zusätzliche Expression von p14^{ARF} die Menge des mit Flag-SEN3 interagierenden

Ergebnisse

NPM1 nicht wesentlich beeinflusst. p14^{ARF} scheint seine stimulierende Wirkung auf die Sumoylierung also nicht über eine Inhibition der Interaktion zwischen SENP3 und NPM1 auszuüben.

Interessanterweise zeigte sich aber in Immunfluoreszenz-Versuchen, dass nach Expression von p14^{ARF} SUMO2, das ansonsten weitgehend aus dem Nukleolus ausgeschlossen bleibt, in einer punktförmigen Art in den Nukleolus rekrutiert wird (Abb. 13B). Diese SUMO2-enhaltenden Foci könnten Bereiche im Nukleolus darstellen, in denen - abhängig von p14^{ARF} - spezifisch die Sumoylierung bestimmter Proteine ermöglicht wird.

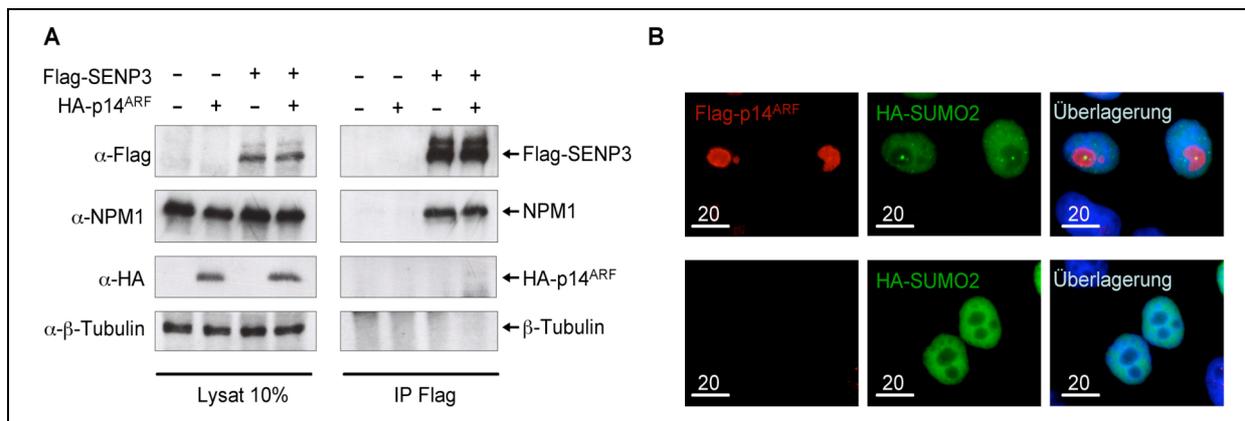


Abb. 13: Expression von p14^{ARF} hat keinen Einfluss auf die Interaktion von SENP3 mit NPM1, führt aber zu einer Rekrutierung von SUMO2 in den Nukleolus

(A) HeLa S3 Zellen wurden mit HA-p14^{ARF} und Flag-SENP3 wie angegeben transfiziert. Nach der Präparation von Zelllysaten wurde Flag-SENP3 mit anti-Flag M2 Agarose immunpräzipitiert. Gebundene Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot mit den angegebenen Antikörpern untersucht. **(B)** HeLa S3 Zellen wurden mit Flag-SUMO2 und HA-p14^{ARF} oder Leervektor transfiziert und die Lokalisierung der jeweiligen Proteine wurde anhand immunologischer Färbung mit anti-HA und anti-Flag Antikörpern bestimmt. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt, Maßstab: 20 μm.

Die bisherigen Ergebnisse dokumentieren, dass die exogene Expression von SENP3 eine demodifizierende Aktivität gegenüber sumoyliertem NPM1 zeigt. Im Weiteren sollte überprüft werden, ob SENP3 auch unter physiologischen Bedingungen als SUMO-Protease für NPM1 agiert. Hierfür wurde His₆-SUMO2 in HEK293T Zellen exprimiert und SENP3 sowie als zusätzliche Spezifitätskontrolle SENP5 durch Transfektion jeweils spezifischer siRNA Oligonukleotide depletiert. Die Effizienz der Depletion beider SUMO-Proteasen wurde dabei durch Western Blots überprüft. His₆-SUMO2-Konjugate wurden über magnetische Ni-NTA *beads* aufgereinigt, über SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot analysiert. Hierbei zeigte sich, dass eine Depletion von SENP3 mit jedem der beiden eingesetzten Oligonukleotide zu einem signifikanten Anstieg an His₆-SUMO2-NPM1-Konjugaten führte (Abb. 14, Spuren 2 und 3), während die ebenfalls effiziente Depletion von SENP5 keinen Einfluss auf

Ergebnisse

dieselben hatte (Abb. 14, Spur 4). Dies ist ein eindeutiger Hinweis darauf, dass SENP3 unter physiologischen Bedingungen die Modifikation von NPM1 mit SUMO2 wieder rückgängig macht und zumindest für dieses Substrat keine redundante Wirkung von SENP3 und dem eng verwandten SENP5 besteht.

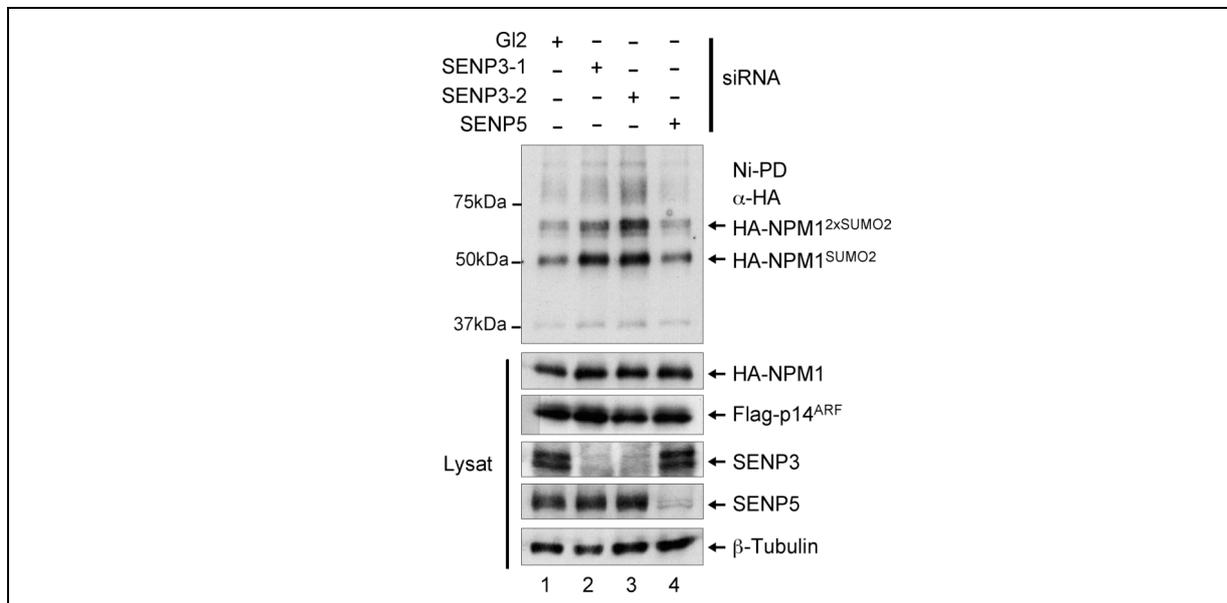


Abb. 14: Endogenes SENP3 katalysiert die Desumoylierung von NPM1

SENP3 und SENP5 wurden mit siRNA-Oligonukleotiden in HEK293T Zellen, die gleichzeitig mit HA-NPM1 und Flag-p14^{ARF} transfiziert wurden, depletiert. His₆-SUMO Konjugate wurden über magnetische Ni-NTA *beads* aufgereinigt und in einem Western Blot mit anti-HA Antikörper untersucht. Die Expression der jeweiligen Proteine wurde in Western Blots mit den entsprechenden Antikörpern überprüft.

Die bisherigen Daten zeigen somit, dass SENP3 mit NPM1 interagiert und die Modifikation von NPM1 mit SUMO2 sowohl in Überexpression als auch bei physiologischem Expressionsniveau rückgängig machen kann. Um schließlich formal zu zeigen, dass SENP3 auf direkte Weise sumoyliertes NPM1 demodifiziert und seine Wirkung nicht über andere Mediatorproteine entfaltet, wurde ein *in vitro* Sumoylierungs/Desumoylierungs-Ansatz etabliert. In diesem Versuch wurde zunächst ³⁵S-markiertes NPM1 durch *in vitro* Transkription/Translation erzeugt und in Anwesenheit von ATP durch Inkubation mit rekombinanten Komponenten der Sumoylierungsmaschinerie (E1 und Ubc9) mit SUMO1 bzw. SUMO2 modifiziert. Anschließend wurden dem Reaktionsansatz *in vitro* transkribiertes/translatiertes SENP3 und SENP5 bzw. deren katalytisch inaktive Varianten hinzugefügt und erneut inkubiert. Die Detektion der ³⁵S-markierten NPM1-Spezies erfolgte nach Auftrennung mittels SDS-PAGE über Autoradiographie. In der Kontrollreaktion, die ohne die Zugabe einer der beiden SUMO-Isoformen durchgeführt wurde, war auf der Autoradiographie eine starke Bande von unmodifiziertem NPM1 bei etwa 37kDa sichtbar (Abb. 15, oben, Spur 1). In Anwesenheit der Sumoylierungskomponenten hingegen wurden

Ergebnisse

weitere höhermolekulare Banden sichtbar, die SUMO1 bzw. SUMO2-Konjugaten von NPM1 entsprachen. NPM1-SUMO1 Konjugate blieben dabei von der Zugabe von SENP3 oder SENP5 weitgehend unbeeinflusst (Abb. 15, oben, Spuren 2 - 6), wohingegen eine Inkubation mit SENP3 eine vollständige Desumoylierung von SUMO2 modifiziertem NPM1 zur Folge hatte (Abb. 15, oben, Spur 8). In Anwesenheit der katalytisch inaktiven Mutante von SENP3 hingegen blieben NPM1-SUMO2 Konjugate ebenso stabil wie nach Zugabe von SENP5 und dessen katalytisch inaktiver Mutante (Abb. 15, Spuren 9 - 10). Da SENP5 jedoch C-terminale Prozessierung von Flag-SUMO2GG-HA zeigte (Abb. 15, mitte, Spur 10), kann davon ausgegangen werden, dass SENP5 als aktives Protein vorlag, aber trotz seiner engen Verwandtschaft zu SENP3 und seiner Spezifität für SUMO2/3-konjugierte Spezies keinen Effekt auf SUMO2-modifiziertes NPM1 hatte. Dieser Versuch bestätigt damit die Ergebnisse der *in vivo* Experimente und lässt den Schluss zu, dass die katalytische Aktivität von SENP3 direkt für die Demodifikation von SUMO2-modifiziertem NPM1 verantwortlich ist.

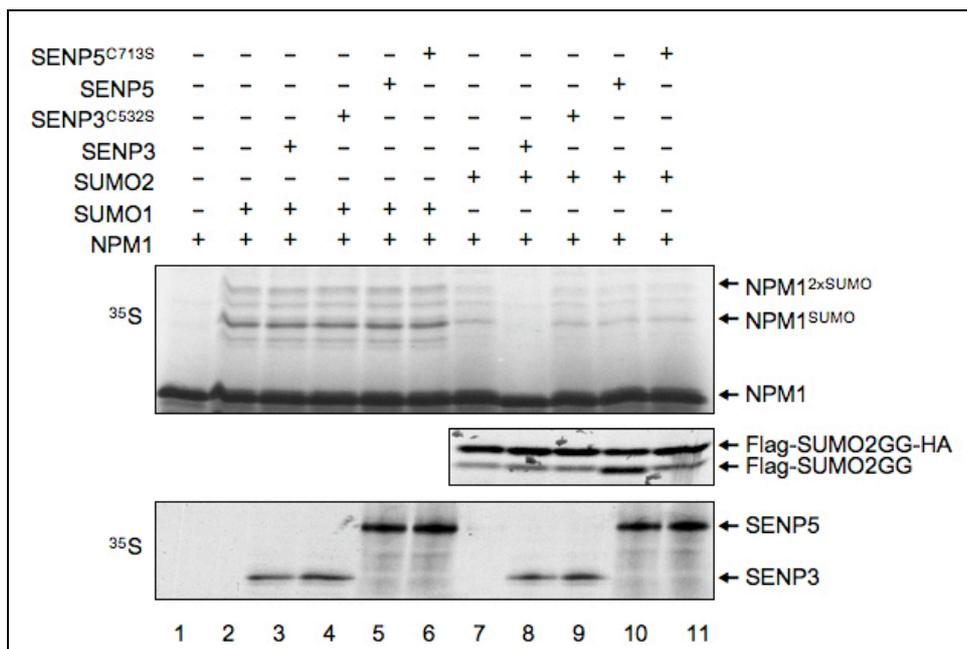


Abb. 15: SENP3 katalysiert die Desumoylierung von NPM1 *in vitro*

³⁵S-markiertes, mittels *in vitro* Transkription/Translation generiertes NPM1 wurde mit rekombinanten E1, E2 und SUMO1 (Spur 2-6) bzw. SUMO2 (Spur 7-11) in der Anwesenheit von ATP inkubiert. Die Kontrollreaktion (Spur 1) enthielt kein SUMO. Nach der Modifikationsreaktion wurde *in vitro* transkribiertes/translatiertes SENP3 oder SENP5 bzw. deren katalytisch inaktive Mutanten wie angegeben hinzugegeben. Um die Aktivität von *in vitro* translatiertem SENP3 und SENP5 zu testen, wurde N-terminal mit einem Flag und C-terminal mit einem HA-Epitop versehenes SUMO2 *in vitro* translatiert nach der Modifikationsreaktion inkubiert. Die Menge an SENP3 bzw. SENP5 und deren Mutanten sind in der unteren Autoradiographie gezeigt.

Zusammenfassend zeigen damit die bisherigen Experimente, dass p14^{ARF} und SENP3 als regulatorische Komponenten den dynamischen Zyklus der Sumoylierung

und Desumoylierung von NPM1 kontrollieren. Im Folgenden sollte die Funktion dieser regulierten Modifikation von NPM1 untersucht werden.

3.1.3 Depletion von SENP3 inhibiert die Reifung der 28S rRNA

NPM1 ist ein multifunktionales Protein, das Aufgaben in den verschiedensten zellulären Prozessen wie etwa der Verdopplung von Centrosomen, der Antwort auf DNA-Schäden, der Regulation der Transkription, sowie der Proteinfaltung und der Reifung ribosomaler RNA hat (Grisendi et al., 2006). Die Beteiligung bei der Reifung der 28S rRNA scheint hierbei die zentrale Funktion von NPM1 im Nukleolus zu sein. Abb. 16A fasst die wichtigsten Schritte der Prozessierung ribosomaler RNA zusammen. Die 47S prä-rRNA reift dabei über zahlreiche Zwischenstufen zu den maturierten 18S, 5,8S und 28S rRNA-Spezies heran. NPM1 beeinflusst dabei über die Prozessierung der 32S rRNA die Entstehung der gereiften 28S rRNA, (Itahana et al., 2003; Savkur und Olson, 1998). NPM1 ist an der Spaltung innerhalb der ITS2-Region des 32S rRNA Intermediats beteiligt, aus dem die reifen 28S und die 5,8S rRNA-Formen hervorgehen.

Um zu überprüfen, ob SENP3 ebenfalls Einfluss auf die Prozessierung der 32S rRNA nimmt, wurden die Expressionsniveaus von SENP3 und SENP5 mit siRNA-Oligonukleotiden reduziert. Die Depletion der Proteine wurde dabei durch einen Western Blot mit den jeweiligen Antikörpern überprüft. Als Positivkontrolle diente in diesem Versuch ein siRNA-Oligonukleotid gegen die mRNA von NPM1. Nach Depletion der entsprechenden Proteine wurde für die radioaktive Markierung der RNA eine sogenannte metabolische *in vivo* Markierung durchgeführt. Hierbei wird dem Zellkulturmedium ³²P-Orthophosphat für 1h zugegeben. Nach dem Entfernen der Radioaktivität und einer Inkubation für weitere 2h mit nichtradioaktivem Medium kann die Prozessierung der so markierten RNA nach Präparation der Gesamt-RNA, Auftrennung derselben über ein denaturierendes Agarose-Gel und Autoradiographie verfolgt werden. Da die ribosomale RNA dabei im Vergleich zur restlichen mRNA sehr abundant ist, heben sich die 47S Vorläuferform sowie einzelne prozessierte rRNA Formen in der Autoradiographie klar ab.

Abb. 16B zeigt, dass neben der 47S rRNA-Vorläufer-Form, das 32S Intermediat, sowie die reifen 28S und 18S rRNA-Formen deutlich detektiert wurden. In unbehandelten Zellen (Abb. 16B, Spur 1), sowie der Kontrolltransfektion mit einem unspezifischen Oligonukleotid (Abb. 16B, Spur 2) zeigte sich die 28S rRNA Spezies als die abundanteste Form. Im Einklang mit der bereits beschriebenen Rolle von NPM1 als 32S-Prozessierungsfaktor war in NPM1-depletierten Zellen dagegen eine deutliche Abnahme der reifen 28S rRNA-Form sichtbar (Abb. 16B, Spur 3).

Ergebnisse

Interessanterweise führte eine Depletion von SENP3 mit zwei unabhängigen Oligonukleotiden ebenfalls zu einer dramatischen Abnahme der gereiften 28S rRNA (Abb. 16B, Spuren 4 und 5). Eine Depletion von SENP5 hingegen, zeigte keine Effekte auf die Prozessierung der 32S rRNA. Somit scheint SENP3 ebenso wie NPM1 eine zentrale Rolle bei der Reifung der 28S rRNA zu spielen.

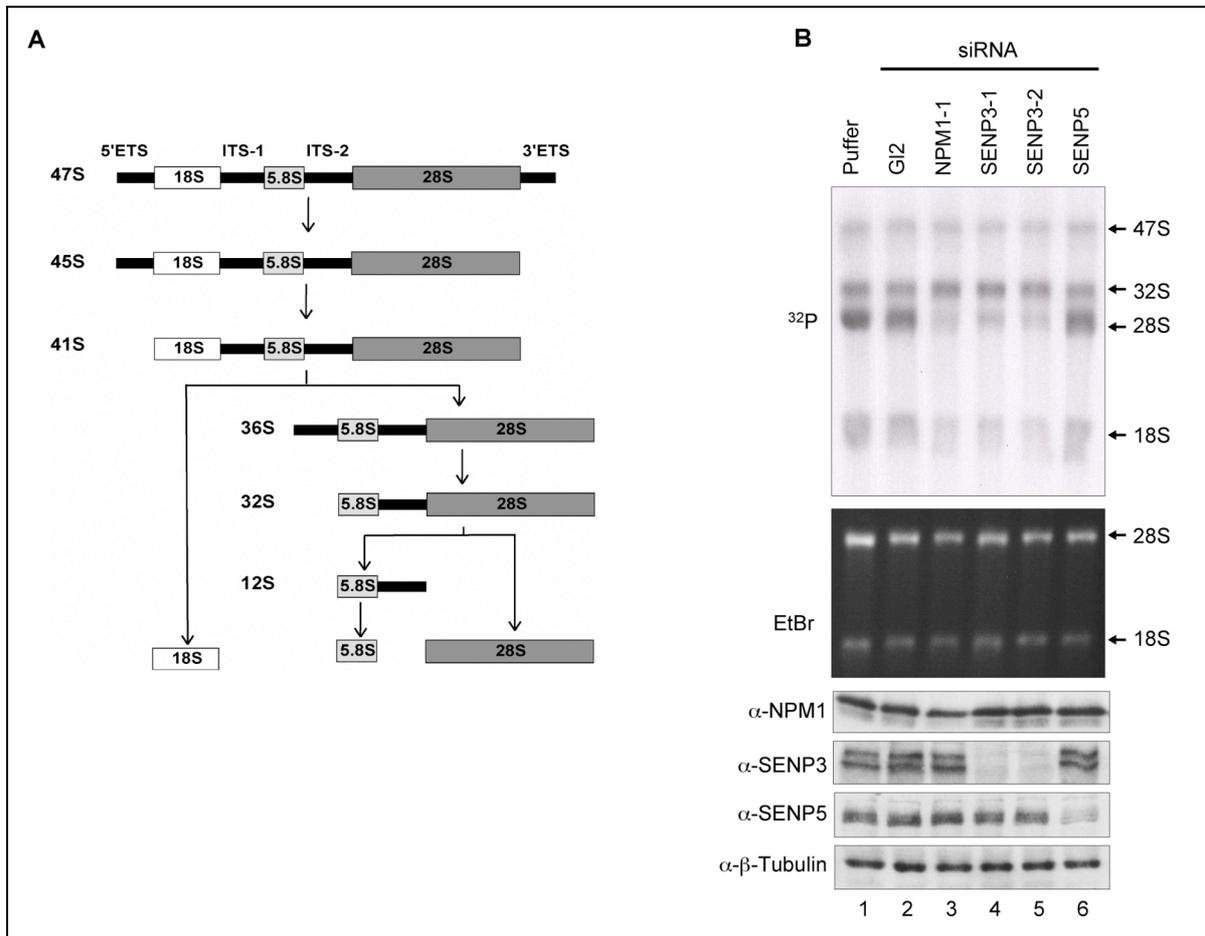


Abb. 16: Depletion von SENP3 inhibiert die Prozessierung ribosomaler RNA

(A) Übersicht über die wichtigsten Schritte der Prozessierung ribosomaler RNA (B) HeLa S3 Zellen wurden mit siRNAs gegen NPM1, SENP3 und SENP5 wie angegeben transfiziert. Als Kontrollen dienten die Transfektion eines unspezifischen Oligonukleotids (G12) sowie Puffer ohne Oligonukleotid. 72h nach Transfektion wurden die Zellen 1h mit ^{32}P -Orthophosphat markiert. Nach Entfernung der Radioaktivität wurden die Zellen für weitere 2h inkubiert. Nach Präparation der Gesamt-RNA wurde eine gleiche Menge an RNA auf ein denaturierendes Agarose-Gel geladen und die eingesetzte RNA-Menge durch EtBr-Färbung der 28S- und 18S-rRNA überprüft. Die Depletion der entsprechenden Proteine wurde in einem Western Blot überprüft. ETS = externer transkribierter Spacer, ITS = interner transkribierter Spacer.

3.1.4 SENP3 und NPM1 sind epistatisch

Trotz der Gleichartigkeit der Effekte einer Depletion von SENP3 und NPM1 auf die Prozessierung der 32S rRNA, der Interaktion beider Proteine und der SENP3-vermittelten Demodifikation von sumoyliertem NPM1, bestand gleichwohl die

Ergebnisse

Möglichkeit, dass beide Proteine unabhängig voneinander ihre Funktion während der Reifung ribosomaler RNA erfüllen. Um die Frage zu adressieren, ob SENP3 und NPM1 in einem gemeinsamen Reaktionsweg in der Ribosomenbiogenese wirken, wurde ein siRNA-basierter Epistase-Versuch durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden beide Proteine sowohl einzeln als auch gemeinsam in HeLa S3 Zellen depletiert und erneut mittels *in vivo* Markierung die Prozessierung ribosomaler RNA verfolgt.

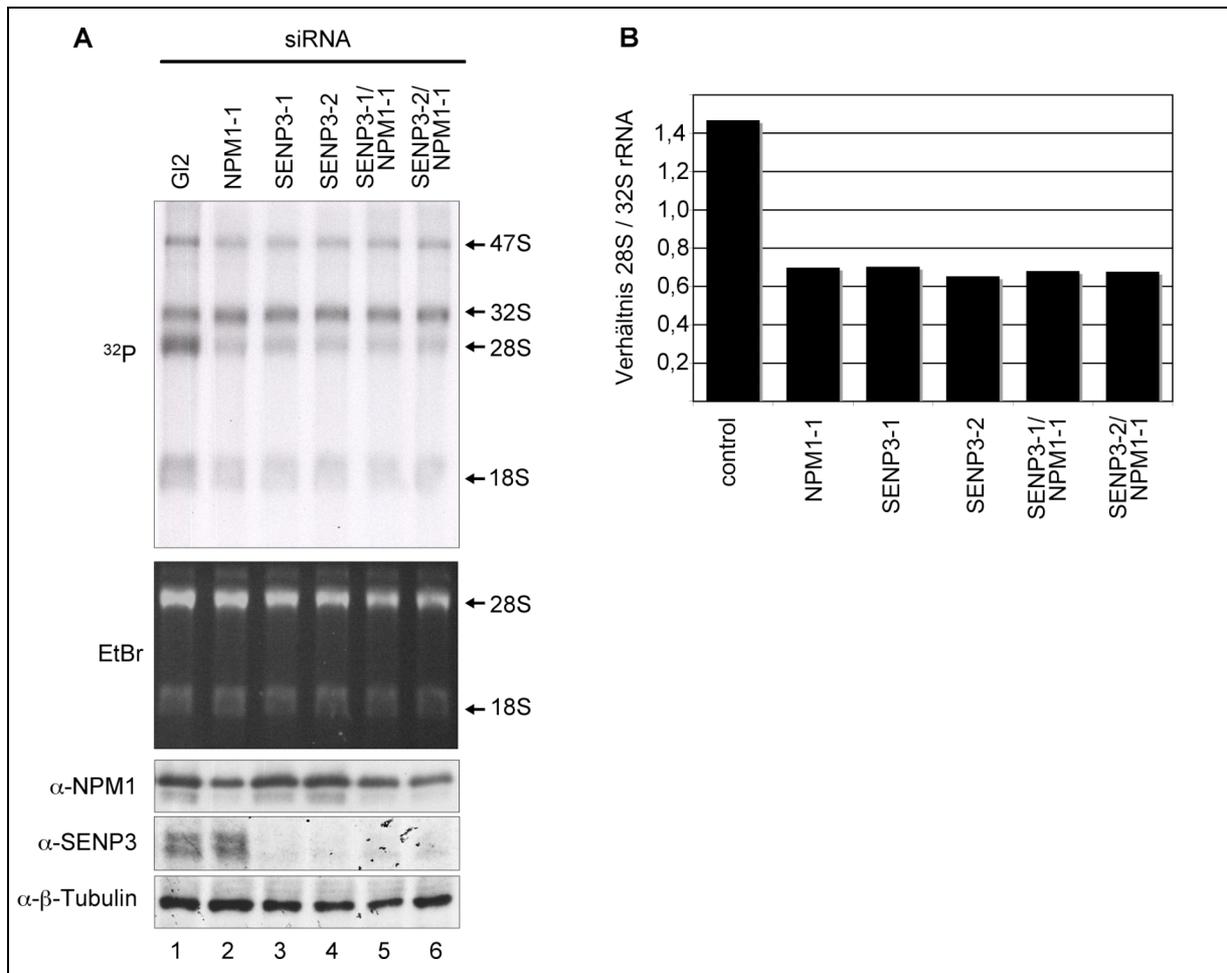


Abb. 17: SENP3 und NPM1 sind epistatisch bei der Prozessierung ribosomaler RNA

(A) HeLa S3 Zellen wurden mit siRNA-Oligonukleotiden wie angegeben transfiziert. Als Kontrolle diente die Transfektion eines unspezifischen Oligonukleotids. 72h nach Transfektion wurden die Zellen 1h mit ^{32}P -Orthophosphat markiert. Nach Entfernung der Radioaktivität wurden die Zellen für weitere 2h inkubiert. Nach Präparation der Gesamt-RNA wurde eine gleiche Menge an RNA auf ein denaturierendes Agarose-Gel geladen und die eingesetzte RNA-Menge durch EtBr-Färbung der 28S und 18S rRNA überprüft. Die Depletion der entsprechenden Proteine wurde in einem Western Blot überprüft. **(B)** Die Signalintensitäten der 28S und der 32S rRNA Formen wurden in einem Phosphoimager analysiert und das Verhältnis 28S/32S bestimmt.

Wie in Abb. 17 zu sehen ist, erschien in Zellen, die mit einem Kontroll-Oligonukleotid transfiziert wurden, die 28S rRNA Spezies wieder als die abundanteste Form (Abb. 17A, Spur 1), wohingegen in Zellen mit reduziertem Expressionsniveau von SENP3 bzw. NPM1 oder von SENP3 und NPM1 in Kombination deutliche Defekte bei der Prozessierung der 32S rRNA auftraten (Abb. 17A, Spuren 2 - 6). Die Signale der 28S

und 32S rRNA Spezies wurden schließlich mit Hilfe eines Phosphoimagers quantifiziert und das Verhältnis 28S/32S rRNA ermittelt (Abb. 17B). Eine Depletion von NPM1 und SENP3 führte zu einer etwa 50%igen Reduktion des Verhältnisses zwischen 28S und 32S rRNA im Vergleich zur Kontrolle. Eine Ko-Depletion beider Proteine konnte diesen Effekt nicht weiter verstärken. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass SENP3 und NPM1 in einem gemeinsamen Reaktionsweg und nicht unabhängig voneinander bei der Reifung der 28S rRNA agieren.

3.1.5 Sumoylierung von NPM1 beeinträchtigt die Reifung der 28S rRNA

Vor dem Hintergrund der beschriebenen Resultate, sollte im Weiteren untersucht werden ob die Sumoylierung von NPM1 dessen Funktion bei der Prozessierung der 32S rRNA kontrolliert. Hierzu sollte zum einen die Aktivität einer nicht mehr sumoylierbaren Mutante von NPM1 bei diesem Prozess untersucht werden. Um insbesondere die Bedeutung der SENP3-vermittelten Dekonjugation zu verstehen, sollte zusätzlich eine konstitutiv sumoylierte Version von NPM1 in Form eines Fusionsproteins generiert werden. Um die Aktivität dieser NPM1 Versionen zu testen, wurde eine *knock-down/knock-in*-Strategie verfolgt (Holzel et al., 2007), bei der nach siRNA-vermittelter Depletion von endogenem NPM1 die Komplementation dieses *knock-downs* mit exogenen siRNA-resistenten Versionen von NPM1 erfolgte. Da für eine derartige Strategie, eine homogene Zellpopulation unerlässlich ist wurden die NPM1 Formen in den pRTS1-Vektor kloniert, der dank seines EBV-basierten OriP/EBNA1-Systems in Säugerzellen episomal repliziert und über Hygromycin B selektierbar ist (Bornkamm et al., 2005). Zusätzlich enthält dieser pRTS1-Vektor noch einen Tetracyclin/Doxycyclin induzierbaren Promotor. So erhält man nach Transfektion eines pRTS1-Konstruktes und Selektion mit Hygromycin B im Gegensatz zu einer transienten Transfektion eine homogene Zellpopulation, die nach Induktion mit Doxycyclin stabil das gewünschte Protein exprimiert. Jede NPM1-depletierte Zelle muss gleichzeitig eine exogene Version von NPM1 enthalten, da ansonsten keine Aussagen über das Potential der jeweiligen NPM1-Version für eine Komplementation getroffen werden kann.

3.1.5.1 Lysin263 ist nicht die Hauptakzeptorstelle in NPM1 für SUMO2

Um zu überprüfen, ob ein nicht mehr sumoylierbares NPM1 direkten Einfluss auf die Prozessierung ribosomaler RNA hat, musste zunächst das für die Sumoylierung verantwortliche Lysin mutiert werden. NPM1 besitzt 33 Lysine, von denen sich vier innerhalb einer ψ KxE/D-Konsensussequenz für eine Modifikation mit SUMO befinden. Drei dieser Konsensus-Lysine haben offenbar keinen Einfluss auf den

Ergebnisse

Sumoylierungsstatus von NPM1 (Tago et al., 2005), wohingegen Lysin263 in einer aktuellen Veröffentlichung als Haupt-Modifikationsstelle für SUMO beschrieben wurde (Liu et al., 2007). Eine NPM^{K263R}-Mutante soll dabei neben fehlerhafter Sumoylierung auch Defekte in der nukleolären Lokalisierung aufweisen und sollte deshalb auf ihre Fähigkeit getestet werden, eine Depletion von endogenem NPM1 komplementieren zu können.

Zunächst sollten die publizierten Daten der Ye-Gruppe noch einmal verifiziert werden. Abb. 18A zeigt, dass NPM1^{K263R} in Gegenwart von p14^{ARF} immer noch sumoyliert wird (Abb. 18A, Spur 6) und dass im Vergleich zu NPM1^{wt} (Abb. 18A, Spur 3) auch keine Reduzierung der SUMO-modifizierten Formen erkennbar war. Ein Experiment zur *in vitro* Sumoylierung (siehe 3.1.2) von NPM1^{K263R} führte zu demselben Ergebnis (Abb. 18B). Auch hier war kein Unterschied im Bezug auf das Ausmaß einer Modifikation mit SUMO2 zwischen beiden Versionen von NPM1 zu erkennen (Abb. 18B, Spuren 3 und 6). Auch SUMO1 wurde mit gleicher Effizienz an beide Proteine angeheftet (Abb. 18B, Spuren 2 und 5).

Diese Ergebnisse und unabhängige Untersuchungen einer weiteren Forschergruppe, die ebenfalls keine reduzierte Sumoylierung von NPM^{K263R} beobachten konnte (Nishida und Yamada, 2008), zeigen damit, dass Lysin263 offenbar nicht die Haupt-Akzeptorstelle für SUMO2 in NPM1 ist und konnten die Daten von Liu et al. somit nicht bestätigen.

Damit im Einklang steht auch der Befund, dass NPM^{K263R} keine Lokalisierungsdefekte wie von Liu et al. beschrieben (Abb. 18C) aufweist und keine Defekte in Bezug auf die Prozessierung der 32S rRNA zeigt (Abb. 18D). Ein *knock-down/knock-in*-Komplementationsversuch (siehe 3.1.5) mit anschließender *in vivo* Markierung zeigte, dass NPM1^{K263R} wie NPM1^{wt} im vollen Umfang in der Lage ist, Prozessierungsdefekte der 32S rRNA nach Depletion von endogenem NPM1 zu revertieren (Abb. 18D).

Ergebnisse

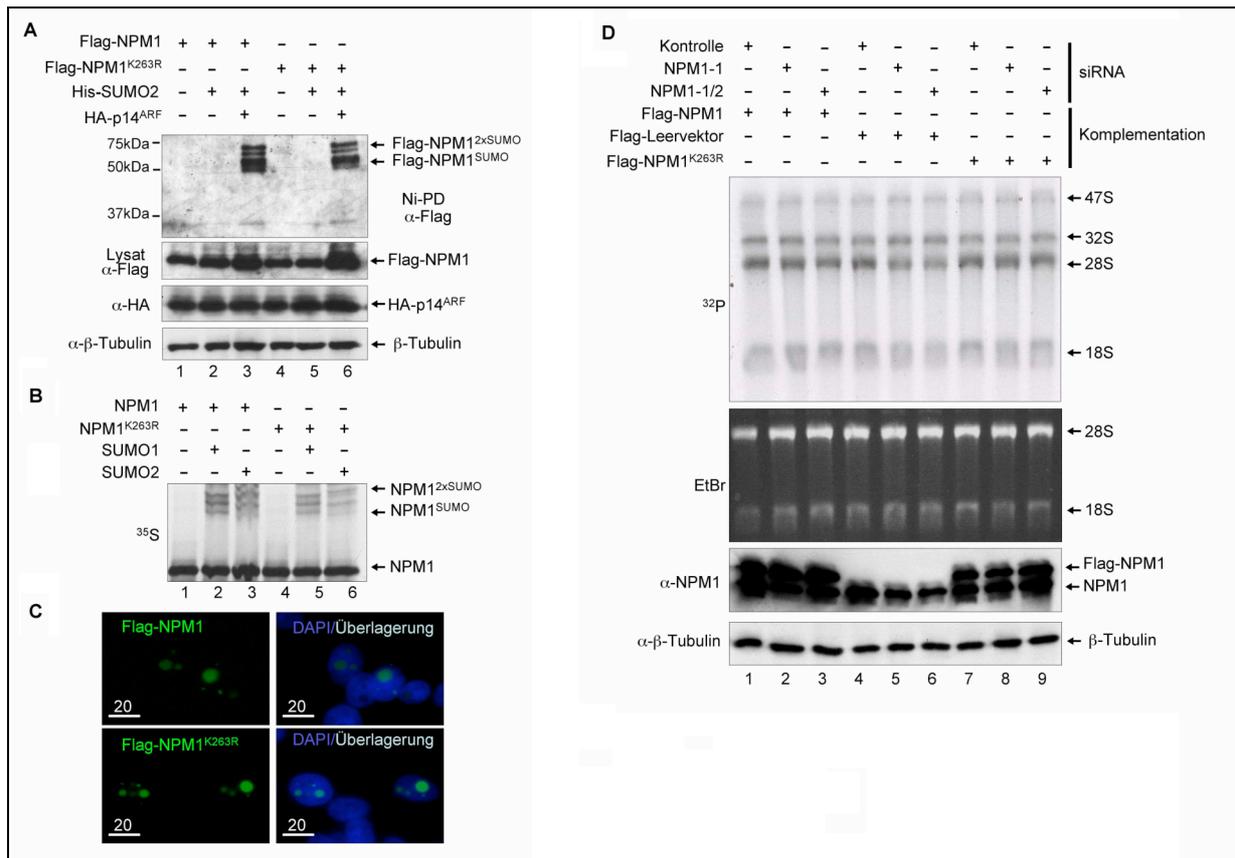


Abb. 18: NPM1^{K263R} zeigt keine Defekte in Bezug auf SUMO Modifikation, nukleoläre Lokalisierung and rRNA Prozessierung

(A) Flag-NPM1 und Flag-NPM1^{K263R} wurden alleine oder mit HA-p14^{ARF} und His₆-SUMO2 in HEK293T Zellen exprimiert. His₆-SUMO Konjugate wurden über magnetische Ni-NTA *beads* aufgereinigt und in einem Western Blot mit anti-Flag Antikörper untersucht. Die Expression der jeweiligen Proteine wurde in Western Blots mit den entsprechenden Antikörpern überprüft. (B) ³⁵S-markiertes, mittels *in vitro* Transkription/Translation generiertes NPM1 bzw. NPM1^{K263R} wurde mit rekombinantem E1, E2 und SUMO1 bzw. SUMO2 in der Anwesenheit von ATP inkubiert. Die Kontrollreaktionen (Spuren 1 und 3) enthielten kein SUMO. (C) HEK293T Zellen wurden mit Flag-NPM1 und Flag-NPM1^{K263R} transfiziert und die Lokalisierung beider Proteine wurde anhand immunologischer Färbung mit anti-Flag Antikörper bestimmt. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstab: 20µm. (D) HeLa S3 Zellen, die Tetracyclin/Doxycyclin induzierbare siRNA-resistente Versionen von Flag-NPM1 oder Flag-NPM1^{K263R} exprimierten, wurden entweder mit einem Kontroll-siRNA-Oligonukleotid oder zwei unterschiedlichen NPM1-spezifischen siRNA-Oligonukleotiden transfiziert. Die Reaktion NPM1-1/2 beinhaltet eine Mischung aus NPM1-1 und NPM1-2, einem Oligonukleotid, das gegen die 3' nichttranslatierte Region von NPM1 gerichtet ist. 72h nach der Transfektion wurden die Zellen mit ³²P-Orthophosphat für 1h radioaktiv markiert und nach Entfernung der Radioaktivität für weitere 2h inkubiert. Nach Präparation der Gesamt-RNA wurden gleiche Mengen an RNA auf ein denaturierendes Agarose-Gel geladen. Die Ethidiumbromid-Färbung der 28S and 18S rRNA ist gezeigt. Die Expressionsniveaus der jeweiligen Proteine wurde mittels Western Blots untersucht.

3.1.5.2 Eine lineare Fusion zwischen NPM1 und SUMO2 inhibiert die Reifung der 28S rRNA

Da offensichtlich keines der 4 Lysine in NPM1, die sich innerhalb einer Konsensussequenz für eine Modifikation mit SUMO befinden, als Haupt-Akzeptorstelle für SUMO2 dient, wurde ein alternativer und direkterer Ansatz gewählt, um die Funktion von sumoyliertem NPM1 in der Ribosomenbiogenese zu untersuchen. Wie bereits in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden konnte, kann eine lineare Fusion von SUMO

Ergebnisse

an das Zielprotein die physiologische Funktion einer persistierenden Sumoylierung imitieren (Huang et al., 2003; Ross et al., 2002; Steffan et al., 2004). Deshalb wurde SUMO2 C-terminal an NPM1 fusioniert und die Funktionalität diese Fusionsproteins im Kontext der Reifung ribosomaler RNA überprüft. Hierzu wurde erneut eine *knock-down/knock-in*-Strategie (siehe 3.1.5) verfolgt, bei der homogene Zellpopulationen mit induzierbarem Flag-NPM1 bzw. Flag-NPM1-SUMO2 erzeugt wurden und deren Potential, eine Depletion von endogenem NPM1 kompensieren zu können, in Form einer *in vivo* Markierung überprüft werden sollte. Die Depletion von endogenem NPM1, sowie die Expression der jeweiligen zur Komplementation eingesetzten NPM1-Konstrukte wurden mit Western Blots getestet.

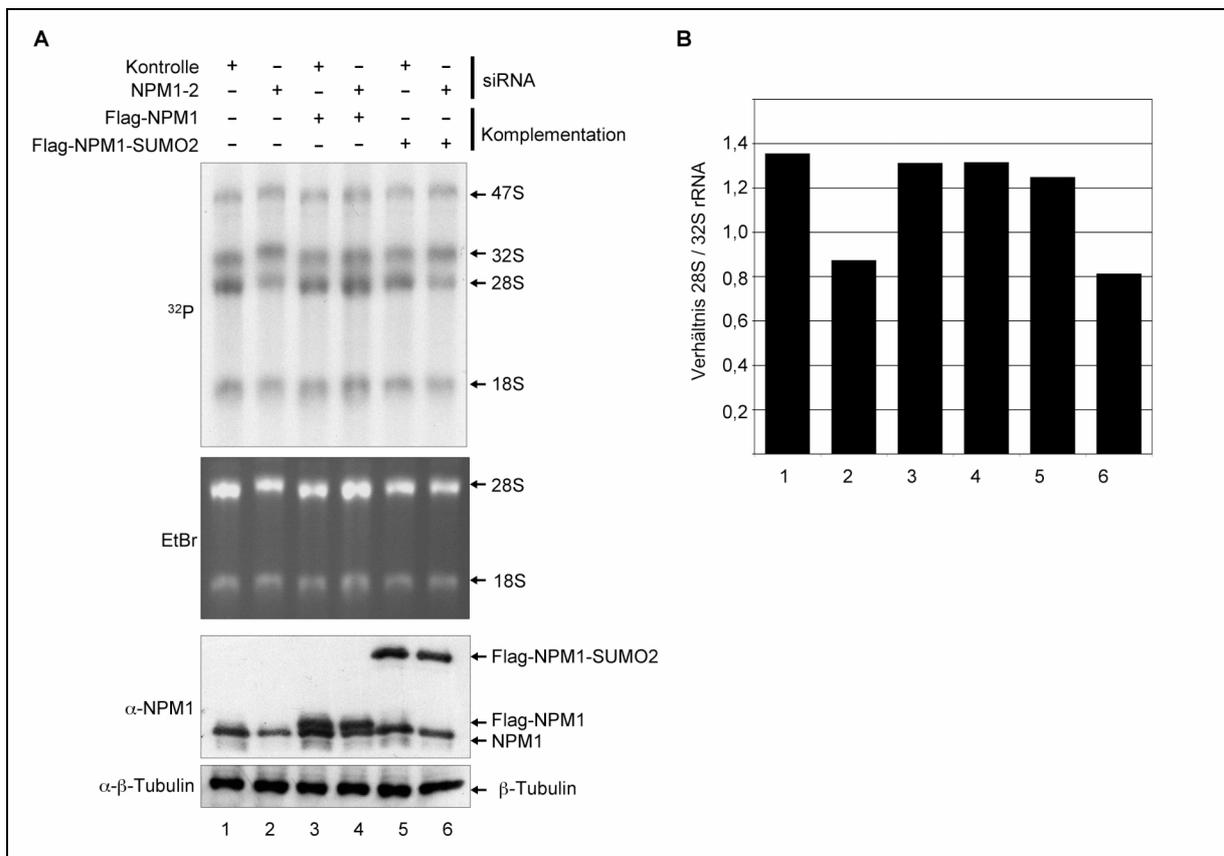


Abb. 19: Eine lineare Fusion SUMO2 an NPM1 interferiert mit der Prozessierung von rRNA

(A) HeLa S3 Zellen, die Tetracyclin/Doxycyclin induzierbare siRNA-resistente Versionen von Flag-NPM1 oder Flag-NPM1-SUMO2 exprimieren, wurden entweder mit einem Kontroll-siRNA-Oligonukleotid oder einem NPM1-spezifischen siRNA-Oligonukleotid transfiziert. 72h nach der Transfektion wurden die Zellen mit ^{32}P -Orthophosphat für 1h radioaktiv markiert und nach Entfernung der Radioaktivität für weitere 2h inkubiert. Nach Präparation der Gesamt-RNA wurden gleiche Mengen an RNA auf ein denaturierendes Agarose-Gel geladen. Die Ethidiumbromid-Färbung der 28S und 18S rRNA ist gezeigt. Die Expressionsniveaus der jeweiligen Proteine wurde mittels Western Blots untersucht. (B) Die Signalintensitäten der 28S und der 32S rRNA Formen wurden in einem Phosphoimager analysiert und das Verhältnis 28S/32S bestimmt.

Abb. 19A macht deutlich, dass in Kontrollzellen, die nur mit Kontrollvektor transfiziert wurden, erwartungsgemäß eine deutliche Abnahme der gereiften 28S rRNA aus der Depletion von NPM1 resultierte (Abb, 19A, Spur 2). Dieser Effekt wurde durch

Ergebnisse

induziertes Flag-NPM1 vollständig komplementiert (Abb. 19A, Spuren 3 und 4), wie auch eine Quantifizierung der 28S und 32S rRNA-Banden mit einem Phosphoimager und die Berechnung des Verhältnisses 28S/32S rRNA zeigte (Abb. 19B). Flag-NPM1-SUMO2 hingegen war nicht in der Lage, die Depletion von endogenem NPM1 zu kompensieren. Obwohl das Expressionsniveau dieser SUMO2-Fusion vergleichbar mit unfusioniertem NPM1 war (Abb. 19A, Western Blot, Spuren 3 und 4 bzw. 5 und 6), konnte es den durch die Depletion von endogenem NPM1 hervorgerufenen Defekt in der Reifung der 28S rRNA nicht komplementieren (Abb. 19A, Spuren 5 und 6, Abb. 19B, Spalten 5 und 6).

Zusammenfassend sprechen diese Daten dafür, dass ein Defekt in der Desumoylierung von NPM1 direkt mit dessen Funktion bei der Prozessierung der 32S rRNA interferiert.

Einen Hinweis, dass diese Fusion mit SUMO2 keine Auswirkungen auf die generelle Funktionalität von NPM1 hat, lieferte ein Experiment, bei dem das Fusionsprotein auf generelle Eigenschaften von NPM1 wie etwa die Homodimerisierung oder die Interaktion mit bekannten Interaktionspartnern getestet werden sollte. Flag-NPM1 bzw. Flag-NPM1-SUMO2 wurde hierzu in HeLa S3 Zellen exprimiert. Beide mit dem Flag-Epitop versehenen NPM1 Versionen sowie assoziierte Proteine wurden mittels anti-Flag M2 Agarose aufgereinigt, über SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. Abb. 20A zeigt, dass Flag-NPM1-SUMO2 im selben Ausmaß wie Flag NPM1 mit endogenem NPM1 (Abb. 20A, Spuren 7 und 8, Pfeil) homodimerisieren konnte. Auch im Bezug auf die Interaktion mit bekannten Bindungspartnern von NPM1, wie p14^{ARF}, pRB, PARP-1 oder Histon H3 verhielt sich die Fusion analog zum Wildtyp-Protein (Abb. 20B, Spuren 7 und 8). Zudem schien eine Fusion mit SUMO2 auch keine Veränderung in der subzellulären Lokalisierung von NPM1 herbeizuführen wie durch eine vergleichende Immunfluoreszenz von Flag-NPM1-SUMO2 und Flag NPM1 gezeigt wurde (Abb. 20C). Diese Beobachtungen legen nahe, dass eine lineare Fusion von SUMO2 mit NPM1 keine Auswirkungen auf die generelle Struktur und Funktion von NPM1 hat und demzufolge geeignet ist, eine persistierende Modifikation von NPM1 mit SUMO2 zu imitieren.

Ergebnisse

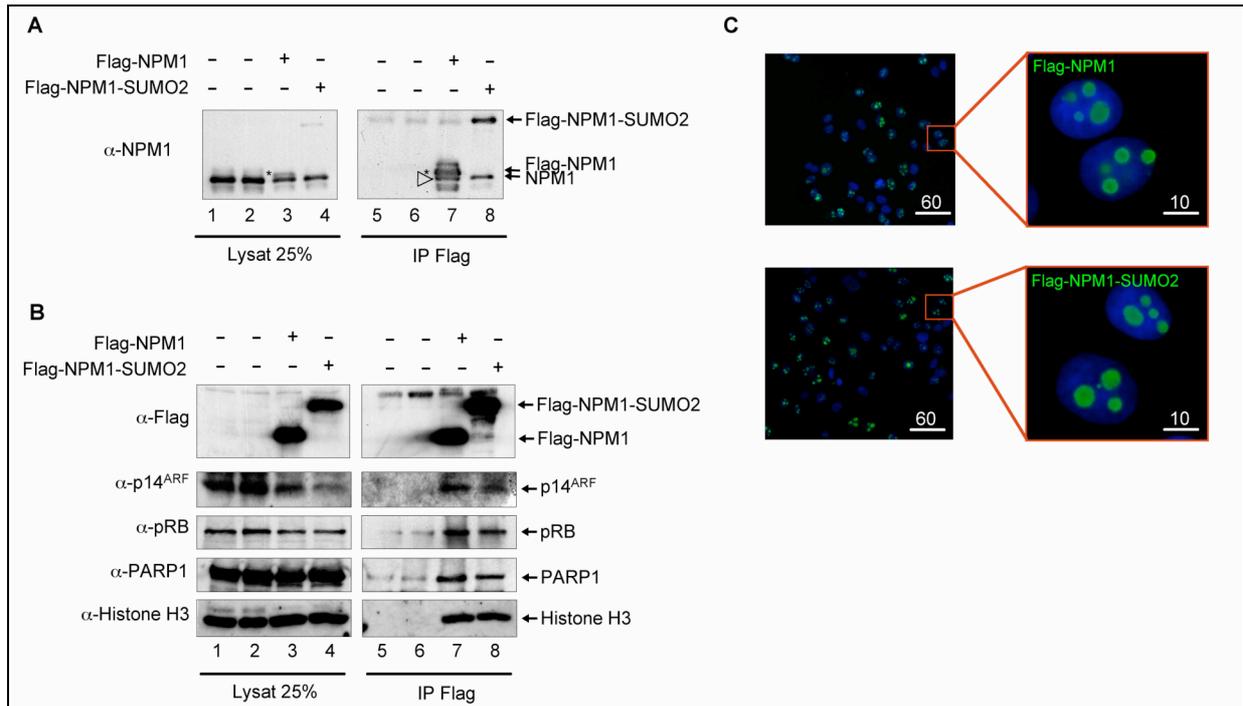


Abb. 20: Flag-NPM1-SUMO2 interagiert noch mit NPM1 und Bindungspartnern von NPM1

(A), (B) HeLa S3 Zellen, die Tetracyclin/Doxycyclin induzierbare siRNA-resistente Versionen von Flag-NPM1 oder Flag-NPM1-SUMO2 exprimierten, wurden wie angegeben mit Doxycyclin induziert. Nach der Präparation von Zelllysaten wurden die entsprechenden Proteine mit anti-Flag M2 Agarose immunpräzipitiert. Gebundene Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und in Western Blots mit den angegebenen Antikörpern untersucht. (A) exogenes Flag-NPM1 ist mit einem Sternchen, endogenes NPM1 mit einem Pfeil markiert. (C) Die Lokalisierung von Tetracyclin/Doxycyclin induzierbarem Flag-NPM1 und Flag-NPM1-SUMO2 in HeLa S3 Zellen wurde anhand immunologischer Färbung mit anti-Flag Antikörper bestimmt. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstab: 60 μ m bzw. 10 μ m.

3.2 Die Rolle von SENP3 in der Mitose

3.2.1 SENP3 wird während der Mitose reguliert

Genetische Daten aus der Hefe zu den SUMO-Isopeptidasen Ulp1 und Ulp2 deuten darauf hin, dass eine genaue Koordination von Sumoylierung und Desumoylierung kritisch für mitotische Ereignisse wie etwa den Eintritt in die Mitose oder die Kohäsion und Segregation von Chromosomen ist (Bachant et al., 2002; Li und Hochstrasser, 1999). Neuere Daten legen nahe, dass das SUMO-System auch in Säugerzellen für das Fortschreiten der Mitose und dabei vor allem für die korrekte Funktion des Centromers/Kinetochors entscheidend ist (Dawlaty et al., 2008; Di Bacco et al., 2006; Zhang et al., 2008). Ein genaueres Verständnis detaillierter Regulationsmechanismen und mitotischer SUMO-Substrate fehlt jedoch bislang.

Um zu überprüfen, ob SENP3, ähnlich wie die SUMO-Isopeptidasen in Hefe eine Funktion in der Mitose hat, sollte zunächst getestet werden, ob SENP3 selbst einer mitotischen Regulation unterliegt. Zu diesem Zweck wurden HeLa S3 Zellen mittels Nocodazol bzw. Thymidin arretiert und die Menge von SENP3 sowie sein Laufverhalten mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot untersucht. Nocodazol inhibiert durch die Depolymerisierung von Mikrotubuli den Aufbau einer funktionsfähigen mitotischen Spindel und führt so zu Arretierung der Zellen in der Prometaphase, während Thymidin im Überschuss die Zellen durch Inhibition der Nukleotid-Neusynthese am G1/S-Übergang arretiert. In Extrakten von Nocodazol arretierten Zellen (Abb. 21A, Spur 1) war dabei im Unterschied zu Extrakten von Thymidin-behandelten und asynchronen Zellen deutlich eine sehr starke, höhermolekulare anti-SENP3 reaktive Bande zu erkennen (Abb. 21A, Spuren 2 und 3). Um zu überprüfen, ob es sich hierbei um eine Phosphorylierung von SENP3 handelte, wurden Zellextrakte mit λ -Phosphatase behandelt. Diese Phosphatase entfernt *in vitro* effektiv Phosphatgruppen von Proteinen und ist deshalb ein geeignetes Werkzeug, um Phosphorylierungs-abhängige Retardierung des Laufverhaltens von Proteinen rückgängig zu machen. Abb. 21 macht deutlich, dass es sich bei der im Nocodazol Arrest zutage tretenden, anti-SENP3-reaktiven Spezies tatsächlich um eine hyperphosphorylierte Form von SENP3 handelt, da diese nach Inkubation mit λ -Phosphatase gänzlich verschwand (Abb. 21B). Auch in asynchronen Zellen scheint phosphoryliertes SENP3 vorzuliegen, da hier ebenfalls eine zweite, allerdings viel schwächere und tiefer laufende Bande erkennbar ist, die nach Inkubation mit λ -Phosphatase ebenfalls verschwindet (Abb. 21A, B).

Ergebnisse

Um zu untersuchen, wie sich die Phosphorylierung von SENP3 im weiteren Verlauf der Mitose entwickelt, wurde nach Arretierung der Zellen in der Prometaphase Nocodazol durch mehrmaliges Waschen aus dem Medium entfernt. Derart behandelte Zellen können den Arrest in der Prometaphase überwinden, indem sie in Abwesenheit von Nocodazol eine mitotische Spindel aufbauen und weiter in der Mitose und dem Zellzyklus voranschreiten. Als Kontrolle für die Progression in der Mitose diente dabei die Detektion der Menge an CyclinB, das zu Beginn der Anaphase abgebaut wird. Nach etwa 60min (Abb. 21C, Spur 4) wurde dabei eine zweite modifizierte Bande von SENP3 etwas unterhalb der jetzt schwächer werdenden hyperphosphorylierten Form sichtbar. Mit zunehmender Dauer nahm die hyperphosphorylierte Form dann immer mehr zugunsten tiefer laufender Banden ab (Abb. 21C, Spuren 5-9).

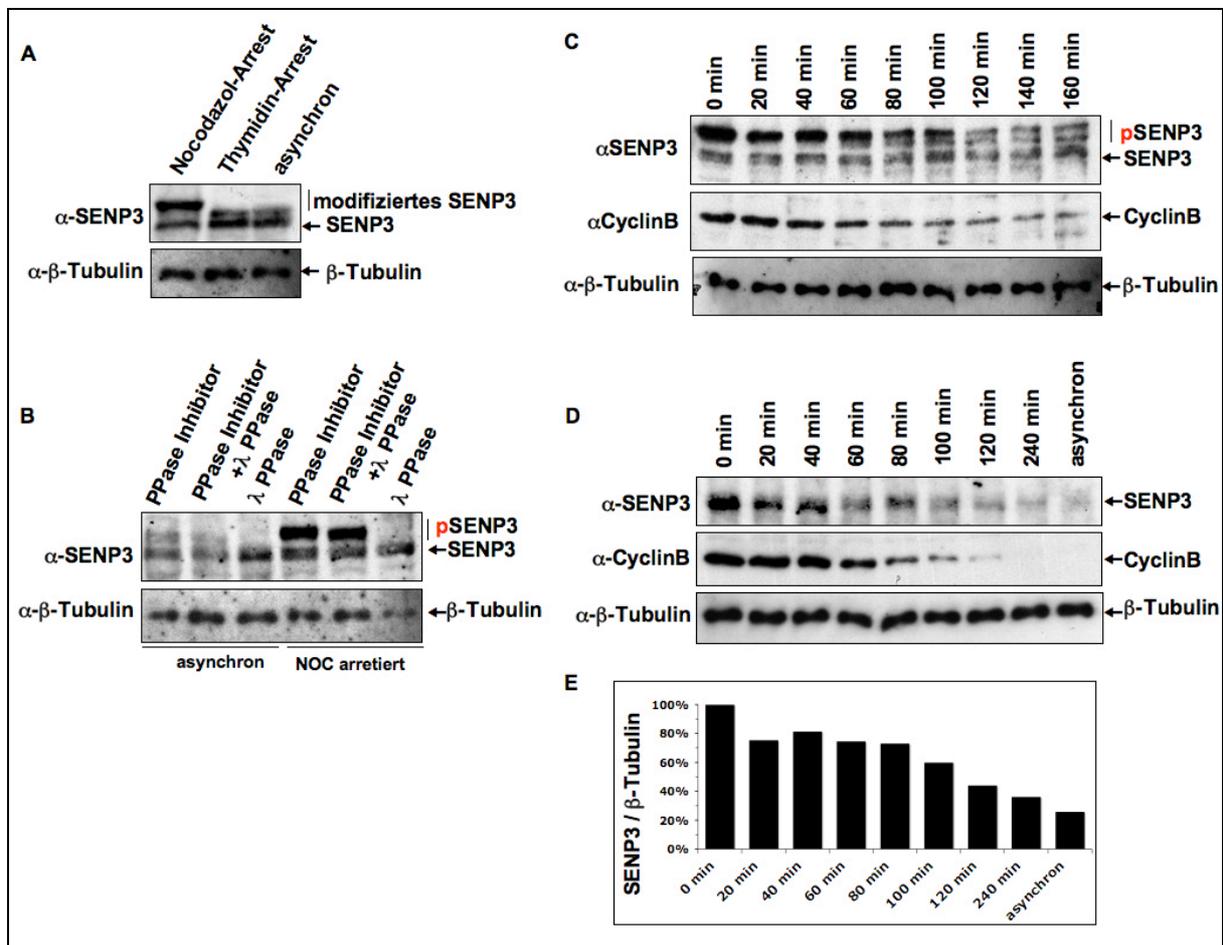


Abb. 21: SENP3 wird während der Mitose dynamisch phosphoryliert und abgebaut

(A) - (D) HeLa S3 Zellen wurden wie angegeben behandelt und Zelllysate in Western Blots mit den angegebenen Antikörpern getestet. Nocodazol arretierte Zellen wurden mit einem Doppel-Thymidin-Block vorsynchronisiert. (A) HeLa S3 Zellen wurden mit Nocodazol in der Prometaphase arretiert, mit Thymidin am G1/S-Übergang arretiert oder blieben unsynchronisiert. (B) Asynchrone oder mit Nocodazol arretierte HeLa S3 Zellen wurden nach Lyse mittels 0,5% NP40-Lysepuffer wie angegeben mit Phosphatase-Inhibitoren bzw. λ -Phosphatase behandelt. (C), (D) HeLa S3 Zellen wurden mit Nocodazol arretiert und nach dessen Entfernung für die angegebenen Zeitspannen inkubiert. (D) Proben wurden nach Lyse mit 0,5% NP40-Lysepuffer mit λ -Phosphatase behandelt. (E) Quantifizierung des Verhältnisses SENP3/ β -Tubulin.

Die Ergebnisse in Abb. 21C zeigen nicht nur eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus, sondern scheinen auch auf eine generelle Abnahme der Proteinmenge von SENP3 hinzuweisen. Da ein quantitativer Vergleich der Gesamtmenge an SENP3 in Abb. 21C aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens nicht möglich ist, wurden HeLa S3 Zellen wie in Abb. 21C behandelt und Lysate anschließend mit λ -Phosphatase inkubiert. Auf diese Weise konnte das Laufverhalten sämtlicher SENP3-Spezies zu allen Zeitpunkten angeglichen werden. Wie Abb. 21D und eine Quantifizierung des Verhältnisses SENP3/ β -Tubulin in Abb. 21E zeigen, nimmt auch die Gesamtmenge an SENP3 im Verlauf der Mitose dramatisch ab. So betrug die relative Proteinmenge von SENP3 240min nach Entfernen des Nocodazols noch etwa 36% des Wertes zum Zeitpunkt 0 und in asynchronen Zellen gar nur 26%. Da weitere Daten darauf hinweisen, dass die Transkription von SENP3 über den Zellzyklus hinweg konstant bleibt, scheint die Abnahme der Proteinmenge wohl auf einen vermehrten Abbau von SENP3 zurückzuführen zu sein. SENP3 scheint also sowohl über Phosphorylierung als auch einen Anstieg der Proteinmenge während der Mitose reguliert zu werden. Dies ist ein weiterer Hinweis für die Bedeutung von SENP3 während dieser Zellzyklusphase.

3.2.2 SENP3 wird während der Mitose an mehreren Stellen phosphoryliert

Um die Phosphorylierungsstellen von SENP3 zu kartieren, wurde Flag-SENP3 in HeLa S3 Zellen exprimiert, über anti-Flag M2 Agarose aufgereinigt und massenspektrometrisch untersucht. Die Zellen blieben entweder unsynchronisiert oder wurden mit Nocodazol bzw. Taxol arretiert. Im Gegensatz zu Nocodazol stört Taxol den Abbau der Mikrotubuli und verhindert, dass eine dynamische Spindel während der Mitose entstehen kann. Es aktiviert dadurch genau wie Nocodazol den SAC und arretiert Zellen in der Prometaphase, allerdings geht man davon aus, dass in Taxol-arretierten Zellen zumindest teilweise noch eine Anheftung von Mikrotubuli an das Kinetochor stattfinden kann. Gleichwohl können durch die fehlende Dynamik der Spindel keine Zugkräfte mehr am Kinetochor entstehen, sodass der SAC auf diesem Weg aktiviert wird. In Taxol-arretierten Zellen liegt also ein aktivierter SAC mit angehefteten Mikrotubuli vor, wohingegen in Nocodazol arretierten Zellen weder eine Anheftung stattfindet, noch Zugkräfte auftreten können. Da von einigen mitotischen Regulatoren wie etwa den Kinasen Aurora B oder Plk1 bekannt ist, dass sie als Sensoren für das Auftreten von Zugkräften am Kinetochor und die Anheftung von Mikrotubuli an das Kinetochor in unterschiedlicher Weise fungieren, wäre auch eine unterschiedliche Regulation der SENP3 Phosphorylierung in Nocodazol bzw. Taxol arretierten Zellen denkbar. In Abb. 22 ist bei Nocodazol- sowie Taxol-arretierten Zellen

Ergebnisse

eine deutlich höhermolekulare Spezies von Flag-SEN3 verglichen mit asynchronen Zellen zu erkennen. Die schematische Darstellung der Ergebnisse aus der massenspektrometrischen Analyse der jeweils ausgeschnittenen hyperphosphorylierten bzw. hypophosphorylierten Form von Flag-SEN3 zeigt, dass im Falle von Nocodazol-arretierten Zellen zu den bereits in asynchronen Zellen vorhandenen vier phosphorylierten Aminosäuren acht weitere hinzukommen. Da die Peptidabdeckung der massenspektrometrischen Analyse etwa im Bereich von 45% liegt (Anhang Abb. 2), ist die wahre Anzahl an Phosphorylierungsstellen vermutlich noch höher. Im Vergleich zu Nocodazol fehlt in Taxol-arretierten Zellen in der Tat eine dieser Mitose-spezifischen Phosphorylierungen, nämlich an Threonin229. Dies könnte ein Hinweis auf eine spezifische Regulation von SEN3 innerhalb der zwei unterscheidbaren Phasen des SAC – die Anheftung von Mikrotubuli an das Kinetochor und das Auftreten von Zugkräften am Kinetochor – sein.

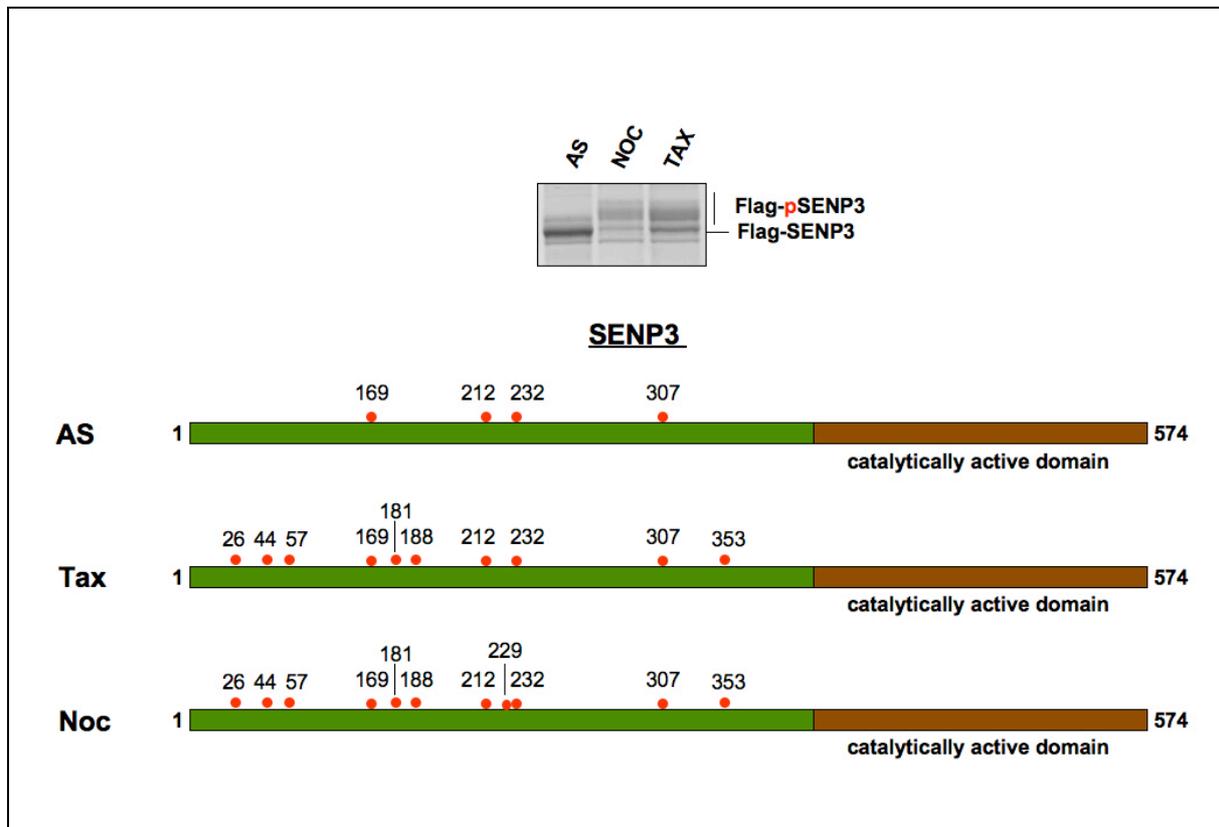


Abb. 22: Kartierung der Phosphorylierungsstellen von SEN3

Flag-SEN3 wurde in humanen HeLa S3 Zellen, die mit Nocodazol bzw. Taxol arretiert wurden oder asynchron wuchsen, exprimiert und über eine anti-Flag M2 Agarose-Säule affinitätsgereinigt. Gebundene Proteine wurden mit Flag-Peptid eluiert, über SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie Brilliant Blue R-250 angefärbt. Die hypophosphorylierte Bande von asynchronen sowie die hyperphosphorylierten Banden aus Nocodazol bzw. Taxol arretierten Zellen wurden ausgeschnitten und die Proteine massenspektrometrisch analysiert. Die schematische Darstellung zeigt eine Kartierung der Phosphorylierungsstellen von SEN3. AS = asynchron, Noc = Nocodazol, Tax = Taxol.

3.2.3 SENP3 interagiert mit Plk1

3.2.3.1 SENP3 interagiert mit Plk1 im yeast two hybrid System

Wie bereits erwähnt fungieren mitotische Kinasen als kritische Regulatoren der Mitose. Vor dem Hintergrund der Mitose-spezifischen Phosphorylierung von SENP3 sollten die drei wichtigsten mitotischen Kinasen - Plk1, Cdk1 und Aurora B - in einem gerichteten *yeast two hybrid* Versuch auf eine Interaktion mit SENP3 überprüft werden. Im Falle von Plk1 wurde zusätzlich dessen Bindedomäne PBD (*polo box binding domain*), über die Plk1 zu seinen Substraten rekrutiert wird, auf Interaktion mit SENP3 überprüft. Aus Abb. 23 wird ersichtlich, dass SENP3 mit Plk1 sowie PBD interagiert, wohingegen zumindest in diesem experimentellen System keine Interaktion von SENP3 mit Cdk1 und Aurora B zu erkennen war.

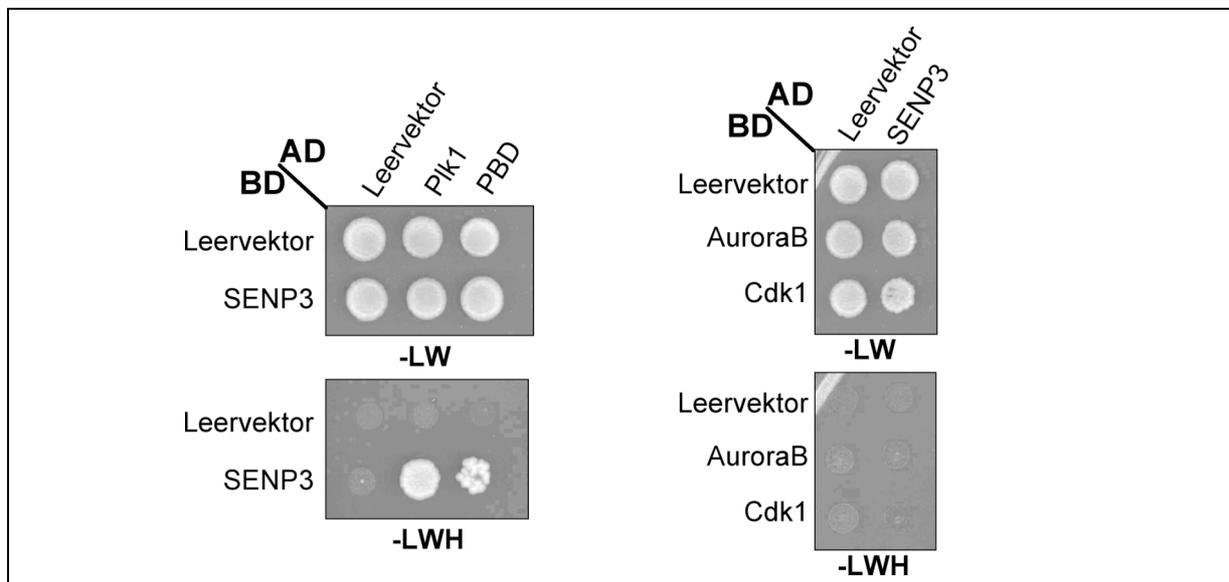


Abb. 23: SENP3 interagiert mit Plk1 im yeast two hybrid System

Der Hefestamm PJ69-7a wurde mit den angegebenen Konstrukten transformiert und in gleichen Mengen auf Selektionsplatten ausgetüpfelt. AD: Konstrukte, die mit der GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert wurden; BD : Konstrukte, die mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne fusioniert wurden. L = Leucin, W = Tryptophan, H = Histidin.

3.2.3.2 Die Interaktion mit Plk1 ist abhängig vom Phosphorylierungsstatus von SENP3

Die PBD von Plk1 erkennt in seinen Interaktionspartnern gewöhnlich ein kurzes, präphosphoryliertes Sequenzmotiv des S-pS/pT-P-Typs. Die Kürze dieser Erkennungssequenz macht es möglich, Interaktionspartner von Plk1 mit der sogenannten Farwestern-Methode zu untersuchen. Diese Technik wurde sich zu Nutze gemacht, um die Interaktion zwischen SENP3 und Plk1 näher zu analysieren. Es sollte zunächst untersucht werden, ob auch im Falle von SENP3 eine Präphosphorylierung vonnöten ist, um mit Plk1 zu interagieren. Zunächst wurde Flag-

Ergebnisse

SENP3 in unsynchronisierten und Nocodazol arretierten HeLa S3 Zellen exprimiert und über anti-Flag M2 Agarose aufgereinigt. Flag-SENP3 aus Nocodazol arretierten Zellen wurde entweder nicht behandelt oder mit λ -Phosphatase vollständig dephosphoryliert. Danach wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und anschließend mit rekombinanter GST-PBD inkubiert. Gebundenes GST-PBD wurde im Anschluss daran mit einem gegen GST gerichteten Antikörper detektiert. Abb. 24 verdeutlicht, dass eine Phosphorylierung von SENP3 essentiell für die Interaktion mit PBD ist, da dephosphoryliertes SENP3 nicht mehr in der Lage war, GST-PBD zu binden (Abb. 24A Spur 2). Phosphoryliertes SENP3 aus Nocodazol arretierten Zellen hingegen zeigte eine starke Wechselwirkung mit GST-PBD (Abb. 24A, Spur 3), während SENP3 aus asynchron wachsenden Zellen nur relativ schwach mit PBD interagierte (Abb. 24A, Spur 3). PBD bindet also im Farwestern-Ansatz an phosphoryliertes SENP3.

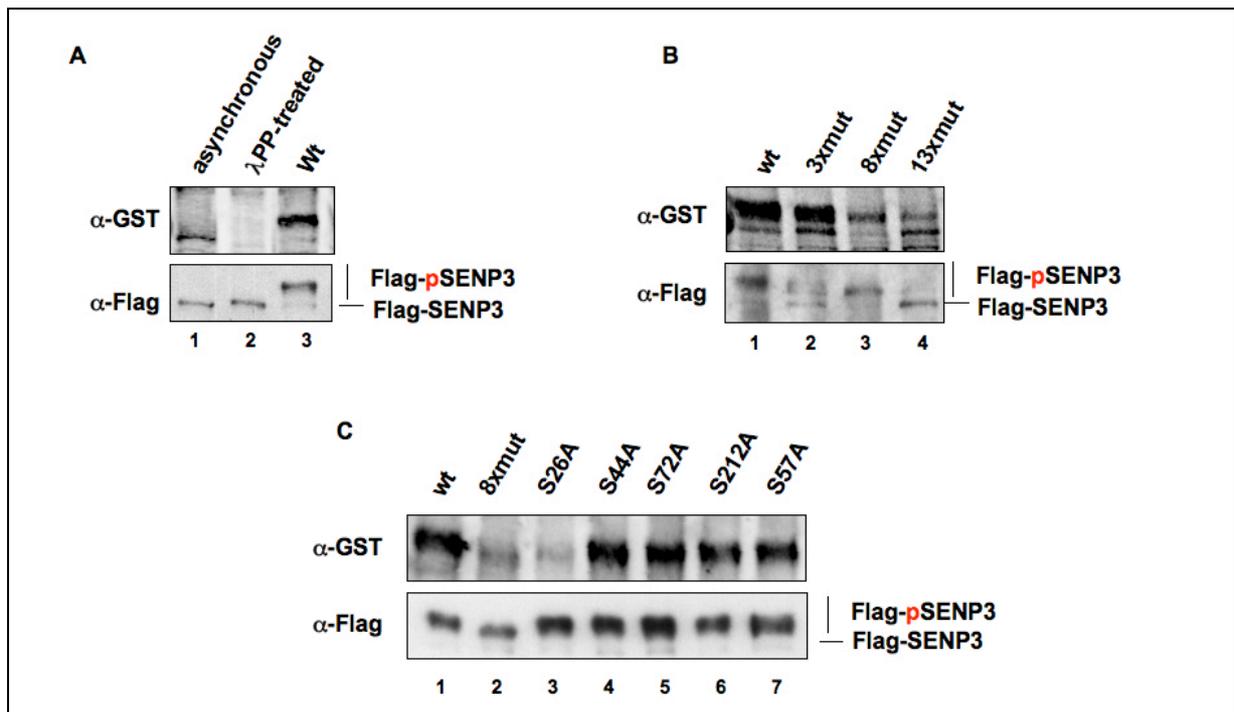


Abb. 24: SENP3 interagiert phosphorylierungsabhängig mit Plk1

(A) – (C) Verschiedene Varianten von SENP3 wurden in HeLa S3 Zellen exprimiert und über eine anti-Flag M2 Agarose-Säule affinitätsgereinigt. Gebundene Proteine wurden über SDS-PAGE getrennt und in einem Western Blot in Form einer Farwestern-Analyse mit rekombinantem GST-PBD, anti-GST Antikörper aus Kaninchen und anti-Kaninchen-IgG-Antikörper getestet. (A) Flag-SENP3 wurde in asynchronen (Spur 1) oder Nocodazol- arretierten Zellen, die mit λ -Phosphatase behandelt wurden (Spur 2) oder unbehandelt blieben (Spur 3) exprimiert und einer Farwestern-Analyse unterzogen. (B), (C) Verschiedene Flag-SENP3 Varianten wurden in Nocodazol-arretierten Zellen exprimiert und einer Farwestern-Analyse unterzogen. 3xmut = T121A, T229A, T353A; 8xmut = S26A, S44A, T57A, S73A, T121A, S212A, T229A, T353A; 13xmut = S26A, S44A, T57A, S73A, T121A, S169A, S181A, S188A, S212A, S232A, S238A, T307A, T353A.

3.2.3.3 Phosphoryliertes Serin26 dient als Andockstelle für Plk1 an SENP3

Nachdem die Phosphorylierungsstellen von SENP3 identifiziert worden waren und sich die Farwestern-Analyse als geeignete Methode erwiesen hatte, eine von der Phosphorylierung abhängige Interaktion von Plk1 und SENP3 nachzuweisen, sollte die Bindungsstelle von Plk1 auf SENP3 kartiert werden. In einem ersten Ansatz wurden dabei die bisher identifizierten Phosphorylierungsstellen von SENP3 in Gruppen mutiert und wie in 3.2.3.2 in einer Farwestern-Analyse auf Interaktion mit GST-PBD untersucht. Hier zeigte sich, dass eine Mutante, bei der drei Phosphorylierungsstellen gegen Alanine ausgetauscht wurden, noch immer in der Lage war, GST-PBD zu binden (Abb. 24B, Spur 2), wohingegen eine Version mit acht mutierten Phosphorylierungsstellen, die die Mutationen der dreifach-Mutante und fünf weitere Mutationen enthielt, dazu nur noch sehr eingeschränkt fähig war (Abb. 24B, Spur 3). Eine Version von SENP3, bei der alle zwölf identifizierten Phosphorylierungsstellen und eine zusätzliche putative Plk1-Phosphorylierungsstelle mutiert worden waren, zeigte ebenfalls nur eine äußerst schwache Wechselwirkung mit GST-PBD (Abb. 24B, Spur 4). Somit konnte die Zahl möglicher Plk1 Bindungsstellen von SENP3 auf fünf eingegrenzt werden. Diese fünf Aminosäuren - Serin26, Serin44, Threonin57, Serin73 und Serin212 - wurden schließlich einzeln zu Alaninen mutiert und diese Mutanten wieder in einer Farwestern-Analyse untersucht. Abb. 24C zeigt, dass S26A als einzige dieser Mutanten nicht mehr in der Lage war, GST-PBD zu binden (Abb. 24C, Spur 3). Die Tatsache, dass Serin26 dabei innerhalb einer Cdk1-Konsensussequenz (S²⁵-pS²⁶-P²⁷) liegt, ist ein zusätzlicher Hinweis darauf, dass es sich hierbei um eine PBD-Bindestelle handelt, für die eine Präphosphorylierung durch Cdk1 benötigt wird.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass SENP3 einer mitotischen Regulation in Form von Phosphorylierung und eventuell Proteindegradation unterliegt und eine spezifische Phosphorylierung an Serin26 die Interaktion mit der mitotischen Kinase Plk1 vermittelt.

Eine funktionelle Konsequenz der Bindung von Plk1 an SENP3 könnte die Plk1-vermittelte Phosphorylierung von SENP3 sein. Daneben ist aber auch denkbar, dass SENP3 als demodifizierendes Enzym für Plk1 fungiert. Interessanterweise zeigte ein erster Versuch zur *in vitro* Sumoylierung von Plk1 (Abb. 25A), dass Plk1 sowohl mit SUMO1 als auch mit SUMO2 sehr effizient modifiziert wird. Ob Plk1 *in vivo* ein mitotisches Substrat für SUMO darstellt und SENP3 am Demodifikationsprozess beteiligt ist, müssen weitere Untersuchungen klären.

Ergebnisse

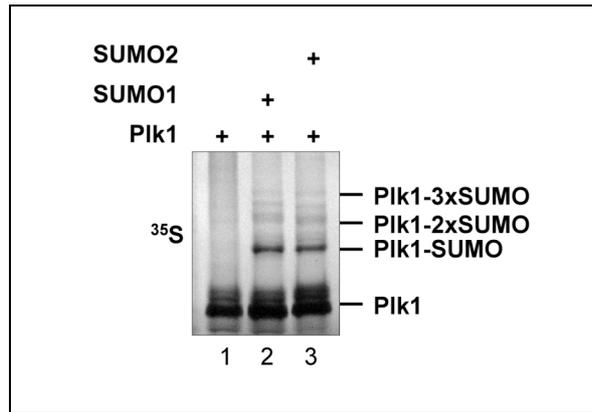


Abb. 25: PIK1 wird *in vitro* sumoyliert

³⁵S-markiertes, durch *in vitro* Transkription/Translation generiertes PIK1 wurde mit rekombinantem E1, E2 und SUMO1 (Spur 2) bzw. SUMO2 (Spur 3) in der Anwesenheit von ATP inkubiert. Die Kontrollreaktion (Spur 1) enthielt kein SUMO.

3.2.4 SENP3 interagiert mit Borealin und katalysiert dessen Desumoylierung

Während eine direkte Beteiligung von SENP3 bei der Desumoylierung von PIK1 noch unklar ist, konnte ein erstes mitotisches Substrat von SENP3 jedoch in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Erich Nigg (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) identifiziert werden. Ausgangspunkt dieser Arbeiten war dabei ein *two hybrid screen*, bei dem Interaktionspartner der CPC-Komponente Borealin identifiziert werden sollten (Klein et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Im Rahmen dieses *screens* wurden zunächst Ubc9 und SUMO1 als Interaktionspartner von Borealin gefunden. Weitere Untersuchungen konnten schließlich zeigen, dass Borealin *in vivo* und *in vitro* ein Substrat für eine Modifikation mit SUMO1 und SUMO2/3 ist (Abb. 26), unter endogenen Bedingungen jedoch präferenziell eine Modifikation mit SUMO2/3 erfolgt. Diese Modifikation scheint in der Metaphase - einer Phase, in der sich der CPC an den Centromeren befindet - ihr Maximum zu erreichen (Abb. 26A, Spur 6).

Als weitere regulatorische Komponenten für einen Zyklus von Sumoylierung und Desumoylierung von Borealin konnten schließlich die SUMO-E3-Ligase RanBP2 und SENP3 als SUMO-Isopeptidase identifiziert werden. Zunächst konnte eine Interaktion von SENP3 bzw. RanBP2 mit Borealin im *yeast two hybrid* System und über Immunpräzipitationsexperimente in humanen HeLa S3 Zellen (Klein et al., zur Veröffentlichung eingereicht, Markus Haindl, unveröffentlichte Daten) gezeigt werden. Versuche mit transienter Überexpression konnten SENP3 dabei *in vivo* als dekonjugierendes Enzym für SUMO2/3-modifiziertes Borealin beschreiben. Schließlich konnte durch eine siRNA-vermittelte Verminderung des Expressionsniveaus von SENP3 und RanBP2 gezeigt werden, dass beide Enzyme auch unter physiologischen Bedingungen am Sumoylierungs-/Desumoylierungs-Zyklus von Borealin beteiligt sind (Abb. 26C). Ein *in vitro* Experiment zur Demodifikation von Borealin untermauerte

Ergebnisse

dabei zusätzlich den Befund, dass die katalytische Aktivität von SENP3 direkt für die Demodifikation von SUMO2/3-modifiziertem, nicht aber SUMO1-modifiziertem Borealin benötigt wird (Abb. 26B, Spuren 3 und 8).

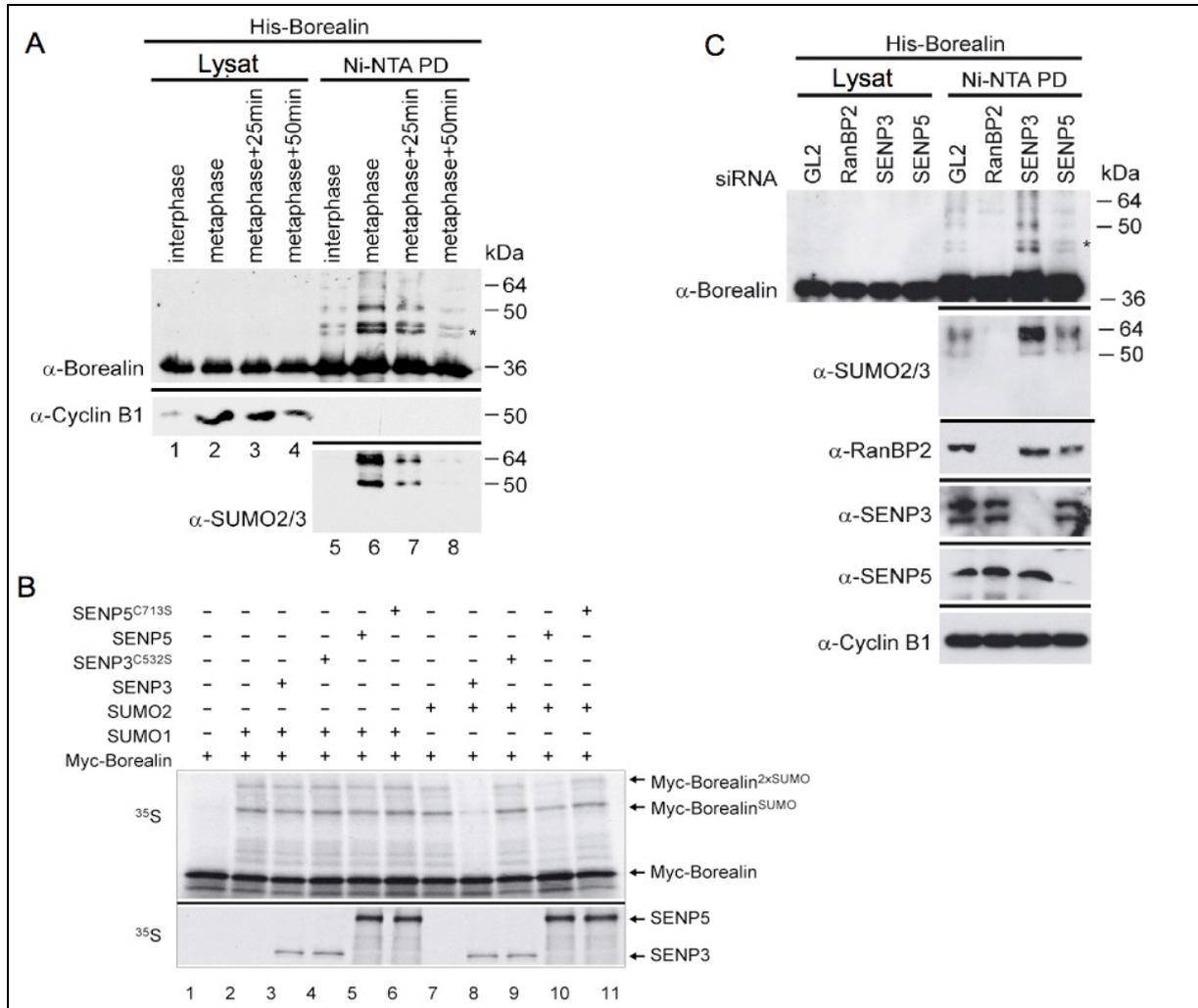


Abb. 26: Borealin wird sumoyliert und SENP3 katalysiert die Demodifikation

(A) HeLa S3 Zellen wurden mit His₆-Borealin transfiziert und mit 2mM Thymidin am G1/S-Übergang arretiert, mit 1 μ M Taxol in der Prometaphase arretiert oder nach Entfernen von Taxol für die angegebenen Zeitspannen inkubiert. His₆-Borealin Konjugate wurden über magnetische Ni-NTA *beads* aufgereinigt und in einem Western Blot mit anti-HA Antikörper untersucht. Die Expression der jeweiligen Proteine wurde in Western Blots mit den entsprechenden Antikörpern überprüft. Abbildung aus: (Klein et al., zur Veröffentlichung eingereicht) **(B)** ³⁵S-markiertes, durch *in vitro* Transkription/Translation generiertes Myc-Borealin wurde mit rekombinantem E1, E2 und SUMO1 (Spur 2-6) bzw. SUMO2 (Spur 7-11) in der Anwesenheit von ATP inkubiert. Die Kontrollreaktion (Spur 1) enthielt kein SUMO. Nach der Modifikationsreaktion wurde *in vitro* transkribiertes/translatiertes SENP3 oder SENP5 bzw. deren katalytisch inaktive Mutanten wie angegeben hinzugegeben. Die Menge an SENP3 bzw. SENP5 und deren Mutanten sind in dem unteren Autoradiogramm gezeigt. **(C)** HeLa S3 Zellen wurden mit den angegebenen siRNA-Oligonukleotiden transfiziert, mit 2mM Thymidin in der S-Phase arretiert und nach Wegnahme des Thymidins für 10h wachsen gelassen, damit sie die Mitose erreichen. His₆-SUMO Konjugate wurden über magnetische Ni-NTA *beads* aufgereinigt und in einem Western Blot mit anti-HA Antikörper untersucht. Die Expression der jeweiligen Proteine wurde in Western Blots mit den entsprechenden Antikörpern überprüft. Abbildung aus: (Klein et al., zur Veröffentlichung eingereicht).

Die funktionellen Konsequenzen einer SUMO-Modifikation von Borealin blieben im Rahmen der Untersuchung von Klein et al. offen. Zumindest die Lokalisation von Borealin und des gesamten CPC am Centromer wurde von der Modifikation mit SUMO jedoch nicht kompromittiert.

3.2.5 Depletion von SENP3 verzögert den Beginn der Anaphase

Da die bisherigen Daten für eine mitotische Funktion von SENP3 sprechen, sollte im Weiteren untersucht werden, welche mitotischen Prozesse SENP3 reguliert. Hierzu wurde die Auswirkung einer siRNA-vermittelten Depletion von SENP3 auf den zeitlichen Verlauf der Mitose untersucht. Als Analyse-Methode bot sich hier Zeitraffer-Mikroskopie an, da mit dieser Methode das dynamische Verhalten von Zellen über den gesamten Verlauf der Mitose verfolgt werden kann. Um die Dynamik der DNA bzw. der Chromosomen zu analysieren wurde eine HeLa S3 Zelllinie gewählt, die ein stabil in ihr Genom integriertes Histon H2B enthielt, das mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) markiert war. Nach Depletion von SENP3 stellte sich heraus, dass die einzelnen Stadien der Mitose in Abwesenheit von SENP3 zwar normal durchlaufen werden, die Zeitspanne von der Kondensation der DNA zu Beginn der Mitose bis zum Beginn der Anaphase, d.h. der Trennung der Schwesterchromatiden jedoch enorm verlängert war (Abb. 27A). Eine Quantifizierung dieser in Abb. 27A exemplarisch gezeigten verlängerten Zeitspanne ergab eine mittlere Dauer von 79min in SENP3-depletierten Zellen. Dem steht eine durchschnittliche Dauer von 37min in Zellen, die mit einem Kontroll-Oligonukleotid behandelt wurden, gegenüber (Abb. 27B). Um eventuelle Sekundäreffekte eines einzelnen siRNA-Oligonukleotids auszuschließen, wurde SENP3 noch mit einer zweiten siRNA depletiert. Hier verlängerte sich die mittlere Zeitspanne bis zum Beginn der Anaphase sogar bis auf 97 Minuten (Anhang Abb. 5). Da nachfolgende Phasen der Mitose bei Depletion von SENP3 wieder normal abzulaufen scheinen, deutet dieses Ergebnis auf eine Aufgabe von SENP3 in frühen mitotischen Stadien bis zum Beginn der Anaphase hin.

Ergebnisse

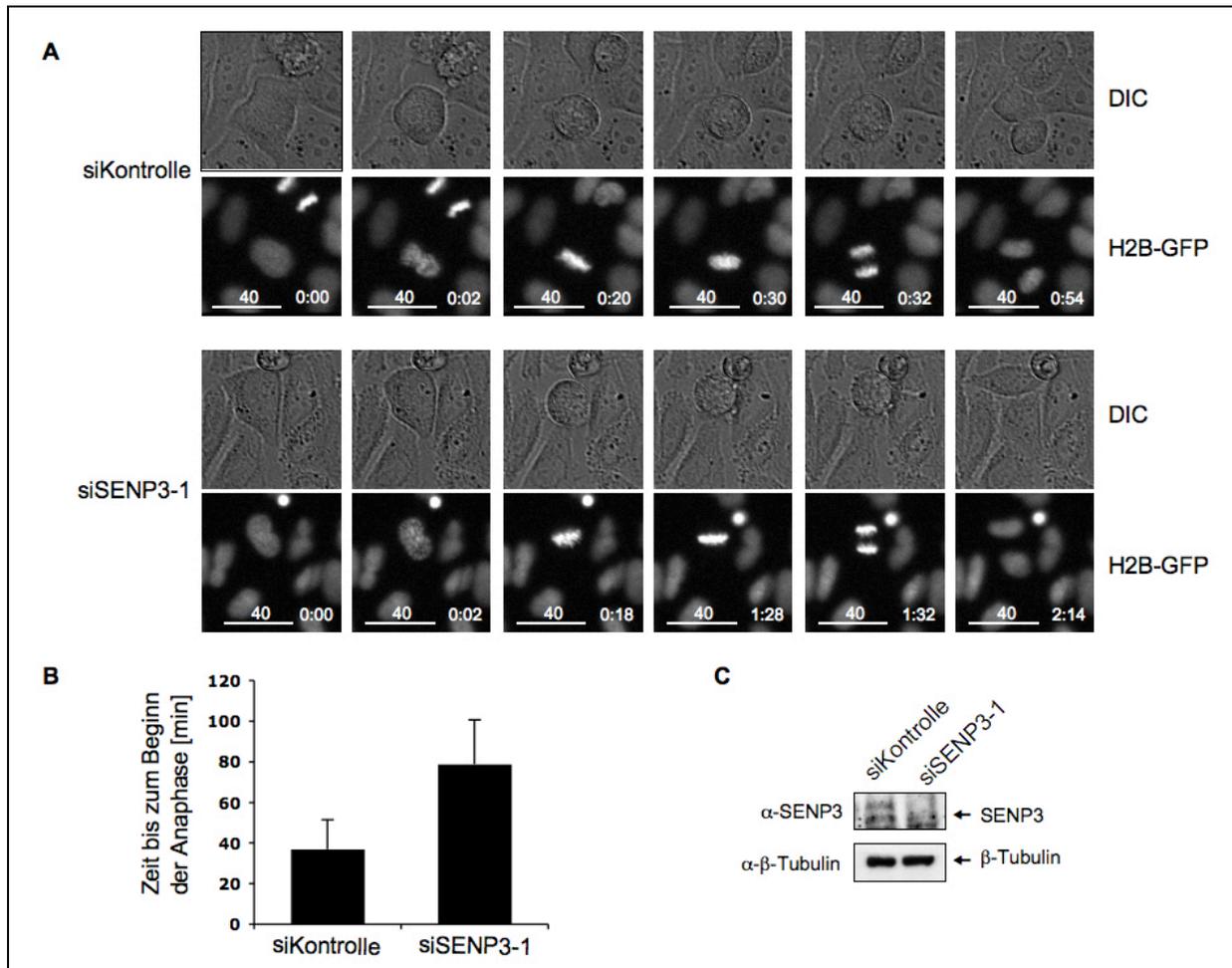


Abb. 27: Depletion von SENP3 verzögert den Beginn der Anaphase

(A) HeLa S3 Zellen mit stabil integriertem Histon H2B-GFP wurden wie angegeben mit siRNA Oligonukleotiden behandelt. Die Einzelbilder sind repräsentative Aufnahmen und zeigen das Fortschreiten einzelner Zellen in der Mitose zu den angegebenen Zeitpunkten. Maßstab: 40 μ m, Zeit [h:min] (B) Quantifizierung der Zeitspanne zwischen DNA-Kondensation und Beginn der Anaphase (C) Kontrolle der Depletion von SENP3 in diesem Experiment in Form eines Western Blots.

3.2.6 SENP3 beeinflusst den *spindle assembly checkpoint*

Einen Hinweis auf eine mögliche Funktion von SENP3 in der frühen Mitose lieferte ein *screen* der Arbeitsgruppe um Steven Elledge. In dieser systematischen Analyse wurde nach Proteinen gesucht, deren Depletion die Funktion des SAC beeinträchtigt. Charakteristischerweise führt die Depletion von SAC-Komponenten zu einem fehlerhaften Überschreiten des SAC in Anwesenheit von Spindelgiften wie Nocodazol oder Taxol. Dies manifestiert sich im Auftreten von Zellen mit mehrlappigen Interphase-Nuklei statt kondensierter mitotischer DNA. SENP3 wurde dabei als eines der Kandidaten-Proteine identifiziert, nach deren Depletion derartige mehrlappige Interphase-Nuklei auftreten. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden HeLa S3 Zellen nach siRNA-vermittelter Depletion von SENP3 für 24h mit Nocodazol behandelt und der Zellzyklusstatus anschließend anhand einer FACS-Analyse untersucht. Im Normalfall sollten Zellen in Gegenwart von Nocodazol aufgrund des Fehlens einer

Ergebnisse

mitotischen Spindel in der Prometaphase mit aktiviertem SAC arretieren und einen DNA-Gehalt von 4n aufweisen. Wird dieser Arrest allerdings durch eine Misregulation etwaiger SAC-Komponenten fehlerhaft überschritten, sollte es den Zellen möglich sein – wenn auch fehlerhaft – die Mitose zu durchlaufen und in die G1 Phase des Zellzyklus einzutreten. Im Falle von Kontrollzellen in Abb. 28 war eine deutliche Akkumulation von Zellen mit einem DNA-Gehalt von 4n nach Behandlung mit Nocodazol zu erkennen. Nach Depletion von Mad2 hingegen – einer essentiellen Komponente des SAC – nahm die Menge an 4n-Zellen drastisch zugunsten von 2n-Zellen ab. Derselbe Effekt war auch in SENP3-depletierten Zellen, allerdings etwas abgeschwächt, zu erkennen. Auch hier nahm die 2n- auf Kosten der 4n-Zellpopulation zu. Diese FACS-gestützte Analyse bestätigt damit eine Funktion von SENP3 im SAC.

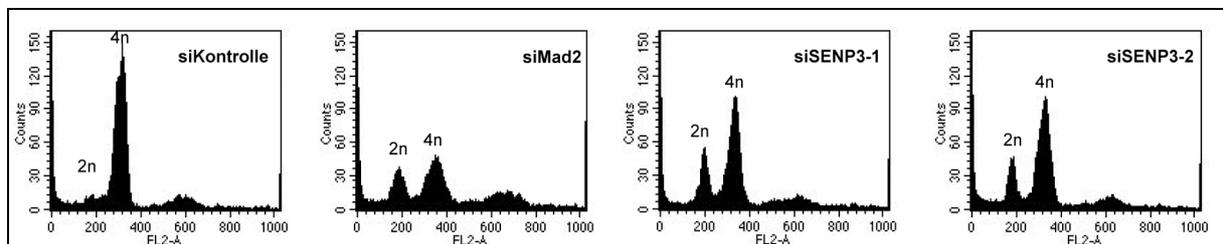


Abb. 28: SENP3 beeinflusst den *spindle assembly checkpoint*

FACS-Analyse von HeLa S3 Zellen, die wie angegeben mit siRNA-Oligonukleotiden transfiziert und für 24h mit Nocodazol behandelt wurden. Sowohl von der Zellkultur-Schale abgelöste als auch adhärenente Zellen wurden geerntet und nach Propidiumjodid-Färbung des Chromatins auf ihren DNA Gehalt untersucht. Es wurde die Menge an Zellen (*counts*) gegen den DNA-Gehalt (integriertes Signal des FL2-Kanals, FL2-A) aufgetragen.

3.2.7 Lokalisierung von SAC-Proteinen nach Depletion von SENP3

Der genaue Mechanismus, wie der SAC die fehlende Anheftung von Mikrotubuli am Kinetochor erkennt und daraufhin ein primäres Signal weiterleitet, ist nur unvollständig verstanden. Essentiell scheint jedoch dafür die korrekte Lokalisierung von SAC-Komponenten am Kinetochor zu sein, da die Mislokalisierung einzelner Proteine meist zu einem Verlust eines funktionsfähigen SAC führt (Chen et al., 1998; Taylor et al., 1998). Die meisten der bisher bekannten SAC-Proteine scheinen dabei für die korrekte Lokalisierung von Mad2 erforderlich zu sein und befinden sich somit in dieser Signalkaskade oberhalb von Mad2 (Vigneron et al., 2004). Aufgrund dieser Abhängigkeiten lässt sich anhand der Lokalisierung von Mad2 und anderer SAC Komponenten folglich eine erste Abschätzung treffen, an welchem Punkt in der SAC-Signalkaskade SENP3 erforderlich ist.

Zu diesem Zweck wurden HeLa S3 Zellen nach Transfektion mit einem SENP3-spezifischen sowie einem Kontroll-siRNA-Oligonukleotid mit einem Doppel-Thymidinblock vorsynchronisiert und mit Nocodazol behandelt, um den SAC zu

Ergebnisse

aktivieren. Da - wie in 3.2.6 gezeigt - eine Depletion von SENP3 jedoch zu einem fehlerhaften Überschreiten eines Nocodazol-induzierten Prometaphase-Arrests führt, mussten die Zellen noch zusätzlich mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 vor der Anaphase arretiert werden (Schema, Anhang Abb. 3). MG132 verhindert dabei den APC/C-vermittelten, Ubiquitin-abhängigen Abbau von Securin und CyclinB und verhindert so die Induktion der Anaphase. Für die indirekte Immunfluoreszenz wurde CREST-Antiserum als Kinetochor/Centromer-Marker benutzt. Abb. 29 verdeutlicht, dass keines der exemplarisch getesteten SAC-Proteine nach Depletion von SENP3 mislokalisiert. Jedes der Proteine zeigt nämlich die für SAC-Proteine typische Lokalisation an den Enden des Centromers. Sowohl Hec1, das eine essentielle Funktion bei der Anheftung von Mikrotubuli an Kinetochore und der Stabilität dieser Interaktion hat (DeLuca et al., 2006), als auch BubR1, das zusammen mit Mad2 und Bub3 einen inhibitorischen Komplex mit Cdc20, den sogenannten MCC (*mitotic checkpoint complex*) bildet (Sudakin et al., 2001), lokalisierten in SENP3-depletierten Zellen normal (Abb. 29A und B). Auch Mad2 selbst (Abb. 29D) sowie dessen Zielprotein Cdc20 (Abb. 29C) akkumulierten trotz einer effektiven Depletion von SENP3 (Abb. 29E) noch an Kinetochoren. Auch ein zweites siRNA-Oligonukleotid, das ebenfalls zu einer effektiven Verringerung des Expressionsniveaus von SENP3 führte, hatte keine Mislokalisierung eines der getesteten SAC-Proteine zur Folge (Anhang Abb. 6). Als Positivkontrolle diente die Depletion von PICH, einer ATPase der SNF2-Familie, die gemäß publizierter Daten (Baumann et al., 2007), eine selektive Mislokalisierung von Mad2 zur Folge hatte (Anhang Abb. 6 D).

Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass die Depletion von SENP3 nicht wie die Depletion der meisten SAC-Komponenten zu einer Mislokalisierung von Mad2 führt und damit unterhalb oder parallel von Mad2 in der SAC-Signalkaskade agiert.

Ergebnisse

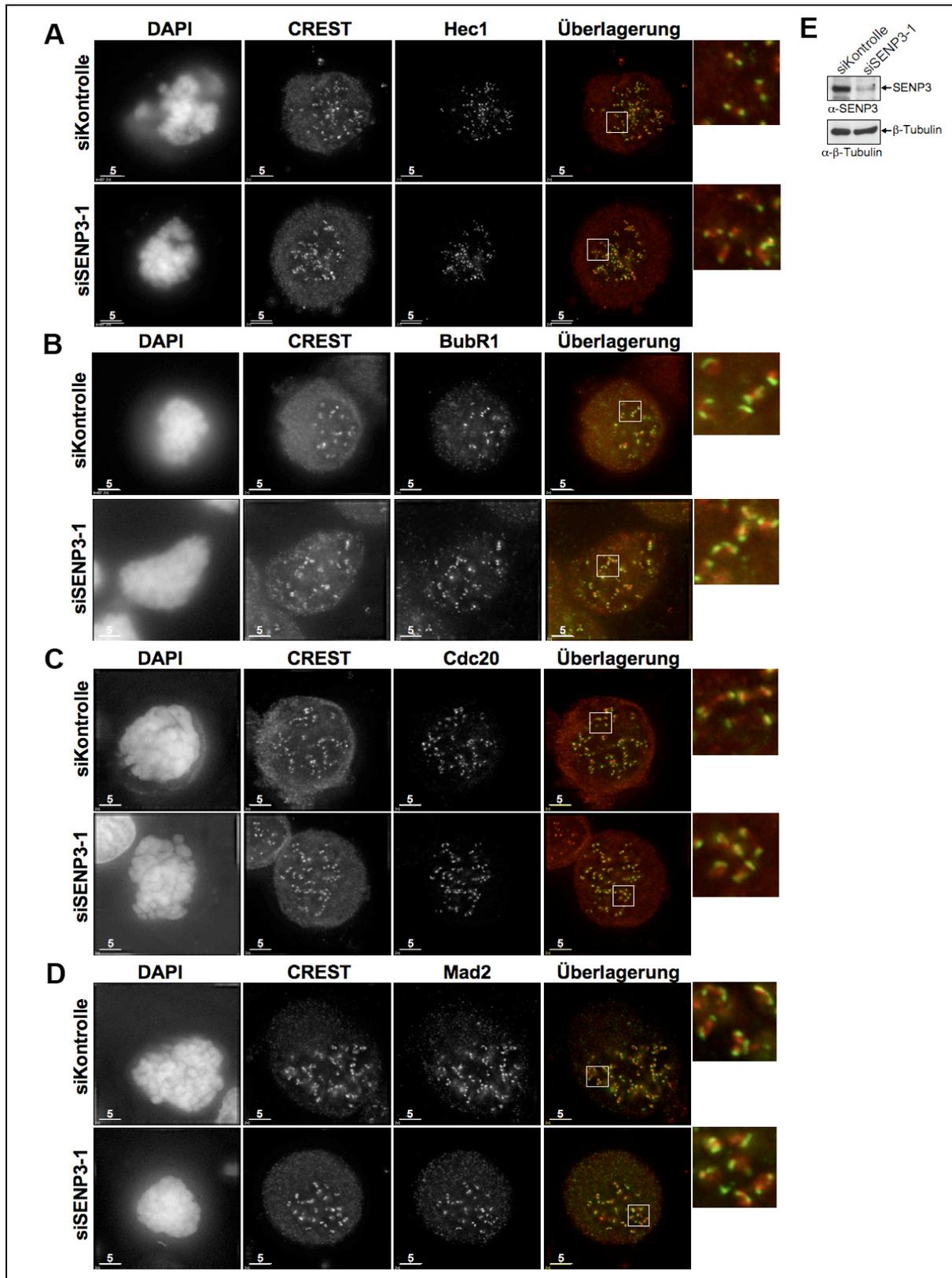


Abb. 29: Lokalisierung von SAC-Proteinen nach Depletion von SENP3

(A) – (D) Die Lokalisierung einzelner SAC-Proteine in HeLa S3 Zellen wurde nach Transfektion des angegebenen siRNA-Oligonukleotids anhand immunologischer Färbung mit den angegebenen Antikörpern bestimmt (grün). DNA wurde mit DAPI angefärbt. CREST-Antiserum (rot) wurde als Kinetochor/Centromer-Marker benutzt. Maßstab: 5µm. Einzelne Kinetochor-Paare wurden vierfach vergrößert. (E) Depletion von SENP3 in den für diesen Versuch benutzten Zellen.

3.2.8 Cdc20 wird *in vitro* mit SUMO modifiziert

Einen Hinweis auf eine Funktion von SENP3 unterhalb von Mad2 in der SAC-Signalkaskade lieferte eine Untersuchung zur *in vitro* Sumoylierung verschiedener SAC-Proteine. Hier zeigte sich, dass Cdc20 im Vergleich zu dem bereits als SUMO-Substrat beschriebenen BubR1 (Zhang et al., 2008) sehr effektiv mit SUMO1 und SUMO2 modifiziert werden kann (Abb. 30, Spuren 14 und 15). Andere exemplarisch getestete SAC-Proteine hingegen (Mad1, Bub3, Mad2) konnten in diesem Ansatz nicht sumoyliert werden (Abb. 30, Spuren 4 - 12) und zeigen so die Spezifität dieses Versuches.

Cdc20 wird also *in vitro* mit SUMO modifiziert. Wie in der Diskussion beschrieben, könnte diese Sumoylierung ähnlich wie die Ubiquitinierung von Cdc20 (Stegmeier et al., 2007) ein Mechanismus sein, über den die Weiterleitung des SAC-Signals über die Regulation von Interaktionen seitens Cdc20 gesteuert wird.

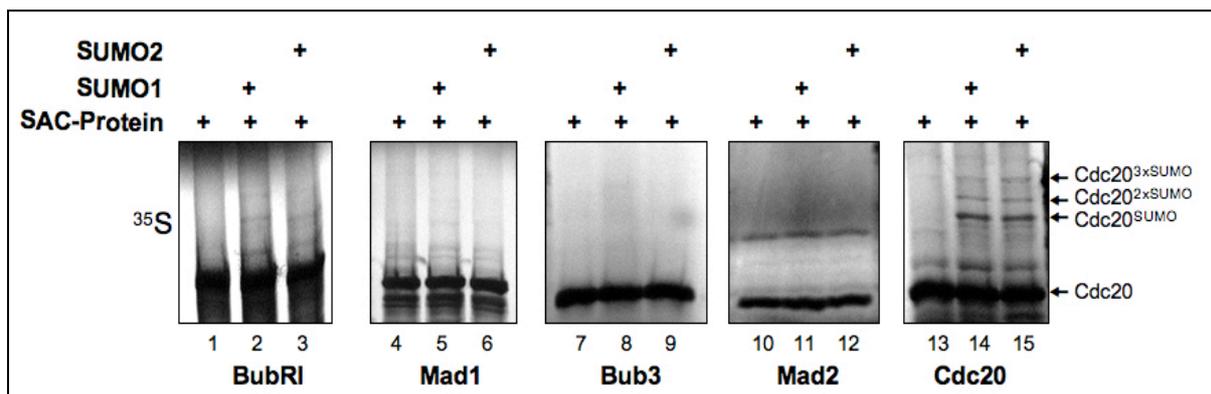


Abb. 30: *in vitro* Sumoylierung von SAC-Proteinen

³⁵S-markiertes, *in vitro* translatiertes BubR1, Mad1, Bub3, Mad2 und Cdc20 wurden mit rekombinantem E1, E2 und SUMO1 (Spuren 2, 5, 8, 11, 14) bzw. SUMO2 (Spuren 3, 6, 9, 12, 15) in Anwesenheit von ATP inkubiert. Die Kontrollreaktionen (Spuren 1, 4, 7, 10, 13) enthielten kein SUMO.

3.3 Die Rolle von SENP6 in der Mitose

3.3.1 Depletion von SENP6 verhindert den Arrest von Zellen mit Nocodazol

Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Funktion von SENP3 deuten darauf hin, dass eine Dekonjugation von SUMO2/3 für eine korrekte Funktion des SAC erforderlich ist. Im Weiteren sollte nun geprüft werden, ob auch andere Mitglieder der humanen SENP-Familie den spindle assembly checkpoint beeinflussen.

Zu diesem Zweck wurden HeLa S3 Zellen nach Depletion der entsprechenden Proteine mit einem doppelten Thymidinblock synchronisiert und nach Freisetzung aus

Ergebnisse

diesem Block mit Nocodazol behandelt, um den SAC zu aktivieren und einen Arrest in der Prometaphase herbeizuführen.

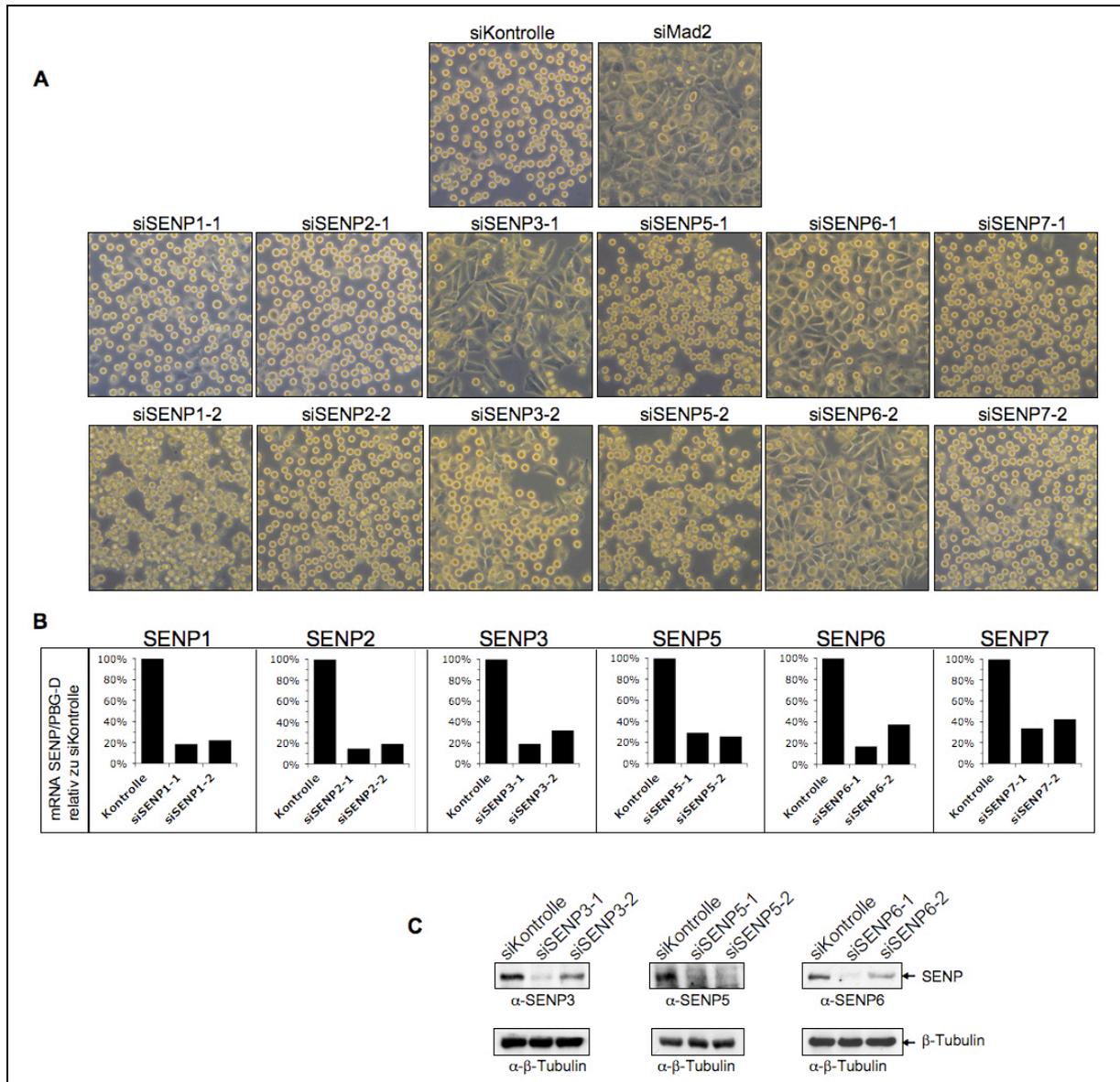


Abb. 31: Akkumulation von Interphase-Zellen im Nocodazol-Arrest nach Depletion von SENP6

(A) HeLa S3 Zellen wurden mit den angegebenen siRNA-Oligonukleotiden transfiziert, mit einem Doppel-Thymidinblock vorsynchronisiert und nach Freisetzung aus dem zweiten Thymidinblock mit Nocodazol arretiert. Nach 16h wurden Phasenkontrastaufnahmen der Zellen gemacht. (B) Der relative mRNA Gehalt einzelner SENPs wurde in einer Realtime RT-PCR gemessen. Aufgetragen ist das Verhältnis der mRNA des jeweiligen SENPs und der mRNA des Haushaltgens Porphobilinogen Deaminase (PBG-D) relativ zu siKontrolle. Das Verhältnis SENP/PBG-D wurde dabei in siKontrolle jeweils auf 100% gesetzt. (C) Depletion einzelner SENPs wurde - sofern die entsprechenden Antikörper verfügbar waren - in einem Western Blot untersucht.

16h nach Aufhebung des Thymidinblocks wurden schließlich Phasenkontrastbilder der Zellen aufgenommen (Abb. 31A) und die Depletion mit einer Quantifizierung der relativen mRNA-Mengen (Abb. 31B) oder - soweit Antikörper gegen das jeweilige SENP verfügbar waren - mit Western Blots (Abb. 31C) überprüft. Im Falle einer Transfektion mit einem unspezifischen Kontroll-siRNA-Oligonukleotid waren dabei

Ergebnisse

konsistent mit einem Arrest in der Prometaphase abgerundete mitotische Zellen sichtbar. Wurde Mad2 depletiert und auf diese Weise die Funktion des *spindle assembly checkpoints* kompromittiert, zeigten sich normale adhärenzte Interphase-Zellen, die offenbar den Arrest mit Nocodazol fehlerhaft überschritten hatten. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen in 3.2.6 war derselbe Effekt auch in SENP3-depletierten Zellen sichtbar, allerdings schien das Überschreiten des Nocodazol-Arrests dabei sehr vom Expressionsniveau von SENP3 abhängig zu sein, da bei nur leicht verringerter SENP3-Expression (Abb. 31B/C, siSENP3-2) auch nur wenige Interphase-Zellen in Anwesenheit von Nocodazol zu sehen waren (Abb. 31A, siSENP3-2). Depletion von SENP1, SENP2 und SENP5 schien dabei keinen Effekt auf die Funktion des SAC zu haben, wohingegen eine Depletion von SENP6 zu einer deutlichen Akkumulation von Interphase-Zellen führte.

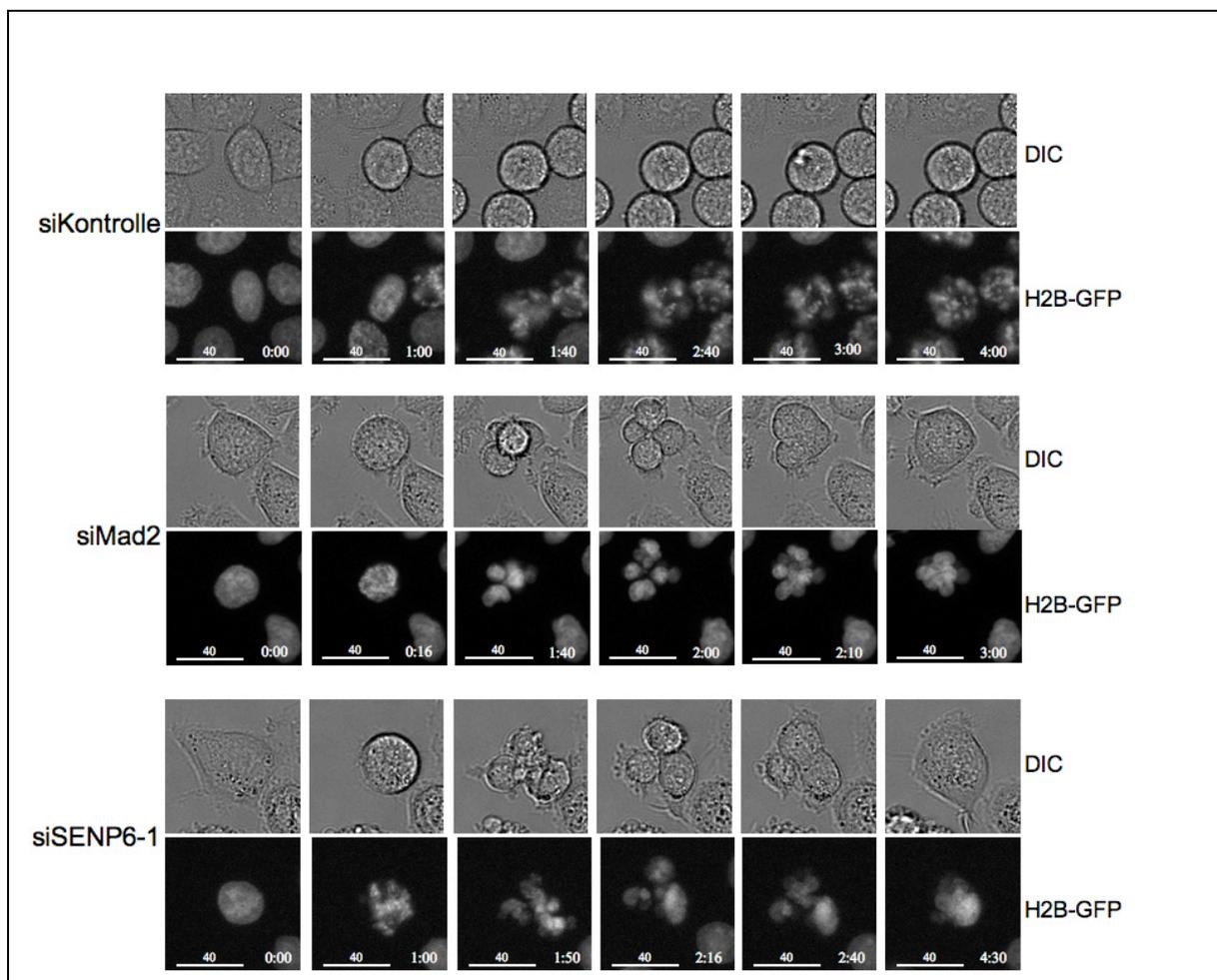


Abb. 32: Depletion von SENP6 führt zu fehlerhaftem Überschreiten eines Nocodazol-Arrests

(A) HeLa S3 Zellen mit stabil integriertem Histon H2B-GFP wurden wie angegeben mit siRNA Oligonukleotiden transfiziert und nach einem Doppel-Thymidinblock mit Nocodazol behandelt. Die Einzelbilder sind repräsentative Aufnahmen und zeigen das Verhalten einzelner Zellen in der Mitose zu den angegebenen Zeitpunkten. Maßstab: 40μm, Zeit [h:min].

Unter diesen Versuchsbedingungen wäre allerdings das Auftreten von Interphase-Zellen nicht allein durch ein fehlerhaftes Überschreiten des SAC, sondern ebensogut durch einen prämitotischen Arrest in der G2-Phase erklärbar wären. Um zwischen diesen beiden Szenarien zu unterscheiden, wurde das Verhalten von SENP6-depletierten Zellen, die mit Nocodazol behandelt wurden, mittels Zeitraffer-Mikroskopie in einer HeLa S3 Zelllinie mit stabil integriertem Histon H2B-GFP verfolgt (Schema, Anhang Abb. 4). Zellen, die mit einem Kontroll-siRNA-Oligonukleotid transfiziert wurden, rundeten sich dabei wie erwartet ab und zeigten deutlich eine für einen Prometaphase-Arrest typische Kondensation der DNA (Abb. 32). Depletion von Mad2 - als Positivkontrolle für einen kompromittierten SAC - führte zu einer fehlerhaften Induktion der Anaphase und resultierte schließlich in der Entstehung multinukleärer Zellen mit mehrlappigen Zellkernen. Dasselbe Szenario war in SENP6-depletierten Zellen mit zwei unabhängigen siRNA-Oligonukleotiden sichtbar (Abb. 32, Anhang Abb. 7). Auch hier leiteten Zellen nach Abrundung und Kondensation der DNA fehlerhaft die Anaphase ein und wurden schließlich nach einer inkorrekten Cytokinese multinukleär.

Diese Beobachtungen machen deutlich, dass ein prämitotischer Arrest SENP6-depletierter Zellen ausgeschlossen werden kann und weisen - vor allem im Hinblick auf die Analogie der Ereignisse in Mad2-depletierten Zellen - auf eine Funktion von SENP6 im SAC hin.

3.3.2 Depletion von SENP6 führt zu einer verfrühten Initiation der Anaphase

Um die Bedeutung von SENP6 für das Fortschreiten einer ungestörten Mitose zu untersuchen, wurden HeLa S3 Zellen nach siRNA-vermittelter Depletion von SENP6 über Zeitraffer-Mikroskopie wie unter 3.2.5 beobachtet. Als Kontrollen dienten die Transfektion eines unspezifischen siRNA Oligonukleotids und die Depletion von Mad2. Ähnlich wie bei Versuchen in Nocodazol arretierten Zellen glichen sich die Phänotypen von SENP6- und Mad2-depletierten Zellen wieder in auffälliger Weise. Die Depletion beider Proteine führte zu verschiedenen mitotischen Defekten wie etwa der Unfähigkeit, eine definierte Metaphasenplatte zu bilden oder dem Auftreten von *lagging* Chromosomen (Abb. 33A, Pfeile). Depletion von SENP6 mit einem zweiten unabhängigen siRNA-Oligonukleotid führte dabei zum selben Ergebnis (Anhang Abb. 8). SENP6 scheint also eine essentielle Funktion den Ablauf eines ungestörten Zellzyklus zu haben, wie es auch bei anderen SAC-Proteinen der Fall ist (Bharadwaj und Yu, 2004; Musacchio und Hardwick, 2002).

Ein Vergleich der zeitlichen Koordination der Initiation der Anaphase in Zellen mit reduziertem Expressionsniveau von SENP6 bzw. Mad2 mit Kontrollzellen verdeutlichte dabei, dass eine Depletion von SENP6 - ähnlich wie eine Depletion von Mad2 - zu

Ergebnisse

einer signifikanten Beschleunigung der Initiation der Anaphase führte. Die mittlere Zeitspanne zwischen Kondensation der DNA und Beginn der Anaphase betrug dabei in Kontrollzellen 36min und verkürzte sich bei einer Depletion von Mad2 auf 18min bzw. 22min im Falle einer Depletion von SENP6 (Abb. 33B).

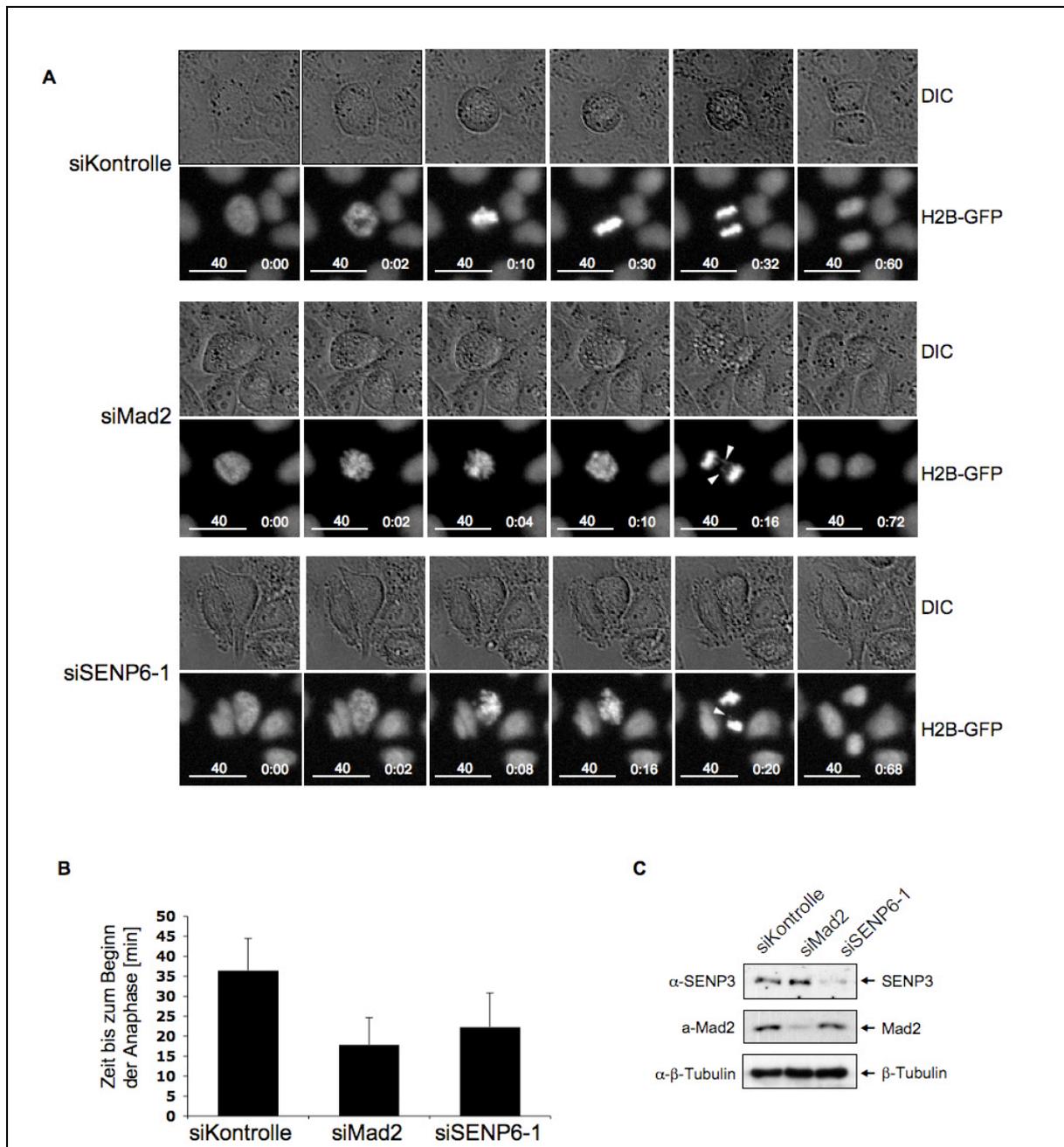


Abb. 33: Depletion von SENP6 beschleunigt den Beginn der Anaphase

(A) HeLa S3 Zellen mit stabil integriertem Histon H2B-GFP wurden wie angegeben mit siRNA Oligonukleotiden behandelt. Die Einzelbilder sind repräsentative Aufnahmen und zeigen das Fortschreiten einzelner Zellen in der Mitose zu den angegebenen Zeitpunkten. Weiße Pfeile zeigen *lagging* Chromosomen an. Maßstab: 40µm, Zeit [h:min] **(B)** Quantifizierung der Zeitspanne zwischen DNA-Kondensation und Beginn der Anaphase **(C)** Kontrolle der Depletion von SENP6 in diesem Experiment in Form eines Western Blots.

Ein zweites, unabhängiges siRNA-Oligonukleotid gegen SENP6 konnte diese Zeitspanne nicht ganz so dramatisch verkürzen (31min, Anhang Abb. 8B), allerdings

konnte es das Expressionsniveau von SENP6 auch nur schwach reduzieren. Dies spricht für eine starke Abhängigkeit der zeitlichen Koordination des Beginns der Anaphase von der Menge an verfügbarem SENP6. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass SENP6 als Komponente des SAC fungiert und den Zeitverlauf der Mitose ähnlich wie Mad2 beeinflusst.

3.3.3 Depletion von SENP6 führt zu einer selektiven Mislokalisierung von Mad2

Basierend auf diesen Ergebnissen sollte im Weiteren analog zu den oben beschriebenen Experimenten zu SENP3 in Immunfluoreszenzexperimenten untersucht werden, an welchem Punkt in der SAC-Signalkaskade SENP6 erforderlich ist. Zu diesem Zweck wurden wie unter 3.2.7 HeLa S3 Zellen nach Transfektion mit einem SENP6-spezifischen sowie einem Kontroll-siRNA-Oligonukleotid mit einem Doppel-Thymidinblock vorsynchronisiert und mit Nocodazol bzw. MG132 arretiert. (Schema, Anhang Abb. 3). Abb. 34 verdeutlicht, dass die mittels Immunfluoreszenz exemplarisch getesteten SAC-Proteine Hec1, BubR1 und Cdc20 in SENP6-depletierten Zellen nach wie vor normal am Kinetochor lokalisierten (Abb. 34A, B, C). Mad2 hingegen konnte in Zellen mit reduziertem Expressionsniveau von SENP6 nicht mehr am Kinetochor detektiert werden und schien in diesen Zellen einer selektiven Mislokalisierung unterworfen zu sein (Abb. 34D). Als Positivkontrolle diente erneut die Depletion von PICH, die gemäß publizierter Daten ebenfalls zu einer selektiven Mislokalisierung von Mad2 führte (Anhang Abb. 9D) (Baumann et al., 2007). Ein zweites, unabhängiges siRNA-Oligonukleotid, das ebenfalls zu einer effektiven Verringerung des Expressionsniveaus von SENP6 führte, zeigte dabei analoge Effekte (Anhang Abb. 9). Die Western Blots in Abb. 34E und Anhang Abb. 9 E verdeutlichen zudem, dass das Nichtvorhandensein von Mad2 am Kinetochor bei einer Depletion von SENP6 nicht auf eine generelle Verringerung des Expressionsniveaus von Mad2 zurückzuführen ist. Zudem spricht die korrekte Lokalisierung von Hec1, BubR1 und Cdc20 gegen eine generelle Störung der Kinetochor/Centromer-Struktur.

SENP6 scheint also den SAC über eine selektive Mislokalisierung von Mad2 zu steuern und dabei keinen Einfluss auf den generellen Aufbau des Kinetochors/Centromers zu nehmen.

Ergebnisse

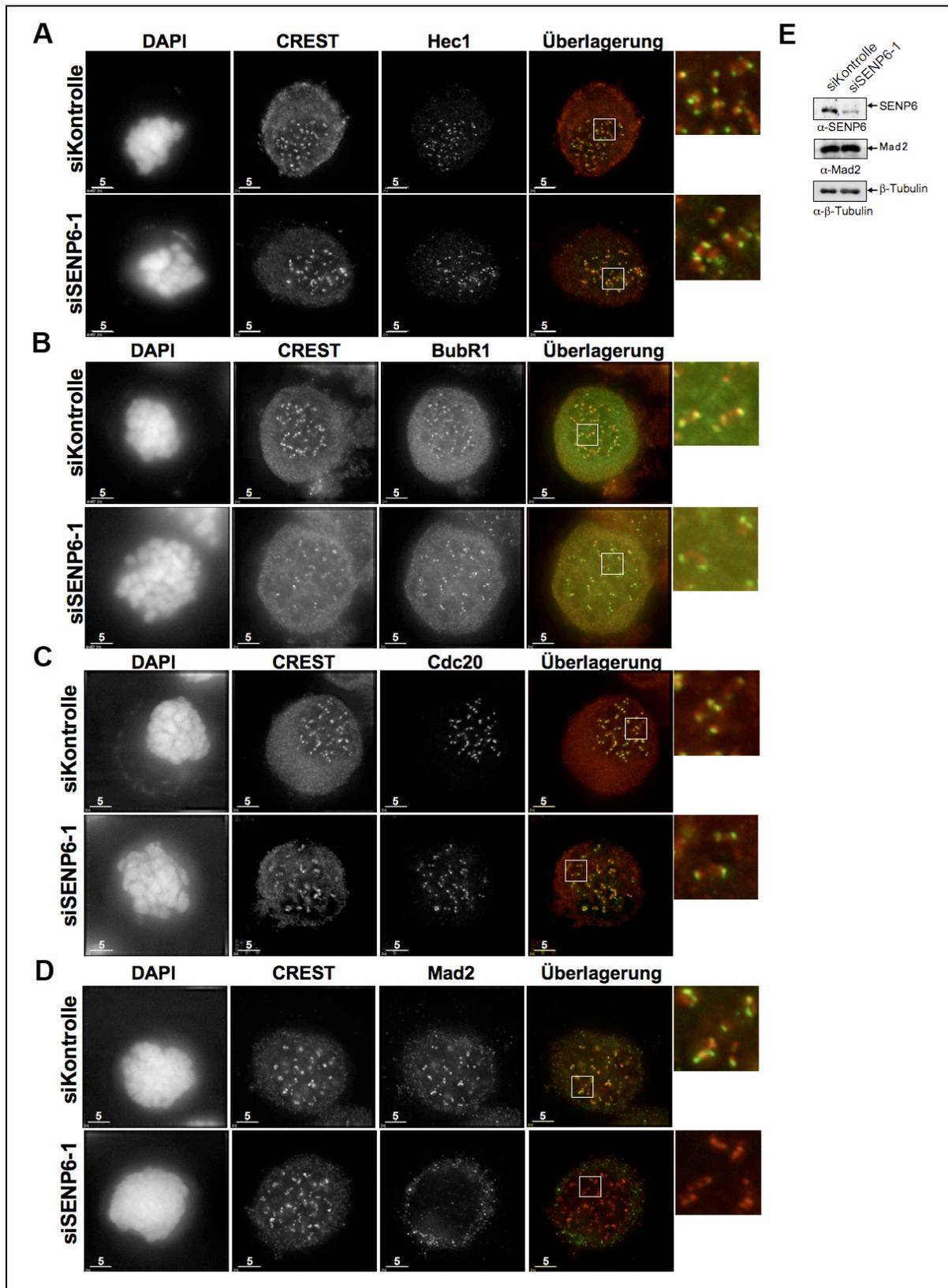


Abb. 34: Lokalisierung von SAC-Proteinen nach Depletion von SENP6

(A) – (D) Die Lokalisierung einzelner SAC-Proteine in HeLa S3 Zellen wurde nach Transfektion des angegebenen siRNA-Oligonukleotids anhand immunologischer Färbung mit den angegebenen Antikörpern bestimmt (grün). DNA wurde mit DAPI angefärbt. CREST-Antiserum (rot) wurde als Kinetochor/Centromer-Marker benutzt. Maßstab: 5µm. Einzelne Kinetochor-Paare wurden vierfach vergrößert. (E) Depletion von SENP6 in den für diesen Versuch benutzten Zellen.

4 Diskussion

4.1 SENP3 kontrolliert die Reifung ribosomaler RNA

Die eukaryotische Ribosomenbiogenese ist ein äußerst energieaufwändiger und genau regulierter Prozess, der von der Hefe bis zum Menschen in einer Reihe von hochkonservierten Schritten abläuft. Das koordinierte Wirken einer Vielzahl von Proteinen ist dabei nötig, um eine Zelle ausreichend mit Ribosomen zu versorgen und so deren Vitalität sicherzustellen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die SUMO-Isopeptidase SENP3 in diesen Prozess über die Regulation der Prozessierung der 32S rRNA eingreift. Hierbei scheint die SENP3-vermittelte Demodifikation von SUMO2-modifiziertem NPM1 ein kritischer Schritt zu sein.

4.1.1 Desumoylierung von NPM1 ist ein kritischer Schritt bei der Ribosomenbiogenese

Über einen biochemischen Ansatz wurde im Zuge dieser Arbeit NPM1 als Interaktionspartner von SENP3 identifiziert und die Interaktion beider Proteine durch Immunpräzipitations- und *yeast two hybrid* Experimente bestätigt. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist NPM1 ein multifunktionales Protein. Eine seiner Hauptaufgaben ist die Kontrolle der Prozessierung des 32S rRNA-Vorläufers zur reifen 28S rRNA (siehe Schema Abb 15A) (Apicelli et al., 2008; Itahana et al., 2003; Savkur und Olson, 1998), wobei der exakte Mechanismus, über den NPM1 in diesen Prozess eingreift bisher ungeklärt blieb. Einem Modell von Itahana et al. zufolge wirkt p14^{ARF} dabei antagonistisch zu NPM1 indem es dessen Ubiquitinierung und Abbau induziert (Itahana et al., 2003). Allerdings zählt NPM1 interessanterweise auch zu einer Reihe von nukleolären Proteinen, die p14^{ARF}-abhängig sumoyliert werden (Tago et al., 2005). Die funktionelle Konsequenz dieser Modifikation war jedoch bislang unklar. Vor dem Hintergrund der Interaktion zwischen NPM1 und SENP3 wurde untersucht, ob SENP3 als dekonjugierendes Enzym für SUMO-modifiziertes NPM1 fungiert. Durch Überexpressionsversuche als auch unter endogenen Bedingungen bei reduziertem Expressionsniveau von SENP3 konnte dies spezifisch für SUMO2-modifiziertes NPM1 *in vivo* aufgezeigt werden. Zudem konnte ein Versuch zur *in vitro* Desumoylierung von NPM1 eine direkte dekonjugierende Aktivität von SENP3 für SUMO2-modifiziertes NPM1 belegen. Diese Spezifität für SUMO2 ist dabei konsistent mit Literaturdaten, die SENP3 eine strenge Paralogspezifität für SUMO2 zuschreiben (Di Bacco und Gill, 2006; Gong und Yeh,

2006; Nishida et al., 2000). Schließlich hatte eine Depletion von SENP3 neben der Stabilisierung von NPM1-SUMO2-Konjugaten auch Defekte in der Prozessierung der 32S rRNA zur Folge und wies somit exakt denselben Effekt wie eine Depletion von NPM1 auf. Ein weiterführendes Experiment zur Epistase beider Proteine verdeutlichte zudem, dass SENP3 und NPM1 über einen gemeinsamen und nicht parallele Signalwege die Reifung der 32S rRNA steuern. Deshalb lag die Vermutung nahe, dass der beobachtete Effekt einer Depletion von SENP3 in der Ribosomenbiogenese auf die fehlende Desumoylierung von NPM1 zurückzuführen ist und SUMO2-modifiziertes NPM1 somit die Prozessierung des 32S-Intermediats negativ beeinflusst. Konsistent mit dieser Annahme zeigte eine konstitutiv mit SUMO2 modifizierte Form von NPM1 ebenfalls Defekte in der Reifung der 28S rRNA. Anhand dieser Daten konnte SENP3 als essentieller Faktor für die Ribosomenbiogenese identifiziert werden. Außerdem weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass NPM1 ein kritisches Substrat von SENP3 bei diesem Prozess darstellt.

4.1.2 Modell für die dynamischen Sumoylierung von NPM1

Den Ergebnissen dieser Arbeit entsprechend kann von einem Modell ausgegangen werden, das NPM1 in den Kontext eines nukleolären und dynamischen Sumoylierungs-/Desumoylierungs-Zyklus stellt, der p14^{ARF} im Konjugationsprozess und SENP3 als dekonjugierendes Enzym einschließt (Abb. 35). Der exakte Mechanismus der p14^{ARF}-stimulierten Konjugation von SUMO bleibt allerdings letztendlich unklar. Die Expression von p14^{ARF} führt zu einer Akkumulation von SUMO2 im Nukleolus und scheint damit dazu zu führen, dass SUMO2 in ausreichenden Mengen für eine Konjugation zur Verfügung steht. Damit scheint p14^{ARF} eine Sumoylierung auf indirektem Weg zu induzieren. Im Einklang mit dieser Idee zeigt p14^{ARF} zwar eine stimulierende Wirkung auf die Sumoylierung einer Reihe von Substraten *in vivo*, hat aber *in vitro* keine direkte SUMO-Ligase Aktivität (den Besten et al., 2006; Tago et al., 2005). Denkbar wäre demnach beispielsweise, dass es seine stimulierende Wirkung auf die SUMO-Modifikation durch die Inhibition nukleolärer Isopeptidasen entfaltet. Im Zuge dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression von p14^{ARF} zumindest die Interaktion von NPM1 und SENP3 nicht beeinflusst.

Im Gegensatz zu p14^{ARF} fungiert SENP3 direkt als dekonjugierendes Enzym von NPM1, da es auch in einem direkten *in vitro* Ansatz die Desumoylierung von SENP3 katalysiert. Die Tatsache, dass in keinem dieser Experimente eine desumoylierende Aktivität von SENP5 festgestellt werden konnte, spricht vor dem Hintergrund der

Diskussion

dem Nukleolus wurde beispielsweise in humanen Zellen für die nukleoläre RecQ-Helikase WRN und Topoisomerasel gezeigt (Mo et al., 2002; Woods et al., 2004), wobei die Modifikation von WRN interessanterweise auch von p14^{ARF} induziert wird. Direktere Hinweise auf einen SUMO-abhängigen Ausschluss aus dem Nukleolus ergaben Studien zu Rad52 in der Hefe *S. cerevisiae* (Torres-Rosell et al., 2007). Interessanterweise wurde kürzlich eine Mutante von NPM1 beschrieben, die nicht mehr sumoyliert werden kann (NPM1^{K263R}) und infolgedessen vom Nukleolus in das Nukleoplasma relokalisiert (Liu et al., 2007). Diese Relokalisierung konnte allerdings in dieser Arbeit nicht betätigt werden. Darüberhinaus konnte auch der beschriebene Verlust der Sumoylierung von NPM1^{K263R} nicht reproduziert werden. Obwohl eine SUMO-abhängige Relokalisierung von NPM1 ein attraktives Konzept wäre, um die beobachteten Defekte in der Ribosomenbiogenese zu erklären, konnte weder nach Überexpression noch nach Depletion von SENP3 eine Veränderung in der Lokalisierung von NPM1 beobachtet werden (Markus Haindl, unveröffentlichte Daten). Auch eine Überexpression von p14^{ARF} führt laut Literaturdaten zu keiner Relokalisierung von NPM1, sondern scheint es vielmehr im Nukleolus zurückzuhalten (Brady et al., 2004). Diese Daten deuten darauf hin, dass eine verstärkte Modifikation von NPM1 mit SUMO2 dessen Funktion also innerhalb des Nukleolus beeinflusst. Interessanterweise besitzt der Nukleolus drei Substrukturen, nämlich das fibrilläre Zentrum (FC), das dichte fibrilläre Zentrum (DFC) und die granuläre Komponente (GC), die für verschiedenen Schritte der Ribosomenbiogenese verantwortlich zeichnen (Boisvert et al., 2007). NPM1 z.B. lokalisiert im Einklang mit seiner Funktion in späteren Schritten der rRNA Reifung in der granulären Komponente. In Anbetracht dieser Tatsache bestünde also noch die Möglichkeit einer Relokalisierung von NPM1 innerhalb des Nukleolus nach einer Modifikation mit SUMO2. Im Einklang mit einer intra-nukleolären Beeinflussung der Funktion von NPM1 durch eine Modifikation mit SUMO steht auch die Beobachtung, dass p14^{ARF} die Akkumulation von SUMO1 und SUMO2 im Nukleolus induziert (Tago et al., 2005) (3.1.2, Abb. 13B).

Ein alternativer Mechanismus, wie eine Sumoylierung von NPM1 auf molekularer Ebene die Prozessierung der 32S rRNA beeinflussen könnte, steht im Zusammenhang mit dem p14^{ARF}-abhängigen Abbau von NPM1. Wie erwähnt wurde in einer Publikation der Zhang-Gruppe gezeigt, dass p14^{ARF} der Funktion von NPM1 in der Ribosomenbiogenese über die Induktion eines Ubiquitin-abhängigen Abbaus von NPM1 entgegenwirkt (Itahana et al., 2003). Die Ergebnisse dieser Arbeit hingegen deuten auf eine Induktion der SUMO2-Modifikation von NPM1 durch p14^{ARF} hin, was letztendlich zum Verlust der Funktion von NPM1 in der Ribosomenbiogenese führt.

Interessanterweise haben nun aktuelle Untersuchungen ein Zusammenspiel zwischen Sumoylierung und einer Ubiquitinierung bei der Degradation von Proteinen aufgedeckt. In manchen Fällen kann die Sumoylierung eines Proteins dessen Interaktion mit einem SUMO Interaktionsmotiv (SIM) einer Ubiquitin Ligase vermitteln und damit die Ubiquitinierung stimulieren (Prudden et al., 2007; Sun et al., 2007; Uzunova et al., 2007). Wäre ein äquivalenter Mechanismus auch im Falle der SUMO2-Modifikation von NPM1 vorhanden, so könnten die Ergebnisse der Zhang-Gruppe mit einer verstärkten SUMO-Modifikation von NPM1 erklärt und mit den Daten dieser Arbeit in Einklang gebracht werden.

Zusätzlich muss angemerkt werden, dass in dieser Arbeit zwar gezeigt wurde, dass NPM1 und SENP3 in Bezug auf die Prozessierung der 32S rRNA epistatisch sind und sich eine Modifikation mit SUMO2 negativ auf die Funktion von NPM1 in der Ribosomenbiogenese auswirkt, aber NPM1 vermutlich nicht das einzige Substrat von SENP3 in diesem Prozess darstellt. So wurde beispielsweise Pes1, eine Komponente des PeBoW-Komplexes, der ebenfalls eine Rolle bei der Prozessierung der 32S rRNA spielt (Holzel et al., 2005), als Substrat für eine Modifikation mit SUMO1 und SUMO2 gefunden (Markus Haindl, unveröffentlichte Daten). Desweiteren weisen Daten aus der Hefe *S. cerevisiae* auf eine noch umfassendere Rolle des SUMO-Systems in der Ribosomenbiogenese hin. Die Arbeitsgruppe um E. Hurt konnte beispielsweise in genetischen Studien zeigen, dass sowohl Sumoylierung als auch Desumoylierung wichtig für die Formation und den Export präribosomaler Partikel sind (Panse et al., 2006). Zusammengenommen deuten diese Daten darauf hin, dass eine Beteiligung des SUMO-Systems in der Ribosomenbiogenese ein evolutionär konservierter und hochgradig regulierter Mechanismus ist.

4.2 SENP3 wird in der Mitose reguliert und beeinflusst mitotische Vorgänge

Eine immer größer werdende Menge an Daten deutet darauf hin, dass die Ribosomenbiogenese und die Funktion des Nukleolus selbst mit dem Fortschreiten des Zellzyklus und der Mitose gekoppelt sind (Boisvert et al., 2007; Dez und Tollervey, 2004). Allerdings sind bisher nur wenige Proteine bekannt, die am Schnittpunkt dieser zellulären Vorgänge wirken. Ein neues Beispiel solcher Proteine könnte die SUMO-Isopeptidase SENP3 sein, da diesem Protein im Zuge dieser Arbeit neben seiner entscheidenden Rolle in der Ribosomenbiogenese auch eine maßgebliche Funktion in der Mitose zugeordnet werden konnte. So wird SENP3

während der Mitose in hohem Maße reguliert und ist neben der Desumoylierung der *chromosomal passenger complex* (CPC)-Komponente Borealin noch für die Kontrolle des *spindle assembly checkpoints* (SAC) und die zeitliche Koordination der Initiation der Anaphase verantwortlich.

4.2.1 SENP3 wird während der Mitose reguliert und interagiert mit Plk1

Im Zuge dieser Arbeit konnte belegt werden, dass SENP3 zu Beginn der Mitose in starkem Maße phosphoryliert wird und dass diese Phosphorylierung im weiteren Verlauf der Mitose wieder abnimmt. Diese dynamische Phosphorylierung könnte einen Mechanismus darstellen, um die Aktivität von SENP3 über mitotische Kinasen und Phosphatasen zu regulieren. Eine Kartierung konnte als Phosphorylierungsstellen vor allem Serine und Threonine in der N-terminalen Domäne von SENP3 identifizieren. Da den N-terminalen Domänen von Ulp1/SENPs eine Rolle für die subzelluläre Lokalisierung und Vermittlung von Interaktionen zu anderen Proteinen zugesprochen wird (Hay, 2007; Mukhopadhyay und Dasso, 2007), könnte dies darauf hindeuten, dass offenbar weniger die Aktivität von SENP3 als vielmehr die Lokalisierung oder die Interaktion mit bestimmten Proteinen durch die Phosphorylierung gesteuert wird.

Parallel zu einer Reduzierung der Phosphorylierung von SENP3 erfolgt schließlich auch eine Reduzierung der Proteinmenge der SUMO-Isopeptidase in späteren mitotischen Stadien. Vor allem die Tatsache, dass das Expressionsniveau von SENP3 zu Beginn der Mitose das von interphasischen Zellen um etwa das vierfache übersteigt, ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Aktivität von SENP3 offensichtlich für den korrekten Ablauf der Mitose benötigt wird. Das Maximum an SENP3-Expression zu Beginn der Mitose und die graduelle Verringerung der Proteinmenge einhergehend mit einer Dephosphorylierung über den weiteren Verlauf der Mitose sprechen dabei vor allem für eine Funktion dieser Isopeptidase in frühen mitotischen Stadien. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, stellt die Ubiquitin-abhängige Degradation mitotischer Regulatoren neben der Phosphorylierung den zweiten dominierenden Mechanismus für die Kontrolle der Mitose dar. Da die Proteinmenge von SENP3 im Verlauf der Mitose abnimmt und keine Regulation auf der mRNA-Ebene im Verlauf des Zellzyklus festgestellt werden konnte (Klein et al., zur Veröffentlichung eingereicht), könnte SENP3 auch durch Proteindegradation während der Mitose reguliert werden. Interessanterweise enthält SENP3 in der Tat Motive in seiner Aminosäuresequenz, die für eine Ubiquitin-abhängige Degradation verantwortlich sein könnten. Zum einen finden sich zwei Sequenzmotive, die exakt einer sogenannten D-Box (*destruction box*) entsprechen, über die der APC/C

gewöhnlich seine Substrate erkennt und deren Ubiquitin-abhängige Degradation einleitet (Peters, 2006). Desweiteren weist SENP3 ein sogenanntes Phosphodegron auf, das als Erkennungsstelle für einen zweiten Ubiquitin-Ligase-Komplex, den SCF^{β-TRCP}-Komplex fungiert (Watanabe et al., 2005). Ein derartiger Ubiquitin-abhängiger Abbau einer SUMO-Isopeptidase würde ein weiteres Beispiel für die Verknüpfung des SUMO- und des Ubiquitin-Systems darstellen und das Konzept der gegenseitigen Beeinflussung beider Systeme um eine neue Variante erweitern.

Weiterhin konnte in *yeast two hybrid* Versuchen und Farwestern-Analysen gezeigt werden, dass SENP3 mit der mitotischen Kinase Plk1 in einem phosphorylierungsabhängigen Mechanismus interagiert und nach einer Kartierung der Phosphorylierungsstellen von SENP3 konnte Serin26 als die Bindestelle von Plk1 auf SENP3 bestimmt werden. Eine derartige phosphorylierungsabhängige Interaktion mit Plk1 ist dabei konsistent mit dem gängigen Mechanismus für eine Bindung von Plk1 an seine Substrate. Die sogenannte PBD (*polo box binding domain*), die Bindedomäne von Plk1, bindet diesem Modell zufolge an präphosphorylierte Serine oder Threonine, die zumeist innerhalb einer Cdk1-Konsensussequenz liegen (Elia et al., 2003). Aus diesem Grund fungiert Cdk1 auch in den meisten Fällen als präphosphorylierende Kinase für eine Bindung von Plk1 und schafft so eine Matrix für dessen Bindung und Lokalisierung während der Mitose (Barr et al., 2004; Elia et al., 2003). Serin26 liegt dabei ebenfalls innerhalb einer Cdk1-Konsensussequenz. Die Konsequenz dieser Befunde könnte zum einen eine Plk1-vermittelte Phosphorylierung von SENP3 an weiteren Aminosäuren sein, die weiteren Einfluss auf die Aktivität oder die Lokalisation der SUMO-Isopeptidase nehmen könnte. Zum anderen könnte aber auch die gegenseitige Rekrutierung in subzelluläre Bereiche die Folge der Interaktion beider Proteine sein

In Anbetracht der Beobachtung, dass Plk1 zumindest *in vitro* mit SUMO modifiziert wird, ist es auch attraktiv zu vermuten, dass SENP3 als SUMO dekonjugierendes Enzym für Plk1 fungiert. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob die Aktivität oder Lokalisierung von Plk1 über SUMO-Konjugation/Dekonjugation reguliert wird. Wie weiter unten besprochen, könnte jedoch die beobachtete Beeinflussung der Mitoselänge nach Depletion von SENP3 über Plk1 vermittelt werden.

4.2.2 SENP3 desumoyliert Borealin

Interessanterweise kommt SENP3 nicht nur als möglicher Regulator der mitotischen Kinase Plk1 in Betracht, sondern ist möglicherweise auch an der Kontrolle von Aurora B beteiligt.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Erich Nigg (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) konnte nämlich gezeigt werden, dass SENP3 mit der *chromosomal passenger* (CPC)-Komponente Borealin interagiert und dessen RanBP2-vermittelter Modifikation mit SUMO2 in der Mitose entgegenwirkt (Klein et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Dabei ist die Sumoylierung von Borealin zu Beginn der Mitose maximal und nimmt in deren weiteren Verlauf wieder ab. Damit korreliert die Sumoylierung von Borealin mit der Lokalisierung des CPC am Centromer. Mit dieser Beobachtung im Einklang ist die beschriebene Akkumulation von SUMO2/3 am Centromer kondensierter Chromosomen (Ayaydin und Dasso, 2004; Azuma et al., 2003; Zhang et al., 2008). Da für Topoisomerase II als weiteres RanBP2-abhängiges SUMO-Substrat gezeigt wurde, dass eine Sumoylierung die Lokalisierung zum Centromer bestimmt (Dawlaty et al., 2008), wurde auch die Lokalisierung von hyper- sowie hyposumoyliertem Borealin untersucht. Es zeigte sich, dass das SUMO System keinen Einfluß auf die Lokalisierung von Borealin und des gesamten CPC am Centromer hat, da weder eine Depletion von RanBP2 oder SENP3 noch die Expression einer vollständig Lysin-freien Mutante von Borealin eine Relokalisierung des Proteins zeigten (Klein et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Weitere Untersuchungen konnten auch die Rolle der Sumoylierung von Borealin auf CPC Lokalisierung oder Aurora B Aktivität in späteren mitotischen Stadien nicht klären. Wie im folgenden Abschnitt näher erläutert, könnte allerdings die beobachtete Verlängerung der Mitose nach Depletion von SENP3 mit einer Aktivierung von Aurora B am Centromer in einem frühen mitotischen Stadium erklärt werden.

4.2.3 SENP3 kontrolliert die Dauer der Mitose

In SENP3-depletierten Zellen konnte interessanterweise eine Verlängerung der Dauer zwischen DNA-Kondensation und Initiation der Anaphase beobachtet werden. Zellen mit reduziertem Expressionsniveau von SENP3 benötigten dabei mehr als die doppelte Zeitspanne bis sie schließlich die Anaphase einleiten und weiter in der Mitose voranschreiten konnten. Obwohl unklar ist, welche Substrate von SENP3 hierfür verantwortlich sind, kämen sowohl der CPC als auch Plk1 als mögliche Kandidaten in Frage.

Denkbar wäre beispielsweise eine Hyperaktivierung der katalytisch aktiven CPC-Komponente Aurora B durch eine persistierende SUMO2-Modifikation von Borealin. Eine der Aufgaben von Aurora B am Centromer ist die Korrektur fehlerhafter Mikrotubulus-Kinetochor-Interaktionen (Vader et al., 2006). Wie Untersuchungen von Vader et al. ergaben, bewirkt eine hyperaktivierte Aurora B-Kinase, die nicht mehr vom äußeren Centromer-Bereich entfernt werden kann, auch bei korrekt an Spindel-

Mikrotubuli angehefteten Kinetochoren eine Auflösung der Kinetochor-Mikrotubulus-Interaktion und führt in der Folge zu einer verlängerten Zeitspanne zwischen DNA-Kondensation und Initiation der Anaphase (Vader, 2008).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für eine verlängerte Mitose nach Depletion von SENP3 könnte eine Fehlregulation von Plk1 sein. Plk1 akkumuliert in der Prometaphase am Kinetochor und ist dort für eine korrekte Anheftung von Mikrotubuli an das Kinetochor (Lenart et al., 2007) und eine korrekte Anordnung der Chromosomen in der Metaphasenplatte (Hanisch et al., 2006) verantwortlich. Dabei vermindert eine Inaktivierung von Plk1 die Anzahl sogenannter *k-fibers*, d.h. Mikrotubuli, die an das Kinetochor angeheftet werden (Sumara et al., 2004). Im Hinblick auf die oben angeführten Szenarien für die Interaktion zwischen Plk1 und SENP3 wäre es denkbar, dass bei einer Depletion von SENP3 eine verstärkte SUMO-Modifikation von Plk1 zu einer Inaktivierung der Kinase und infolgedessen einer Reduzierung der Anzahl an *k-fibers* führt. Dies würde schließlich die verlängerte Zeitspanne bis zur Initiation der Anaphase nach Depletion von SENP3 erklären. Alternativ könnte das Fehlen von SENP3 und dadurch das Nichtvorhandensein eines wichtigen Rekrutierungsfaktors zu einer Mislokalisierung der Kinase und zu einem identischen Phänotyp führen.

Eine weitere wichtige Aufgabe von Plk1 während der Mitose ist darüberhinaus die Aktivierung des APC/C über zwei verschiedene Mechanismen. In der späten Prophase phosphoryliert Plk1 Emi1, einen bedeutenden Inhibitor des APC/C, und initiiert auf diese Weise dessen SCF^{β-TRCP1}-abhängigen Abbau (Hansen et al., 2004; Moshe et al., 2004). In etwa zur selben Zeit trägt Plk1 durch eine direkte Phosphorylierung mehrerer Aminosäuren von APC/C zusätzlich zu dessen Aktivierung bei (Golan et al., 2002; Kraft et al., 2003). Würde eine Depletion von SENP3 über die bereits weiter oben erwähnten Mechanismen zu einer Inaktivierung oder Fehllokalisierung von Plk1 führen, wäre eine fehlende Aktivierung von APC/C eine weitere Erklärungsmöglichkeit für eine Verzögerung des Beginns der Anaphase.

4.2.4 SENP3 beeinflusst den SAC

Synchronisierungsexperimente in Kombination mit einer Depletion von SENP3 konnten darüber hinaus in FACS-Analysen Untersuchungen bestätigen, denen zufolge SENP3 in die Kontrolle des *spindle assembly checkpoints* (SAC) involviert ist. Obwohl der genaue Mechanismus, wie der SAC die fehlende Anheftung von Mikrotubuli an Kinetochore erkennt, nicht im Detail verstanden ist, scheint jedoch die korrekte Lokalisierung einzelner SAC-Komponenten am Kinetochor für dessen Funktion essentiell zu sein (Chen et al., 1998; Taylor et al., 1998). Die genaue

Diskussion

Abfolge wie SAC-Proteine dabei fungieren, wurde anhand von Untersuchungen zu gegenseitigen Abhängigkeiten in Bezug auf die Rekrutierung zum Kinetochor bestimmt. Für eine korrekte Lokalisierung von Mad2 war dabei der Großteil der bisher bekannten SAC-Proteine erforderlich (Vigneron et al., 2004). Dieser Befund platziert Mad2 folglich an das Ende der SAC-Kaskade am Kinetochor. Da eine Untersuchung der Lokalisierung verschiedener SAC Proteine wie Hec1, BubR1, Cdc20 aber auch Mad2 keine Relokalisierung eines dieser Proteine nach Depletion von SENP3 offenbarte, muss SENP3 in den *spindle assembly checkpoint* also parallel von Mad2 oder nachgeschaltet in die Signalkaskade des SAC eingreifen. Die bisherigen Befunde implizieren also, dass Zellen trotz einer Depletion von SENP3 nicht mit Mikrotubuli besetzte Kinetochore detektieren können und SAC Proteine auf korrekte Weise rekrutiert werden. Dennoch scheinen dieselben Zellen nicht dazu fähig zu sein, die Aktivität des APC^{Cdc20}-Komplexes zu unterdrücken. Ein identisches Szenario wurde kürzlich in Veröffentlichungen der Gruppen um S. Elledge und M. Kirshner nach Depletion der Ubiquitin-Protease Usp44 beschrieben. Als kritisches Substrat von Usp44 konnte dabei Cdc20 identifiziert werden (Reddy et al., 2007; Stegmeier et al., 2007). Eine Ubiquitinierung von Cdc20, die vom E2 Enzym Ubch10 stimuliert wird, führt dabei zu einer Auflösung der auf APC/C inhibitorisch wirkenden Mad2-Cdc20-Komplexe. Usp44-depletierte Zellen überschreiten infolgedessen aufgrund einer persistierenden Ubiquitinierung von Cdc20 und entsprechenden vorzeitigen Aktivierung des APC/C^{Cdc20} fehlerhaft den *spindle assembly checkpoint*. Ein ähnlicher Mechanismus wäre für SENP3-depletierte Zellen denkbar. Vor allem der Befund, dass Cdc20 im Vergleich zu dem bereits bekannten SUMO-Substrat BubR1 *in vitro* sehr effektiv sumoyliert werden kann und dies bei anderen SAC-Proteinen wie Mad1, Mad2 und Bub3 nicht der Fall ist, stellt einen ersten Hinweis für einen derartigen Mechanismus dar. Weiterführende Versuche müssten jedoch zeigen, ob SENP3 in einen Sumoylierungs-/Desumoylierungszyklus von Cdc20 eingebunden ist. Insbesondere vor dem Hintergrund neuerer Daten, die - wie bereits oben erwähnt - eine Verknüpfung des SUMO-Systems mit der Ubiquitinierungsmaschinerie herstellen konnten (Prudden et al., 2007; Tatham et al., 2008; Uzunova et al., 2007), wäre es denkbar, dass eine persistierende Sumoylierung von Cdc20 in SENP3-depletierten Zellen zu einer verstärkten Ubiquitinierung des Proteins und infolgedessen einem fehlerhaften Überschreiten des SAC im Rahmen des oben beschriebenen Modells führt. Dies würde eine weitere interessante Variante der Interaktion des SUMO- und des Ubiquitin-Systems darstellen.

4.2.5 Wie lassen sich verlängerte Mitose und Kompromittierung des SAC vereinbaren?

Angesichts der Befunde zum fehlerhaften Überschreiten des SAC in SENP3-depletierten Zellen ist die bereits oben beschriebene verlängerte Zeitspanne bis zum Beginn der Anaphase in diesen Zellen nur schwerlich mit Mechanismen zu erklären, die zu einer fehlerhaften Anheftung von Mikrotubuli an das Kinetochor führen. Eine vorzeitige Aktivierung des APC/C würde nämlich trotz fehlerhafter oder unvollständiger Anheftung von Mikrotubuli an das Kinetochor zu einer vorzeitigen Initiation der Anaphase führen und daher als dominanter Mechanismus die Zeit bis zur Anaphase verkürzen (Dai et al., 2004; Michel et al., 2001). Es wäre allerdings vorstellbar, dass eine fehlende Aktivierung des APC/C durch Plk1, wie oben beschrieben, zu einer Verzögerung der endgültigen Initiation der Anaphase führt und so eine verlängerte Zeitspanne zwischen DNA-Kondensation und dem Beginn der Anaphase trotz inaktiviertem SAC zur Folge hat. Ein derartiger Mechanismus wäre konsistent mit Daten zu einer SAC-unabhängigen Verzögerung der Anaphase durch fehlende Aktivität von Plk1 (Moshe et al., 2004; Seong et al., 2002).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für ein fehlerhaftes Überschreiten des SAC in Kombination mit einer Verzögerung des Beginns der Anaphase ist ein Mechanismus, der als Adaptation oder *mitotic leakage* bezeichnet wird (Rieder und Maiato, 2004).

Diesem Mechanismus liegt die Beobachtung zugrunde, dass die Abwesenheit einer mitotischen Spindel in Säuger-Zellen zu einer signifikant verlängerten Mitose mit aktiviertem SAC führt. Diese Verzögerung kann zwar zu einem permanenten und für die Zelle letztendlich unüberwindbaren und tödlichen Arrest führen, in den meisten Fällen ist sie allerdings nur transient und wird von den Zellen überlebt (Schimke et al., 1991). Folglich ist es für die meisten somatischen Zellen nicht essentiell, den SAC zu inaktivieren, um die Mitose zu vollenden. Der Mechanismus, wie eine Mitose trotz aktiviertem SAC vollendet werden kann, ist dabei nur schlecht verstanden. Daten aus *S. cerevisiae* deuten aber darauf hin, dass die Grundlage dafür eine Inaktivierung von CyclinB/Cdk1 über den Cyclin-dependent Kinase Inhibitor (CKI) Sic1 ist (Minshull et al., 1996; Novak et al., 1999; Rudner et al., 2000). Dieses Phänomen der Adaptation würde folglich die beobachtete Überwindung eines aktivierten SAC in Kombination mit einer Verzögerung der Initiation der Anaphase in Zellen mit reduziertem Expressionsniveau von SENP3 erklären.

4.3 SENP6 kontrolliert den SAC

Abschließend wurden in dieser Arbeit neben SENP3 weitere humane SUMO-Isopeptidasen auf eine Funktion während der Mitose und im Speziellen dem *spindle assembly checkpoint* geprüft werden. Dabei zeigte sich, dass die Ulp2-verwandte humane SUMO-Protease SENP6 den SAC vermutlich über die Kontrolle der Lokalisierung von Mad2 beeinflusst.

4.3.1 SENP6 kontrolliert die Mitose und den SAC in Mad2-ähnlicher Weise

In einem ersten Ansatz, bei dem eine Depletion aller humanen SUMO-Isopeptidasen der SENP-Familie erfolgte, konnte zunächst gezeigt werden, dass SENP6 als weiteres Mitglied dieser Proteinfamilie neben SENP3 Einfluss auf den *spindle assembly checkpoint* zu nehmen scheint. Wie weitergehende Versuche in Form von Zeitraffer-Mikroskopie zeigten, arretierten SENP6 depletierte Zellen in Gegenwart des Spindelgiftes Nocodazol nicht mit aktiviertem SAC in der Prometaphase, sondern initiierten die Anaphase und vollendeten schließlich die Mitose. Der phänotypische Ablauf dieses fehlerhaften Überschreitens eines derartigen Arrests nach Depletion von SENP6 war dabei den Vorgängen in Mad2-depletierten Zellen sehr ähnlich. In beiden Fällen schienen die Zellen zunächst eine Art Cytokinese einzuleiten und die DNA in mehrere Einzelzellen aufzuteilen bevor sie wieder zu einer einzigen Zelle mit mehrlappigen Zellkernen und zweifachem DNA-Gehalt fusionierten. Das Auftreten solcher mehrlappiger Nuklei ist dabei typisch für eine Depletion von Komponenten des *spindle assembly checkpoints* (Stegmeier et al., 2007).

Weitere Parallelen zwischen SENP6 und Mad2 fanden sich auch in der Analyse einer ungestörten Mitose nach Depletion beider Proteine. In beiden Fällen war es den Zellen nicht mehr möglich, Chromosomen in der Äquatorialebene anzuordnen und eine definierte Metaphasenplatte zu etablieren. Derartige Defekte in der Chromosomen-Kongression sind auch für weitere SAC-Proteine wie etwa Bub1 (Meraldi und Sorger, 2005) oder die Kinase Tao1 (Draviam et al., 2007) zusätzlich zu ihrer Funktion im *spindle assembly checkpoint* beschrieben. Da eine Depletion von Mad2 sowie von SENP6 allerdings darüber hinaus zu einer drastisch verkürzten Zeitspanne zwischen DNA-Kondensation und Initiation der Anaphase führte, könnte das Fehlen einer definierten Metaphasenplatte auch auf ein zu kleines Zeitfenster für die Chromosomen-Kongression als vielmehr generelle Defekte in diesem Prozess über einen separaten Signalweg zurückzuführen sein. Grundsätzlich kann man SAC-Defekte in zwei verschiedene Kategorien einteilen. So sind Defekte, die eine Regulation der Kinetochor-vermittelten Kontrolle der SAC-Kaskade betreffen, von

Defekten zu unterscheiden, die sich auf die generelle zeitliche Koordination von Ereignissen während der Mitose auswirken und so eine vorzeitige Initiation der Anaphase zu frühen mitotischen Stadien nicht verhindern können (Meraldi et al., 2004a). Die Dauer bis zum Beginn der Anaphase würde somit lediglich nur noch durch die Zeitspanne bestimmt werden, die für den Abbau von CyclinB und Securin in Abwesenheit eines SAC-Signals benötigt wird. Die einzigen bisher bekannten SAC-Proteine, die in diese zweite Kategorie fallen, sind Mad2 und BubR1, denen eine duale Rolle in der zeitlichen Koordination der Mitose zugeschrieben wird (Meraldi et al., 2004a). Eine Zuordnung zu einer dieser Kategorien lässt sich dabei über das Ausmaß treffen, inwieweit sich eine Depletion des jeweiligen Proteins auf die zeitliche Koordination der Mitose auswirkt. Wie bereits erwähnt, führte die Depletion von Mad2 sowie SENP6 zu einer drastischen Verkürzung der Zeitspanne zwischen DNA-Kondensation und Initiation der Anaphase, sodass SENP6 wie Mad2 eindeutig der zweiten Kategorie zuzuordnen ist. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass SENP6-depletierte Zellen in gleicher Weise wie Zellen mit verringertem Expressionsniveau von Mad2 Defekte in der zeitlichen Koordination der Mitose haben. Da die Kontrolle des Beginns der Anaphase eine entscheidende Funktion des SAC ist, weisen diese Befunde auf eine wichtige Funktion von SENP6 im *spindle assembly checkpoint* hin.

4.3.2 Depletion von SENP6 führt zu einer selektiven Mislokalisierung von Mad2

Eine Beteiligung von SENP6 bei der Kontrolle des SAC konnte durch Immunfluoreszenzexperimente weiter erhärtet werden. Eine Depletion von SENP6 führte dabei zu einer selektiven Mislokalisierung von Mad2, während die Lokalisierung anderer SAC-Proteine nicht beeinflusst wurde. Dieses Fehlen von Mad2 am Kinetochor nach Depletion von SENP6 wäre dabei durch zwei Mechanismen erklärbar. Zum einen könnte SENP6 für die Rekrutierung von Mad2 an das Kinetochor benötigt werden, zum anderen könnte aber auch eine Reduzierung des Expressionsniveaus von Mad2 als Erklärung für das Nichtvorhandensein dieses SAC-Proteins am Kinetochor dienen. Western Blots zeigten jedoch, dass die Abundanz von Mad2 nach Depletion von SENP6 nicht betroffen war. Diese Befunde und die Tatsache, dass die Lokalisierung anderer SAC-Proteine nach Depletion von SENP6 nicht betroffen war, sprechen dafür, dass die Unfähigkeit SENP6-depletierter Zellen, ein SAC-Signal zu etablieren, auf eine direkte Rolle von SENP6 im *spindle assembly checkpoint* zurückzuführen ist und dass SENP6 diese Funktion vermutlich über die Kontrolle der Lokalisierung von Mad2 und keine generelle Störung des Aufbaus des Kinetochors vermittelt. Eine derartige selektive Mislokalisierung von

Mad2 in SENP6-depletierten Zellen würde die strukturelle Aktivierung von Mad2 gemäß dem in der Einleitung vorgestellten *template* Modell (De Antoni et al., 2005) verhindern und dadurch eine Inaktivierung des APC/C-Mediators Cdc20 unmöglich machen. Dies würde das fehlerhafte Überschreiten des SAC in Nocodazol-arretierten Zellen erklären.

4.3.3 Wie beeinflusst SENP6 den SAC auf molekularer Ebene?

Eine Frage, die sich nun natürlich aufwirft, betrifft das oder die Substrate von SENP6, die für die beobachtete Mislokalisierung von Mad2 verantwortlich sind. Mad2 selbst kommt dabei als Kandidat für eine Sumoylierung eher nicht in Frage, da *in vitro* Studien keine Modifikation mit SUMO1 oder SUMO2 für dieses Protein zeigen konnten. Ein mögliches Substrat lieferte eine unlängst publizierte Untersuchung zum Mikrotubulus-Motorprotein CENP-E (Zhang et al., 2008). Dabei wurde BubR1 als Substrat für eine Modifikation mit Poly-SUMO2/3-Ketten gefunden und diese Modifikation als essentiell für die Rekrutierung von CENP-E an das Kinetochor beschrieben. Vor dem Hintergrund, dass Mad2 und BubR1 als einzige bisher bekannte SAC-Proteine die zeitliche Koordination der Mitose bestimmen und die korrekte Lokalisierung von Mad2 am Kinetochor zumindest in *Xenopus*-Extrakten abhängig von BubR1 ist (Chen, 2002), wäre ein Mechanismus denkbar, bei dem eine Poly-SUMO2/3-Modifikation von BubR1 einen negativen Effekt auf die Rekrutierung von Mad2 hat. Auf diese Weise würde eine persistierende Sumoylierung von BubR1 in SENP6-depletierten Zellen zu der beobachteten Mislokalisierung von Mad2 führen und die Signalkaskade des SAC kompromittiert werden. Die Tatsache, dass SENP6 eine Präferenz für Poly-SUMO2/3-modifizierte Substrate zugesprochen wird (Dasso, 2008), und ebenso wie BubR1 und Mad2 für die zeitliche Koordination der Initiation der Anaphase verantwortlich ist, wäre dabei im Einklang mit diesem Modell. Ob jedoch Poly-SUMO2/3-modifiziertes BubR1 tatsächlich ein Substrat für eine SENP6-vermittelte Demodifikation ist, bleibt noch zu zeigen.

Generell scheint allerdings das Konzept, dass das SUMO-System bei der Lokalisierung mitotisch wichtiger Proteine an Centromer und Kinetochor eine essentielle Rolle spielt, immer mehr an Attraktivität zu gewinnen (Dasso, 2008; Dawlaty et al., 2008; Strunnikov et al., 2001; Zhang et al., 2008).

5 Material und Methoden

Die nachfolgend beschriebenen Methoden richten sich im Wesentlichen nach Standardprotokollen (Sambrook und Russel, 2001) (Ausubel, 1994) und den Angaben der Hersteller. In aller Regel wurden entionisiertes, steriles Wasser, sterile Lösungen und sterile Gefäße eingesetzt. Soweit nicht anders vermerkt, fanden analysenreine Chemikalien und Reagenzien der Firmen Aldrich, Applied Biosystems, Biomol, Biorad, Difco, Fluka, Invitrogen, Kodak, Merck, Roth, Riedel de Haen, Serva oder Sigma Verwendung. Molekularbiologische Reagenzien, Restriktionsendonukleasen und die Mehrzahl anderer Enzyme wurden (wenn nicht anders angegeben) von den Firmen Roche, MBI Fermentas, New England Biolabs, und Stratagene bezogen. Radiochemikalien stammten von GE-Healthcare.

5.1 Computeranalysen

Datenbank-Recherchen (Sequenzsuchen, Sequenzvergleiche sowie Literatur-Recherchen) wurden mit Hilfe der Datenbank-Programme des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt. Für Sequenzanalysen (Erstellen von Restriktionskarten, Auswertungen von DNA-Sequenzierungen, Vergleiche von Proteinsequenzen und Design von Primern) wurde das Programmpaket DNA-Star (DNA Star Inc.) verwendet. Western Blots wurden entweder über die Entwicklung 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 ^{32}P -markierter RNA erfolgte in einem Phosphoimager (BAS-2500, Fuji). Eine Quantifizierung von Signalen aus einem Western Blot oder ^{32}P -markierter RNA erfolgte mittels der Quantifizierungssoftware ImageGauge 4.23 (Fuji). Die Erstellung von Texten, Tabellen und Abbildungen wurde mit Hilfe der Programme des Microsoft Office Pakets (Microsoft Corp.) durchgeführt.

5.2 Mikrobiologische Methoden

5.2.1 Methoden für *E. coli*

5.2.1.1 *E. coli* Stämme

SURE	e14 ⁻ (McrA ⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan ^r) uvrC [F' proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)].
XL-10 Gold	Tet ^r Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI ^q ZDM15 Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r].

5.2.1.2 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Flüssigkulturen von *E. coli* wurden in LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, sterilisiert durch Autoklavieren) bei 37°C geschüttelt (200rpm) und Agarplatten (LB-Medium, 0,5% Agar) bei 37°C inkubiert. Für die Selektion von transformierten Bakterien wurden dem Medium dem Resistenzmarker des jeweiligen Plasmids entsprechend Antibiotika hinzugefügt (50µg/ml Ampicillin, 30µg/ml Kanamycin). Die Dichte frisch gewachsener Kulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600nm (OD₆₀₀) bestimmt. Kurzfristig wurden *E. coli* Bakterien in Flüssigkulturen oder Ausstriche auf Agarplatten bei 4°C aufbewahrt. Für eine langfristige Lagerung wurden stationäre Flüssigkulturen mit Glycerin zu einer Endkonzentration von 17% versetzt und bei –80°C eingefroren.

5.2.1.3 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Für einfache Transformationen und Vermehrung von Plasmid-DNA in *E. coli* wurden chemisch kompetente SURE Zellen verwendet. Hierfür wurde mit einer frisch ausgestrichenen Einzelkolonie eine Übernachtskultur in Flüssigmedium angesetzt. Mit 2ml dieser Kultur wurden 500ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Nach Abkühlen der Kultur in Eiswasser für 10min wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Alle weiteren Schritte erfolgten unter Verwendung von vorgekühlten Materialien und eiskalten sterilen Lösungen. Die sedimentierten Zellen wurden vorsichtig in 40ml 100mM MgCl₂ resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 80ml 100mM CaCl₂ aufgenommen. Nach 20min Inkubation auf Eis und erneuter Zentrifugation (1.000g, 5min) wurden die sedimentierten Zellen in 4ml 100mM CaCl₂/15% Glycerin resuspendiert. Aliquots dieser Suspension wurden zu 100µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

5.2.1.4 Herstellung „ultra-kompetenter“ Bakterien

Für die Klonierung von sehr großen Plasmiden (pRTS-1-Konstrukte) wurden nach dem Inoue Protokoll (Sambrook und Russel, 2001) hergestellte XL10-Gold Zellen verwendet. Hierfür wurde mit einer frisch ausgestrichenen Einzelkolonie eine 25ml Flüssigkultur in SOB-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,05% NaCl und 2,5mM KCl sterilisiert durch Autoklavieren, kurz vor Gebrauch MgCl₂ auf 10mM zugegeben) angesetzt und 6-8h bei 37°C geschüttelt. Mit 2,5ml dieser Kultur wurden 250ml SOB-Medium angeimpft und bei 18°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,55 inkubiert. Nach Abkühlen der Kultur in Eiswasser für 10min wurden die Zellen durch

Zentrifugation für 10min bei 2500g und 4°C sedimentiert. Alle weiteren Schritte erfolgten unter Verwendung von vorgekühlten Materialien und eiskalten sterilen Lösungen. Nach vollständiger Entfernung des Mediums wurden die Zellen vorsichtig in 80ml Inoue Transformationspuffer (10mM PIPES [pH 6.7], 250mM KCl, 55mM MnCl₂ und 15mM CaCl₂) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden vorsichtig in 20ml Inoue Transformationspuffer aufgenommen und nach Zugabe von 1,5ml DMSO 10min auf Eis inkubiert. Schließlich wurden Aliquots zu 100µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.2.1.5 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Um Plasmid-DNA in *E. coli* zu transformieren, wurde nach der Hitzeschock-Methode verfahren. Dazu wurde der jeweilige kompetente *E. coli* Stamm kurz vor der Transformation auf Eis aufgetaut. 50ng Plasmid-DNA bzw. 8µl eines Ligationsansatzes wurden mit 92µl der kompetenten Zellen gemischt und in 1,5ml-Eppendorf Reaktionsgefäßen 10min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 45s bei 42°C und einer anschließenden Inkubation für 5min auf Eis wurde 1ml LB-Medium zugegeben und 1h bei 37°C geschüttelt. Transformierte Zellen wurden anschließend auf Selektionsplatten ausgestrichen und in der Regel über Nacht bei 37°C inkubiert. Sollte für eine Maxiprep in Flüssigkultur angeimpft werden, wurde der gesamte Ansatz an transformierten Bakterien in 300ml selektives LB-Medium überführt und 14h bei 37°C und 150rpm geschüttelt.

5.2.2 Methoden für *S.cerevisiae*

5.2.2.1 *S.cerevisiae* Stamm

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

5.2.2.2 *S. cerevisiae* Vektoren

pACT2	Clontech
pGAD-C1	(James et al., 1996)
pGBD-C1	(James et al., 1996)
pFBT9	modifizierter pGBT9 (Bartel et al., 1993) Ampicillin- durch Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt

5.2.2.3 *S.cerevisiae* Plasmidkonstrukte

Zur Analyse von *yeast two hybrid* Interaktionen wurden cDNAs im entsprechenden Leserahmen N-terminal mit der GAL4-Aktivierungsdomäne des pGAD-C1- oder des pACT2-Vektors bzw. mit der GAL4-DNA-Bindedomäne des pGBD-C1- oder des pFBT9-Vektors fusioniert.

5.2.2.4 Kultivierung und Lagerung von *S.cerevisiae*

Flüssigkulturen von *S. cerevisiae* wurden mit Kolonien von Plattenausstrichen angeimpft und bei 30°C unter Schütteln (200rpm) für 16h in SC-Medium (2% Glukose, 0,67% Hefe-Stickstoffbasis, 0,2% *drop out* Mix) inkubiert. Die Zelldichte einer frisch angewachsenen Kultur wurde stets photometrisch bestimmt und die Zellzahl kalkuliert ($OD_{600} = 1$ entspricht etwa $1,5 \times 10^7$ Zellen/ml). Für einen Zeitraum bis zu acht Wochen wurden Hefen auf SC-Platten (SC-Medium, 2% Agar) bei 4°C gelagert.

5.2.2.5 Herstellung kompetenter Zellen von *S. cerevisiae*

Hefezellen wurden aus einer Übernacht-Kultur in 400ml SC-Medium auf eine OD_{600} von 0,1 inokuliert und anschließend bei 30°C bis zu einer OD_{600} von 0,7 kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (500g, 5min, RT) geerntet, mit sterilem Wasser und SORB (100mM LiOAc, 10mM Tris-HCl [pH 8,0], 1mM EDTA [pH 8,0], 1M Sorbitol, sterilisiert durch Filtration) gewaschen und in 3ml SORB resuspendiert. Nach Zugabe von 1µg/µl Träger-DNA (denaturierte Lachssperma-DNA, Invitrogen), wurden die Zellen zu 100µl aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

5.2.2.6 Transformation von *S. cerevisiae*

Für die Transformation von *S. cerevisiae* wurden zu 15µl kompetenten Hefezellen 0,3µg Plasmid-DNA gegeben und durch Pipettieren gemischt. Diese Suspension wurde in sechsfachem Volumen PEG (100mM LiOAc, 10mM Tris-HCl [pH 8,0] 1mM EDTA [pH 8,0], 40% PEG-3350, sterilisiert durch Filtration) aufgenommen und bei RT für 30min inkubiert. Nach Zugabe von DMSO zu einer Endkonzentration von 10% erfolgte der Hitzeschock, indem der Ansatz für 15min bei 42°C inkubiert wurde. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (3min bei 500g), in 100µl Wasser aufgenommen und auf Selektionsplatten (SC ohne Leu und Trp) ausgestrichen.

5.2.2.7 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit dem *two hybrid System*

Protein-Protein-Interaktionen wurden durch das *yeast two hybrid System* (Chien et al., 1991; Fields und Song, 1989) getestet. Die cDNAs der zu untersuchenden Proteine wurden N-terminal mit der DNA-Binde- bzw. Aktivierungsdomäne von GAL4 fusioniert. Diese Fusionskonstrukte wurden zusammen im Hefestamm PJ69-7a exprimiert. Im Fall einer Interaktion zwischen den beiden Proteinen führt dies zur Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsaktivators und Expression eines Reportergens, das unter der Transkriptionskontrolle von GAL4 liegt. Als Reportergen dient das HIS3 Gen, so dass Hefe-Zellen bei einer positiven Interaktion der jeweiligen Proteine auf Platten mit entsprechendem Selektionsmedium ohne Histidin wachsen. Zu diesem Zweck wurden stationäre Hefekulturen in sterilem Wasser auf

eine OD_{600} von 0,5 eingestellt, jeweils 5 μ l dieser Verdünnung auf Platten mit Selektionsmedium getüpfelt, und drei bis fünf Tage bei 30°C inkubiert. Das Austüpfeln gleicher Zellzahlen wurde durch eine Kontrollplatte ohne Selektionsmedium überprüft.

5.3 Zellbiologische Methoden

5.3.1 Zelllinien

HEK293T mit SV40 large T Antigen transformiertes Derivat der HEK293 Zelllinie
HeLa S3 humane Zervix-Adenokarzinomzelllinie

5.3.2 Expressionsvektoren für die Zellkultur

pCI	Promega
pRTS-1	(Bornkamm et al., 2005)
pcDNA3.1(-)	Invitrogen
pSG5	Stratagene

5.3.3 Kultivierung von Säugerzellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in Zellkulturschalen bei 37°C, 7.5% CO₂ 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 supplementiert. Um Zellen von der Zellkulturschale abzulösen, wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit sterilem PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1,4mM KH₂PO₄, [pH7.4], sterilisiert durch Autoklavieren) gewaschen. Anschließend wurden 2,5ml Trypsin/EDTA Lösung (PAA) pro 150cm² Kulturschale zugegeben und bis zum Ablösen der Zellen vom Schalenboden bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 10ml Medium resuspendiert und für 3min bei 400g bei RT abzentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in frisches DMEM aufgenommen und je nach Bedarf zur weiteren Kultivierung 1:5 bis 1:10 verdünnt in frischen Kulturschalen angesetzt oder für Experimente in definierter Zellzahl in Kulturschalen ausgesät. Die Ermittlung der Zellzahl der Zellsuspension erfolgte hierfür mittels eines Z2TM Coulter Counters (Beckman-Coulter).

5.3.4 Lagerung von Säugerzellen

Zur Langzeitlagerung wurden Säugerzellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierzu wurden exponentiell wachsende Zellen bei ca. 80% Konfluenz wie in 5.3.3 beschrieben abgeerntet, in FCS mit 10% DMSO resuspendiert und die Zellsuspension in Cryo-Röhrchen (Nalgene) aliquotiert. Die Zellen wurden sofort in einem vorgekühlten Isopropanol-gefüllten Cryo-Einfriergefäß (Nalgene) bei -80°C eingefroren. Nach ein bis zwei Tagen konnten die Zellen dann in flüssigen Stickstoff

überführt werden. Zum Auftauen wurden die Zellen in Cryo-Röhrchen in einem Wasserbad schnell auf 37°C erwärmt, zum Entfernen des DMSO abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und wie 5.3.3 beschrieben kultiviert.

5.3.5 Transfektion von Säugerzellen mit Plasmid-DNA

HEK293T Zellen wurden mittels der Calcium-Phosphat Methode transfiziert. Hierfür wurden $3,5 \times 10^6$ Zellen pro 10cm Schale bzw. $4,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch Platte ausgesät und am folgenden Tag transfiziert. Für einen Transfektionsansatz wurden in einem 2ml Eppendorfgefäß 15µg Plasmid-DNA mit Wasser auf 450µl aufgefüllt und mit 50µl 2,5M CaCl_2 Lösung gemischt. Anschließend wurden 500µl 2xHBS Lösung (16,012g/l NaCl, 0,744g/l KCl, 9,532g/l HEPES und 0,248g/l Na_2HPO_4) langsam tropfenweise unter Schütteln des Reaktionsgefäßes zugegeben und 5min bei RT inkubiert. Diese Transfektionslösung wurde schließlich tropfenweise zum Medium der am Vortag ausgesäten Zellen gegeben (1ml Lösung pro 10cm Schale bzw. 300µl pro Vertiefung einer 6-Loch Platte) und diese dann für 5h im Brutschrank inkubiert. Nach Wechseln des Mediums wurden die Zellen zur Expression des transfizierten Plasmides für 48-72h inkubiert.

HeLa S3 Zellen wurden mit dem kommerziellen Transfektionsreagenz FuGENE HD (Roche) gemäß dem Herstellerprotokoll transfiziert. Hierfür wurden am Tag vor der Transfektion 3×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch Platte bzw. $2,5 \times 10^6$ Zellen pro 10cm Schale ausgesät. Für die Transfektion von Zellen in einer 6-Loch Schale wurden 2µg DNA in 100µl Opti-MEM (Gibco BRL) verdünnt und mit 5µl FuGENE-HD versetzt. Nach einer Inkubation von 15min wurde die Transfektionslösung tropfenweise zu den am Vortag ausgesäten Zellen gegeben und diese dann zur Expression des Plasmids 48 bis 72h inkubiert.

5.3.6 Transfektion von Säugerzellen mit siRNA-Oligonukleotiden

Zur gezielten Verminderung des zellulären Expressionsniveaus eines Proteins durch RNA Interferenz wurden Zellen mit siRNA-Oligonukleotiden transfiziert. Hierzu wurde das Transfektionsreagens Oligofectamin (Invitrogen) nach Angabe des Herstellers verwendet. Am Tag vor der Transfektion wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch Platte bzw. $1,25 \times 10^6$ Zellen pro 10cm Schale ausgesät. Für die Transfektion von Zellen in einer 6-Loch Schale wurden 1,2µl 100µM siRNA-Oligonukleotid in 100µl Opti-MEM (Gibco BRL) verdünnt und mit 4µl Oligofectamin versetzt. Nach einer Inkubation von 15min wurde die Transfektionslösung tropfenweise zu den am Vortag ausgesäten Zellen gegeben und diese dann zur Etablierung der Depletion des jeweiligen Proteins 48 bis 72h inkubiert.

Folgende siRNA-Oligonukleotide fanden in dieser Arbeit Verwendung:

Name	Sequenz 19mer
siKontrolle	5'-cguacgcggaauacuucga-3'
siSENP1-1	5'-auucaguacaugauucagu-3'
siSENP1-2	5'-gcuuuggauccaaagauu-3'
siSENP2-1	5'-gcccagguaacuucugcu-3'
siSENP2-2	5'-guacuuucuucuauccuaa-3'
siSENP3-1	5'-caccagggcuggaaagguu-3'
siSENP3-2	5'-cuggcccugucucagccau-3'
siSENP5-1	5'-gaacaucguucuaauacc-3'
siSENP5-2	5'-agaaagcucucaaaucca-3'
siSENP6-1	5'-ugagucuacuggaccauua-3'
siSENP6-2	5'-guaacagccuuucauuca-3'
siSENP7-1	5'-gcagacugcgacaauaaa-3'
siSENP7-2	5'-ucaccacuguccaaauuca-3'
siPICH	5'-caagaucucuccaguauaa-3'
siMad2	5'-cuauugaaucaguuuccaa-3'
siNPM1-1	5'-ugaugaaaaugagcaccag-3'
siNPM1-2	5'-ggaagucucuuaagaaaa-3'

5.3.7 Expression von Proteinen über das pRTS-1-System

Der Vektor pRTS-1 verfügt über einen CMV-Promotor, der über ein tetO7-Element und die Bindung der ebenfalls auf dem Plasmid codierten rtet-Transaktivator- und tet-Repressor-Proteine reguliert ist. In Abwesenheit des Tetracyclin-Derivates Doxycyclin bindet der tet-Repressor und reprimiert aktiv den Promotor. Nach der Zugabe von Doxycyclin löst sich der tet-Repressor und der rtet-Transaktivator bindet an das tetO7-Element. Dies führt zu einer Aktivierung der Transkription. In Säugerzellen repliziert der Vektor dank seines EBV-basierten OriP/EBNA1- Systems episomal und ist über Hygromycin B selektierbar (Bornkamm et al., 2005).

Nach Transfektion von pRTS-1-Konstrukten in HeLa S3 Zellen, wie unter 5.3.5 beschrieben, erfolgte eine Selektion der transfizierten Kultur mit 200µg/ml Hygromycin für zwei Wochen, bevor eine Aussaat für das jeweilige Experiment vorgenommen wurde. Die Induktion der jeweiligen Proteine wurde dabei stets mit 1µg/ml Doxycyclin durchgeführt.

5.3.8 FACS-Analyse

Für die FACS Analyse wurden HeLa S3 Zellen durch Trypsinieren vom Kulturschalenboden gelöst und in PBS resuspendiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (3min, 500g), wurde das Zellpellet in 500µl PBS resuspendiert und diese Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen mit 4,5ml eiskaltem 70% Ethanol überführt. Für eine vollständige Fixierung wurden die Zellen anschließend 1h auf Eis inkubiert,

bevor sie mit 5ml PBS gewaschen wurden. Für die Anfärbung von DNA und den Abbau störender RNA wurden die Zellen in 1ml FACSstain-Lösung (PBS mit 0,5% Triton X-100, 20µg/ml Propidiumjodid, 20µg/ml RnaseA) resuspendiert und 1h bei RT inkubiert. Die Messung erfolgte schließlich in einem FACSCalibur System unter Verwendung der CELLQuest Software (Becton Dickinson). Die Messung des DNA-Gehaltes der Zellen (Propidiumjodid-Fluoreszenz) erfolgte im FL2-Kanal.

5.3.9 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie von asynchron wachsenden Zellen wurden HeLa S3 bzw. HEK293T 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% para-Formaldehyd 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 fünfmal mit PBS-T gewaschen bevor die Zugabe des primären Antikörpergemisches in PBS für 1h bei RT erfolgte. Nach erneutem fünfmaligem Waschen mit PBS-T erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpergemisches für 1h bei RT. Im Anschluss daran wurden Zellkerne durch eine Inkubation von 2min bei RT mit 50µg/ml 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI, Merck) in PBS angefärbt und fünfmal mit PBS-T gewaschen bevor die Deckgläschen kopfüber auf Objektträger mit *mounting medium* (0,5% para-Phenyldiamin in 20mM Tris/HCl [pH 9.0], 90% Glycerin) gelegt und mit Nagellack versiegelt wurden. Die Präparate wurden anschließend anhand eines Zeiss AX10-Mikroskop (Zeiss), das mit einem 63xÖl-Immersionsobjektiv und einer CCD-Kamera ausgestattet war, und über die Bildgebungssoftware Spot 4.5 visualisiert.

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie mitotischer Zellen wurden HeLa S3 Zellen wie in den einzelnen Experimenten angegeben synchronisiert und in der Prometaphase arretiert (5.3.12). Abgerundete mitotische Zellen wurden in Form eines sogenannten mitotischen *shake off* durch heftiges Schütteln von der Zellkulturschale abgelöst und mit PBS abgewaschen. Anschließend wurden die abgeschüttelten Zellen bei 400g auf poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser, die sich in einer 24-Loch Platte befanden, zentrifugiert. Poly-L-Lysin bindet dabei über seine positive Ladung die durch Zuckerketten negativ geladene extrazelluläre Matrix der Zellen und stellt so deren Anheftung an das Deckglas sicher. Nachdem die Zellen einmal mit PBS gewaschen wurden, erfolgte eine Fixierung und gleichzeitige Permeabilisierung der Zellen durch eine Inkubation in PTEMF-Puffer (50 mM PIPES

[pH 6,8], 10 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 0,2% Triton X-100, 3,5% para-Formaldehyd) für 10min bei RT. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zugabe von PBS-T mit 2% BSA gewaschen bevor das primäre Antikörpergemisch in PBS-T mit 2% BSA für 1h bei RT zugegeben wurde. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS-T mit 2% BSA wurde schließlich für 1h bei RT mit dem sekundären Antikörpergemisch in PBS-T mit 2% BSA inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Anfärbung der DNA durch eine Inkubation von 2min bei RT mit 50µg/ml DAPI in PBS. Nach achtmaligem Waschen in PBS-T mit 2% BSA wurden die Deckgläschen kopfüber auf Objektträger mit *mounting medium* gelegt und mit Nagellack versiegelt. Für die Visualisierung mitotischer Präparate wurde ein DeltaVision RT Mikroskop (AppliedPrecision) mit einer Photometrics CoolSNAP HQ Kamera und einem 100xUPlanApo Objektiv (Olympus) benutzt. Es wurden jeweils 10 in der z-Achse gestapelte Aufnahmen in einem Abstand von 0,1µm gemacht und mit einem Dekonvolutions-Algorithmus (Einstellungen: *noise filtering low, numer of cycles 5, method ratio conservative*) bearbeitet. Dekonvolvierte Bilder wurden schließlich anhand der Softworks Software (Applied Precision) in eine Ebene projiziert. Expositionszeiten und Einstellungen zur Dekonvolution wurden innerhalb eines Experiments für alle zu vergleichenden Präparate konstant gehalten. Folgende Antikörper wurden für die Immunfluoreszenzmikroskopie eingesetzt: mouse anti-FLAG M2 (Sigma), mouse anti-HA 16B12 (Covance), mouse anti-Cdc20 E7 (Santa Cruz), mouse anti-BubR1 8G1 (Upstate), mouse anti-V5 (Invitrogen), mouse anti-Hec1 (Genetex), rabbit anti Flag (Sigma), rabbit anti Mad2 (Bethyl), human anti-CREST (Immunovision), goat anti-human Cy3TM-conjugated (Jackson ImmunoResearch), donkey anti-rabbit Cy3TM-conjugated (Jackson ImmunoResearch), donkey anti-mouse FITC-conjugated (Jackson ImmunoResearch)

5.3.10 Zeitraffer-Mikroskopie

Für die Zeitraffer-Mikroskopie wurde eine HeLa S3 Zelllinie verwendet, die ein stabil in ihr Genom integriertes Histon H2B-GFP enthielt. Nach Transfektion der entsprechenden siRNA-Oligonukleotide, wurden Zellen in CO₂-unabhängigem Medium in einer auf 37°C beheizten Kammer kultiviert. Zeitraffer-Aufnahmen wurden in Abständen von 2min in einem DeltaVision RT Mikroskop (AppliedPrecision) mit einer Photometrics CoolSNAP HQ Kamera gemacht, die mit einem 20xUPlanFluorit Objektiv (Olympus) ausgestattet war. Für die Aufnahme und die Bearbeitung einzelner Bilder wurde die Softworks Software (Applied Precision) benutzt.

5.3.11 *In vivo* Markierung ribosomaler RNA

Für die metabolische Markierung ribosomaler RNA wurden HeLa S3 Zellen in Phosphat-freiem DMEM (GIBCO BRL) mit dialysiertem FCS (Sigma-Aldrich) für 30min vorinkubiert. Hierauf wurde das Medium mit Phosphat-freiem DMEM/10% dialysiertem FCS ersetzt, das 15 μ Ci/ml 32 P-Orthophosphat enthielt (GE Healthcare). Nach 1h wurde das radioaktive Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und für 2h in normalem DMEM/10% FCS inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte eine Isolation von Gesamt-RNA (siehe 5.4.12), eine Auftrennung derselben über ein denaturierendes Agarosegel (siehe 5.4.13) und eine Quantifizierung 32 P-markierter Banden mit einem Phosphoimager (BAS-2500, Fuji).

5.3.12 Synchronisierung und Anreicherung mitotischer Zellen

Die Anreicherung mitotischer Zellen erfolgte in der Regel über eine Vorsynchronisierung von HeLa S3 Zellen durch einen doppelten Thymidin-Block. Hierbei wurde normales DMEM/10% FCS für 16h mit 2mM Thymidin supplementiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit warmem PBS wurde auf 37°C vorgewärmtes DMEM/10% FCS hinzugefügt und nach 8h erneut mit 2mM Thymidin supplementiert. Nach 22h wurde erneut dreimal mit warmem PBS gewaschen und 37°C-warmes DMEM/10% FCS hinzugefügt. Im Anschluss daran wurde nach etwa 4h 0,2 μ g/ml Nocodazol oder 0,2 μ g/ml Taxol für die Arretierung der Zellen in der Prometaphase hinzugefügt und die Zellen für weitere 10h inkubiert. Für Immunfluoreszenzversuche in 3.2.7 und 3.3.3 wurde zusätzlich etwa 8h nach Freisetzung der Zellen aus dem zweiten Thymidin-Block der Protease-Inhibitor MG132 in einer Konzentration von 25 μ M dem Medium beigemischt und für weitere 3h inkubiert wie in Anhang Abb. 3 gezeigt. Die Gewinnung angereicherter mitotischer Zellen erfolgte durch einen sogenannten mitotischen *shake off*. Dabei wird eine Kulturschale mit arretierten Zellen mehrmals gegen eine Kante gestoßen, was zur endgültigen Ablösung abgerundeter mitotischer Zellen von der Kulturschale führt. Diese können dann durch Abpipettieren von Interphase-Zellen getrennt werden. Sollten Zellen ab der Prometaphase weiter auf einer Zellkulturschale inkubiert werden, wurden gleiche Mengen der angereicherten Zellen auf 3,5cm Schalen in vorgewärmtes Medium aliquotiert und nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet. In 3.2.7 erfolgte keine Vorsynchronisierung der Zellen durch einen Thymidin Block. Hier wurden Zellen für 24h in Nocodazol inkubiert, durch Trypsin-Behandlung geerntet und nach Waschen in PBS direkt einer FACS-Analyse unterzogen.

5.4 Molekularbiologische Methoden

5.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aus Flüssigkulturen (Birnboim, 1983). Hierbei fanden Kits der Firma Qiagen Verwendung. Kleine Mengen (Miniprep) wurden aus 4ml Übernacht-Kultur, größere Mengen (Maxiprep) aus 300ml Übernachtskultur nach Angaben des Herstellers isoliert (Qiagen Plasmid-Handbuch). Die DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen wurde photometrisch in einem Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Peqlab) bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen.

5.4.2 Restriktionsverdau von DNA

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen wurde nach den allgemein üblichen Vorschriften (Sambrook et al., 1989) und den Empfehlungen des Herstellers (NEB) durchgeführt. Es wurden in der Regel 10U Enzym pro 1µg DNA eingesetzt. Die Restriktionsansätze wurden mindestens 30min für analytische und mehr als 2h für präparative Zwecke bei der für das jeweilige Enzym geeigneten Temperatur inkubiert.

5.4.3 Dephosphorylierung von DNA

Um die Religation eines linearisierten Vektors während Ligationsreaktionen zu verhindern, wurden die 5'-Enden der Vektor-DNA dephosphoryliert. Dies erfolgte durch Zugabe von 10U CIP (*calf intestinal phosphatase*, NEB) pro µg DNA zum Restriktionsansatz und einer Inkubation von 30min bei 37°C.

5.4.4 Phosphorylierung von DNA

Für die Phosphorylierung von hybridisierten Oligonukleotiden an den jeweiligen 5'-Enden wurde die T4 Polynukleotid Kinase (T4-PNK, NEB) verwendet. Es wurden dabei 500ng Oligonukleotid mit 1mM ATP und 10U T4-PNK für 30 min bei 37°C in 1xT4-PNK-Puffer inkubiert. Um eine Störung nachfolgender Reaktionen seitens der T4-PNK zu verhindern, erfolgte anschließend eine Hitzeinaktivierung für 20min bei 65°C.

5.4.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von doppelsträngiger 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 handelsüblichen Mikrowellengerät aufgekocht, mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid supplementiert und in eine Flachgelkammer mit Kamm für die Geltaschen gegossen.

Die DNA-Proben wurden mit 1/6Vol 6xDNA-Probenpuffer (15% Glycerol, 0,25% OrangeG) versetzt und bei einer Spannung von 70V mit 1xTAE als Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurden schließlich 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.

5.4.6 Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Sollten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel isoliert werden, wurde die entsprechende Bande auf einem UV-Flächenstrahler unter langwelligem UV-Licht (324nm) mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Elution der DNA aus dem Gelstück erfolgte mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Die Elution erfolgte in 30-50µl sterilem, entionisiertem H₂O.

5.4.7 Ligation von DNA

Die Mengen der für die Ligation eingesetzten DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen abgeschätzt. Für die Ligation wurden Insert und Vektor etwa in einem molaren Verhältnis von 5:1 bei etwa 100ng Vektor-DNA eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde mit 1µl T4 DNA-Ligase (NEB) in 20µl 1x Ligase-Puffer mit 2mM ATP angesetzt und 1h bei RT inkubiert.

5.4.8 Einfügen von kurzen Oligonukleotid-Sequenzen

Kurze für Epitop-Markierungen kodierende DNA-Sequenzen wurden über hybridisierte Oligonukleotide an bestimmten Restriktionsschnittstellen in Plasmide eingefügt. Hierfür wurden jeweils zwei komplementäre Oligonukleotide hybridisiert, deren Sequenzen am 5'- und 3'-Ende so gewählt wurden, dass bei der Hybridisierung zu den jeweiligen Restriktionsschnittstellen passende Enden entstanden. Für die Hybridisierung wurden jeweils 5µg der beiden Oligonukleotide in 50µl Hybridisierungspuffer (50mM HEPES/KOH [pH 7.4], 100mM NaCl) gemischt, in einem Thermoblock für 10min bei 95°C erhitzt und durch Ausschalten des Thermoblocks langsam auf RT abgekühlt. 5µl der hybridisierten Oligonukleotide (500ng) wurden in einen Phosphorylierungsansatz (5.4.4) eingesetzt. Nach Hitzeinaktivierung der T4-PNK wurden schließlich 500ng der phosphorylierten Oligonukleotide in 100ng des entsprechend verdauten Expressionsplasmids ligiert.

5.4.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR-Bedingungen wurden im Zuge dieser Arbeit je nach Anforderungen wie Länge und GC-Gehalt der Primer oder Länge der zu amplifizierenden Sequenz variiert. Dabei wurden die Reaktionen stets in 50µl Gesamtvolumen durchgeführt und enthielten im Standardprotokoll folgende Komponenten.

5xPhusion PCR-PufferGC.(NEB)	10µl
dNTP-Mix (10mM).(NEB)	1µl
<i>forward</i> Primer (10 µM)	2µl
<i>reverse</i> Primer (10µM)	2µl
Phusion DNA-Polymerase (2U/µl).(NEB)	1µl
Matrizen-DNA	50ng
ddH ₂ O	ad 50µl

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

Schritt	Temperatur /°C	Dauer
initiale Denaturierung	94	2 min
Denaturierung	94	30s
Anlagerung	56-60	45s
Extension	72	30s/kb
terminale Extension	72	10 min

Es wurden 33 Zyklen der Schritte Denaturierung, Anlagerung und Extension gefahren, bevor die terminale Extension erfolgte. Die Anlagerungs-Temperatur wurde in der Regel so gewählt, dass sie etwa 5°C unter der T_M des Primers mit der geringeren Schmelztemperatur lag. Die Dauer der Extension wurde wie angegeben an die Länge des entstehenden PCR-Produkts angepasst.

Im Anschluss wurde das PCR-Produkt durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und ausgeschnitten (5.4.5, 5.4.6). In Fällen, in denen die Abtrennung der Matrizen-DNA nicht notwendig war, wurde das PCR-Produkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll gereinigt.

5.4.10 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.

5.4.11 Zielgerichtete *in vitro* Punktmutagenese

Für den gezielten Austausch einzelner Basen mittels einer PCR-basierten Methode wurde der QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wurden zwei komplementäre Oligonukleotide verwendet, die in der Mitte die gewünschte Punktmutation gegenüber der Zielsequenz trugen und in die 5'- und 3'-Richtungen noch jeweils mindestens 17bp komplementär zur Zielsequenz aufwiesen. Sollten mehrere Basen einer Gensequenz ausgetauscht werden, wurde der QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Hier erfolgte das Versuchsprotokoll und das Design der Oligonukleotide nach demselben Prinzip, allerdings wurde nur ein Primer pro einzuführender Mutation verwendet und maximal 5 Basen pro Reaktion ausgetauscht. Die methylierte Plasmid-DNA der Matrize wurde nach der PCR durch einen DpnI-Verdau für 1h bei 37°C beseitigt und 4µl dieses Ansatzes in *E. coli* transformiert. Die eingefügten Mutationen wurden über Sequenzierungen überprüft.

5.4.12 Isolierung von RNA aus Säugerzellen

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus Säuger-Zellkulturen erfolgte mittels des RNeasy RNA Purification Kit (Qiagen) wie vom Hersteller angegeben. Für eine Homogenisierung des Zelllysates vor dem Auftragen auf die RNA-Säulchen wurden zusätzlich noch QIAShredder Säulen (Qiagen) verwendet. Nach Elution der Gesamt-RNA mit RNase-freiem ddH₂O erfolgte bis zur weiteren Verwendung eine Lagerung bei -80°C. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm in einem BioPhotometer (Eppendorf). Eine optische Dichte von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 40µg/ml RNA.

5.4.13 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

Die Elektrophorese von RNA erfolgte stets denaturierend unter der Verwendung von MOPS-gepufferten (1xMOPS: 200mM MOPS [pH 7,0], 50mM Natriumacetat, 1mM EDTA) Formaldehydgelen (1% Agarose, 1xMOPS, 6,25% Formaldehyd). Für eine Denaturierung der RNA vor dem Gellauf wurden jeweils 2µg RNA mit 20µl RNA-Ladepuffer (50% Formamid, 6,25% Formaldehyd, 1xMOPS, 0,1% Bromphenolblau, 10µg/ml EtBr) versetzt und bei 55°C für 10min inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben sofort auf Eis gekühlt und auf das Gel geladen. Die Auftrennung der RNA erfolgte dabei mit 1xMOPS als Laufpuffer unter einer Spannung von 30V für 3-6h. Anschließend wurden die geladene RNA-Menge und die Intaktheit der RNA durch Sichtbarmachung der 28S und 18S rRNA bei UV-Licht der Wellenlänge 324nm auf

einem UV-Illuminator (IDA) überprüft. Hierauf erfolgte die Trocknung des Gels auf einem Whatman-Filterpapier unter Vakuum bei 80°C für 3h, bevor eine Quantifizierung der ³²P-markierten rRNA-Spezies mit einem Phosphorimager (BAS-2500, Fuji) und der Quantifizierungssoftware ImageGauge 4.23 (Fuji) durchgeführt wurde.

5.4.14 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription von mRNA wurde nach Extraktion der RNA aus Säugerzellen (5.4.12) der Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden *random hexamer*-Primer verwendet, um eine möglichst vollständige reverse Transkription von RNAs zu gewährleisten. 2µl der entstandenen cDNA wurden anschließend in der Realtime RT-PCR eingesetzt.

5.4.15 Realtime RT-PCR

Die Realtime RT-PCR ist eine Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Durch sie ist es möglich, über den gesamten Reaktionsverlauf einer PCR hinweg die Amplifizierung der DNA zu verfolgen und innerhalb des linearen Anstiegsbereiches der PCR die ursprünglich eingesetzte DNA-Menge zu ermitteln. Das Prinzip der Quantifizierung bei der Realtime PCR beruht dabei auf der unspezifischen Bindung des Farbstoffes SYBR Green an doppelsträngige DNA, da sich die Fluoreszenzintensität dieses interkalierenden Agens proportional zur neugebildeten DNA-Menge verhält. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte dazu in einem LightCycler® 480 (Roche). Realtime RT-PCR-Versuche in dieser Arbeit wurden stets halbquantitativ durchgeführt. Dazu wurde der LightCycler® 480 SYBR Green I Kit (Roche) nach Herstellerangaben verwendet. Da bereits MgCl₂, dNTPs, SYBR Green, der entsprechende PCR-Puffer und die FastStart Taq DNA Polymerase im Master Mix vorhanden waren, beschränkte sich ein Einzelansatz auf folgende Komponenten:

2xLightCycler® 480 SYBR Green I Master	10 µl
forward Primer (10 µM)	1 µl
reverse Primer (10 µM)	1 µl
ddH ₂ O	6 µl
cDNA	2 µl

Das Protokoll bestand, nach einer Aktivierung der FastStart Taq DNA Polymerase von 5min bei 95°C, aus 40 Zyklen mit jeweils 10s Denaturierungsphase bei 95°C, 15s Anlagerungs-Phase bei 58°C und 25s Elongationsphase bei 72°C. Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach der Elongationsphase in jedem Zyklus. Nach dem Ende des Amplifikationsprogrammes wurde noch das Schmelzverhalten der

amplifizierten DNA analysiert. Dazu wurde die DNA langsam (0,1°C/sec) von 60°C auf 95°C erhitzt und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. War die Reaktion spezifisch, d.h. entstand lediglich ein einziges Produkt in der PCR-Reaktion, so sollte die Fluoreszenz bei einem für das Produkt charakteristischen Punkt plötzlich abnehmen. Bei einer unspezifischen Reaktion hingegen ist keine scharfe Abnahme der Fluoreszenz oder gar eine mehrstufige Abnahme zu beobachten, die auf das Auftreten mehrerer unspezifischer Produkte zurückzuführen ist. In dieser Arbeit wurde bei jedem Versuch durch Analyse des Schmelzverhaltens die Spezifität der PCR-Reaktion validiert. Um eine semiquantitative Expressionsanalyse durchführen zu können, wurde in jeder Probe neben der zu analysierenden cDNA auch die cDNA des Haushaltsgens Porphobilinogen-Deaminase (PBG-D) quantifiziert und jeweils das Verhältnis aus beiden cDNAs gebildet. Nach Erstellen einer Standardkurve für jedes eingesetzte Primerpaar und der Errechnung der relativen mRNA-Mengen durch die LightCycler[®] 480 Software (Roche) konnten so die relativen mRNA-Mengen des zu untersuchenden Gens aus verschiedenen Proben miteinander verglichen werden. Die relative mRNA Menge des zu untersuchenden Gens wurde dabei in der Kontrollreaktion auf 100% gesetzt und alle anderen Proben relativ dazu betrachtet. Zusätzlich wurde für jedes Primerpaar eine Negativkontrolle angesetzt, die als Kontrollansatz ohne cDNA-Matrize die Gültigkeit des entsprechenden Versuches gewährleisten sollte. Folgende Primer wurden in dieser Arbeit für Realtime RT-PCR benutzt:

Zielgen	Primer 1	Primer 2
SENP1	5'-tccagatgatgaagtatcagag-3'	5'-ctcagaggcgacatgtagtac-3'
SENP2	5'-ggctgtaatagaagaccaggtg-3'	5'-caccctcctccacagtacaatg-3'
SENP3	5'-caaagtctctctggaccctg-3'	5'-tgctgcacacattgctgatgag-3'
SENP5	5'-ctgtggtgaaggggacgaacttc -3'	5'-cacaggcccatctacgtactcac -3'
SENP6	5'-catcatgctcatgcacagatac-3'	5'-ccactgtgattcggactcttc-3'
SENP7	5'-aacatatccgagggtgtcctg-3'	5'-tctaggctgcatcagat gat g-3'
PBG-D	5'- ccctggagaagaatgaagtgg -3'	5'- ttctctggcagggtttctagg -3'

5.5 Proteinbiochemische Methoden

5.5.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Polyacrylamid Gelelektrophoresen nur unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (Laemmli, 1970). Typischerweise wurden Gele mit 10% Trenngel (10% Acrylamid/Bisacrylamid [29:1], 390mM Tris [pH 8.8], 0,1% SDS, 0,2% TEMED, 0,2% APS) in Gelapparaturen aus der technischen Werkstatt des Max Planck Instituts für Biochemie gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde Isopropanol dekantiert, auf das

Trenngel ein 5%iges Sammelgel (5% Acrylamid/Bisacrylamid [29:1], 125mM Tris [pH 6.8], 0,1% SDS, 0,2% TEMED, 0,2% APS) gegossen und für die Ausbildung von Sammelaschen ein Teflonkamm mit 15 Zähnen für je 20 μ l Probenvolumen in das noch flüssige Sammelgel gesteckt. Proteinproben wurden in 1xSDS-Probenpuffer (62,5mM Tris [pH 6.8], 10% Glycerin, 2% SDS, 5% β -Mercaptoethanol und 0,01% Bromphenolblau) aufgenommen, durch Erhitzen (5 min bei 95°C) denaturiert, auf das Gel aufgetragen und bei einer Stromstärke von 25mA in SDS-Laufpuffer (50mM Tris, 384mM Glycin und 0,1% SDS) aufgetrennt. Als Molekulargewichtstandard für das Abschätzen der Größe von Proteinen fand der Precision Prestained Plus Protein Standard (BioRad) Verwendung. Die Acrylamidkonzentration der Gele richtete sich dabei nach dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine und wurde gegebenenfalls angepasst. Für die Auftrennung eines großen Spektrums an Proteingrößen wurden 4-20%ige Gradientengele verwendet. Zwei Gellösungen (4%-Lösung: 4% Acrylamid/Bisacrylamid [29:1], 390mM Tris [pH 8.8], 0,1% SDS; 20%-Lösung: 15% Saccharose 20% Acrylamid/Bisacrylamid [29:1], 390mM Tris [pH 8.8], 0,1% SDS) wurden in zwei getrennte Kammern eines Gradientenmischers gegeben und mit 1/100 Vol 10% APS und 1/1000 Vol TEMED gemischt. Nach Öffnen des Verbindungskanal wurden die Gele dann unter Rühren der vorderen (20%) Kammer mit einer Peristaltikpumpe von oben in die Gelform gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde der Alkohol entfernt und ein 3.75%iges Sammelgel (3,75% Acrylamid/Bisacrylamid [29:1], 125mM Tris [pH 6.8], 0,1% SDS, 0,2% APS und 0,2% TEMED) auf das Trenngel gegossen.

5.5.2 Coomassiefärbung von Proteingelen

Um Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden Polyacrylamid-Gele für 2h bei RT in PageBlue™ Protein Staining Solution (Fermentas) gefärbt und anschließend durch wiederholtes Waschen mit ddH₂O entfärbt.

5.5.3 Western Blot

Mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden in einer Semidry-Apparatur (Werkstatt des Max-Planck Instituts für Biochemie) aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond-C Extra, Amersham) überführt. Der Transfer wurde bei RT für 90min in Transferpuffer (48mM Tris, 39mM Glycin, 0,038% SDS und 20% Methanol) bei einer konstanten Stromstärke von 2mA/cm² Membran durchgeführt. Für die Besetzung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulose-Membran mit den immobilisierten Proteinen anschließend für mindestens 90min bei 4°C in *blocking*-Puffer (PBS, 0,05% Tween-20, 0,2% (w/v) I-Block (Tropix)) blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in *blocking* Puffer

über Nacht bei RT. Die Membran wurde dreimal für 5min mit PBST (PBS, 0,05% Tween-20) gewaschen und anschließend für 1h bei RT mit einem Alkalische Phosphatase-konjugierten sekundären Antikörper in einer Verdünnung von 1:15.000 in *blocking* Puffer inkubiert. Nach 5-maligem Waschen in PBST wurde die Membran noch zweimal für 3min in *assay*-Puffer (1mM MgCl₂, 20mM Tris [pH 9,8]) inkubiert, um für die Reaktion der Alkalischen Phosphatase ein basisches Milieu zu schaffen. Anschließend wurde der gebundene Antikörper mittels Chemiluminiszenz (CDP-Star Western Kit, Tropix) über das Auflegen eines Films (Amersham) oder direkt mit einer Kamera (LAS-3000, Fuji) nachgewiesen. Folgende Antikörper wurden verwendet: mouse anti-FLAG M2 (Sigma), mouse anti-HA 16B12 (Covance), mouse anti-V5 (Invitrogen), mouse anti-SENP6 (Abcam), mouse anti-NPM1 FC-61991 (Zymed), mouse anti-pRb (PharMingen), mouse anti-PARP1 (BD Biosciences), mouse p14^{ARF} DCS-240 (Sigma), mouse anti-CyclinB1 Ab-2 (Calbiochem), mouse anti-Tubulin E7 (DSHB), rabbit anti Mad2 (Bethyl), rabbit anti-Histon H3 (Abcam), rabbit anti-SENP5 (zur Verfügung gestellt von E. Yeh, (Gong und Yeh, 2006)), rabbit anti-SENP3 (diese Arbeit, siehe 5.5.10)

5.5.4 Farwestern-Analyse

Für die Untersuchung von Flag-SENP3-Varianten in einer Farwestern-Analyse wurde jeweils eine 10cm Kulturschale HeLa S3 Zellen wie unter 5.3.7 beschrieben mit dem jeweiligen pRTS-1-Konstrukt in Hygromycin selektioniert, durch einen doppelten Thymidin-Block und Arrest in Nocodazol in der Prometaphase arretiert und mit einem mitotischen *shake off* angereichert (5.3.12). Die Lyse erfolgte nach einmaligem Waschen in kaltem PBS in 250µl IP-Puffer (50mM Tris [pH 7.4], 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Triton-X100), der mit Complete Proteaseinhibitor Cocktail (Roche) und gegebenenfalls einer Mischung von Phosphatase-Inhibitoren (10mM NaF, 10mM β-Glycerophosphat, 1mM Na₃VO₄) versetzt wurde. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt und in einem 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß für 30min bei 4°C an einem Drehrad inkubiert. Zelltrümmer wurden anschließend für 10min bei 20.000g und 4°C abzentrifugiert. Nach Anreicherung von Flag-SENP3-Varianten (5.5.7) wurden die Zellen nicht behandelt oder mit 8U/µl Lambda Proteinphosphatase (NEB) inkubiert bevor sie in 1xSDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5min aufgegekocht wurden. Anschließend wurden die Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt und wie bei einem normalen Western Blot weiterverfahen. Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte allerdings eine Inkubation der Nitrocellulose Membran mit 1µg/ml GST-PBD (Boos, 2007) in *blocking* Puffer für 3h. Nach dreimaligem Waschen in PBST wurde die nun gebundene GST-PBD mit anti-

GST-Antikörper aus Kaninchen (Boos, 2007) und Alkalischer Phosphate gekoppeltem anti-Kaninchen Antikörper wie unter 5.5.3 nachgewiesen.

5.5.5 Lyse und Präparation von Zelllysaten

Zelllysate, die direkt über SDS-PAGE und Western Blot analysiert werden sollten, wurden nach einmaligem Waschen der Zellen in kaltem PBS durch direkte Zugabe von 400µl 1xSDS-Probenpuffer pro Vertiefung einer 6-well Platte lysiert. Das Lysat wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 5min bei 95°C aufgeköcht bevor eine Analyse über SDS-PAGE und Western Blot erfolgte. Sollte endogenes SENP3 untersucht werden, wurden Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und sofort mit 250µl IP-Puffer (50mM Tris [pH 7.4], 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Triton-X100) und Complete Proteaseinhibitor Cocktail (Roche) versetzt. Sollte die Phosphorylierung von SENP3 dabei erhalten bleiben, wurde zusätzlich eine Mischung von Phosphatase-Inhibitoren (10mM NaF, 10mM β -Glycerophosphat, 1mM Na_3VO_4) beigemischt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt, und in einem 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß für 30min bei 4°C an einem Drehrad inkubiert. Zelltrümmer wurden anschließend für 10min bei 20.000g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand stellte das Zelllysate dar, das nach Zugabe von 62,5µl 5xSDS-Probenpuffer (312mM Tris [pH 6.8], 50% Glycerin, 10% SDS, 25% β -Mercaptoethanol und 0,05% Bromphenolblau) und dreiminütigem Aufkochen in einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blot untersucht wurde.

5.5.6 Identifikation von SENP3-Interaktoren

Zur Identifikation von SENP3-Interaktoren wurden jeweils zehn 15cm-Schalen HEK293T Zellen transient mit pCI-Flag-SENP3^{C352S} oder Leervektor transfiziert und 48h später durch Rotation in 5ml Lysepuffer (50 mM Tris [pH 7.4], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,1% NP40) mit Complete Proteaseinhibitor Cocktail (Roche) für 30 min bei 4°C lysiert. Zelltrümmer wurden für 30 min bei 20.000g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand auf eine anti-FLAG M2 Agarose-Säule (Sigma) mit 250 µl Bettvolumen geladen. Nach vier Waschschritten mit je 5ml Lysepuffer wurden gebundene Proteine mit 2ml 0,2mg/ml FLAG-Peptid in Lysepuffer eluiert und durch Zugabe von 100µl 55% TCA für 20min auf Eis gefällt. Die nun gefällten Proteine wurden für 20min bei 20.000g und 4°C abzentrifugiert und einmal mit eiskaltem Ethanol gewaschen. Die Proteine wurden getrocknet, in 1xSDS-Probenpuffer aufgenommen, durch fünfminütiges Kochen denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Mit SENP3 aufgereinigte Proteinbanden wurden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht, ausgeschnitten und im Gel tryptisch verdaut. Die aus dem Gel eluierten Peptide wurden anschließend im MALDI-TOF

Massenspektrometer analysiert. Die Identifikation der Proteine erfolgte über deren Peptidmassen unter Benutzung des Programmes Mascot.

5.5.7 Immunpräzipitation und Anreicherung von Flag-SEN3

Für Immunpräzipitationen und eine Anreicherung von Flag-SEN3 wurden HeLa S3 oder HEK293T Zellen in einer 10cm Kulturschale bis zu einer Konfluenz von etwa 90% kultiviert, einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und sofort mit 1ml IP-Puffer (50mM Tris [pH 7.4], 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Triton-X100) und Complete Proteaseinhibitor Cocktail (Roche) versetzt. Sollte eine Phosphorylierung dabei erhalten bleiben, wurde zusätzlich eine Mischung von Phosphatase-Inhibitoren (10mM NaF, 10mM β -Glycerophosphat, 1mM Na_3VO_4) beigemischt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt, und in einem 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß für 30min bei 4°C an einem Drehrad inkubiert. Zelltrümmer wurden anschließend für 10min bei 20.000g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand stellte das Zell-Lysat dar, das nun mit 20 μ l anti-Flag M2 Agarose (Sigma) für 3h bei 4°C inkubiert wurde. Für die Immunpräzipitation von endogenem SEN3 wurde 1ml Lysat einer 90% konfluenten 10cm Kulturschale mit 3 μ g polyklonalem SEN3-Antikörper für 3h bei 4°C inkubiert und mit 25 μ l einer 50%igen Aufschlämmung von Protein G Plus/Protein A-Agarose (Calbiochem) für 1h gebunden. Nach fünfmaligem Waschen mit IP-Puffer wurden die Proteine durch fünfminütiges Kochen in 1xSDS-Probenpuffer von der Matrix eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot untersucht. Alternativ wurde angereichertes Flag-SEN3 nach Auftrennung über eine SDS-PAGE durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht, ausgeschnitten und im Gel tryptisch verdaut. Die aus dem Gel eluierten Peptide wurden anschließend in einem Orbitrap LTQ Massenspektrometer (Thermo Electron) auf phosphorylierte Fragmente untersucht. Die Auswertung erfolgte unter Benutzung des Programmes Mascot.

5.5.8 Anreicherung His₆-markierter Proteine über eine Ni-NTA-Matrix

HEK293T bzw. HeLa S3 Zellen wurden in 10cm Zellkulturschalen transfiziert und 48h nach Transfektion mit 1ml denaturierendem Nickel-Lysepuffer (6M Guanidiniumhydrochlorid, 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris/HCl [pH 8.0]) versetzt und in einem 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß 3 x 15s bei 20% sonifiziert (Sonopuls HD2200, Bandelin). Nach Zentrifugation bei 13.000g für 5min wurden 50 μ l des Überstandes einer TCA-Präzipitation unterzogen und später als Lysat auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die restlichen 950 μ l wurden über Nacht mit 20 μ l magnetischen Ni-NTA Agarose *beads* (Qiagen) bei RT an einem Drehrad inkubiert. Die magnetischen *beads* wurden je zweimal mit 1ml Waschpuffer A (8M Harnstoff, 100mM NaH_2PO_4 ,

10mM Tris/HCl [pH 8.0]) und B (8M Harnstoff, 100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris/HCl [pH 6.8]) sowie einmal mit PBS gewaschen und für 5min in 50µl 1xSDS-Probenpuffer aufgekocht. Anschließend erfolgte eine Analyse der Proteine über SDS-PAGE und Western Blot.

5.5.9 *In vitro*-Modifikation mit SUMO und Demodifikation

Substrate wurden durch *in vitro* Transkription/Translation (TNT quick coupled reticulocyte lysate system Kit, Promega) gemäß den Angaben des Herstellers erzeugt und bei der Translation durch die Zugabe von ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert. Anschließend wurden für eine Modifikation mit SUMO 2µl des Translatats mit 100ng E1, bestehend aus GST-AOS1 und His₆-UBA2, 50ng Ubc9 und 3µg His₆-SUMO1 bzw. His₆-SUMO2 in Modifikationspuffer (50mM Tris/HCl [pH 7.5], 5mM MgCl₂, 2mM ATP) für 90min bei 30°C in einem 20µl Reaktionsansatz inkubiert. Sollte zusätzlich die Demodifikation des Substrates überprüft werden, wurden 4µl der entsprechenden *in vitro* translatierten SUMO-Isopeptidase und 150mM NaCl zugegeben und für weitere 90min bei 30°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 6xSDS-Probenpuffer abgestoppt, für 5min bei 95°C aufgekocht und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Trocknung des SDS-Gels unter Vakuum bei 80°C erfolgte die Detektion des *in vitro* translatierten Substrates und der SUMO-modifizierten Formen mittels Autoradiographie.

5.5.10 Herstellung und Aufreinigung eines SENP3 Antikörpers

Die Herstellung des anti-SENP3 Antikörpers erfolgte in einem Kaninchen durch Injektion einer Mischung zweier Peptide aus SENP3 (LPPRWSQLGTSQRPR und TQQDMPKLRRIYK) durch die Firma Eurogentec. Das erhaltene Serum wurde über eine Affinitätssäule, an die beide Peptide anhand des Sulfolink Coupling Gel Matrix Kits (Pierce) kovalent gekoppelt wurden, gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

6 Literaturverzeichnis

- Amerik, A.Y. and Hochstrasser, M. (2004) "Mechanism and function of deubiquitinating enzymes". *Biochim Biophys Acta*, **1695**, 189-207.
- Andrews, P.D., Ovechkina, Y., Morrice, N., Wagenbach, M., Duncan, K., Wordeman, L. and Swedlow, J.R. (2004) "Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere". *Dev Cell*, **6**, 253-268.
- Apicelli, A.J., Maggi, L.B., Jr., Hirbe, A.C., Miceli, A.P., Olanich, M.E., Schulte-Winkeler, C.L., Saporita, A.J., Kuchenreuther, M., Sanchez, J., Weilbaecher, K. and Weber, J.D. (2008) "A non-tumor suppressor role for basal p19ARF in maintaining nucleolar structure and function". *Mol Cell Biol*, **28**, 1068-1080.
- Archambault, V., Li, C.X., Tackett, A.J., Wasch, R., Chait, B.T., Rout, M.P. and Cross, F.R. (2003) "Genetic and biochemical evaluation of the importance of Cdc6 in regulating mitotic exit". *Mol Biol Cell*, **14**, 4592-4604.
- Arnautov, A. and Dasso, M. (2005) "Ran-GTP regulates kinetochore attachment in somatic cells". *Cell Cycle*, **4**, 1161-1165.
- Ausubel, F.M., Brent, R. Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmna, J. G., Smith, J. A. Struhl, K. . (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. Green and Wiley, New York.
- Ayaydin, F. and Dasso, M. (2004) "Distinct in vivo dynamics of vertebrate SUMO paralogues". *Mol Biol Cell*, **15**, 5208-5218.
- Azuma, Y., Arnautov, A., Anan, T. and Dasso, M. (2005) "PIASy mediates SUMO-2 conjugation of Topoisomerase-II on mitotic chromosomes". *Embo J*, **24**, 2172-2182.
- Azuma, Y., Arnautov, A. and Dasso, M. (2003) "SUMO-2/3 regulates topoisomerase II in mitosis". *J Cell Biol*, **163**, 477-487.
- Baba, D., Maita, N., Jee, J.G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugasawa, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H. and Shirakawa, M. (2005) "Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1". *Nature*, **435**, 979-982.
- Bachant, J., Alcasabas, A., Blat, Y., Kleckner, N. and Elledge, S.J. (2002) "The SUMO-1 isopeptidase Smt4 is linked to centromeric cohesion through SUMO-1 modification of DNA topoisomerase II". *Mol Cell*, **9**, 1169-1182.
- Bailey, D. and O'Hare, P. (2004) "Characterization of the localization and proteolytic activity of the SUMO-specific protease, SENP1". *J Biol Chem*, **279**, 692-703.
- Barr, F.A., Sillje, H.H. and Nigg, E.A. (2004) "Polo-like kinases and the orchestration of cell division". *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 429-440.
- Bartel, P., Chien, C.T., Sternglanz, R. and Fields, S. (1993) "Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system". *Biotechniques*, **14**, 920-924.
- Baumann, C., Korner, R., Hofmann, K. and Nigg, E.A. (2007) "PICH, a centromere-associated SNF2 family ATPase, is regulated by Plk1 and required for the spindle checkpoint". *Cell*, **128**, 101-114.
- Bernier-Villamor, V., Sampson, D.A., Matunis, M.J. and Lima, C.D. (2002) "Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1". *Cell*, **108**, 345-356.
- Bharadwaj, R. and Yu, H. (2004) "The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer". *Oncogene*, **23**, 2016-2027.
- Birnboim, H.C. (1983) "A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA". *Methods Enzymol*, **100**, 243-255.
- Boisvert, F.M., van Koningsbruggen, S., Navascues, J. and Lamond, A.I. (2007) "The multifunctional nucleolus". *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 574-585.
- Boos, D. (2007) "Separase: Regulation, Funktion und neue Substrate ". *Dissertation an der Ludwig Maximilians Universität München*.
- Bornkamm, G.W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J.M., Laux, G., Bachi, J., Korndoerfer, M., Schlee, M., Holzel, M., Malamoussi, A., Chapman, R.D., Nimmerjahn, F., Mautner, J., Hillen, W., Bujard, H. and Feuillard, J. (2005) "Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system". *Nucleic Acids Res*, **33**, e137.

Literaturverzeichnis

- Brady, S.N., Yu, Y., Maggi, L.B., Jr. and Weber, J.D.** (2004) "ARF impedes NPM/B23 shuttling in an Mdm2-sensitive tumor suppressor pathway". *Mol Cell Biol*, **24**, 9327-9338.
- Bylebyl, G.R., Belichenko, I. and Johnson, E.S.** (2003) "The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast". *J Biol Chem*, **278**, 44113-44120.
- Chen, R.H.** (2002) "BubR1 is essential for kinetochore localization of other spindle checkpoint proteins and its phosphorylation requires Mad1". *J Cell Biol*, **158**, 487-496.
- Chen, R.H., Shevchenko, A., Mann, M. and Murray, A.W.** (1998) "Spindle checkpoint protein Xmad1 recruits Xmad2 to unattached kinetochores". *J Cell Biol*, **143**, 283-295.
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R. and 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.
- Ciehanover, A., Hod, Y. and Hershko, A.** (1978) "A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes". *Biochem Biophys Res Commun*, **81**, 1100-1105.
- Clute, P. and Pines, J.** (1999) "Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase". *Nat Cell Biol*, **1**, 82-87.
- Dai, W., Wang, Q., Liu, T., Swamy, M., Fang, Y., Xie, S., Mahmood, R., Yang, Y.M., Xu, M. and Rao, C.V.** (2004) "Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency". *Cancer Res*, **64**, 440-445.
- Dasso, M.** (2008) "Emerging roles of the SUMO pathway in mitosis". *Cell Div*, **3**, 5.
- Dawlaty, M.M., Malureau, L., Jeganathan, K.B., Kao, E., Sustmann, C., Tahk, S., Shuai, K., Grosschedl, R. and van Deursen, J.M.** (2008) "Resolution of sister centromeres requires RanBP2-mediated SUMOylation of topoisomerase IIalpha". *Cell*, **133**, 103-115.
- De Antoni, A., Pearson, C.G., Cimini, D., Canman, J.C., Sala, V., Nezi, L., Mapelli, M., Sironi, L., Faretta, M., Salmon, E.D. and Musacchio, A.** (2005) "The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint". *Curr Biol*, **15**, 214-225.
- DeLuca, J.G., Gall, W.E., Ciferri, C., Cimini, D., Musacchio, A. and Salmon, E.D.** (2006) "Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1". *Cell*, **127**, 969-982.
- den Besten, W., Kuo, M.L., Tago, K., Williams, R.T. and Sherr, C.J.** (2006) "Ubiquitination of, and sumoylation by, the Arf tumor suppressor". *Isr Med Assoc J*, **8**, 249-251.
- Denison, C., Rudner, A.D., Gerber, S.A., Bakalarski, C.E., Moazed, D. and Gygi, S.P.** (2005) "A proteomic strategy for gaining insights into protein sumoylation in yeast". *Mol Cell Proteomics*, **4**, 246-254.
- Desterro, J.M., Rodriguez, M.S. and Hay, R.T.** (1998) "SUMO-1 modification of I κ B inhibits NF- κ B activation". *Mol Cell*, **2**, 233-239.
- Desterro, J.M., Thomson, J. and Hay, R.T.** (1997) "Ubc9 conjugates SUMO but not ubiquitin". *FEBS Lett*, **417**, 297-300.
- Dez, C. and Tollervey, D.** (2004) "Ribosome synthesis meets the cell cycle". *Curr Opin Microbiol*, **7**, 631-637.
- Di Bacco, A. and Gill, G.** (2006) "SUMO-specific proteases and the cell cycle. An essential role for SENP5 in cell proliferation". *Cell Cycle*, **5**, 2310-2313.
- Di Bacco, A., Ouyang, J., Lee, H.Y., Catic, A., Ploegh, H. and Gill, G.** (2006) "The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division". *Mol Cell Biol*, **26**, 4489-4498.
- Diaz-Martinez, L.A., Gimenez-Abian, J.F., Azuma, Y., Guacci, V., Gimenez-Martin, G., Lanier, L.M. and Clarke, D.J.** (2006) "PIASgamma is required for faithful chromosome segregation in human cells". *PLoS ONE*, **1**, e53.
- Dieckhoff, P., Bolte, M., Sancak, Y., Braus, G.H. and Irniger, S.** (2004) "Smt3/SUMO and Ubc9 are required for efficient APC/C-mediated proteolysis in budding yeast". *Mol Microbiol*, **51**, 1375-1387.
- Draviam, V.M., Stegmeier, F., Nalepa, G., Sowa, M.E., Chen, J., Liang, A., Hannon, G.J., Sorger, P.K., Harper, J.W. and Elledge, S.J.** (2007) "A functional genomic screen identifies a role for TAO1 kinase in spindle-checkpoint signalling". *Nat Cell Biol*, **9**, 556-564.
- Eichler, D.C. and Craig, N.** (1994) "Processing of eukaryotic ribosomal RNA". *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **49**, 197-239.
- Elia, A.E., Rellos, P., Haire, L.F., Chao, J.W., Ivins, F.J., Hoepker, K., Mohammad, D., Cantley, L.C., Smerdon, S.J. and Yaffe, M.B.** (2003) "The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain". *Cell*, **115**, 83-95.

- Fatica, A. and Tollervey, D. (2002) "Making ribosomes". *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 313-318.
- Fields, S. and Song, O. (1989) "A novel genetic system to detect protein-protein interactions". *Nature*, **340**, 245-246.
- Gardner, R.D. and Burke, D.J. (2000) "The spindle checkpoint: two transitions, two pathways". *Trends Cell Biol*, **10**, 154-158.
- Gassmann, R., Carvalho, A., Henzing, A.J., Ruchaud, S., Hudson, D.F., Honda, R., Nigg, E.A., Gerloff, D.L. and Earnshaw, W.C. (2004) "Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle". *J Cell Biol*, **166**, 179-191.
- Giet, R., Petretti, C. and Prigent, C. (2005) "Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link?" *Trends Cell Biol*, **15**, 241-250.
- Gimenez-Abian, J.F., Sumara, I., Hirota, T., Hauf, S., Gerlich, D., de la Torre, C., Ellenberg, J. and Peters, J.M. (2004) "Regulation of sister chromatid cohesion between chromosome arms". *Curr Biol*, **14**, 1187-1193.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O.A., Thain, A., Anderson, L.A., Snowden, A.W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N.D. and Hay, R.T. (2003) "P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification". *Mol Cell*, **11**, 1043-1054.
- Glotzer, M., Murray, A.W. and Kirschner, M.W. (1991) "Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway". *Nature*, **349**, 132-138.
- Golan, A., Yudkovsky, Y. and Hershko, A. (2002) "The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk". *J Biol Chem*, **277**, 15552-15557.
- Gong, L., Millas, S., Maul, G.G. and Yeh, E.T. (2000) "Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease". *J Biol Chem*, **275**, 3355-3359.
- Gong, L. and 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.
- Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B. and Pandolfi, P.P. (2006) "Nucleophosmin and cancer". *Nat Rev Cancer*, **6**, 493-505.
- Gruber, S., Haering, C.H. and Nasmyth, K. (2003) "Chromosomal cohesin forms a ring". *Cell*, **112**, 765-777.
- Habedanck, R., Stierhof, Y.D., Wilkinson, C.J. and Nigg, E.A. (2005) "The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication". *Nat Cell Biol*, **7**, 1140-1146.
- Hagting, A., Den Elzen, N., Vodermaier, H.C., Waizenegger, I.C., Peters, J.M. and Pines, J. (2002) "Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1". *J Cell Biol*, **157**, 1125-1137.
- Hang, J. and Dasso, M. (2002) "Association of the human SUMO-1 protease SENP2 with the nuclear pore". *J Biol Chem*, **277**, 19961-19966.
- Hanisch, A., Wehner, A., Nigg, E.A. and Sillje, H.H. (2006) "Different Plk1 functions show distinct dependencies on Polo-Box domain-mediated targeting". *Mol Biol Cell*, **17**, 448-459.
- Hannich, J.T., Lewis, A., Kroetz, M.B., Li, S.J., Heide, H., Emili, A. and Hochstrasser, M. (2005) "Defining the SUMO-modified proteome by multiple approaches in *Saccharomyces cerevisiae*". *J Biol Chem*, **280**, 4102-4110.
- Hansen, D.V., Loktev, A.V., Ban, K.H. and Jackson, P.K. (2004) "Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC Inhibitor Emi1". *Mol Biol Cell*, **15**, 5623-5634.
- Hardeland, U., Steinacher, R., Jiricny, J. and Schar, P. (2002) "Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover". *Embo J*, **21**, 1456-1464.
- Hauf, S., Roitinger, E., Koch, B., Dittrich, C.M., Mechtler, K. and Peters, J.M. (2005) "Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2". *PLoS Biol*, **3**, e69.
- Hauf, S., Waizenegger, I.C. and Peters, J.M. (2001) "Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells". *Science*, **293**, 1320-1323.
- Hay, R.T. (2005) "SUMO: a history of modification". *Mol Cell*, **18**, 1-12.
- 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. and Dikic, I. (2006) "Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs". *J Biol Chem*, **281**, 16117-16127.

- Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L. and Rose, I.A.** (1980) "Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 1783-1786.
- Hicke, L. and Dunn, R.** (2003) "Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins". *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 141-172.
- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S.** (2002) "RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO". *Nature*, **419**, 135-141.
- Holzel, M., Grimm, T., Rohrmoser, M., Malamoussi, A., Harasim, T., Gruber-Eber, A., Kremmer, E. and Eick, D.** (2007) "The BRCT domain of mammalian Pes1 is crucial for nucleolar localization and rRNA processing". *Nucleic Acids Res*, **35**, 789-800.
- Holzel, M., Rohrmoser, M., Schlee, M., Grimm, T., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Hiddemann, W., Bornkamm, G.W. and Eick, D.** (2005) "Mammalian WDR12 is a novel member of the Pes1-Bop1 complex and is required for ribosome biogenesis and cell proliferation". *J Cell Biol*, **170**, 367-378.
- Honda, R., Korner, R. and Nigg, E.A.** (2003) "Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis". *Mol Biol Cell*, **14**, 3325-3341.
- Huang, T.T., Wuerzberger-Davis, S.M., Wu, Z.H. and Miyamoto, S.** (2003) "Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress". *Cell*, **115**, 565-576.
- Ishov, A.M., Sotnikov, A.G., Negorev, D., Vladimirova, O.V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E.T., Strauss, J.F., 3rd and Maul, G.G.** (1999) "PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1". *J Cell Biol*, **147**, 221-234.
- Itahana, K., Bhat, K.P., Jin, A., Itahana, Y., Hawke, D., Kobayashi, R. and Zhang, Y.** (2003) "Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation". *Mol Cell*, **12**, 1151-1164.
- Itahana, Y., Yeh, E.T. and Zhang, Y.** (2006) "Nucleocytoplasmic shuttling modulates activity and ubiquitination-dependent turnover of SUMO-specific protease 2". *Mol Cell Biol*, **26**, 4675-4689.
- Ivanov, D. and Nasmyth, K.** (2005) "A topological interaction between cohesin rings and a circular minichromosome". *Cell*, **122**, 849-860.
- James, P., Halladay, J. and Craig, E.A.** (1996) "Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast". *Genetics*, **144**, 1425-1436.
- Jentsch, S. and Pyrowolakis, G.** (2000) "Ubiquitin and its kin: how close are the family ties?" *Trends Cell Biol*, **10**, 335-342.
- Jeyaparakash, A.A., Klein, U.R., Lindner, D., Ebert, J., Nigg, E.A. and Conti, E.** (2007) "Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together". *Cell*, **131**, 271-285.
- Johnson, E.S. and Blobel, G.** (1997) "Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p". *J Biol Chem*, **272**, 26799-26802.
- Johnson, E.S. and Blobel, G.** (1999) "Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins". *J Cell Biol*, **147**, 981-994.
- Johnson, E.S., Schwienhorst, I., Dohmen, R.J. and Blobel, G.** (1997) "The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer". *Embo J*, **16**, 5509-5519.
- Joseph, J., Liu, S.T., Jablonski, S.A., Yen, T.J. and Dasso, M.** (2004) "The RanGAP1-RanBP2 complex is essential for microtubule-kinetochore interactions in vivo". *Curr Biol*, **14**, 611-617.
- Joseph, J., Tan, S.H., Karpova, T.S., McNally, J.G. and Dasso, M.** (2002) "SUMO-1 targets RanGAP1 to kinetochores and mitotic spindles". *J Cell Biol*, **156**, 595-602.
- Kagey, M.H., Melhuish, T.A. and Wotton, D.** (2003) "The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3". *Cell*, **113**, 127-137.
- Kim, K.I., Baek, S.H., Jeon, Y.J., Nishimori, S., Suzuki, T., Uchida, S., Shimbara, N., Saitoh, H., Tanaka, K. and Chung, C.H.** (2000) "A new SUMO-1-specific protease, SUSP1, that is highly expressed in reproductive organs". *J Biol Chem*, **275**, 14102-14106.
- Kleylein-Sohn, J., Westendorf, J., Le Clech, M., Habedanck, R., Stierhof, Y.D. and Nigg, E.A.** (2007) "Plk4-induced centriole biogenesis in human cells". *Dev Cell*, **13**, 190-202.

Literaturverzeichnis

- Kraft, C., Herzog, F., Gieffers, C., Mechtler, K., Hagting, A., Pines, J. and Peters, J.M.** (2003) "Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation". *Embo J*, **22**, 6598-6609.
- Laemmli, U.K.** (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*, **227**, 680-685.
- Lafontaine, D.L. and Tollervey, D.** (2001) "The function and synthesis of ribosomes". *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 514-520.
- Lane, H.A. and Nigg, E.A.** (1996) "Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes". *J Cell Biol*, **135**, 1701-1713.
- Leary, D.J. and Huang, S.** (2001) "Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus". *FEBS Lett*, **509**, 145-150.
- Lenart, P., Petronczki, M., Steegmaier, M., Di Fiore, B., Lipp, J.J., Hoffmann, M., Rettig, W.J., Kraut, N. and Peters, J.M.** (2007) "The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1". *Curr Biol*, **17**, 304-315.
- Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X., O'Neil, J., Park, E.J. and Chen, J.D.** (2000) "Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML". *Mol Cell Biol*, **20**, 1784-1796.
- Li, S.J. and Hochstrasser, M.** (1999) "A new protease required for cell-cycle progression in yeast". *Nature*, **398**, 246-251.
- Li, S.J. and Hochstrasser, M.** (2000) "The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein". *Mol Cell Biol*, **20**, 2367-2377.
- Li, S.J. and Hochstrasser, M.** (2003) "The Ulp1 SUMO isopeptidase: distinct domains required for viability, nuclear envelope localization, and substrate specificity". *J Cell Biol*, **160**, 1069-1081.
- 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., Hung, C.C., Suen, C.S., Hwang, M.J., Chang, K.S., Maul, G.G. and Shih, H.M.** (2006) "Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors". *Mol Cell*, **24**, 341-354.
- Liu, X., Liu, Z., Jang, S.W., Ma, Z., Shinmura, K., Kang, S., Dong, S., Chen, J., Fukasawa, K. and Ye, K.** (2007) "Sumoylation of nucleophosmin/B23 regulates its subcellular localization, mediating cell proliferation and survival". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 9679-9684.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. and Melchior, F.** (1997) "A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2". *Cell*, **88**, 97-107.
- Martelli, F., Hamilton, T., Silver, D.P., Sharpless, N.E., Bardeesy, N., Rokas, M., DePinho, R.A., Livingston, D.M. and Grossman, S.R.** (2001) "p19ARF targets certain E2F species for degradation". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4455-4460.
- Matunis, M.J., Coutavas, E. and Blobel, G.** (1996) "A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex". *J Cell Biol*, **135**, 1457-1470.
- McGuinness, B.E., Hirota, T., Kudo, N.R., Peters, J.M. and Nasmyth, K.** (2005) "Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells". *PLoS Biol*, **3**, e86.
- Melese, T. and Xue, Z.** (1995) "The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome". *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 319-324.
- Meluh, P.B. and Koshland, D.** (1995) "Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C". *Mol Biol Cell*, **6**, 793-807.
- Mendoza, H.M., Shen, L.N., Botting, C., Lewis, A., Chen, J., Ink, B. and Hay, R.T.** (2003) "NEDP1, a highly conserved cysteine protease that deNEDDylates Cullins". *J Biol Chem*, **278**, 25637-25643.
- Meraldi, P., Draviam, V.M. and Sorger, P.K.** (2004a) "Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression". *Dev Cell*, **7**, 45-60.
- Meraldi, P., Honda, R. and Nigg, E.A.** (2004b) "Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility". *Curr Opin Genet Dev*, **14**, 29-36.
- Meraldi, P. and Sorger, P.K.** (2005) "A dual role for Bub1 in the spindle checkpoint and chromosome congression". *Embo J*, **24**, 1621-1633.

Literaturverzeichnis

- Michel, L.S., Liberal, V., Chatterjee, A., Kirchwegger, R., Pasche, B., Gerald, W., Dobles, M., Sorger, P.K., Murty, V.V. and Benezra, R. (2001) "MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells". *Nature*, **409**, 355-359.
- Minshull, J., Straight, A., Rudner, A.D., Dernburg, A.F., Belmont, A. and Murray, A.W. (1996) "Protein phosphatase 2A regulates MPF activity and sister chromatid cohesion in budding yeast". *Curr Biol*, **6**, 1609-1620.
- Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M. and Caput, D. (2000) "Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif". *J Biol Chem*, **275**, 36316-36323.
- Mo, Y.Y., Yu, Y., Shen, Z. and Beck, W.T. (2002) "Nucleolar delocalization of human topoisomerase I in response to topotecan correlates with sumoylation of the protein". *J Biol Chem*, **277**, 2958-2964.
- Montpetit, B., Hazbun, T.R., Fields, S. and Hieter, P. (2006) "Sumoylation of the budding yeast kinetochore protein Ndc10 is required for Ndc10 spindle localization and regulation of anaphase spindle elongation". *J Cell Biol*, **174**, 653-663.
- Moshe, Y., Boulaire, J., Pagano, M. and Hershko, A. (2004) "Role of Polo-like kinase in the degradation of early mitotic inhibitor 1, a regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 7937-7942.
- Mossessova, E. and Lima, C.D. (2000) "Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast". *Mol Cell*, **5**, 865-876.
- Mukhopadhyay, D., Ayaydin, F., Kolli, N., Tan, S.H., Anan, T., Kametaka, A., Azuma, Y., Wilkinson, K.D. and Dasso, M. (2006) "SUSP1 antagonizes formation of highly SUMO2/3-conjugated species". *J Cell Biol*, **174**, 939-949.
- Mukhopadhyay, D. and Dasso, M. (2007) "Modification in reverse: the SUMO proteases". *Trends Biochem Sci*, **32**, 286-295.
- Muller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S. (2001) "SUMO, ubiquitin's mysterious cousin". *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 202-210.
- Muller, S., Matunis, M.J. and Dejean, A. (1998) "Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus". *Embo J*, **17**, 61-70.
- Muratani, M. and Tansey, W.P. (2003) "How the ubiquitin-proteasome system controls transcription". *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 192-201.
- Musacchio, A. and Hardwick, K.G. (2002) "The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling". *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 731-741.
- Musacchio, A. and Salmon, E.D. (2007) "The spindle-assembly checkpoint in space and time". *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 379-393.
- Nacerddine, K., Lehembre, F., Bhaumik, M., Artus, J., Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C., Pandolfi, P.P. and Dejean, A. (2005) "The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice". *Dev Cell*, **9**, 769-779.
- Nasmyth, K. (2005) "How do so few control so many?" *Cell*, **120**, 739-746.
- Nasmyth, K., Peters, J.M. and Uhlmann, F. (2001) "Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids". *Novartis Found Symp*, **237**, 113-133; discussion 133-118, 158-163.
- Neef, R., Klein, U.R., Kopajtich, R. and Barr, F.A. (2006) "Cooperation between mitotic kinesins controls the late stages of cytokinesis". *Curr Biol*, **16**, 301-307.
- Nigg, E.A. (1998) "Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish". *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 776-783.
- Nigg, E.A. (2001) "Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints". *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 21-32.
- Nishida, T., Tanaka, H. and Yasuda, H. (2000) "A novel mammalian Smt3-specific isopeptidase 1 (SMT3IP1) localized in the nucleolus at interphase". *Eur J Biochem*, **267**, 6423-6427.
- Nishida, T. and Yamada, Y. (2008) "SMT3IP1, a nucleolar SUMO-specific protease, deconjugates SUMO-2 from nucleolar and cytoplasmic nucleophosmin". *Biochem Biophys Res Commun*, **374**, 382-387.
- Novak, B., Toth, A., Csikasz-Nagy, A., Gyorffy, B., Tyson, J.J. and Nasmyth, K. (1999) "Finishing the cell cycle". *J Theor Biol*, **199**, 223-233.
- Nowak, M. and Hammerschmidt, M. (2006) "Ubc9 regulates mitosis and cell survival during zebrafish development". *Mol Biol Cell*, **17**, 5324-5336.

Literaturverzeichnis

- Ohi, R., Sapra, T., Howard, J. and Mitchison, T.J. (2004) "Differentiation of cytoplasmic and meiotic spindle assembly MCAK functions by Aurora B-dependent phosphorylation". *Mol Biol Cell*, **15**, 2895-2906.
- Panse, V.G., Kressler, D., Pauli, A., Petfalski, E., Gnadig, M., Tollervey, D. and Hurt, E. (2006) "Formation and nuclear export of preribosomes are functionally linked to the small-ubiquitin-related modifier pathway". *Traffic*, **7**, 1311-1321.
- Panse, V.G., Kuster, B., Gerstberger, T. and Hurt, E. (2003) "Unconventional tethering of Ulp1 to the transport channel of the nuclear pore complex by karyopherins". *Nat Cell Biol*, **5**, 21-27.
- Peters, J.M. (2002) "The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond". *Mol Cell*, **9**, 931-943.
- Peters, J.M. (2006) "The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy". *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 644-656.
- Petronczki, M., Lenart, P. and Peters, J.M. (2008) "Polo on the Rise-from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1". *Dev Cell*, **14**, 646-659.
- Pfander, B., Moldovan, G.L., Sacher, M., Hoegel, C. and 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. and Melchior, F. (2002) "The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity". *Cell*, **108**, 109-120.
- Prudden, J., Pebernard, S., Raffa, G., Slavin, D.A., Perry, J.J., Tainer, J.A., McGowan, C.H. and Boddy, M.N. (2007) "SUMO-targeted ubiquitin ligases in genome stability". *Embo J*, **26**, 4089-4101.
- Qi, Y., Gregory, M.A., Li, Z., Brousal, J.P., West, K. and Hann, S.R. (2004) "p19ARF directly and differentially controls the functions of c-Myc independently of p53". *Nature*, **431**, 712-717.
- Reddy, S.K., Rape, M., Margansky, W.A. and Kirschner, M.W. (2007) "Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation". *Nature*, **446**, 921-925.
- Reverter, D. and Lima, C.D. (2004) "A basis for SUMO protease specificity provided by analysis of human Senp2 and a Senp2-SUMO complex". *Structure*, **12**, 1519-1531.
- Reverter, D. and Lima, C.D. (2006) "Structural basis for SENP2 protease interactions with SUMO precursors and conjugated substrates". *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 1060-1068.
- Reverter, D., Wu, K., Erdene, T.G., Pan, Z.Q., Wilkinson, K.D. and Lima, C.D. (2005) "Structure of a complex between Nedd8 and the Ulp/Senp protease family member Den1". *J Mol Biol*, **345**, 141-151.
- Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoegel, C. and Jentsch, S. (2005) "A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting". *Cell*, **120**, 73-84.
- Rieder, C.L. and Maiato, H. (2004) "Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint". *Dev Cell*, **7**, 637-651.
- Ross, S., Best, J.L., Zon, L.I. and Gill, G. (2002) "SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization". *Mol Cell*, **10**, 831-842.
- Ruchaud, S., Carmena, M. and Earnshaw, W.C. (2007) "Chromosomal passengers: conducting cell division". *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 798-812.
- Rudner, A.D., Hardwick, K.G. and Murray, A.W. (2000) "Cdc28 activates exit from mitosis in budding yeast". *J Cell Biol*, **149**, 1361-1376.
- Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001) "Molecular Cloning: A laboratory Manual". *CSH Laboratory Press*, **3**.
- Savkur, R.S. and Olson, M.O. (1998) "Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease". *Nucleic Acids Res*, **26**, 4508-4515.
- Schimke, R.T., Kung, A.L., Rush, D.F. and Sherwood, S.W. (1991) "Differences in mitotic control among mammalian cells". *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **56**, 417-425.
- Schmidt, D. and Muller, S. (2002) "Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 2872-2877.
- Schwarz, S.E., Matuschewski, K., Liakopoulos, D., Scheffner, M. and Jentsch, S. (1998) "The ubiquitin-like proteins SMT3 and SUMO-1 are conjugated by the UBC9 E2 enzyme". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 560-564.
- Seeler, J.S. and Dejean, A. (2003) "Nuclear and unclear functions of SUMO". *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 690-699.

- Seeler, J.S., Marchio, A., Losson, R., Desterro, J.M., Hay, R.T., Chambon, P. and Dejean, A. (2001) "Common properties of nuclear body protein SP100 and TIF1alpha chromatin factor: role of SUMO modification". *Mol Cell Biol*, **21**, 3314-3324.
- Seong, Y.S., Kamijo, K., Lee, J.S., Fernandez, E., Kuriyama, R., Miki, T. and Lee, K.S. (2002) "A spindle checkpoint arrest and a cytokinesis failure by the dominant-negative polo-box domain of Plk1 in U-2 OS cells". *J Biol Chem*, **277**, 32282-32293.
- Seufert, W., Futcher, B. and Jentsch, S. (1995) "Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins". *Nature*, **373**, 78-81.
- Shen, L., Tatham, M.H., Dong, C., Zagorska, A., Naismith, J.H. and Hay, R.T. (2006a) "SUMO protease SENP1 induces isomerization of the scissile peptide bond". *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 1069-1077.
- Shen, L.N., Dong, C., Liu, H., Naismith, J.H. and Hay, R.T. (2006b) "The structure of SENP1-SUMO-2 complex suggests a structural basis for discrimination between SUMO paralogues during processing". *Biochem J*, **397**, 279-288.
- Shen, T.H., Lin, H.K., Scaglioni, P.P., Yung, T.M. and Pandolfi, P.P. (2006c) "The mechanisms of PML-nuclear body formation". *Mol Cell*, **24**, 331-339.
- Song, J., Durrin, L.K., Wilkinson, T.A., Krontiris, T.G. and Chen, Y. (2004) "Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 14373-14378.
- Steffan, J.S., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E., Trotman, L.C., Slepko, N., Illes, K., Lukacsovich, T., Zhu, Y.Z., Cattaneo, E., Pandolfi, P.P., Thompson, L.M. and Marsh, J.L. (2004) "SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology". *Science*, **304**, 100-104.
- Stegmeier, F., Rape, M., Draviam, V.M., Nalepa, G., Sowa, M.E., Ang, X.L., McDonald, E.R., 3rd, Li, M.Z., Hannon, G.J., Sorger, P.K., Kirschner, M.W., Harper, J.W. and Elledge, S.J. (2007) "Anaphase initiation is regulated by antagonistic ubiquitination and deubiquitination activities". *Nature*, **446**, 876-881.
- Steinacher, R. and Schar, P. (2005) "Functionality of human thymine DNA glycosylase requires SUMO-regulated changes in protein conformation". *Curr Biol*, **15**, 616-623.
- Strunnikov, A.V., Aravind, L. and Koonin, E.V. (2001) "Saccharomyces cerevisiae SMT4 encodes an evolutionarily conserved protease with a role in chromosome condensation regulation". *Genetics*, **158**, 95-107.
- Sudakin, V., Chan, G.K. and Yen, T.J. (2001) "Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2". *J Cell Biol*, **154**, 925-936.
- Sugimoto, M., Kuo, M.L., Roussel, M.F. and Sherr, C.J. (2003) "Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing". *Mol Cell*, **11**, 415-424.
- Sumara, I., Gimenez-Abian, J.F., Gerlich, D., Hirota, T., Kraft, C., de la Torre, C., Ellenberg, J. and Peters, J.M. (2004) "Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles". *Curr Biol*, **14**, 1712-1722.
- Sumara, I., Vorlaufer, E., Stukenberg, P.T., Kelm, O., Redemann, N., Nigg, E.A. and Peters, J.M. (2002) "The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase". *Mol Cell*, **9**, 515-525.
- Sun, H., Leverson, J.D. and 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. and Sherr, C.J. (2005) "Sumoylation induced by the Arf tumor suppressor: a p53-independent function". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 7689-7694.
- Tanaka, K., Nishide, J., Okazaki, K., Kato, H., Niwa, O., Nakagawa, T., Matsuda, H., Kawamukai, M. and Murakami, Y. (1999) "Characterization of a fission yeast SUMO-1 homologue, pmt3p, required for multiple nuclear events, including the control of telomere length and chromosome segregation". *Mol Cell Biol*, **19**, 8660-8672.
- Tatham, M.H., Geoffroy, M.C., Shen, L., Plechanovova, A., Hattersley, N., Jaffray, E.G., Palvimo, J.J. and 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.
- Tatham, M.H., Jaffray, E., Vaughan, O.A., Desterro, J.M., Botting, C.H., Naismith, J.H. and Hay, R.T. (2001) "Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9". *J Biol Chem*, **276**, 35368-35374.

Literaturverzeichnis

- Taylor, S.S., Ha, E. and McKeon, F. (1998) "The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase". *J Cell Biol*, **142**, 1-11.
- Torres-Rosell, J., Sunjevaric, I., De Piccoli, G., Sacher, M., Eckert-Boulet, N., Reid, R., Jentsch, S., Rothstein, R., Aragon, L. and Lisby, M. (2007) "The Smc5-Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus". *Nat Cell Biol*, **9**, 923-931.
- Uhlmann, F. (2004) "The mechanism of sister chromatid cohesion". *Exp Cell Res*, **296**, 80-85.
- Uzunova, K., Gottsche, K., Miteva, M., Weisshaar, S.R., Glanemann, C., Schnellhardt, M., Niessen, M., Scheel, H., Hofmann, K., Johnson, E.S., Praefcke, G.J. and Dohmen, R.J. (2007) "Ubiquitin-dependent proteolytic control of SUMO conjugates". *J Biol Chem*, **282**, 34167-34175.
- Vader, G., Medema, R.H. and Lens, S.M. (2006) "The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis". *J Cell Biol*, **173**, 833-837.
- Vader, G. (2008) "Restriction of Aurora-B activity upon bi-orientation promotes timely anaphase onset". *Abstract, Conference The Cell Cycle, May 2008*, 252.
- Valentin, G.G. (1836) "Repertorium für Anatomie und Physiologie". *Verlag von Huber u. Comp., Band1*.
- Vigneron, S., Prieto, S., Bernis, C., Labbe, J.C., Castro, A. and Lorca, T. (2004) "Kinetochore localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom?" *Mol Biol Cell*, **15**, 4584-4596.
- Waizenegger, I.C., Hauf, S., Meinke, A. and Peters, J.M. (2000) "Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase". *Cell*, **103**, 399-410.
- Watanabe, N., Arai, H., Iwasaki, J., Shiina, M., Ogata, K., Hunter, T. and Osada, H. (2005) "Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic Wee1 via multiple pathways". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 11663-11668.
- Watts, F.Z. (2007) "The role of SUMO in chromosome segregation". *Chromosoma*, **116**, 15-20.
- Wilkinson, K.D., Urban, M.K. and Haas, A.L. (1980) "Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes". *J Biol Chem*, **255**, 7529-7532.
- Wohlschlegel, J.A., Johnson, E.S., Reed, S.I. and Yates, J.R., 3rd. (2004) "Global analysis of protein sumoylation in *Saccharomyces cerevisiae*". *J Biol Chem*, **279**, 45662-45668.
- Woods, Y.L., Xirodimas, D.P., Prescott, A.R., Sparks, A., Lane, D.P. and Saville, M.K. (2004) "p14 Arf promotes small ubiquitin-like modifier conjugation of Werner's helicase". *J Biol Chem*, **279**, 50157-50166.
- Xu, Z. and Au, S.W. (2005) "Mapping residues of SUMO precursors essential in differential maturation by SUMO-specific protease, SENP1". *Biochem J*, **386**, 325-330.
- Zeitlin, S.G., Shelby, R.D. and Sullivan, K.F. (2001) "CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis". *J Cell Biol*, **155**, 1147-1157.
- Zhang, H., Saitoh, H. and Matunis, M.J. (2002) "Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex". *Mol Cell Biol*, **22**, 6498-6508.
- Zhang, X.D., Goeres, J., Zhang, H., Yen, T.J., Porter, A.C. and 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.
- Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P.S., Dejean, A. and Pandolfi, P.P. (2000) "Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation". *Blood*, **95**, 2748-2752.

7 Anhang

7.1 Abbildungen

A						
Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Sequence
25 - 32	1023.5694	1022.5621	1022.4821	0.0800	1	K.ADKDYHFK.V
33 - 45	1568.8178	1567.8105	1567.7226	0.0879	0	K.VDNDENEHQLSLR.T
46 - 54	803.5278	802.5205	802.4549	0.0656	0	R.TVSLGAGAK.D
81 - 101	2227.4176	2226.4104	2226.2083	0.2021	0	K.MSVQPTVSLGGFEITPPVVL.R
81 - 101	2243.3749	2242.3676	2242.2032	0.1644	0	K.MSVQPTVSLGGFEITPPVVL.R Oxidation (M)
207 - 221	1603.8540	1602.8467	1601.7757	1.0710	1	K.SNQGKDSKPSSTPR.S
213 - 221	974.5955	973.5882	973.4829	0.1053	0	K.DSKPSSTPR.S
222 - 229	910.5399	909.5326	909.4556	0.0770	1	R.SKGQESFK.K
240 - 248	931.5392	930.5320	930.4658	0.0661	0	K.GPSSVEDIK.A
251 - 257	806.4749	805.4676	805.4004	0.0673	0	K.MQASIEK.G
278 - 291	1819.9913	1818.9840	1818.8359	0.1481	0	R.MTDQEAIQDLWQWR.K
278 - 291	1835.9628	1834.9555	1834.8308	0.1247	0	R.MTDQEAIQDLWQWR.K Oxidation (M)

B						
1	MEDSMMDMS	PLRPQNYLFG	CELKADKDYH	FKVDNDENEH	QLSLRTVSLG	
51	AGAKDELHIV	EAEAMNYEGS	PIKVTLATLK	MSVQPTVSLG	GFEITPPVVL	
101	RLKCGSGPVH	ISGQHLVAVE	EDAASEDEEE	EDVKLLSISG	KRSAPGGGSK	
151	VPQKKVKLAA	DEDDDDDEE	DDDDDDDD	FDDEEAEEKA	PVKKSIRDTP	
201	AKNAQKSNQN	GKDSKPSSTP	RSKGQESFK	QEKTPKTPKG	PSSVEDIKAK	
251	MQASIEKGGG	LPKVEAKFIN	YVKNCFRMTD	QEAIQDLWQW	RKSL	

Anhang Abb. 1: Identifizierung von NPM1 durch Massenspektrometrie

(A) Eine Gruppe von tryptisch verdauten Peptiden eines 37kDa großen Proteins, das mit SENP3 interagiert, stimmt mit theoretisch berechneten Massen tryptisch verdauter Peptide von NPM1 überein. (B) Die Position dieser übereinstimmenden Peptide in der Sequenz von NPM1 ist mit roter Schrift gezeigt, Abdeckung 32%.

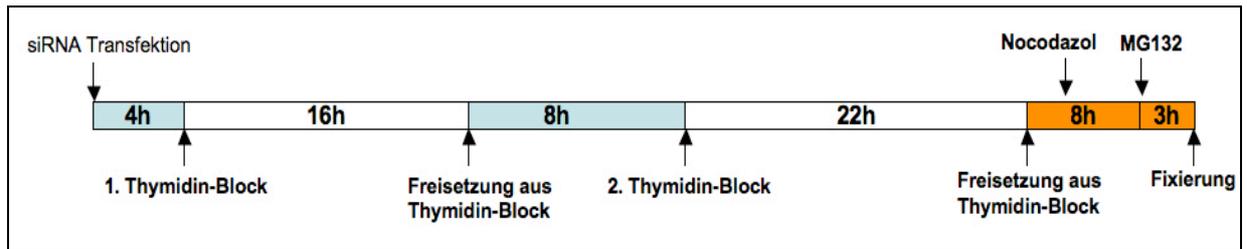
A										B									
1	MKETIQGTGS	WGPEPPGPGI	PPAYSSPRE	RLRWPPPKP	RLKSGGGFGP	1	MKETIQGTGS	WGPEPPGPGI	PPAYSSPRE	RLRWPPPKP	RLKSGGGFGP								
51	DPGSGTTVPA	RRLPVPRPSF	DASASEEEEE	EEEEDEDEE	EVAAWRLPP	51	DPGSGTTVPA	RRLPVPRPSF	DASASEEEEE	EEEEDEDEE	EVAAWRLPP								
101	RWSQLGTSQR	PRPSRPTHK	TCSQRRRAM	RAFRLLYSK	STSLTFHWKL	101	RWSQLGTSQR	PRPSRPTHK	TCSQRRRAM	RAFRLLYSK	STSLTFHWKL								
151	WGRHRGRRR	LAHPKNHLS	QGGATPQV	SPCCRFDSR	GPPPLRGLL	151	WGRHRGRRR	LAHPKNHLS	QGGATPQV	SPCCRFDSR	GPPPLRGLL								
201	GALMAEDGVR	GSPVPVSGPP	MEEDGLRWT	KSPLDPDSGL	LSCTLPNGFG	201	GALMAEDGVR	GSPVPVSGPP	MEEDGLRWT	KSPLDPDSGL	LSCTLPNGFG								
251	QSGPEGERS	LAPPDASILI	SNVCSIGDHV	AQELFQSD	GMAEEAERP	251	QSGPEGERS	LAPPDASILI	SNVCSIGDHV	AQELFQSD	GMAEEAERP								
301	EKAGQHSPLR	EEHVTCVQSI	LDEFQTYGS	LIPSTDEV	EKLEDIFQOE	301	EKAGQHSPLR	EEHVTCVQSI	LDEFQTYGS	LIPSTDEV	EKLEDIFQOE								
351	FSTPSRKGLV	LQLIQSYQRM	PGNAMVRGFR	VAYKRHLVLT	DDLGLTYGQN	351	FSTPSRKGLV	LQLIQSYQRM	PGNAMVRGFR	VAYKRHLVLT	DDLGLTYGQN								
401	WLNDQVMNMY	GDLVMDTVE	KVHFNFFY	DKLRTKGYDG	VKRWTKNVDI	401	WLNDQVMNMY	GDLVMDTVE	KVHFNFFY	DKLRTKGYDG	VKRWTKNVDI								
451	FNKELLLPI	HLEVHWSLIS	VDVRRRTITY	FDSQRTLNR	CPKHIAKYLQ	451	FNKELLLPI	HLEVHWSLIS	VDVRRRTITY	FDSQRTLNR	CPKHIAKYLQ								
501	AEAVKDRDL	FHQGWKGYFK	MNVARQNDS	DCGAFVLQYC	KHLALSQPF	501	AEAVKDRDL	FHQGWKGYFK	MNVARQNDS	DCGAFVLQYC	KHLALSQPF								
551	FTQQDMPKLR	RQIYKELCHC	KLTV			551	FTQQDMPKLR	RQIYKELCHC	KLTV										

C									
1	MKETIQGTGS	WGPEPPGPGI	PPAYSSPRE	RLRWPPPKP	RLKSGGGFGP				
51	DPGSGTTVPA	RRLPVPRPSF	DASASEEEEE	EEEEDEDEE	EVAAWRLPP				
101	RWSQLGTSQR	PRPSRPTHK	TCSQRRRAM	RAFRLLYSK	STSLTFHWKL				
151	WGRHRGRRR	LAHPKNHLS	QGGATPQV	SPCCRFDSR	GPPPLRGLL				
201	GALMAEDGVR	GSPVPVSGPP	MEEDGLRWT	KSPLDPDSGL	LSCTLPNGFG				
251	QSGPEGERS	LAPPDASILI	SNVCSIGDHV	AQELFQSD	GMAEEAERP				
301	EKAGQHSPLR	EEHVTCVQSI	LDEFQTYGS	LIPSTDEV	EKLEDIFQOE				
351	FSTPSRKGLV	LQLIQSYQRM	PGNAMVRGFR	VAYKRHLVLT	DDLGLTYGQN				
401	WLNDQVMNMY	GDLVMDTVE	KVHFNFFY	DKLRTKGYDG	VKRWTKNVDI				
451	FNKELLLPI	HLEVHWSLIS	VDVRRRTITY	FDSQRTLNR	CPKHIAKYLQ				
501	AEAVKDRDL	FHQGWKGYFK	MNVARQNDS	DCGAFVLQYC	KHLALSQPF				
551	FTQQDMPKLR	RQIYKELCHC	KLTV						

Anhang Abb. 2: Identifizierung von SENP3-Phosphorylierungsstellen durch Massenspektrometrie

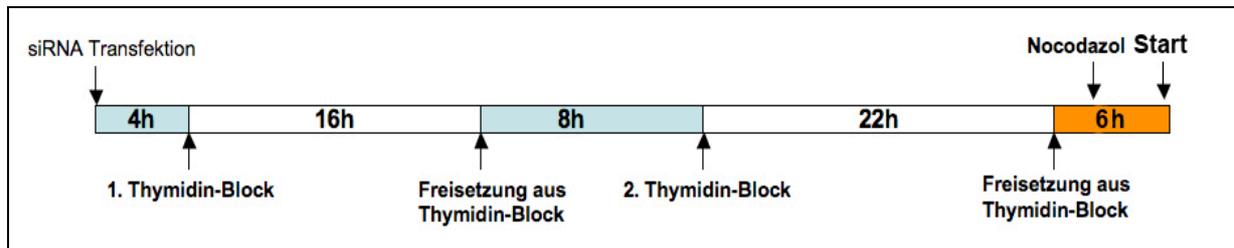
(A)-(C) Flag-SENP3 wurde in HeLa S3 Zellen exprimiert, über anti-Flag M2 Agarose aufgereinigt, tryptisch verdaut und einer massenspektrometrischen Analyse auf Phosphorylierungsstellen unterzogen. Die Position einzelner Peptide, die mit theoretisch berechneten Massen tryptisch verdauter Peptide von SENP3 übereinstimmen, ist mit roter Schrift gezeigt. (A) Flag-SENP3 aus asynchronen Zellen, Abdeckung 48% (B) Flag-SENP3 aus Nocodazol-arretierten Zellen, Abdeckung 46% (C) Flag-SENP3 aus Taxol-arretierten Zellen, Abdeckung 45%.

Anhang



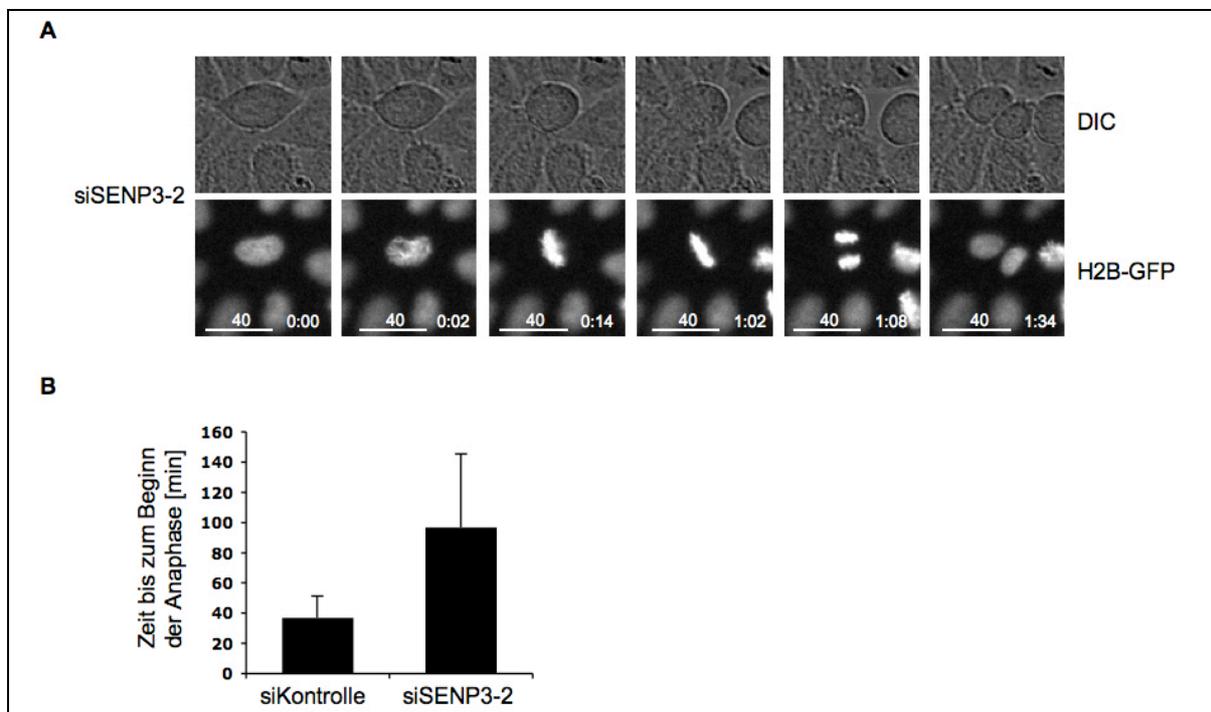
Anhang Abb. 3: Synchronisierungs-Schema zur Gewinnung mitotischer Zellen

Nach Transfektion wurden HeLa S3 Zellen mit einem doppelten Thymidin Block vorsynchronisiert und anschließend mit Nocodazol arretiert, um den *spindle assembly checkpoint* zu aktivieren. Nach etwa 8h wurde dem Medium zusätzlich MG132 beigemischt, um zu verhindern, dass Zellen die Mitose weiter durchlaufen. 3h nach Zugabe von MG132 wurden Zellen durch mitotischen *shake off* gesammelt, auf poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser zentrifugiert und mit PTEMF-Puffer fixiert.



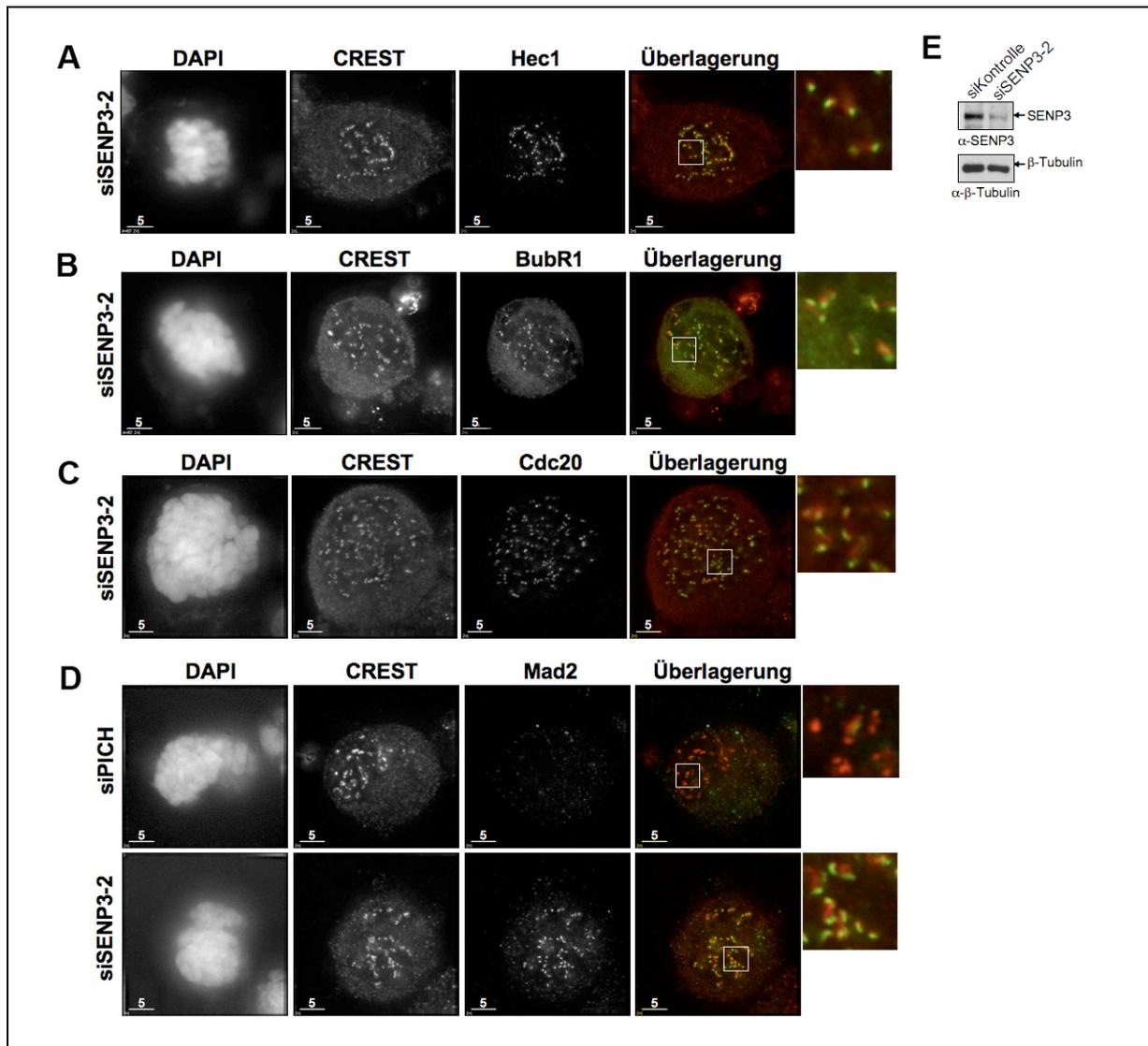
Anhang Abb. 4: Synchronisierungs-Schema für die Zeitraffer-Mikroskopie

Nach Transfektion wurden HeLa S3 Zellen mit einem doppelten Thymidin Block vorsynchronisiert. Etwa 3h nach Freisetzung der Zellen aus dem zweiten Thymidinblock wurde Nocodazol hinzugefügt, um den *spindle assembly checkpoint* zu aktivieren. 6h nach Freisetzung aus dem zweiten Thymidinblock wurde die Zeitraffer-Mikroskopie gestartet.



Anhang Abb. 5: Depletion von SENP3 verzögert den Beginn der Anaphase

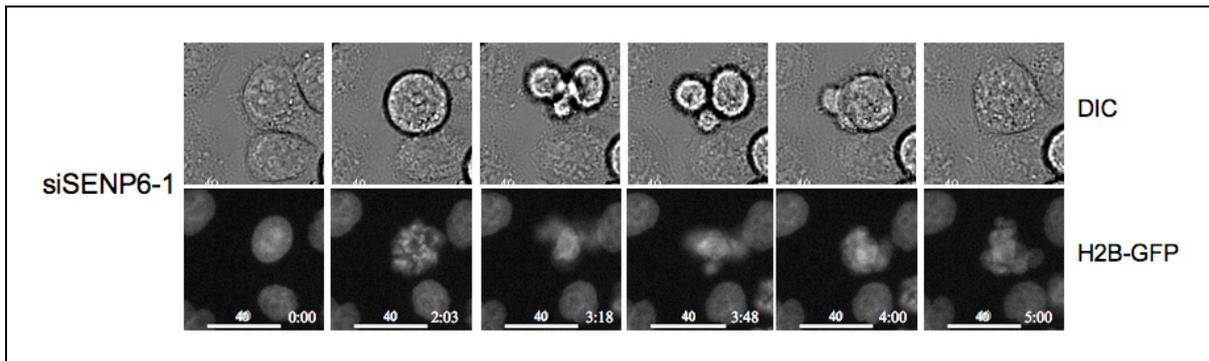
(A) HeLa S3 Zellen mit stabil integriertem Histon H2B-GFP wurden wie angegeben mit siRNA Oligonukleotiden behandelt. Die Einzelbilder sind repräsentative Aufnahmen und zeigen das Fortschreiten einzelner Zellen in der Mitose zu den angegebenen Zeitpunkten. Maßstab: 40µm, Zeit [h:min] (B) Quantifizierung der Zeitspanne zwischen DNA-Kondensationsbeginn und Beginn der Anaphase.



Anhang Abb. 6: Lokalisierung von SAC-Proteinen nach Depletion von SENP3

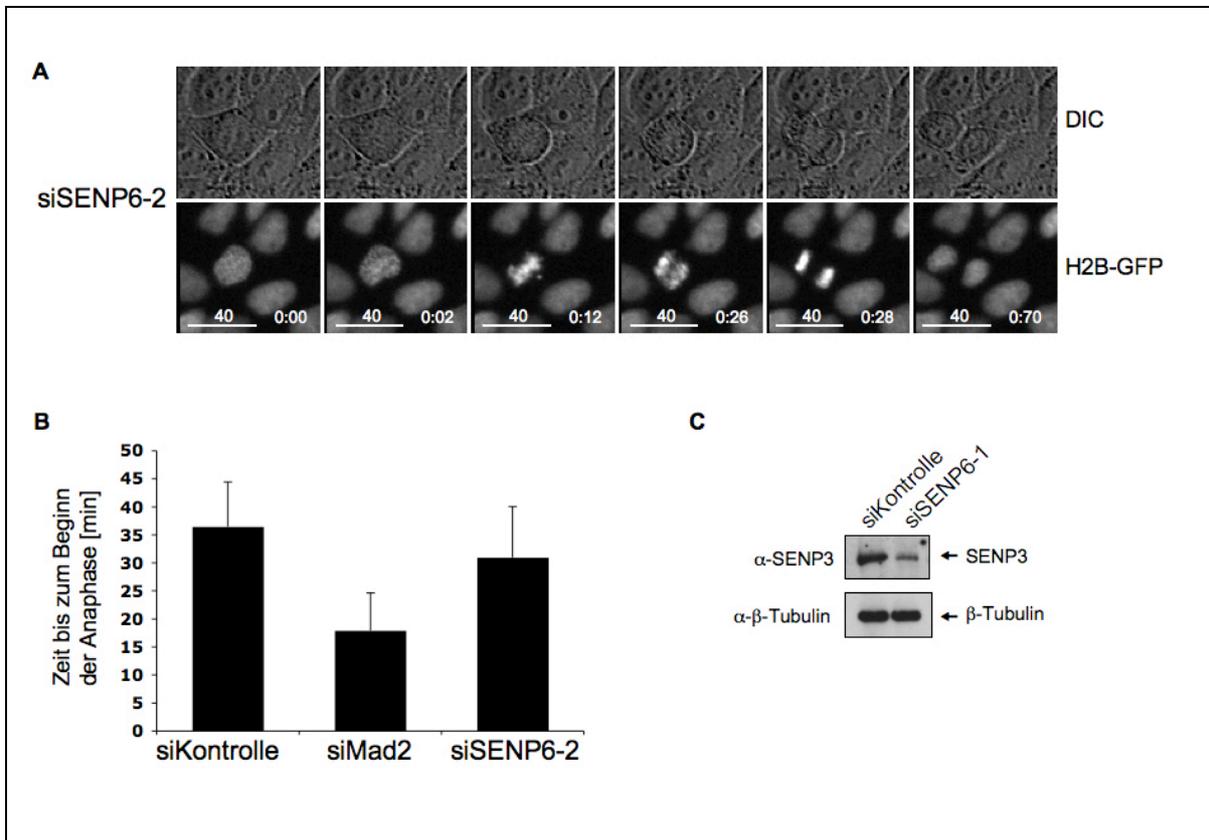
(A) – (D) Die Lokalisierung einzelner SAC-Proteine in HeLa S3 Zellen wurde nach Transfektion des angegebenen siRNA-Oligonukleotids anhand immunologischer Färbung mit den angegebenen Antikörpern bestimmt. DNA wurde mit DAPI angefärbt. (grün) CREST-Antiserum (rot) wurde als Kinetochor/Centromer-Marker benutzt. Maßstab: 5µm. Einzelne Kinetochor-Paare wurden vierfach vergrößert. (D) Depletion von PICH diente als Kontrolle für eine Mislokalisierung von Mad2. (E) Depletion von SENP3 in den für diesen Versuch benutzten Zellen, gezeigt mittels Western Blot.

Anhang



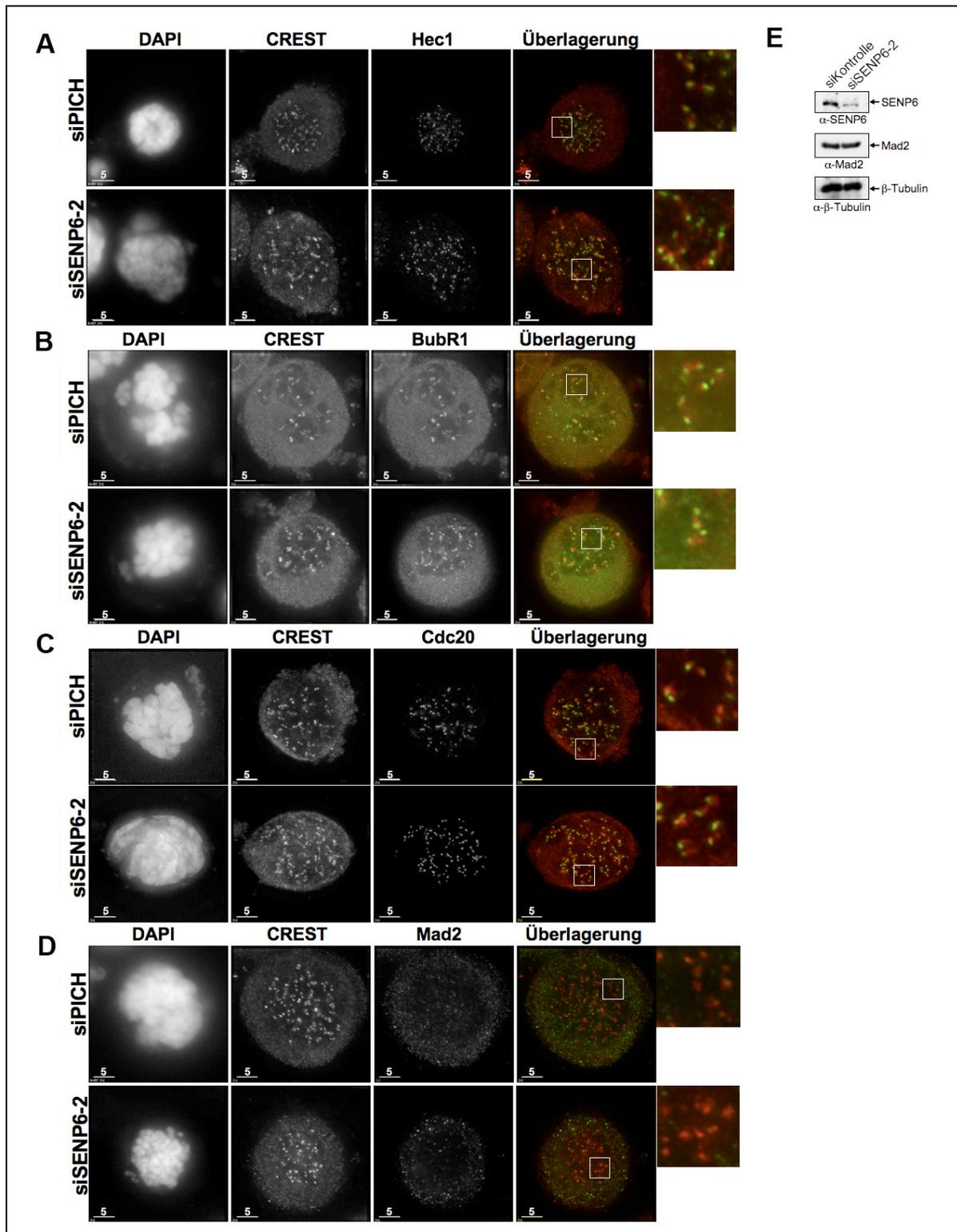
Anhang Abb. 7: Depletion von SENP6 führt zu fehlerhaftem Überschreiten eines Nocodazol-Arrests

(A) HeLa S3 Zellen mit stabil integriertem Histon H2B-GFP wurden wie angegeben mit siRNA Oligonukleotiden transfiziert und nach einem Doppel-Thymidinblock mit Nocodazol behandelt. Die Einzelbilder sind repräsentative Aufnahmen und zeigen das Verhalten einzelner Zellen in der Mitose zu den angegebenen Zeitpunkten. Maßstab: 40 μ m, Zeit [h:min] (B) Quantifizierung der Zeitspanne zwischen DNA-Kondensat



Anhang Abb. 8: Depletion von SENP6 beschleunigt den Beginn der Anaphase

(A) HeLa S3 Zellen mit stabil integriertem Histon H2B-GFP wurden wie angegeben mit siRNA Oligonukleotiden behandelt. Die Einzelbilder sind repräsentative Aufnahmen und zeigen das Fortschreiten einzelner Zellen in der Mitose zu den angegebenen Zeitpunkten. Maßstab: 40 μ m, Zeit [h:min] (B) Quantifizierung der Zeitspanne zwischen DNA-Kondensat (C) Kontrolle der Depletion von SENP6 in diesem Experiment in Form eines Western Blots.



Anhang Abb. 9: Lokalisierung von SAC-Proteinen nach Depletion von SENP6

(A) – (D) Die Lokalisierung einzelner SAC-Proteine in HeLa S3 Zellen wurde nach Transfektion des angegebenen siRNA-Oligonukleotids anhand immunologischer Färbung mit den angegebenen Antikörpern bestimmt. DNA wurde mit DAPI angefärbt (grün). CREST-Antiserum (rot) wurde als Kinetochor/Centromer-Marker benutzt. Maßstab: 5µm. Einzelne Kinetochor-Paare wurden vierfach vergrößert. (E) Depletion von SENP6 in den für diesen Versuch benutzten Zellen.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
APC/C	<i>anaphase promoting complex/cyclosome</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
CCD	<i>charge coupled device</i>
Cdk1	cyclin dependent kinase 1
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CKI	Cdk-Inhibitor
C-terminal	Carboxy-terminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
D-Box	<i>destruction box</i> (Erkennungssequenz für den APC/C)
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotid (N=A,T,G,C)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETS	<i>external transcribed spacer</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	1. Gramm, 2. Gravitationskoeffizient (9,81 m/sec ²)
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
Ig	Immunglobulin
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Leu	Leucin
M	Mol/l, molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOPS	3-N-Morpholinopropan-sulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>

Danksagung

N	normal
NBs	<i>nuclear bodies</i>
NLS	Kern-Lokalisierungs-Sequenz
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
NPC	Kernporen-Komplex (<i>nuclear pore complex</i>)
NPM1	Nucleophosmin
N-terminal	Amino-terminal
N-Terminus	Amino-Terminus
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda=600\text{nm}$
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBD	Polo-Box-Domäne
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
rRNA	ribosomale RNA
RT	1. Reverse Transkription, 2. Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Sedimentationskoeffizient (Svedberg)
SAC	<i>spindle assembly checkpoint</i>
SCF ^{β} -TRCP	Skp1-Cullin-F-Box-Komplex
SC-Medium	<i>synthetic complete</i> Medium
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
Trp	Tryptophan
U	<i>unit</i>
UBA	<i>ubiquitin-associated domain</i>
UBC	<i>ubiquitin conjugating</i>
UBL	<i>ubiquitin-like protein</i>
Ulp	<i>ubiquitin-like protease</i>
UV	ultraviolett
Wt	Wildtyp

7.3 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Dr. Stefan Müller für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und seine ständige Diskussionsbereitschaft bedanken. Er war immer zu einem Gespräch bereit und gewährte mir den nötigen Freiraum, um kreativ während meiner Arbeit wirken zu können.

Bei Prof. Dr. Stefan Jentsch möchte ich mich für die Übernahme des Erstgutachtens und für die hervorragenden Arbeitsbedingungen in seiner Abteilung bedanken. Er hat stets für eine wissenschaftlich stimulierende und zugleich äußerst kollegiale Stimmung innerhalb seiner Abteilung gesorgt.

Zudem danke ich den Mitgliedern der Prüfungskommission für die Begutachtung meiner Arbeit.

Bei Prof. Dr. Dirk Eick und Thomas Harasim sowie Prof Dr. Erich Nigg und Ulf Klein möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit im Rahmen des Nucleophosmin- und des Borealin-Projekts bedanken. Dr. Frank Siedler und Dr. Roman Körner danke ich für die Hilfe bei massenspektrometrischen Analysen.

Ganz besonders danke ich auch den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Abteilung für Molekulare Zellbiologie. Insbesondere seien hier die Mitglieder der Arbeitsgruppe Müller erwähnt. Sie sorgten stets für eine angenehme und familiäre Atmosphäre und standen mit Rat und Tat zur Seite, wenn einmal Hilfe nötig war. Ohne euch hätte es nur halb soviel Spass gemacht.

Auch bei allen Mitstreitern aus dem MCB-Fussballteam möchte ich mich bedanken. Ihr habt dafür gesorgt, dass ich meinen größten sportlichen Erfolg - den Gewinn des MPI-Cups 2008 - feiern durfte. Ihr seid einfach „die Besten wo gibt“!

Meinen Eltern möchte ich für die Unterstützung während der gesamten Promotion und so manch entspannendes Wochenende in meinem Elternhaus danken. Die gute Verpflegung gab wieder neuen Schwung für kommende Aufgaben.

Ganz besonders sei meiner Freundin Karin für ihre Nachsicht und moralische Unterstützung gedankt. Es war sicherlich oft nicht leicht, mit meinen Arbeitszeiten auszukommen.

7.4 Lebenslauf

Name Markus Haindl
Adresse Marktplatz 18c
83607 Holzkirchen
Geburtsdatum 24. März 1978
Geburtsort Kelheim a.d. Donau

Schulbildung

1984-1989 Volksschule Rohr i. NB

1989-1998 Johannes-Nepomuk-Gymnasium Rohr i. NB
Abschluss mit Abitur im Juni 1998

Zivildienst

1998-1999 Prälat Michael Thaller Schule, Offenstetten

Studium

1999-2004 Universität Regensburg

Studiengang: Biologie Diplom
Diplomarbeit über "Sequenzierung, Charakterisierung und posttranskriptionelle Suppression des β -Poly(L-Malat)-Hydrolase-Gens aus *Physarum polycephalum*" am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie (Arbeitsgruppe Holler)
Abschluss mit Diplom im August 2004

Doktorarbeit

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