

# **Posttranslationale Modifikation des Retinoblastoma Tumorsuppressors mit dem Ubiquitin-ähnlichen SUMO Protein**

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

vorgelegt von  
Diplom-Biochemiker  
Andreas Ledl

5. Mai 2006

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Juli 2002 und Mai 2006 unter Anleitung von Dr. Stefan Müller am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Ledl, A., D. Schmidt and S. Müller (2005). Viral oncoproteins E1A and E7 and cellular LxCxE proteins repress SUMO modification of the retinoblastoma tumor suppressor. *Oncogene* 24, 3810-8.

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

Promotionsgesuch eingereicht am 5. Mai 2006

Tag der mündlichen Prüfung 20. Juli 2006

Erster Gutachter Prof. Dr. Stefan Jentsch

Zweiter Gutachter Prof. Dr. Heinrich Leonhardt

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.

Andreas Ledl  
München, den 5. Mai 2006

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
Abkürzungsverzeichnis	II-IV
<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>2</b>
Das Retinoblastoma Protein als klassischer Tumorsuppressor	2
Die Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren	4
<i>Pocket</i> Proteine und E2F-Transkriptionsfaktoren	6
Zelluläre Schlüsselfunktionen der <i>pocket</i> Proteine	7
Das Retinoblastoma Protein und Krebs	13
Posttranslationale Modifikationen und SUMO	15
Die enzymatische Kaskade der SUMOylierung	17
SUMO und die Transkription	20
Funktionelle Konsequenzen der SUMO-Modifikation	23
Zielsetzung der Arbeit	29
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>30</b>
pRB wird durch SUMO modifiziert und bindet Ubc9	30
Die aktive Form pRBs wird bevorzugt durch SUMO modifiziert	34
Tumorigene Mutationen von pRB verhindern die SUMOylierung	36
Lysin 720 dient als Konjugationsstelle	37
LxCxE-Proteine inhibieren die SUMOylierung <i>in vitro</i>	41
LxCxE-Proteine inhibieren die SUMOylierung <i>in vivo</i>	44
pRB-SUMOylierung und LxCxE-Bindung schließen sich nicht aus	47
Funktionelle Untersuchungen zur SUMOylierung von pRB	48
Die Etablierung stabiler, für pRB induzierbarer Zelllinien	53
Die SUMOylierung vermindert pRBs Potenzial zur E2F-Reprimierung	57
<b>4. Diskussion</b>	<b>60</b>
Posttranslationale Modifikationen der <i>pocket</i> Proteine	60
SUMO als Signal für die Rekrutierung von Proteinen	64
pRB-SUMO und LxCxE-Proteine	65
Der Einfluss der pRB-SUMOylierung auf E2F-abhängige Funktionen	67
Eine mögliche Rolle der pRB-SUMOylierung in der Differenzierung	68
Modelle zur Vermittlung einer spezifischen Funktion durch pRB-SUMO	69
<b>5. Material und Methoden</b>	<b>72</b>
Mikrobiologische Methoden	72
Zellbiologische Methoden	73
Molekularbiologische Methoden	77
Proteinbiochemische Methoden	82
Computeranalysen	87
<b>6. Literatur</b>	<b>88</b>

## Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulphat
ATP	Adenosin Triphosphat
BER	<i>base excision repair</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	dominant negativ
dNTP	Deoxynukleotid
DNA	Deoxyribonucleinsäure
DNase	Deoxyribonuclease
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
DTT	Dithiothreitol
E1	Aktivierungsenzym bei Ubiquitin/Ubiquitin-ähnlichen Modifikationen
E2	Konjugationsenzym bei Ubiquitin/Ubiquitin-ähnlichen Modifikationen
E3	Ligase bei Ubiquitin/Ubiquitin-ähnlichen Modifikationen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EID-1	<i>E1A-like inhibitor of differentiation</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FRT	<i>Flp recombination target</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GRIP-1	<i>glucocorticoid receptor interacting protein-1</i>
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
HAT	Histon-Acetyltransferase
HBS	<i>HEPES buffered saline</i>
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HP-1	<i>heterochromatin protein 1</i>
I $\kappa$ B	<i>inhibitor of nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
Luc	Luziferase
M	molar
mAb	monoklonaler Antikörper
MCM	<i>minichromosome maintenance</i>

Mdm2	<i>mouse double minute 2</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
min	Minute
Mitf	<i>microphthalmia-associated transcription factor</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NBs	<i>nuclear bodies</i>
NCoR	<i>nuclear receptor corepressor</i>
NEDD8	<i>neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated 8</i>
NEM	N-Ethylmaleimid
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
Ni <sup>2+</sup> -NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
NP-40	Nonidet P-40
NPC	<i>nuclear pore complex</i>
N-terminal	aminoterminal
N-terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
pRB	Retinoblastoma Protein
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
P/CAF	<i>p300-associated factor</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PIAS	<i>protein inhibitor of activated STAT</i>
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PML	<i>promyelocytic leukaemia protein</i>
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
RFC	<i>replication factor C</i>
RING	<i>really interesting new gene</i>
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
Ro	Rosiglitazon
S	Sedimentationskoeffizient (Svedberg)
SAHFs	<i>senescence-associated heterochromatin foci</i>
sec	Sekunde
SENP	<i>sentrin-specific protease</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulphate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIM	<i>SUMO interaction motif</i>
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>units</i>

UE	Untereinheit
Ulp	<i>ubiquitin-like protease</i>
UV	Ultraviolett
WB	Westernblot/Immunblot
WT	Wildtyp

## 1. Zusammenfassung

Abläufe in der Zelle eines multizellulären Organismus im Rahmen des Zellzyklus oder beim Vorgang der Differenzierung unterliegen strengen Kontrollmechanismen. Ein prominentes Regulationsprotein dieser Mechanismen ist der Retinoblastoma Tumorsuppressor (pRB). Im Zellzyklus liegt die Hauptfunktion pRBs in der Kontrolle des Übergangs von der G1- in die S-Phase. In der aktiven, nichtphosphorylierten Form reprimiert pRB die Expression von S-Phase Genen durch Inaktivierung des Transkriptionsfaktors E2F. Cyclin-abhängige Kinasen überführen pRB in eine mehrfach phosphorylierte, inaktive Form, wodurch die S-Phase eingeleitet wird. Im Gegensatz dazu übt pRB bei Differenzierungsvorgängen aber auch koaktivierende Funktionen aus und wird im Rahmen dieser Prozesse acetyliert.

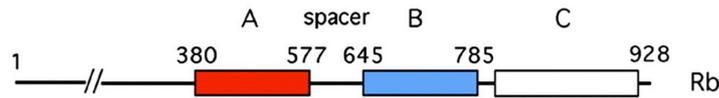
In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass pRB nicht nur phosphoryliert und acetyliert wird, sondern darüber hinaus durch den *small ubiquitin-like modifier* (SUMO) modifiziert wird. Aktives pRB stellt das bevorzugte Substrat dieser Modifikation dar. Das Akzeptorlysine 720 ist konserviert und liegt in einer für die pRB-Funktion entscheidenden Domäne, der sogenannten *pocket B* Region. Zusammen mit der *pocket A* Region bildet sie die *pocket* Domäne, deren strukturelle Integrität sowohl für die Tumorsuppressorfunktion pRBs als auch für die Modifikation durch SUMO essenziell ist. An die *pocket B* Region binden neben zellulären Regulationsproteinen des Zellzyklus und der Differenzierung auch virale Onkoproteine, die pRB inaktivieren und dadurch für die Transformation einer Zelle verantwortlich sind. Diese viralen Onkoproteine und bestimmte zelluläre Proteine inhibieren die SUMO-Modifikation pRBs. Umgekehrt steigt die SUMOylierung von pRB an, wenn mutierte pRB-Versionen eingesetzt werden, die keine viralen oder zellulären Proteine mehr über die *pocket B* Region binden können. Eine Version von pRB, bei der das Lysin 720 zu Arginin ausgetauscht wurde und die somit nicht mehr SUMOyliert werden kann, besitzt ein stärkeres Repressionspotenzial auf die E2F-abhängige Genexpression, wie Reporterexperimente zeigten. Die SUMOylierung vermindert also pRBs Potenzial zur E2F-Reprimierung. Möglicherweise wird durch die SUMO-Modifikation von pRB die Zusammensetzung der Bindungspartner an der wichtigen *pocket B* Region moduliert.

## 2. Einleitung

### **Das Retinoblastoma Protein als klassischer Tumorsuppressor**

Identifiziert wurde das Retinoblastoma Protein (pRB) in den Siebzigerjahren durch Untersuchungen einer vererbaren Krebserkrankung, die sich in Tumoren der Augen, den Retinoblastomen, manifestiert. Knudsen stellte damals die Hypothese auf, dass diese Krankheit durch zwei Mutationen hervorgerufen wird, wobei die Mutation einer Genkopie bei erblich betroffenen Patienten schon in der Keimbahn vorhanden ist. Bei der Mutation der zweiten Genkopie sollte es sich um eine somatische Mutation handeln, die zur völligen Inaktivierung des Genprodukts und damit zum Ausbruch der Krankheit oft schon im Kindesalter führt (Knudson 1971). In den darauf folgenden Jahren konnte durch Untersuchungen an Retinoblastomen gezeigt werden, dass ein Verlust des Chromosoms 13 mit dem Auftreten der Krankheit korreliert (Francke and Kung 1976). Durch Restriktionslängenpolymorphismus und weitere Sonden konnte die Region eingegrenzt werden und es wurde klar, dass sowohl bei der vererbten als auch bei der wesentlich seltener sporadisch auftretenden Krankheit die gleiche allelische Sequenz fehlt (Cavenee et al. 1983). Das entsprechende Gen wurde dann 1986 kloniert (Friend et al. 1986). Es erfüllt alle Voraussetzungen der klassischen Definition für Tumorsuppressorgene: Es wird rezessiv vererbt und in Tumoren sind beide Allele inaktiviert. Wird ein mutiertes Allel vererbt, so erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer Tumorerkrankung, da nur noch eine weitere Mutation notwendig ist. Das pRB-Gen ist in sporadisch auftretenden Krebserkrankungen häufig inaktiviert (Sherr 2004).

Das Genprodukt besteht aus 928 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 107 kDa. Charakteristisch für die Struktur ist die sogenannte *pocket* Region, die sich aus *pocket A* und *pocket B* zusammensetzt (Abbildung 1) und deren Integrität für die Tumorsuppressorfunktion von pRB essenziell ist (Qin et al. 1992). Insgesamt findet man in der pRB-Sequenz 16 Konsensusmotive für Phosphorylierungen durch Cyclin-abhängige Kinasen. Sechs dieser Motive befinden sich im C-Terminus des Proteins. Allerdings ist es bis heute nicht gelungen, die Abfolge und alle tatsächlich phosphorylierten Aminosäuren genau zu identifizieren.

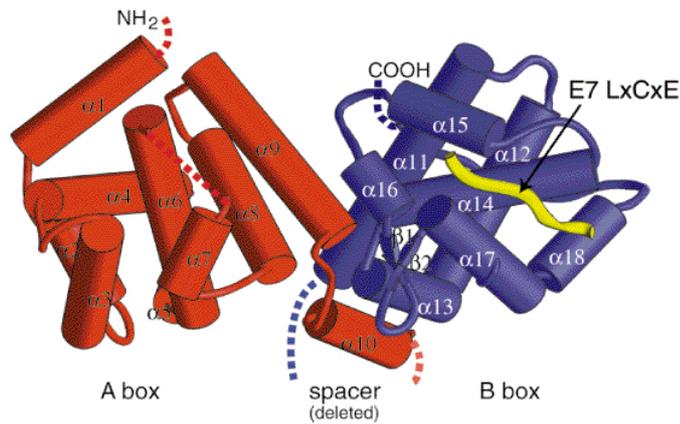


**Abbildung 1. Schematische Darstellung von pRB (Xiao et al. 2003)**

Die *pocket* Region von pRB setzt sich zusammen aus *pocket* A (Aminosäuren 350-577) und *pocket* B (Aminosäuren 645-785). Diese Struktur ist für die Tumorsuppressorfunktion von pRB essenziell. Der C-Terminus ist nicht an der *pocket* Struktur beteiligt, spielt aber für die Funktion ebenso eine wichtige Rolle, da sich hier Phosphorylierungsstellen befinden und die Region die Bindung an den Transkriptionsfaktor E2F mitvermittelt.

Die Kristallstruktur der sogenannten *small pocket* Region von pRB bestehend aus *pocket* A und *pocket* B ohne die dazwischenliegende Region und ohne die N- und C-Termini wurde 1998 gelöst (Lee et al. 1998). Wie aus Abbildung 2 ersichtlich ist, weisen beide *pocket* Regionen eine aus fünf Helices bestehende sogenannte Cyclinfaltung als Grundgerüst auf. Die Berührungsfläche zwischen *pocket* A und B ist relativ ausgeprägt. *Pocket* A scheint für die Stabilisierung der Gesamtstruktur entscheidend zu sein, während *pocket* B als Bindungsregion für Proteine fungiert. In dieser Struktur wurde auch die Bindung eines sogenannten LxCxE-Peptids analysiert. Wie unten näher erläutert, besitzen mehrere virale Onkoproteine und auch einige zelluläre Bindepartner von pRB ein Sequenzmotiv mit der Aminosäureabfolge LxCxE. Es war bereits vor der Strukturaufklärung bekannt, dass dieses Motiv mitentscheidend für die pRB-Bindung ist. Die Struktur zeigt, dass das Peptid, das aus der Sequenz des E7 Proteins des humanen Papilloma Virus stammt und aus neun Aminosäuren besteht, die *pocket* B Region in einer hydrophoben Grube bindet.

Neben pRB weisen noch zwei weitere Proteine die Struktur der *pocket* Region auf. Dabei handelt es sich um p107 und p130. Zusammen mit pRB bilden diese die Familie der sogenannten *pocket* Proteine. Sowohl von der Struktur als auch von der biologischen Rolle her sind p107 und p130 untereinander enger verwandt als eines der beiden Proteine zu pRB. Es existieren viele mit pRB überlappende Funktionen, wobei durch die Analyse von *pocket* Protein-defizienten Mäusen und davon abgeleiteten Zellen auch unterschiedliche Aufgaben der Proteine identifiziert wurden (Classon and Dyson 2001). In der Zellzykluskontrolle haben die *pocket* Proteine die negative Regulation von E2F-Transkriptionsfaktoren gemeinsam.



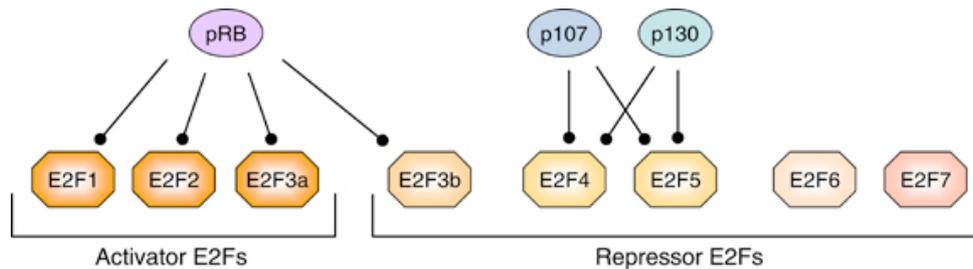
**Abbildung 2. Kristallstruktur der *pocket* Region (Lee et al. 1998)**

Die *pocket* A Region (A box) ist wohl für die Stabilität der Gesamtstruktur entscheidend, die *pocket* B Region (B box) dient als Binderegion für Regulationsproteine. Einiger dieser Proteine, wie etwa das virale E7 Protein, binden dabei über ein LxCxE-Motiv an eine hydrophobe Grube in der B box (in gelb hier ein Minimalpeptid von E7, das die LxCxE Sequenz beinhaltet).

### Die Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren

Der Transkriptionsfaktor E2F wurde ursprünglich durch Experimente identifiziert, die die Aktivierung des adenoviralen E2-Promotors aufklären sollten. Dabei stellte sich heraus, dass dieser zelluläre Faktor zusammen mit dem viralen Protein E1A für die transkriptionelle Aktivierung des viralen Promotors essenziell ist (Kovesdi et al. 1987). Zur selben Zeit wurde ein Faktor isoliert, der während der Differenzierung von embryonalen murinen Krebsstammzellen herunterreguliert wird und deshalb als *differentiation regulated transcription factor* (DRTF1) bezeichnet wurde (La Thangue and Rigby 1987). Die Analyse der Konsensus-DNA-Bindungsstelle stellte sich als identisch mit der von E2F heraus und heute ist klar, dass es sich bei DRTF1 und E2F um das gleiche Protein handelt. E2F kontrolliert die Transkription von zellulären Genen, die für das Zellwachstum essenziell sind. Dabei handelt es sich um Zellzyklusgene (wie etwa Cyclin E und Cyclin A) sowie Enzyme, die an der Nukleotidbiosynthese beteiligt sind (wie die Thymidinkinase oder die Dihydrofolatreduktase) und Komponenten der DNA-Replikationsmaschinerie wie beispielsweise um die DNA-Polymerase  $\alpha$  (Trimarchi and Lees 2002).

Beim Menschen existieren acht E2F-Gene, deren Produkte (Abbildung 3) abgesehen von E2F7, das als Homodimer die DNA bindet, entweder mit DP1 oder DP2 (von DRTF1 *protein*) als Heterodimere in allen möglichen Kombinationen die DNA als funktionelle Transkriptionsfaktoren binden (Wu et al. 1995).



**Abbildung 3. Interaktionen zwischen den *pocket* Proteinen und E2Fs (Cobrinik 2005)**

E2F1 bis E2F6 binden die DNA als Heterodimere mit entweder DP1 oder DP2, während E2F7 als Homodimer bindet. Die Mitglieder der *pocket* Protein Familie interagieren spezifisch mit einzelnen E2Fs. E2F1 bis E2F3a sind starke Aktivatoren der Transkription im Gegensatz zu den restlichen E2Fs, die reprimierend wirken.

Die E2F-Proteine unterscheiden sich in ihren transkriptionellen Eigenschaften, wie in Abbildung 3 gezeigt (Cobrinik 2005). E2F1, E2F2 und E2F3a sind starke Aktivatoren der Transkription. Sie werden in quieszenten Zellen gar nicht oder nur sehr gering exprimiert. Im Gegensatz dazu sind sie in der späten G1-Phase sehr stark induziert. Für die Aktivierung der Transkription verantwortlich sind wohl die durch diese E2Fs rekrutierten Histon-Acetyltransferasen (HATs), wie etwa p300/CBP (Trouche and Kouzarides 1996). E2F4 und E2F5 werden während des gesamten Zellzyklus exprimiert. Sie weisen aber keine eigenen Kernlokalisierungssignale auf. E2F6 und E2F7 besitzen im Gegensatz zu den anderen Vertretern der E2F-Familie keine Transaktivierungsdomänen, sondern rekrutieren über Repressordomänen Proteine der Polycombfamilie, die die Transkription inhibieren (Trimarchi et al. 2001).

Die *pocket* Proteine assoziieren wie in Abbildung 3 gezeigt spezifisch mit bestimmten Vertretern der E2F-Familie und inhibieren deren Eigenschaften als transkriptionelle Aktivatoren (siehe nächstes Kapitel). p107 und p130 binden E2F4 und E2F5, rekrutieren diese in den Zellkern und liegen dort in Form von Repressorkomplexen an den Promotoren vor. pRB ist in G0 mit E2F3b assoziiert und zellzyklusabhängig mit den starken Aktivatoren E2F1, E2F2 und E2F3a. Die *pocket* Proteine interagieren dabei direkt mit den E2Fs und die Strukturaufklärung der *small pocket* Region pRBs im Komplex mit einem E2F-Peptid ergab, dass der Transkriptionsfaktor E2F-1 pRB in der Berührungsfläche zwischen *pocket* A und B bindet (Xiao et al. 2003). Neben dieser Bindungsregion existiert noch ein weiterer ausgeprägter Kontakt zwischen E2F-1 und dem C-Terminus von pRB.

**Pocket Proteine und E2F-Transkriptionsfaktoren**

Durch das Zusammenspiel der *pocket* Proteine mit den E2F-Transkriptionsfaktoren ergeben sich wichtige funktionelle Konsequenzen für zelluläre Prozesse. Die *pocket* Proteine inhibieren nämlich die transkriptionsfördernden Eigenschaften der E2Fs durch zwei verschiedene Mechanismen: In der sogenannten passiven Repression wird die Transaktivierungsdomäne von E2F durch Bindung blockiert und es kann zu keiner Assemblierung von Koaktivatoren und Initiatoren der Transkription kommen (Helin et al. 1993). Darüber hinaus ist aber noch ein zweiter, auch als aktive Repression bezeichneter Mechanismus bekannt. Hierbei werden Enzyme durch die *pocket* Proteine zu den Promotoren rekrutiert, die allgemein einer Initiation der Transkription entgegenwirken. Die bekanntesten Vertreter sind hierbei die Histon-Deacetylasen (HDACs), die durch Deacetylierung der Histone eine geschlossener Promotorkonstitution hervorrufen (Brehm et al. 1998). HDAC-1 und HDAC-2 binden dabei über eine dem LxCxE-Motiv homologen Sequenz an pRB, HDAC-3 dagegen über ein anderes Bindemotiv. Ebenfalls wurden für pRB Interaktionen mit der Methyltransferase Suvar-39h und HP-1 gezeigt (Nielsen et al. 2001). Die durch Suvar-39h katalysierte Methylierung an Lysin 9 des Histons H3 und die darauf folgende Bindung durch die Chromodomäne von HP-1 an das methylierte Lysin kennzeichnen inaktives Heterochromatin. Auch eine Rekrutierung von Komponenten der Chromatin *remodeling* Maschinerie ist bekannt. So interagieren BRG-1 und BRM, die beiden ATPase-Komponenten des humanen SWI/SNF-Komplexes mit pRB (Trouche et al. 1997).

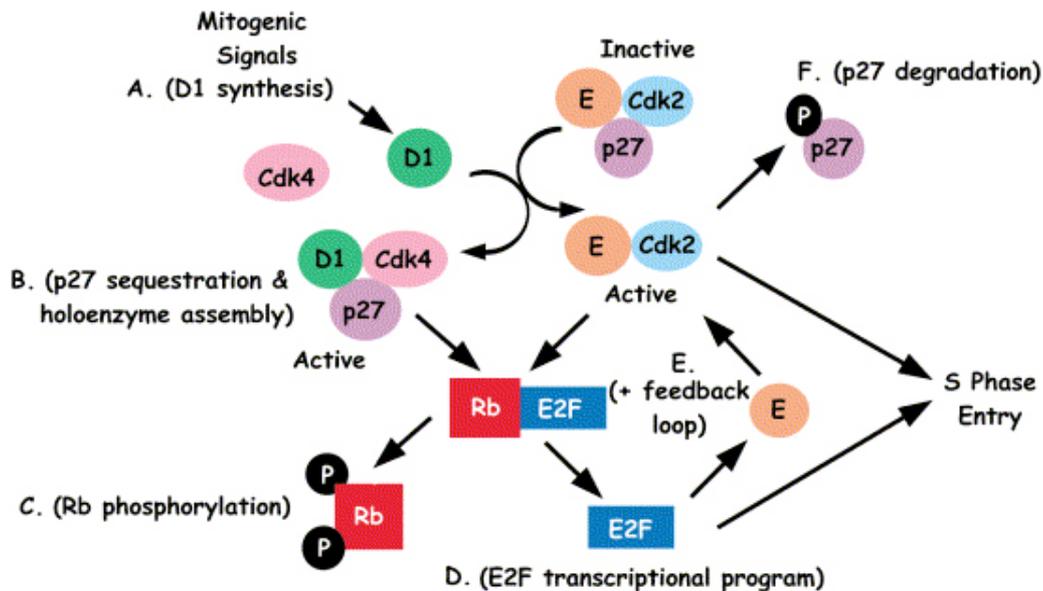
Aus den bisher vorgestellten Komponenten ergeben sich sehr viele Möglichkeiten wie Promotoren E2F-regulierter Gene besetzt sind. Verschiedene E2Fs binden als Heterodimere mit entweder DP1 oder DP2 an die DNA. Je nach E2F-Protein binden dann spezifisch Mitglieder der *pocket* Protein Familie. Diese wiederum sind in der Lage, HDACs, Methyltransferasen oder Komponenten der Chromatin *remodeling* Maschinerie entweder alleine oder teilweise wohl auch im Komplex an das Chromatin zu rekrutieren. Damit können spezifische E2F-regulierte Gene mit sehr unterschiedlichen Repressorkomplexen okkupiert sein und dies kann je nach Gen und biologischem Prozess transient oder dauerhaft sein.

### **Zelluläre Schlüsselfunktionen der *pocket* Proteine**

Die *pocket* Proteine sind also in der Lage, die Expression von E2F-abhängigen Genen zu inhibieren. Darüber hinaus binden sie noch eine Vielzahl weiterer Proteine und beeinflussen auch dadurch zelluläre Prozesse (Morris and Dyson 2001).

Das *pocket* Protein-E2F-Netzwerk steuert Abläufe des Zellzyklus. Am besten untersucht ist hierbei die Rolle pRBs, das hauptsächlich den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase, den sogenannten Restriktionspunkt, reguliert (Dyson 1998). Dabei kommt der Phosphorylierung pRBs eine essenzielle Rolle zu, da vollständig phosphoryliertes pRB nicht mehr an E2F binden kann und in diesem Fall E2F-abhängige Gene nicht mehr reprimiert werden. Wie oben schon erwähnt, kontrollieren die mit pRB interagierenden E2Fs die Expression von Genen, deren Produkte für die S-Phase benötigt werden.

Der am Restriktionspunkt ablaufende Mechanismus soll kurz anhand des Modells von Harbour und Dean vorgestellt werden (Harbour and Dean 2000). Ein vereinfachtes Modell ohne die im Text beschriebenen Korepressoren ist in Abbildung 4 gezeigt. In der G1-Phase blockiert die hypophosphorylierte Form pRBs die Transaktivierungsdomäne von E2F und rekrutiert über seine *pocket* Region sowohl HDACs als auch BRG-1 und BRM (Zhang et al. 2000). Damit ist die Zelle in G1 arretiert. Durch positive Proliferationssignale kommt es nun zur Expression von Cyclin D. Dadurch entsteht eine aktive Kinase aus Cyclin D und CDK4/6, die erste Phosphorylierungen am C-Terminus von pRB katalysiert. Diese Ladungsveränderungen führen zu einer Destabilisierung der Interaktion mit E2F und zu einer intramolekularen Konformationsänderung: der jetzt negativ geladene C-Terminus bindet an positiv geladene Lysine, die die hydrophobe Bindungstasche für LxCxE-Proteine umgeben. Wie oben erwähnt, besitzen HDAC-1 und HDAC-2 ein LxCxE-Motiv und binden über dieses pRB. Durch die erfolgte Konformationsänderung werden die HDACs verdrängt (Harbour et al. 1999). Diese Hypothese wird durch aktuelle Strukturdaten gestützt. Rubin *et al.* konnten zeigen, dass durch Phosphorylierung der Threonine 821 und 826 tatsächlich eine intramolekulare Interaktion zwischen dem C-Terminus von pRB und der *pocket*



**Abbildung 4. Die Regulation des S-Phase-Eintritts durch pRB (Sherr and McCormick 2002)**

pRB inhibiert die Expression von Genen der S-Phase durch die direkte Bindung an die Transaktivierungsdomäne von E2F. Darüberhinaus rekrutiert es aber auch Korepressoren zum Promotor, was als aktive Repression bezeichnet wird. Durch Phosphorylierungen (C) durch die Cyclin-abhängigen Kinasen Cyclin D1/Cdk4 und Cyclin E/Cdk2 verliert pRB seine inhibierende Funktion. Durch Wachstumssignale wird Cyclin D1 exprimiert (A), das zusammen mit Cdk4 eine Kinase bildet und auch den Cyclin E/Cdk2-Inhibitor p27 durch Sequestrierung inaktiviert (B). Nun werden zunehmend E2F-regulierte Gene exprimiert (D), darunter auch verstärkt Cyclin E (E). p27 wird auch durch Cyclin E/Cdk2-abhängige Phosphorylierung inaktiviert (F).

Region induziert wird, die sich auch indirekt destabilisierend auf die Interaktion mit E2F auswirkt (Rubin et al. 2005). Die Verdrängung von HDACs führt zu einer langsam ansteigenden Expression von Cyclin E. Nielsen *et al.* konnten für die pRB-abhängige Repression von Cyclin E eine essenzielle Rolle für die durch pRB rekrutierte Methyltransferase Suvar39h und HP-1 am Promotor zeigen (Nielsen et al. 2001). Sie spekulieren dabei über eine zuvor ablaufende HDAC-vermittelte Deacetylierung der Histone. Diese Daten zeigen, wie komplex und promotorspezifisch die Regulation wohl abläuft. Durch den Konzentrationsanstieg von Cyclin E tritt die Zelle in die S-Phase ein. Die Cyclin E/CDK2-Kinase ist für die nächsten sequenziellen Phosphorylierungen von pRB und der SWI/SNF-Komponenten verantwortlich, die dadurch ebenfalls inaktiviert werden. Schließlich kommt es zu einer vollständigen Phosphorylierung von pRB, damit zu Ladungsveränderungen kritischer Binderegionen und zum vollständigen Verlust der Bindung an E2F und BRG-1 und BRM. Dies wiederum führt im nächsten Schritt zur Expression von Cyclin A und CDK1. Dadurch kommt es zur Aktivierung von Cyclin

B/CDK1 und damit zum Eintritt in die Mitose. Am Ende der Mitose wird pRB durch die Aktivität von Typ I Serin/Threonin Phosphatasen (PP1en) wieder in die aktive Form überführt und arretiert die Zelle damit in der nun folgenden G1-Phase (Ludlow et al. 1993; Rubin et al. 2001). Für diesen Wachstumsarrest ist die *pocket* Domäne zusammen mit dem C-Terminus notwendig und ausreichend (Qin et al. 1992). p130 ist im Gegensatz zu pRB hauptsächlich in der G0-Phase präsent und wird beim Übergang in die G1-Phase sogar abgebaut. p107 bildet Repressorkomplexe mit E2F3 und E2F4 an spezifischen Promotoren. Diese Komplexe werden dann in Abhängigkeit der p107-Phosphorylierung inaktiviert.

Die zelluläre Seneszenz stellt eine extrem stabile Form des Zellzyklusarrests dar, die das Wachstum von geschädigten Zellen stark einschränkt und damit eventuell eine Schutzfunktion gegen das Fortschreiten von Krebszellen übernimmt. Eingeleitet wird die Seneszenz durch eine Vielzahl von Stresssignalen auf die Zelle, wie etwa durch verkürzte Telomere oder aktivierte Onkogene. In einem eleganten Ansatz durch ein konditionales murines pRB-Allel wurde es möglich, gezielt den Verlust von pRB in Mauszellen herbeizuführen (Sage et al. 2003). Dies führt sowohl in primären quieszenten wie auch in seneszenten Zellen zum Wiedereintritt in den Zellzyklus, was die Schlussfolgerung nahe legt, dass pRB alleine ausreichend ist, um einen Wachstumsarrest in beiden Stadien aufrecht zu erhalten. Durch Chromatinimmunpräzipitationen konnte gezeigt werden, dass pRB in seneszenten menschlichen Fibroblasten an E2F-Bindungsstellen der Promotoren von Zellzyklusgenen in distinkten Heterochromatinstrukturen vorhanden ist, den sogenannten SAHFs (*senescence-associated heterochromatic foci*). Spezifisch wird damit eine stabile Repression z. B. von Cyclin A in seneszenten Zellen erreicht (Narita et al. 2003). p130 konnte im Gegensatz zu p107 ebenfalls an diesen beiden Promotoren nachgewiesen werden. Neben dieser Funktion soll pRB auch durch einen posttranslationalen Mechanismus zur Stabilisierung von p27 führen, das Cyclin E bindet und damit Cyclin E assoziierte Kinasen in seneszenten Zellen stark herunterreguliert (Alexander and Hinds 2001).

pRB reguliert auch die Initiation der DNA-Replikation durch seinen Einfluss auf die Transkription daran beteiligter E2F-abhängiger Gene. Weiterhin bindet pRB

aber auch direkt einen sogenannten Lizenzierungsfaktor der Replikation, nämlich das Protein MCM7 des MCM-Komplexes (Sternier et al. 1998). Dieser Komplex ist dafür verantwortlich, dass die DNA pro Zellzyklus nur ein einziges Mal repliziert wird. Er wird als inaktiver Komplex zu den *origins of replication* als Teil der sogenannten Präreplikationskomplexe rekrutiert. Erst nach einem bestimmten Ablauf von Kontrollmechanismen wird das Hexamer aktiviert und erhält dadurch Helikaseaktivität, die wahrscheinlich der Replikationsgabel vorausläuft (Lei and Tye 2001). Durch die Bindung von MCM7 an pRB wird die Bildung von Präreplikationskomplexen und damit die Initiation der DNA-Replikation inhibiert.

Der Prozess der Differenzierung kann in wenigstens zwei koordinierte Schritte unterteilt werden: Dem endgültigen Verlassen des Zellzyklus und der Expression von gewebespezifischen Genen, der sogenannten terminalen Differenzierung. pRB ist an beiden Prozessen beteiligt, während für p130 bisher nur eine Rolle im permanenten Zellzyklusarrest beschrieben wurde (Korenjak and Brehm 2005). In Zellen, die den Zellzyklus endgültig verlassen, ändert sich die Chromatinstruktur. So unterliegen z. B. Promotorbereiche für S-Phase Gene in sich teilenden Zellen reversiblen Acetylierungen und Deacetylierungen bei einer gleich bleibenden Histonmethylierung (Ait-Si-Ali et al. 2004). Im Gegensatz dazu weisen Zellen bei einem dauerhaften Rückzug aus dem Zellzyklus, etwa während der Muskeldifferenzierung, deacetyliertes und an Lysin 9 des Histons H3 verstärkt durch die Methyltransferase Suvar-39h methyliertes Chromatin im Promotorbereich auf. Es kommt zu einer vermehrten Bindung von HP-1 und zur Entstehung von Heterochromatin-*foci* (Narita et al. 2003). Diese Charakteristika können teilweise durch die oben für den Zellzyklus beschriebenen Funktionsweisen von pRB erklärt werden, allerdings muss nun eine dauerhafte Repression von bestimmten Genen erreicht werden. Dies wird einerseits durch die permanente Rekrutierung von Kofaktoren an die Promotoren gesteuert. Andererseits ist es wahrscheinlich, dass sich auch die Zusammensetzung der Komplexe an Promotoren selbst ändert und im Falle des permanenten Zellzyklusrückzugs andere *pocket* Protein-E2F Komplexe gebildet werden als in sich teilenden Zellen. Nach dem Verlassen des Zellzyklus folgt die Expression von gewebespezifischen Genen. Zwei gut etablierte

Modelle dafür stellen die Adipozytendifferenzierung und die oben schon erwähnte Muskeldifferenzierung dar (Yee et al. 1998). Die Expression der jeweils spezifischen Gene setzt dabei immer erst nach dem endgültigen Rückzug aus dem Zellzyklus ein. In beiden Fällen sind die Schlüsseltranskriptionsfaktoren, die das weitere Set an gewebespezifischen Genen kontrollieren, bekannt. Dabei handelt es sich bei Fettzellen um die Familie der C/EBP-, bei Muskelzellen um die Familie der MyoD-Transkriptionsfaktoren. Für beide Familien stellt pRB einen koaktivierenden Partner dar. Im Falle von C/EBP konnte eine direkte Interaktion mit pRB gezeigt werden (Chen et al. 1996). Ein anderes aktuelles Beispiel hierfür stellt auch die Kooperation pRBs mit dem Transkriptionsfaktor Mitf1 dar, den pRB ebenfalls direkt bindet. Dies potenziert den positiven Effekt von Mitf1 auf die Expression von spezifischen Genen für die Differenzierung von Melanoblasten nach erfolgtem Zellzyklusarrest (Carreira et al. 2005). Wie pRB allerdings die aktivierenden Effekte vermittelt, ist unklar. pRB ist wahrscheinlich in allen Fällen durch seine Beteiligung an beiden für die Differenzierung essenziellen Vorgängen in der Lage, den permanenten Rückzug aus dem Zellzyklus mit der Expression von gewebespezifischen Genen zu koppeln. Nguyen *et al.* fügten 2004 der oben beschriebenen Rolle einen interessanten Aspekt hinzu. In ihrer Veröffentlichung konnten sie zeigen, dass die Acetylierung der Lysine 873 und 874 pRBs die differenzierungsspezifischen Eigenschaften reguliert (Nguyen et al. 2004). Die posttranslationale Modifikation, die durch die Acetyltransferasen p300 (Chan et al. 2001) und P/CAF katalysiert wird, ist sowohl für das Verlassen des Zellzyklus als auch für die Induktion späterer Gene in der Muskeldifferenzierung notwendig, nicht aber für die Zellzyklusfunktionen pRBs.

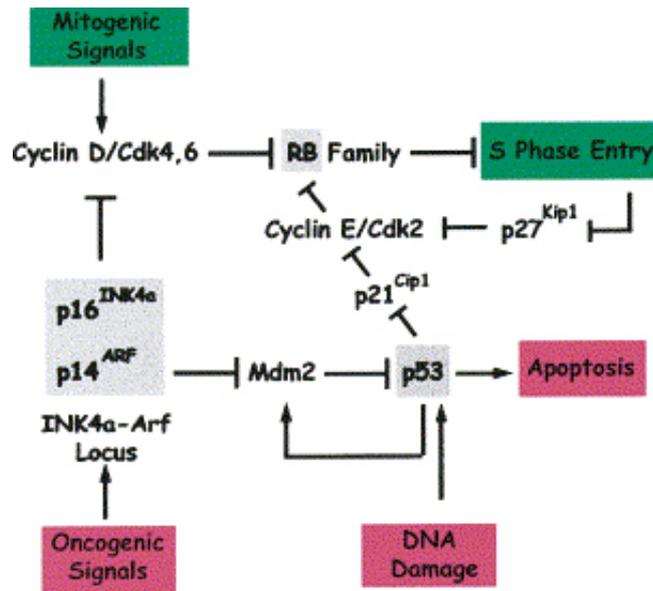
Eine weitere Rolle übernimmt pRB im gezielten und regulierten Zelltod, der Apoptose. Durch diesen Vorgang, der der Zellproliferation entgegengesetzt ist, ist es einem Organismus ebenfalls möglich, die Anzahl seiner Zellen zu regulieren. Vor allem entwicklungs- und gewebespezifische Prozesse werden durch die Apoptose gesteuert. Unabhängig von seiner Eigenschaft, die Zellproliferation zu blockieren ist pRB in der Lage, die Apoptose zu inhibieren (Chau and Wang 2003). Mechanistisch geschieht dies zum einen durch die gezielte Bindung und damit

verbundene Inaktivierung von Proteinen. So wirkt die c-ABL Tyrosin Kinase ebenso wie die JNK Kinase auf Stresssignale hin proapoptotisch. Beide werden aber in dieser Funktion durch die pRB-Bindung inhibiert (Welch and Wang 1993; Shim et al. 2000). Zum anderen konnten in den Promotoren einiger Caspasen und weiterer für die Apoptose entscheidender Gene (wie APAF1) E2F-1-Bindungsstellen identifiziert werden (Nahle et al. 2002). Seine inhibierende Funktion verliert pRB erst durch die Aktivität von Caspasen, die auf apoptotische *stimuli* hin aktiviert werden und pRB gezielt abbauen. Die pRB-Sequenz weist einige Konsensusmotive für die Spaltung durch Caspasen auf, mit der Hauptspaltstelle im extremen C-Terminus (Fattman et al. 2001). Unklar ist, wie die reprimierende Aktivität von pRB auf zellzyklusrelevante Gene einerseits und apoptotische Gene andererseits reguliert wird. Entweder spielen hier noch nicht identifizierte promotorspezifische Faktoren eine Rolle, oder andere Umgebungsfaktoren bestimmen, ob pRB im einen Fall durch Phosphorylierung inaktiviert, im anderen Fall durch Caspaseaktivität abgebaut wird (Chau and Wang 2003). Eine Veröffentlichung der Dyson-Arbeitsgruppe legt nahe, dass pRB E2F-1 im Kontext einer Regulation von apoptoseinduzierten Genen über eine andere Bindungsdomäne komplexiert und damit eine Promotorspezifität ermöglichen würde (Dick and Dyson 2003).

Wie im folgenden Abschnitt näher erläutert, nimmt der pRB/E2F Signalweg neben der Signalintegration durch p53 die entscheidende Kontrollfunktion nach DNA-Schädigungen während der G1-Phase ein. Dies geschieht durch einen Zellzyklusarrest, aber auch durch positive Signale auf das Weiterleben der Zelle nach DNA-Schädigungen. Pennaneach *et al.* konnten 2001 zeigen, dass für dieses positive Signal durch pRB eine Interaktion mit der großen Untereinheit des *replication factor C* (RFC) essenziell ist und zwar über die schon mehrfach erwähnte hydrophobe Grube in der *pocket B* Region und einem LxCxE-Motiv in der Sequenz der großen Untereinheit von RFC (Pennaneach et al. 2001).

## Das Retinoblastoma Protein und Krebs

Nachdem pRB durch die Charakterisierung von Retinoblastomen identifiziert worden war, wurde in der Folgezeit schnell klar, dass es neben p53 bei fast allen Krebserkrankungen inaktiviert ist und damit ebenfalls Kontrollfunktionen im Zellzyklus übernimmt (Sherr 2000; Sherr 2004). Eine schematische Übersicht des pRB und p53 Netzwerks gibt Abbildung 5.



**Abbildung 5. Die Kontrollfunktionen von p53 und pRB im Zellzyklus (Sherr 2004)**

Konstitutive onkogene Signale führen zur Aktivierung des INK4a-Arf Locus. p16<sup>INK4a</sup> inhibiert die Aktivität von Cyclin D abhängigen Kinasen, aktiviert damit pRB und verhindert so den Eintritt in die S-Phase. Durch einen alternativen Leserahmen des INK4a-Locus kommt es ebenso zur Expression von p14<sup>ARF</sup>. p14<sup>ARF</sup> inhibiert Mdm2 und stabilisiert so p53. Dies führt entweder zur p53-abhängigen Apoptose oder zur Induktion von p21<sup>Cip1</sup>, das die Cyclin E/Cdk2 Kinase inhibiert und damit auch einen pRB-abhängigen Zellzyklusarrest einleitet. Durch Mutationen von Komponenten dieses Kontrollsystems kann es zu einer Fehlregulation und damit zu unkontrollierten Zellteilungen kommen. Der Cdk2-Inhibitor p27<sup>Kip1</sup> wird von quieszenten Zellen in hoher Konzentration exprimiert. In der späten G1-Phase wird er durch Cyclin E/Cdk2 durch Phosphorylierungen inaktiviert und beim Eintritt in die S-Phase abgebaut, bevor er nach dem Verlassen des Zellzyklus wieder akkumuliert.

Die meisten Keimbahnmutationen an pRB selbst führen zu einem Verlust der Struktur der *pocket* Domäne durch die resultierenden Aminosäureaustausche wie etwa C706Y oder C712R (Lee et al. 2002) und wurden z.B. bei Osteosarkomen oder bestimmten Lungenkrebsarten identifiziert. Ebenfalls inaktiv ist pRB in einer permanent phosphorylierten Form. Dies kann durch Fehlregulationen von Komponenten, die die pRB-Phosphorylierung steuern, eintreten. Zum einen sind hier die Cyclin-abhängigen Kinasen zu nennen, deren Komponenten (wie etwa

Cyclin D1 oder CDK4) durch Mutationen oder Genamplifikationen konstitutiv exprimiert werden. Genauso können aber auch für die Inhibierung dieser Kinasen zuständige sogenannte CDK-Inhibitoren betroffen sein. p16 ist der bekannteste Vertreter dieser Inhibitoren und häufig in Tumoren mutiert oder gar nicht mehr vorhanden. Beispielsweise ist Cyclin D1 häufig in Brustkrebs oder p16 in Melanomen fehlreguliert (Sherr and McCormick 2002).

Neben den gerade erwähnten Mechanismen, die zur Inaktivierung pRBs führen, haben auch Viren Verfahren entwickelt, um Zellen für ihre eigene virale Replikation umzustellen oder zu transformieren (Helt and Galloway 2003). Beispiele dieser Viren sind das humane Papillomavirus (HPV), das Adenovirus und das Polyoma Virus SV40. Das HPV ist wahrscheinlich an allen Arten von Gebärmutterhalskrebs beteiligt. Neben weiteren zellulären Regulationsproteinen wie p53 wird vor allem pRB durch die Expression folgender viraler Proteine inaktiviert: E7 im Falle des Papillomavirus, E1A beim Adenovirus und large T Antigen (TAg) bei SV40. Interessanterweise weisen alle drei Proteine eine LxCxE Sequenz auf und binden auch über dieses Motiv die *pocket* B Region von pRB (Chellappan et al. 1992; Lee and Cho 2002). Wie oben aus der Struktur ersichtlich ist, liegt die LxCxE-Bindungsstelle weit von der E2F-Bindungsregion entfernt. Trotzdem führt die Bindung viraler Proteine zur Freisetzung von E2F, wahrscheinlich durch Konformationsänderungen in pRB.

Die beschriebenen Mechanismen führen alle zum gleichen Ergebnis: eine pRB-Strukturmutante, konstitutiv hyperphosphoryliertes pRB oder mit viralen Proteinen komplexiertes pRB ist nicht mehr in der Lage E2F zu binden und damit die Zelle beim G1/S-Übergang zu arretieren. Damit ist ein unkontrolliertes Wachstum der Zelle eingeleitet.

Die eben beschriebene Rolle von pRB bei Krebserkrankungen stellt ein vereinfachtes Modell für die Rolle von einzelnen Tumorsuppressoren dar. Es sollte nicht vergessen werden, dass bei Tumorzellen in der Regel nicht nur einzelne Gene mutiert oder einzelne Komponenten fehlreguliert sind, sondern dass es zu sehr viel weitreichenderen Chromosomenumlagerungen oder auch zum Verlust großer Genombereiche kommt.

## **Posttranslationale Modifikationen und SUMO**

Die Transkription von Genen und die mRNA-Translation stellen für sich gesehen schon sehr komplex ablaufende Prozesse zur *de novo* Proteinsynthese dar. Dabei wurde durch die kürzliche Entdeckung der Genregulation durch micro-RNAs oder Vorgängen wie dem alternativen Spleißen deutlich, wie vielschichtig diese Prozesse darüber hinaus moduliert werden können. Durch posttranslationale Modifikationen von Proteinen ergeben sich ebenfalls Möglichkeiten, diese in ihrer Menge und ihren Eigenschaften zu regulieren. Bei diesem Prozess werden Proteine kovalent mit anderen Molekülen verknüpft, wie z. B. mit sehr großen verzweigten Strukturen wie Zuckerresten. Dies ist bis jetzt vor allem für extrazelluläre Proteine beschrieben und bei vielen Prozessen der Zellerkennung wichtig. Eine im Vergleich dazu kleine Modifikation stellt die Phosphorylierung dar, deren Rolle in der Signaltransduktion bisher am besten verstanden und charakterisiert ist. Weiterhin können Proteine auch acetyliert, durch Lipidreste modifiziert oder mit anderen Proteinen verknüpft werden (Muller et al. 2001).

Ein solches Protein wurde 1975 erstmals beschrieben, nach seiner Identifizierung in vielen verschiedenen Organismen als Ubiquitin bezeichnet und 1977 als kovalentes Konjugat mit dem Histon H2A nachgewiesen (Goldstein et al. 1975; Goldknopf and Busch 1977). Wenn es durch Isopeptidbindungen zwischen seinem C-Terminus und dem Lysin 48 des nächsten Ubiquitinmoleküls als Polymer an  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinen der Zielproteine konjugiert ist, so stellt dies in der Regel ein Signal zum Proteinabbau dar. Das so gekennzeichnete Substrat wird über den sogenannten *escort pathway* an das 26S-Proteasom übergeben und dort abgebaut (Richly et al. 2005). Das 26S-Proteasom kommt als Proteasekomplex sowohl im Cytosol als auch im Zellkern vor (Enenkel et al. 1999). Neben dieser klassischen Aufgabe wurden weitere durch Ubiquitin vermittelte Funktionen identifiziert. Dazu gehören Prozesse wie die Endozytose (Hicke and Dunn 2003) und die DNA-Reparatur (Hoegel et al. 2002), bei denen Ubiquitin als Monomer an das Substrat konjugiert wird. Im DNA-Reparaturweg vermittelt es allerdings auch als über Lysin 63 konjugiertes Polymer Signale, wie weiter unten näher erläutert.

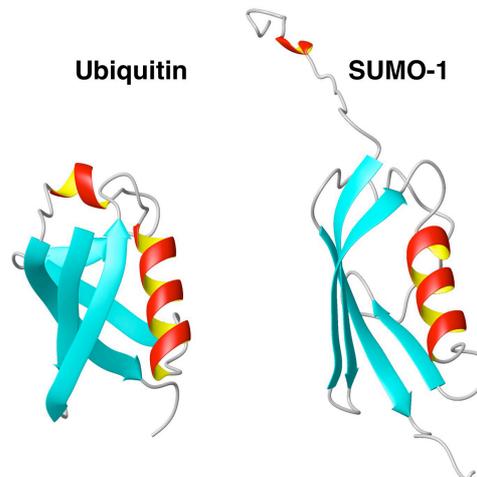
Außerdem reguliert das Ubiquitin/Proteasom-System die Transkription (Muratani and Tansey 2003).

Nach der Identifizierung von Ubiquitin konnte in der Folgezeit eine ganze Reihe von Ubiquitin-ähnlichen Proteinen aufgrund der Homologie in der Sequenz bzw. der Struktur beschrieben werden. NEDD8 beispielsweise wird an Culline konjugiert, die essenzielle Untereinheiten bestimmter Ubiquitin-E3 RING Ligase sind und über die NEDDylierung reguliert werden (Lammer et al. 1998). Auch p53 wird durch NEDD8 modifiziert und reguliert (Xirodimas et al. 2004). APG12 als weiteres Beispiel ist von der Hefe bis zum Säuger konserviert und spielt eine Rolle bei der Autophagie, bei der bestimmte cytoplasmatische Bereiche eingeschlossen und zu Lysosomen transportiert werden. Das einzige bisher bekannte Substrat von APG12 ist das für diesen Prozess ebenfalls benötigte APG5 (Klionsky and Ohsumi 1999). Neben NEDD8 und APG12 werden noch weitere Proteine wie ISG15 und FAT10 und der sogenannte *small ubiquitin-like modifier* (SUMO) zur Klasse der Ubiquitin-ähnlichen Proteine gerechnet (Jentsch and Pyrowolakis 2000).

Beim Menschen sind drei SUMO-Isoformen bekannt. SUMO-2 und -3 sind zu 95% identisch und weisen eine Sequenzhomologie von 50% zu SUMO-1 auf. Interessanterweise werden SUMO-2 und -3 unter Stressbedingungen verstärkt an Substrate konjugiert. Im Folgenden wird humanes SUMO-1 als SUMO bezeichnet. In *S. cerevisiae* existiert ein SUMO-Gen, *SMT3*, das für das Wachstum essenziell ist und zu 47% identische Seitenketten zur humanen SUMO-1-Sequenz aufweist. Der *S. pombe* Gegenpart, *pmt3*, ist für das Wachstum nicht essenziell. Allerdings führt der *knock-out* zu starken Wachstumsstörungen, wie unten näher erläutert. In Pflanzen gibt es bis zu acht SUMO-Gene (Dohmen 2004). Im Gegensatz zum Ubiquitin hat SUMO wohl keine Funktion beim Proteinabbau, und eine PolySUMOylierung von Proteinen konnte bisher nur für SUMO-2 gezeigt werden (Tatham et al. 2001). SUMO-2 und -3 besitzen im Gegensatz zu SUMO-1 ein SUMO-Konjugationslysin in einer Konsensussequenz (siehe unten).

Obwohl die Aminosäuresequenz nur eine Homologie von 18% zum Ubiquitin aufweist, zeigt die SUMO-Struktur die klassische Ubiquitinfaltung (Abbildung 6). Allerdings hat SUMO eine flexible N-terminale Extension im Vergleich zum

Ubiquitin und die Verteilung der Oberflächenladung ist deutlich unterschiedlich, was zur Erkennung durch jeweils spezifische Enzyme und Bindungspartner beiträgt.



**Abbildung 6. Strukturvergleich von Ubiquitin und SUMO-1**

Die Ubiquitinstruktur wurde durch die Röntgenstrukturanalyse ermittelt (Vijay-Kumar et al. 1987), die zum Vergleich gezeigte SUMO-1 Struktur durch NMR (Bayer et al. 1998). SUMO-1 weist die klassische Ubiquitinstruktur auf, wobei der N-Terminus länger ist. Ubiquitin besteht aus 76, SUMO-1 aus 97 Aminosäuren nach der Prozessierung.

### Die enzymatische Kaskade der SUMOylierung

Die SUMO-Konjugation verläuft analog zum enzymatischen Ablauf bei der Verknüpfung von Ubiquitin. Wie Ubiquitin auch muss SUMO erst durch Prozessierung in eine reife, konjugierbare Form gebracht werden. SUMO-Proteasen katalysieren durch ihre Hydrolaseaktivität diesen Prozessierungsschritt, der am C-Terminus zwei aufeinanderfolgende Glycine freilegt. Der letzte Glycinrest wird dann wie unten beschrieben über eine Isopeptidbindung mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins des Substratproteins verknüpft. Nach der Reifung muss SUMO aber erst ebenfalls wie Ubiquitin in einem ATP-verbrauchenden Schritt aktiviert werden. Dabei wird es über das C-terminale Glycin an ein Cystein des aktivierenden Enzyms, des Heterodimers AOS1/UBA2 konjugiert (Johnson et al. 1997). Somit wird die Energie des ATPs im reaktiven Thioester gespeichert.

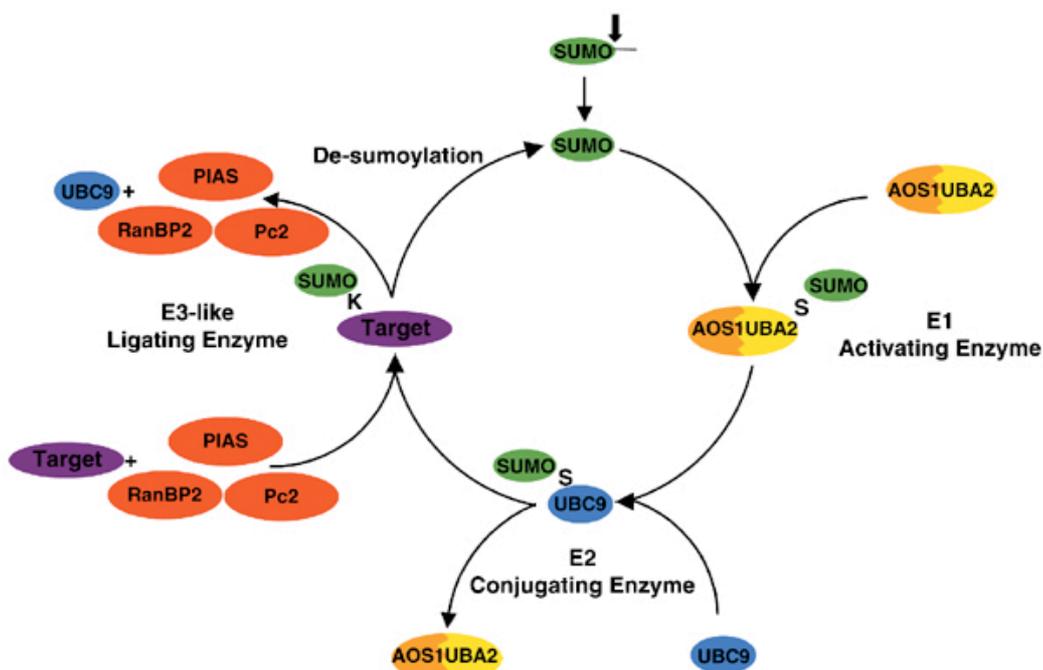
In der Ubiquitinierungskaskade stellen die nun folgenden Enzyme, die konjugierenden Enzyme (oder E2s) bereits einen ersten Schritt zur Substratspezifität der Modifikation dar. So sind je nach Substrat unterschiedliche E2s beschrieben, allerdings sind für die endgültige Spezifität die unten erwähnten E3 Ligasen mitentscheidend. Im Gegensatz dazu ist für den Ablauf der

SUMOylierung nur ein einziges konjugierendes Enzym beschrieben, Ubc9 (Johnson and Blobel 1997). Die entscheidende Funktion von Ubc9 konnte in einer aktuellen Veröffentlichung der Arbeitsgruppe von Dejean, die die Folgen eines Ubc9-*knock-outs* in Mauszellen untersuchte, unterstrichen werden (Nacerddine et al. 2005). Ubc9-defiziente Embryos sterben früh nach dem Implantationsschritt und entsprechende Mausblastozysten in Zellkultur stellen nach nur zwei Tagen mit sehr starken Defekten bei der Chromosomensegregation und des nukleären Aufbaus allgemein das Wachstum ein. Dies zeigt auch die essenzielle Funktion von SUMO für höhere Eukaryonten. Ubc9 scheint für die Modifikation vieler Substrate zumindest *in vitro* ausreichend zu sein. Das dabei modifizierte Lysin liegt oft in der Konsensussequenz  $\psi$ KxE/D, wobei  $\psi$  für eine große hydrophobe und x für eine beliebige Aminosäure steht. Strukturdaten der Arbeitsgruppe von Lima deuten darauf hin, dass die Konsensussequenz oft Teil einer leicht zugänglichen *loop*-Struktur ist, die direkt in die katalytische Tasche von Ubc9 passt (Bernier-Villamor et al. 2002). Allerdings wird SUMO auch an Lysine konjugiert, die nicht in dieser Konsensussequenz liegen.

In der SUMOylierungskaskade existieren wie im Ubiquitinsystem auch sogenannte E3 Ligasen, die für eine weitere Substratspezifität zuständig sind. Im Gegensatz zu einer Klasse von Ubiquitin-E3 Ligasen, den HECT-Ligasen, die direkt an der Katalyse teilnehmen, konnte für die drei beim Menschen bis jetzt identifizierten SUMO-Ligasen keine eigene katalytische Aktivität nachgewiesen werden. Sie ähneln damit also eher der zweiten Klasse von Ubiquitin-Ligasen, den RING-Ligasen. Man vermutet, dass diese in einer Adapterfunktion sowohl das beladene E2 als auch das Substrat binden. Eine erste Struktur des Komplexes der SUMO-E3 Ligase RanBP2, dem SUMOyliertem Substrat RanGAP und Ubc9 wurde kürzlich gelöst (Reverter and Lima 2005). Dabei konnte bestätigt werden, dass RanBP2 durch die Bindung an sowohl SUMO als auch Ubc9 den SUMO-E2 Thioester in eine für die Konjugation optimale Orientierung zum Substrat bringt. Bei den bisher identifizierten E3s handelt es sich um folgende Proteine oder Proteinfamilien: die Klasse der PIAS-Proteine mit einer SP-RING Domäne, die der RING-Domäne von Ubiquitin-E3 Ligasen ähnlich ist (Schmidt and Muller 2002),

dem oben erwähnten RanBP2 (Pichler et al. 2002) und einem Mitglied der Polycombproteine, Pc2 (Kagey et al. 2003). RanBP2 und Pc2 weisen keine offensichtliche Homologie zu den PIAS-Proteinen oder Ubiquitin-E3 Ligasen auf.

Die erwähnten SUMO-Proteasen katalysieren noch eine weitere wichtige Reaktion. Sie spalten durch ihre Isopeptidaseaktivität den SUMO-Rest auch wieder vom Substrat ab. Die Proteasen gehören zur Familie der in *S. cerevisiae* entdeckten Ulp (*ubiquitin-like protease*) Cystein Proteasen, die spezifisch SUMOylierte Substrate in Hefe erkennen (Li and Hochstrasser 1999). Bis jetzt sind sieben Gene dieser Familie beim Menschen bekannt (die *SEN*P Gene), wobei die tatsächliche Anzahl der Proteasen durch alternatives Spleißen wahrscheinlich höher ist und nicht alle für SUMO spezifisch sind. So katalysiert etwa das *SEN*P8-Genprodukt die NEDD8-Abspaltung von NEDDylierten Cullinen (Mendoza et al. 2003). Wodurch die SUMO-Proteasen reguliert werden und welche Spezifität im Hinblick auf die verschiedenen SUMO-Spezies und Substratproteine selbst besteht, ist Gegenstand aktueller Forschung (Melchior et al. 2003). Von entscheidender Bedeutung ist, dass durch diese Enzyme die SUMOylierung reversibel ist, was weitreichende funktionelle Konsequenzen hat (Abbildung 7).



**Abbildung 7. Der Ablauf der SUMO-Konjugation (Muller et al. 2004)**

Analog zum Ubiquitin-Konjugationsweg muss SUMO erst in eine reife Form überführt werden. Anschließend wird es durch das heterodimere Enzym AOS1/UBA2 energieabhängig aktiviert und durch ein einziges konjugierendes Enzym Ubc9 zusammen mit einer E3 Ligase auf das Zielprotein übertragen. Durch die Aktivität von spezifischen SUMO-Isopeptidasen ist die Konjugation reversibel.

## **SUMO und die Transkription**

Durch Untersuchungen des Proteoms von Zellkulturzellen wurden bis heute weit über 100 Substrate der SUMOylierung identifiziert (Li et al. 2004; Vertegaal et al. 2004; Gocke et al. 2005; Rosas-Acosta et al. 2005). Auch die Konjugation bestimmter SUMO-Isoformen unter Stressbedingungen wurde so näher untersucht (Guo et al. 2005). Es zeigte sich, dass hauptsächlich Proteine im Zellkern SUMOyliert werden. Eine große Gruppe von SUMO-Substraten stellen dabei Transkriptionsfaktoren oder mit dem Vorgang der Transkription assoziierte Proteine dar.

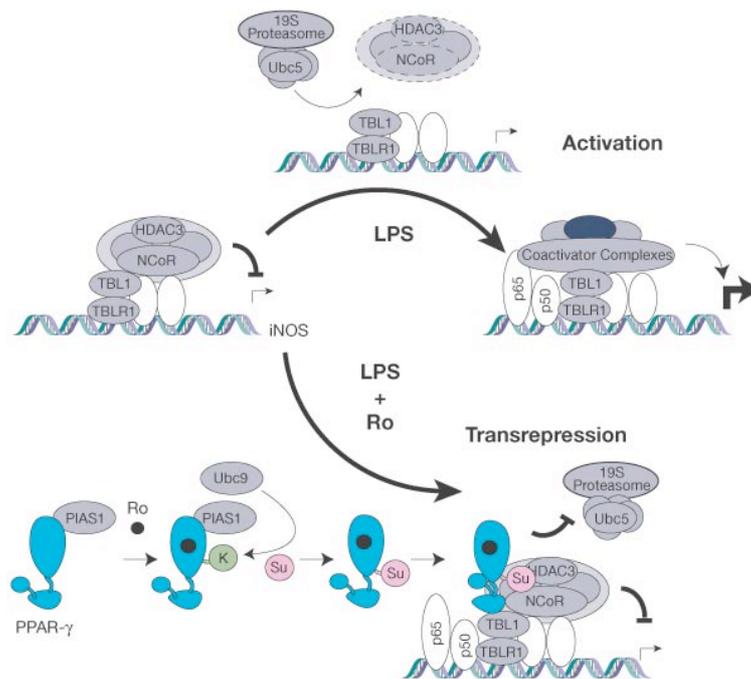
Die SUMOylierung scheint allgemein eher mit der Repression der Transkription assoziiert zu sein. Mittlerweile konnte für eine große Anzahl von humanen Transkriptionsfaktoren, wie etwa Mitgliedern der Steroidhormonrezeptoren, p53 oder C/EBP, eine Modifikation durch SUMO gezeigt werden, die mit der Reprimierung der Aktivität einhergeht (Seeler and Dejean 2003). Dabei liegt die SUMO-Konjugationsstelle häufig in schon früher identifizierten Repressordomänen. Auch die Fusion von SUMO an eine GAL4-Bindungsdomäne in einem artifiziellen System führt zur Repression eines Reportergens *in trans*, wobei die SUMOylierung die DNA-Bindung nicht inhibiert (Yang et al. 2003). Dies legt die Hypothese nahe, dass die SUMOylierung die Transkription durch die Rekrutierung von Korepressoren an die Promotoren inhibiert. In einigen Fällen wird dies wohl durch HDACs (Girdwood et al. 2003) bzw. Daxx (Kuo et al. 2005) erreicht. Allerdings stellt das wohl kein allgemeines Prinzip dar und bisher konnten keine zusätzlichen durch SUMO rekrutierten Korepressoren identifiziert werden (Gill 2005). Zusätzlich komplex wird die Regulation dadurch, dass nicht nur die Transkriptionsfaktoren selbst, sondern auch viele Koaktivatoren, wie etwa GRIP-1 oder CBP, und Korepressoren, wie etwa HDACs, SUMO-Substrate sind. Eventuell führt die SUMOylierung der an der Transkription beteiligten Faktoren zu einer Stabilisierung von Komplexen oder macht die Komplexbildung erst möglich. Es sind auch einige Fälle beschrieben, in denen die SUMOylierung zu einer Aktivierung der Transkription führt (Muller et al. 2004). Eine aktuelle Veröffentlichung postuliert darüber hinaus das Motiv  $\psi$ KxExxSP, bei dem

die SUMOylierung von der Phosphorylierung des Serins abhängig ist und das in vielen Proteinen, die an der Regulation der Transkription beteiligt sind, vorhanden ist. Damit könnte die SUMOylierung in einigen Fällen mit der Phosphorylierung gekoppelt sein (Hietakangas et al. 2006).

Wie bei der Kontrolle der Genexpression durch pRB schon erwähnt spielt die Struktur des Chromatins eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Transkription. Diese wird zu einem großen Teil über reversible Modifikationen von Histonen gesteuert, dem sogenannten *histon code*. Als Marker für eine geschlossene Chromatinkonformation, dem Heterochromatin, gelten Methylierungen an Lysin 9 des Histons H3 sowie die Abwesenheit von Acetylresten. Transkriptionell aktives Chromatin, Euchromatin, zeichnet sich dagegen durch Methylierungen an Lysin 4 des Histons H3 und Acetylreste an den N-Termini der Histone H3 und H4 aus. Abgesehen davon können Histone auch phosphoryliert und ubiquitiniert werden. Diese Modifikationen beeinflussen sich gegenseitig und fungieren in den unterschiedlichsten Kombinationen als Signale. Dadurch und durch seine Reversibilität ist der *histon code* enorm komplex und nur ansatzweise verstanden (Fischle et al. 2003). Für das Histon H4 konnte auch eine SUMOylierung gezeigt werden, die zu einer Rekrutierung von HP-1 und HDAC und damit zur Repression von Genen führt (Shiio and Eisenman 2003). Im Einklang mit den Daten der Histon H4-SUMOylierung beim Menschen führt der *pmt3-knock-out* in *S. pombe* zu *silencing*-Defekten in Heterochromatinbereichen und zur Induktion von Methylierungen des Lysins 4 von Histon H3 (aktives Chromatin in *S. pombe*). Das Ubc9-Homolog konnte in Abhängigkeit des HP-1 Homologs Swi6 und der Histon-Methyltransferase Cir4 durch Chromatinimmunpräzipitationen an Heterochromatin nachgewiesen werden. Ferner wurde gezeigt, dass Swi6 und Cir4 SUMOyliert sind und die nicht mehr SUMOylierbaren Proteine einen ähnlichen Phänotyp wie ein *pmt3-knock-out* aufweisen (Shin et al. 2005). Damit übernimmt die SUMOylierung eine entscheidende Funktion bei der stabilen Markierung von Heterochromatinbereichen in *S. pombe*.

Das folgende Beispiel soll verdeutlichen, wie die SUMOylierung von Transkriptionsfaktoren die komplexe Regulation einzelner Promotoren beeinflusst.

Es handelt sich um die Regulation des murinen iNOS-Gens (Abbildung 8), das bei Entzündungsreaktionen durch NF- $\kappa$ B-Aktivierung stark induziert wird. Durch Agonisten des Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$  wird iNOS auch trotz Induktion stark reprimiert, obwohl PPAR $\gamma$  nicht als sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor an den iNOS-Promotor bindet. Pascual *et al.* konnten zeigen, dass dieser Vorgang der Transrepression von iNOS durch PPAR $\gamma$  SUMO-abhängig ist (Pascual *et al.* 2005).



**Abbildung 8. Transrepression des iNOS-Gens (Pascual *et al.* 2005)**

Durch Lipopolysaccharide (LPS) kann das iNOS-Gen induziert werden. Dabei kommt es zum Ubiquitin-abhängigen Austausch des Korepressorkomplexes HDAC3-NCoR gegen einen Koaktivatorkomplex. Durch den PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon (Ro) wird PPAR $\gamma$  SUMOyliert, was zur Rekrutierung in den Korepressorkomplex und damit trotz LPS zur weiteren Genrepression führt, da der Abbau des Korepressorkomplexes verhindert wird. TBL1 und TBLR1 sind Proteine, die für die Ubiquitinierung des Koaktivatorkomplexes und Rekrutierung des Proteasoms verantwortlich sind.

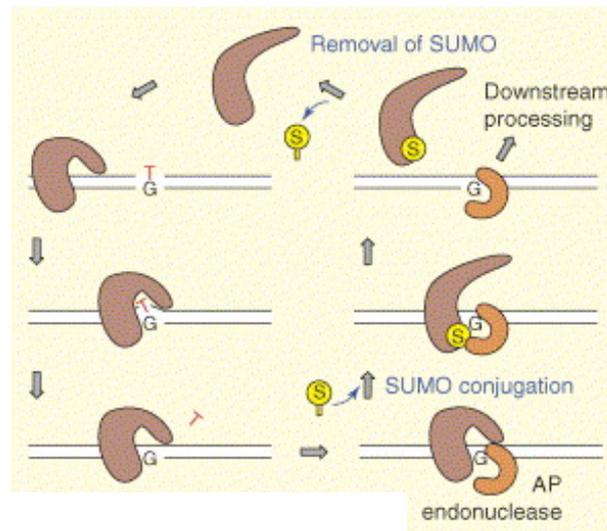
Im nichtinduzierten Zustand wird die Expression des iNOS-Gens durch die Rekrutierung eines Repressorkomplexes bestehend aus NCoR und HDAC3 reprimiert. Nach der Induktion kommt es zum Austausch des Korepressorkomplexes durch NF- $\kappa$ B, das die Genexpression einleitet. Für den Austauschprozess ist das Ubiquitin/Proteasom-System essenziell, da es zum Abbau des HDAC3-NCoR Komplexes führt. Fügt man nun auch noch einen PPAR $\gamma$ -Agonisten hinzu, so bleibt das Gen reprimiert. PPAR $\gamma$  wird durch Bindung des Agonisten PIAS1-abhängig an Lysin 365 durch SUMO modifiziert. Dies führt zu

einer Rekrutierung an den Korepressorkomplex am iNOS-Promotor, da SUMO-PPAR $\gamma$  mit einer höheren Affinität an NCoR bindet. Durch diesen neuen Komplex wird der Ubiquitin-abhängige Abbauschritt verhindert und das Gen bleibt reprimiert. Interessanterweise handelt es sich hier in gewisser Weise um eine antagonistische Funktion von Ubiquitin und SUMO. Ubiquitinierung und damit Abbau sind für die Aktivierung essenziell, SUMO dagegen fördert die weitere Repression.

### **Funktionelle Konsequenzen der SUMO-Modifikation**

Eine Aufzählung aller Substrate und Auswirkungen der SUMOylierung, soweit überhaupt bekannt, würde den Rahmen der Arbeit sprengen. Deshalb wird in diesem Abschnitt anhand von ausgewählten Substraten versucht, die bisher am besten verstandenen Konsequenzen der Modifikation durch SUMO zu erklären. Als allgemeine Funktion der SUMOylierung könnte man dabei die Regulation spezifischer Protein/Protein-Interaktionen ansehen, die unterschiedliche Auswirkungen auf die Proteine hat.

Das erste Beispiel zeigt, wie Enzyme durch die SUMO-Modifikation in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Das Enzym Uracil/Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) hat eine wichtige Funktion im *base excision repair* (BER). Es katalysiert das Entfernen von falsch an Guanin gepaarten Thyminen oder Uracilen, die durch Desaminierungsreaktionen von Cytosinderivaten entstehen und im Falle einer ablaufenden Replikationsrunde zu einem Basenaustausch führen würden. Im nächsten Schritt des BER schneidet die AP Endonuklease 1 auch das Zuckerrückgrat der DNA und leitet damit die Wiederherstellung der korrekten Basenpaarung durch weitere Prozesse ein (Lindahl and Wood 1999). Hardeland *et al.* konnten zeigen, dass TDG durch SUMO modifiziert wird (Hardeland *et al.* 2002) und in den folgenden Jahren wurde die SUMO-Funktion (Steinacher and Schar 2005) ebenso wie die TDG-SUMO Struktur aufgeklärt (Baba *et al.* 2005). Wie in Abbildung 9 gezeigt, erkennt die unmodifizierte TDG ihre Substrate mit hoher Affinität und katalysiert das Entfernen der Base T oder U. Dies resultiert in einer nahezu kompletten Produktinhibition, bei der das Enzym die sonst ungeschützte nichtbasische Stelle abschirmt, wahrscheinlich bis zur Aktivität der AP



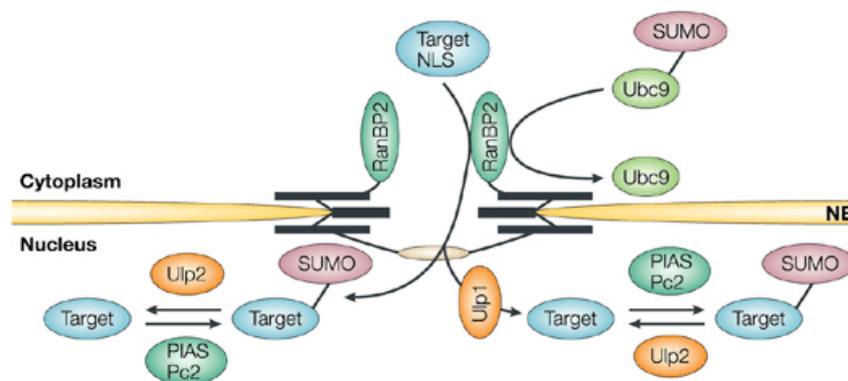
**Abbildung 9. Einfluss der SUMOylierung auf die Aktivität der TDG (Ulrich 2005b)**

Unmodifizierte TDG hat eine hohe Affinität zur DNA. Dies resultiert in einer starken Produktinhibierung. Durch SUMOylierung wird eine Konformationsänderung im N-Terminus bewirkt, die die DNA-Affinität verringert und zur Freisetzung des Enzyms führt. Wahrscheinlich ist diese reversible Modifikation mit der Rekrutierung der AP Endonuklease gekoppelt.

Endonuklease 1. Nach deren Eintreffen wird TDG an einem Lysin im C-Terminus SUMOyliert, was zu einer Konformationsänderung im N-Terminus führt und dadurch die Affinität zur DNA verringert. Dies resultiert in der Freisetzung von TDG. Anschließende DeSUMOylierung macht das Enzym für eine neue Runde mit hoher Bindungsaffinität bereit. Das allgemeine Prinzip liegt hier also darin, dass durch die reversible SUMOylierung eine Änderung in der Bindungsaffinität gesteuert werden kann. Dadurch bleibt das Enzym nicht in bestimmten Positionen gefangen, sondern kann zyklisch agieren.

RanGAP konnte als erstes SUMO-Substrat identifiziert werden. Die SUMOylierte Form RanGAPs bindet an RanBP2, das Bestandteil des Kernporenkomplexes (NPC) ist. Somit ist die SUMOylierung für das *targeting* von RanGAP zur cytosolischen Seite des NPC verantwortlich (Matunis et al. 1996; Mahajan et al. 1997). Nach der Identifizierung des integralen NPC Proteins RanBP2 als SUMO-E3 Ligase (Pichler et al. 2002) und Daten, die die Lokalisierung von SUMO-spezifischen Proteasen auf der nukleären Seite des NPC nahe legten (Hang and Dasso 2002), wurde das in Abbildung 10 gezeigte Modell aufgestellt. Die Komponenten des Systems sind in der Hefe *S. cerevisiae* so nicht vorhanden, aber auch hier konnte eine Rolle der SUMOylierung beim NLS-abhängigen Import

in den Zellkern beobachtet werden (Stade et al. 2002). In diesem Beispiel ist die SUMOylierung also für die Lokalisierung von RanGAP an den NPC verantwortlich. Sie scheint aber dort auch direkten Einfluss auf den Import zu haben. Ein Modell besteht darin, dass die SUMOylierung mechanistisch notwendig für den Prozess der Translokation ist. Auch existiert die Hypothese, dass die SUMOylierung das zu translozierende Protein in einen inaktiven Zustand während des Translokationsprozesses bringt und es anfänglich auch danach im Zellkern modifiziert und damit inaktiv vorliegt (Melchior et al. 2003).



**Abbildung 10. Nukleärer Import und SUMOylierung (Seeler and Dejean 2003)**

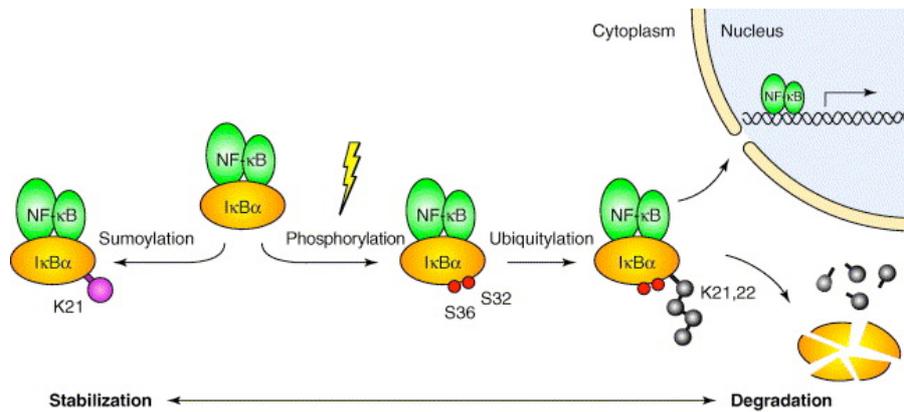
In diesem Modell ist die SUMOylierung am Import von Proteinen mit einer Kernlokalisierungssequenz (NLS) beteiligt. Durch die E3 Ligase RanBP2 werden diese Proteine durch SUMO modifiziert und daraufhin importiert. Im Zellkern erfolgt entweder direkt eine Demodifikation durch Ulp1, oder zu einem späteren Zeitpunkt durch andere Ulps, wie Ulp2. Natürlich können Proteine auch im Kern durch die anderen Ligasen (PIAS, Pc2) wieder SUMOyliert werden.

SUMO ist auch impliziert in die Kontrolle der Assemblierung größerer Proteinkomplexe. Ein gut untersuchtes Beispiel hierfür ist PML beziehungsweise die durch PML als Hauptkomponente gebildeten *PML-nuclear bodies* (NBs) im Zellkern. Pro Zelle existieren etwa 10 bis 20 dieser Multiproteinkomplexe, die in der Immunfluoreszenz sichtbare, distinkte subnukleäre Strukturen bilden. PML selbst agiert unter anderem als transkriptioneller Koaktivator von p53 und hat dadurch proapoptische Funktion und Einfluss auf weitere Prozesse, wie etwa auf die Zellproliferation (Guo et al. 2000). p53 wurde neben vielen anderen Proteinen als Komponente der PML-NBs identifiziert. PML wird an drei Lysinen SUMOyliert und diese Modifikation scheint für die Assemblierung und Stabilität der PML-NBs von

entscheidender Bedeutung zu sein (Muller et al. 1998; Zhong et al. 2000). Dies beeinflusst auch die Rekrutierung von weiteren Komponenten. So wurde für den Korepressor Daxx die PML-SUMO-abhängige Rekrutierung in die PML-NBs beschrieben, die mit einem Verlust der Repression von Daxx-regulierten Genen einhergeht (Li et al. 2000). Für die PML-NBs wird allgemein eine stimulierende Funktion auf die SUMOylierung eigener Komponenten oder transient gebundener Proteine diskutiert (Muller et al. 2001). Sicher ist, dass die SUMOylierung für die Entstehung dieser distinkten nukleären Komplexe verantwortlich ist. Ferner ist eine gezielte, SUMO-abhängige Sequestrierung von Transkriptionsfaktoren in diese oder andere subnukleäre Strukturen zur Regulation der Transkription bekannt (Seeler and Dejean 2003).

Mit dem Nachweis der  $\text{I}\kappa\text{B}$ -SUMOylierung wurde eine weitere Funktion aufgeklärt (Desterro et al. 1998). Hierbei verhält sich SUMO beim Prozess der Signaltransduktion zur Aktivierung von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  antagonistisch zu Ubiquitin. Abbildung 11 zeigt den Ablauf der  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  Aktivierung. Der Transkriptionsfaktor liegt durch die Bindung eines Inhibitors,  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , inaktiv im Cytosol vor. Die Stimulation durch externe Signale bei Entzündungsreaktionen oder durch interne Signale wie DNA-Schäden führt zur Phosphorylierung von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  an den Serinen 32 und 38. Dies wiederum löst die Polyubiquitinierung an den Lysinen 21 und 22 aus, was zum Abbau durch das 26S-Proteasom führt. Dadurch wird das Signal zum Kernimport bei  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  freigelegt und der Transkriptionsfaktor induziert nun die Expression von Zielgenen im Zellkern (Hay 2005).  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  wird aber am Lysin 21 auch SUMOyliert. Dieser so modifizierte Pool an  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  ist vor der Ubiquitinierung als Signal zum Abbau durch direkte Konkurrenz um das Akzeptorlysin geschützt und bindet weiterhin  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ .

Ein besonders für die Replikation essenzielles Protein wird wie  $\text{I}\kappa\text{B}$  durch SUMO und Ubiquitin modifiziert. Es handelt sich dabei um das Protein *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), das die DNA als Homotrimer wie eine Klammer bindet und so als Bindeplattform und Prozessivitätsfaktor für weitere Proteine wie etwa Polymerasen dient. Die PCNA-Modifikationen wurden in *S. cerevisiae* bei Versuchen zu posttranslationalen Modifikationen in Abhängigkeit von DNA-



**Abbildung 11. Antagonistische Effekte von Ubiquitin und SUMO (Ulrich 2005a)**

NF-κB liegt durch die Bindung an IκBα inaktiv im Cytosol vor. Nach Signalkaskaden zur Aktivierung von NF-κB wird IκBα zunächst an den Serinen 32 und 36 phosphoryliert. Dies führt zur Polyubiquitinierung an den Lysinen 21 und 22 und damit zum Abbau des Inhibitors. NF-κB kann nun als Transkriptionsfaktor im Zellkern agieren. Wenn IκBα am Lysin 21 SUMOyliert ist, so wird das Protein stabilisiert und NF-κB liegt weiterhin inaktiv vor.

Schäden gefunden und charakterisiert (Hoeye et al. 2002). DNA-Schäden führen bei der Replikation zum Anhalten der Replikationsgabel und haben damit Auswirkungen auf den gesamten Ablauf der Zellteilung mit eventuell gravierenden Folgen wie unvollständig replizierter DNA. Aus diesem Grund haben Zellen dagegen sehr effektive Schutzmechanismen entwickelt. PCNA wird nach DNA-Schäden hauptsächlich am konservierten Lysin 164 entweder durch Monoubiquitin oder über Lysin 63 verbundenes Polyubiquitin modifiziert. Dies signalisiert im Vergleich zu über Lysin 48 verbundenem Polyubiquitin keinen proteasomalen Abbau. Monoubiquitinierung von PCNA führt dazu, dass über die beschädigte Stelle auch auf die Gefahr einer Mutation hin im sogenannten *error-prone* Reparaturweg repliziert wird (Hoeye et al. 2002; Stelter and Ulrich 2003). Dieser Schritt beinhaltet die gezielte Rekrutierung von fehlertoleranten Polymerasen durch monoubiquitiniertes PCNA, wie am Beispiel der menschlichen Polymerase η gezeigt wurde (Kannouche et al. 2004). Polyubiquitiniertes PCNA dagegen leitet die fehlerfreie Replikation ein, wobei der Mechanismus der Signalübermittlung hierbei bislang wenig verstanden ist. SUMOyliert wird PCNA während der S-Phase an den Lysinen 127 und 164, auch unabhängig von DNA-Schäden. Pfander *et al.* konnten zeigen, dass spezifisch die SUMOylierte Form von PCNA die Helikase Srs2 an die Replikationsgabeln rekrutiert, was ungewollte Rekombinationsereignisse während

der DNA-Replikation verhindert (Pfander et al. 2005). Am Beispiel von PCNA wird also deutlich, was für unterschiedliche Signale je nach Art der Modifikation ausgelöst werden bzw. welche unterschiedlichen Enzyme rekrutiert werden.

Bei der Rekrutierung von Srs2 durch SUMOyliertes PCNA oder beim oben genannten Beispiel der Bindung von SUMO-PPAR $\gamma$  an NCoR handelt es sich um Prozesse, bei denen die SUMOylierung zu einer starken Affinitätserhöhung des Substratproteins, das selbst die Bindung mitvermittelt, zum Bindungspartner führt. Für SUMO-modifizierte Transkriptionsfaktoren gibt es wie oben erläutert die Hypothese, dass die Modifikation für die Rekrutierung von Korepressoren zuständig ist. Damit stellt sich die Frage nach nichtkovalenten Interaktionen, die durch SUMO vermittelt werden bzw. nach einem SUMO-Interaktions-Motiv (SIM) auf Seiten der Bindungsproteine. Zwei Arbeitsgruppen suchten in Hefe *two hybrid screens* nach nichtkovalenten SUMO-Bindungspartnern und konnten bei diesen eine Konsensussequenz identifizieren (Minty et al. 2000; Hannich et al. 2005). Diese lautet nach Hannich *et al.*: K-x<sub>3-5</sub>-(V/I)-(I/L)-(I/L)-x<sub>3</sub>-(D/E/Q/N)-(D/E)-(D/E). Darauf basierende NMR-Studien unterstrichen die Bedeutung der hydrophoben Aminosäuren am Anfang des Motivs (hier lautet das Konsensusmotiv (V/I)-x-(V/I)-(V/I), das zum Beispiel in der Familie der PIAS-Proteine oder PML vorhanden ist), konnten aber zumindest für bestimmte Proteine eine Rolle für die sauren Aminosäuren am Ende nicht bestätigen (Song et al. 2004). Welche Auswirkungen eine Mutation des Motivs in SUMO-Bindungspartnern hat, wie zum Beispiel bei PML in Bezug auf die Assemblierung der PML-NBs, bleibt abzuwarten.

Zusammenfassend konnten für die SUMOylierung bis heute folgende Funktionen aufgeklärt werden: Aktivitätsänderung eines Enzyms, gezielte Proteinlokalisationsänderung, Assemblierung von Multiproteinkomplexen, Proteinstabilisierung sowie Rekrutierung spezifischer Bindungspartner. Diese Funktionen vermitteln die essenzielle Rolle SUMOs bei hauptsächlich zellkernspezifischen Prozessen wie beim Kernaufbau allgemein und bei der Chromatinstruktur und Transkription sowie der Aufrechterhaltung der Genomintegrität und Genomstabilität speziell auch auf der Ebene DNA-spezifischer Prozesse (Muller et al. 2004).

### **Zielsetzung der Arbeit**

Das Ubiquitin-ähnliche SUMO-System kontrolliert zahlreiche zelluläre Schlüsselfunktionen wie Zellproliferation und Apoptose. Prominente SUMO-Zielproteine stellen die Tumorsuppressoren p53 und PML dar. Für PML, die konstitutive Komponente der sogenannten PML-*nuclear bodies* (NBs) konnte gezeigt werden, dass SUMOylierung für die Assemblierung dieser Strukturen und die Rekrutierung NB-assoziiierter Proteine nötig ist. Interessanterweise korreliert hierbei die Lokalisation von Proteinen in PML-NBs häufig mit deren SUMOylierung. Da für den pRB Tumorsuppressor ebenfalls eine transiente Lokalisation in PML-NBs, zum Beispiel nach Induktion zellulärer Seneszenz, beschrieben ist, stellte pRB ein potenzielles Zielprotein für die SUMOylierung dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb zunächst, pRB auf eine kovalente Modifikation mit SUMO hin zu untersuchen. Eine mögliche SUMO-Modifikation sollte sowohl unter zellulären Bedingungen als auch in einem rekombinanten System *in vitro* untersucht werden. Im Falle einer nachgewiesenen SUMOylierung sollte in einem nächsten Schritt versucht werden, die Konjugationsstelle(n) für SUMO zu identifizieren.

Durch die gezielte Mutagenese von Lysinen, an die SUMO konjugiert wird, kann eine Proteinspezies erzeugt werden, die nicht mehr durch SUMO modifiziert wird. Der Vergleich einer solchen pRB-Form mit dem Wildtyp-Protein in weiteren Versuchen sollte dann zur Aufklärung einer möglichen Funktion der pRB-SUMOylierung führen. Dabei sollten zunächst bereits beschriebene funktionelle Experimente zu pRB *in vivo* und *in vitro* durchgeführt werden. Anschließend sollte versucht werden, den molekularen Mechanismus zu identifizieren, durch den pRB-SUMO seinen Effekt vermittelt.

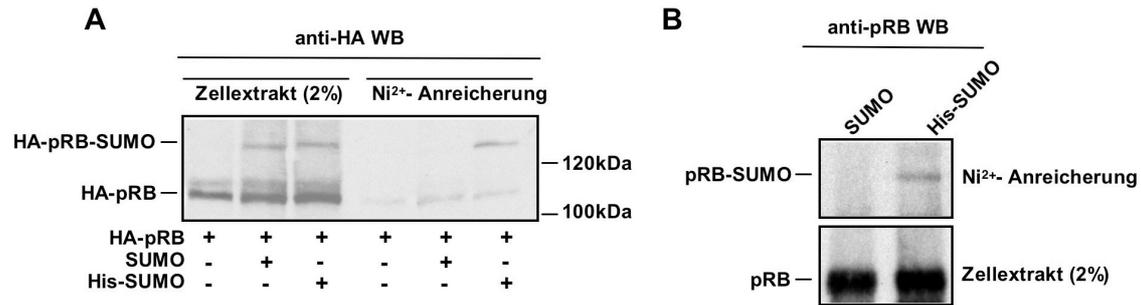
### 3. Ergebnisse

#### **pRB wird durch SUMO modifiziert und bindet Ubc9**

Um zu untersuchen, ob pRB ein Substrat für die SUMOylierung darstellt, wurden zunächst Transfektionsversuche mit pRB- und SUMO-Konstrukten in C33a Zellen durchgeführt. Diese Zellen stammen von einem Cervixkarzinom ab und exprimieren verkürztes, nicht funktionelles pRB (Scheffner et al. 1991). Damit stellen sie ein ideales System zur Analyse von transfiziertem, exogenen pRB dar, da nur diese Form vor einem pRB-negativen Hintergrund vorhanden ist.

Nach der transienten Transfektion dieser Zellen mit pcDNA3-HA-pRB und der Expression des HA-epitopmarkierten pRBs zeigen in der SDS-PAGE aufgetrennte Proteine des Gesamtzellextrakts ein Duplett für HA-pRB im Westernblot (Abbildung 12A, links). Diese Banden entsprechen der hypo- und der hyperphosphorylierten Spezies des Proteins, die nach ihrem Molekulargewicht in der denaturierenden Auftrennung unterschiedliches Laufverhalten haben. Die obere Bande entspricht dabei der hyperphosphorylierten HA-pRB-Spezies.

Die Koexpression von entweder SUMO oder HIS-SUMO führt zur Entstehung einer weiteren, in der SDS-PAGE höher laufenden HA-pRB-Spezies. Der Unterschied in der scheinbaren molekularen Masse zwischen unmodifiziertem HA-pRB und dieser weiteren HA-pRB-Form liegt bei ungefähr 15 bis 20 kDa, was typisch ist für den Unterschied zwischen unmodifiziertem Protein und der SUMOylierten Form. Im Falle der Expression von HIS-SUMO können durch eine Inkubation des unter denaturierenden Bedingungen erhaltenen Zellextrakts mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Kügelchen spezifisch HIS-SUMO-Konjugate angereichert werden. Der HIS-*tag* bindet auch unter diesen Bedingungen an Ni<sup>2+</sup>-NTA. Die nach verschiedenen Waschschritten zur Entfernung unspezifischer Bindungspartner noch gebundenen Proteine werden durch Aufkochen in SDS-Puffer von den Kügelchen gelöst und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis, dass es sich bei der höhermolekularen Bande um HIS-SUMO-HA-pRB handelt, erfolgte nach dieser Anreicherung im Westernblot mit einem HA-Antikörper gegen HA-pRB-Spezies (Abbildung 12A, rechts).



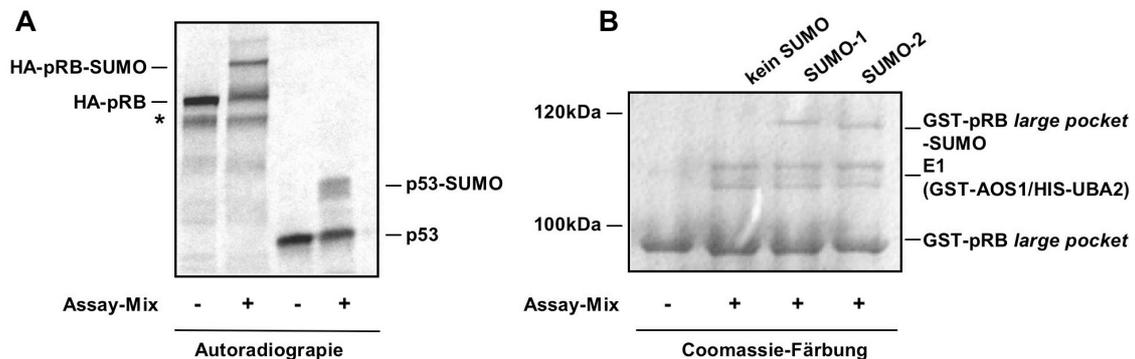
### Abbildung 12. pRB wird *in vivo* durch SUMO modifiziert

(A) C33a Zellen wurden wie angegeben mit HA-pRB und SUMO-Konstrukten transfiziert. Der Gesamtzellextrakt sowie Proteine nach der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Anreicherung wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und einem HA-Westernblot unterzogen. (B) U2OS Zellen wurden nur mit SUMO bzw. HIS-SUMO transfiziert und wie in (A) analysiert. Für die Detektion im Westernblot wurde ein für pRB spezifischer Antikörper verwendet.

Um eine Modifikation von endogenem pRB durch SUMO nachzuweisen, wurden in anschließenden Experimenten U2OS Zellen verwendet. Diese Zellen stammen von einem Osteosarkom ab und exprimieren im Gegensatz zu den C33a Zellen funktionelles pRB. Werden U2OS Zellen mit pSG5-SUMO bzw. pSG5-HIS-SUMO transfiziert, so erkennt man im pRB-Westernblot des Gesamtzellextrakts keine pRB-Bande mit einem ca. 20 kDa höheren Molekulargewicht, welche die SUMOylierte Spezies darstellen könnte (Abbildung 12B, unten). Wenn man aber wie oben beschrieben wieder spezifisch HIS-SUMO-Konjugate anreichert und diese auf pRB-Spezies untersucht, so wird wiederum eine HIS-SUMO-pRB Bande im Westernblot detektiert (Abbildung 12B, oben). Dies zeigt, dass eine Fraktion von endogenem pRB als Konjugat mit SUMO vorliegt.

Die Konjugation von SUMO an Zielproteine kann in einem rekombinanten *in vitro* Modifikationssystem rekonstituiert werden, in dem neben aufgereinigtem E1, Ubc9 und SUMO auch ATP vorhanden ist. Einzelne Proteine können im zellfreien System bestehend aus Retikulozytenlysat durch *in vitro* Transkription/Translation hergestellt und dabei durch Zugabe von <sup>35</sup>S-Methionin spezifisch markiert werden. Die Detektion erfolgt dann nach Auftrennung der Proteine im SDS-Gel durch Autoradiographie. Auf diese Weise radioaktiv markiertes HA-pRB wurde einer SUMOylierungsreaktion *in vitro* unterzogen. Die Autoradiographie zeigt die ca. 20 kDa höher laufende SUMOylierte HA-pRB-Spezies (Abbildung 13A, links). Als

Positivkontrolle der Reaktion wurde die schon bekannte SUMOylierung von p53 durchgeführt (Abbildung 13A, rechts).



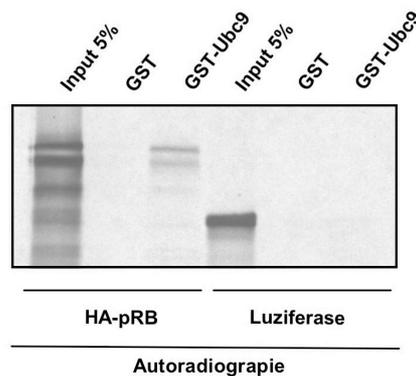
### Abbildung 13. pRB wird *in vitro* durch SUMO modifiziert

(A) Durch *in vitro* Transkription/Translation hergestelltes <sup>35</sup>S-markiertes HA-pRB wurde ohne (-) oder mit (+) Assay-Mix inkubiert. Dieser bestand aus rekombinantem humanen E1 (GST-AOS1/HIS-UBA2), GST-Ubc9 und HIS-SUMO-1 sowie ATP. Nach der Inkubation wurden die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und HA-pRB-Spezies durch Autoradiographie detektiert. Das Sternchen kennzeichnet ein Abbruchprodukt HA-pRBs bei der Translation *in vitro*. (B) Aufgereinigtes GST-pRB *large pocket* wurde mit dem oben genannten Assay-Mix inkubiert, die Proteine aufgetrennt und durch Coomassie angefärbt. Dieses Experiment wurde sowohl mit HIS-SUMO-1 als auch mit HIS-SUMO-2 durchgeführt. Als Kontrolle fehlte SUMO in einem Ansatz.

Bei der Verwendung von HA-pRB als Substrat, das durch *in vitro* Transkription/Translation hergestellt wurde, befinden sich im Reaktionsansatz neben den rekombinanten Proteinen der SUMOylierungsreaktion auch noch die Proteine des Retikulocytenlysats, die die Reaktion beeinflussen könnten. Aus diesem Grund wurde pRB im nächsten Experiment ebenfalls rekombinant eingesetzt, um die Reaktion in einem vollständig rekombinanten System nachzustellen. Es ist allerdings nicht möglich, ein GST-pRB-Vollängenkonstrukt in *E. coli* zu exprimieren. Reduziert man den pRB-Anteil auf die *large pocket* Region, so kann das Fusionsprotein aufgereinigt werden. Die *large pocket* Region pRBs enthält wie in der Einleitung beschrieben die wichtigsten strukturellen pRB-Regionen mit der *pocket* Domäne und dem C-Terminus. Die Inkubation von GST-pRB *large pocket* mit den oben genannten Komponenten im rein rekombinanten System führte ebenso zur Entstehung einer GST-pRB *large pocket* Bande mit höherem Molekulargewicht, die den für SUMO typischen Unterschied zum nichtmodifizierten GST-pRB *large pocket* von ca. 20 kDa aufweist. Neben SUMO-1

kann auch SUMO-2 an GST-pRB *large pocket* konjugiert werden (Abbildung 13B). Außer diesen GST-pRB *large pocket* SUMO-Spezies und dem unmodifizierten GST-pRB *large pocket* wird in der Coomassie-Färbung auch das heterodimere E1 Enzym detektiert, das aus GST-AOS1 und HIS-UBA2 besteht.

Ein Charakteristikum von SUMO-Zielproteinen ist die Bindung an das E2 Enzym. Um zu bestätigen, dass pRB mit Ubc9 interagiert, wurden Bindungsstudien durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde HA-pRB zunächst wiederum durch *in vitro* Transkription/Translation hergestellt. Anschließend wurde das radioaktiv markierte Protein mit GST-Ubc9 inkubiert, das im Versuchsansatz an Glutathion-Kügelchen gebunden vorhanden war. Nach mehreren Waschschritten zur Entfernung von unspezifisch an GST-Ubc9 gebundenen Proteinen wurden die Kügelchen mit SDS-Lysepuffer versetzt und aufgeköcht. Diese Proteine wurden neben einem Aliquot des *inputs* in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend zur Detektion der radioaktiv markierten Proteine eine Autoradiographie durchgeführt. Um auszuschließen, dass die Bindung dabei über den GST-Teil des GST-Ubc9-Fusionsproteins abläuft, wurde HA-pRB parallel dazu auch mit nur durch GST beladenen Kügelchen inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Luziferase eingesetzt, die wie erwartet weder mit GST noch GST-Ubc9 interagiert (Abbildung 14, rechts).

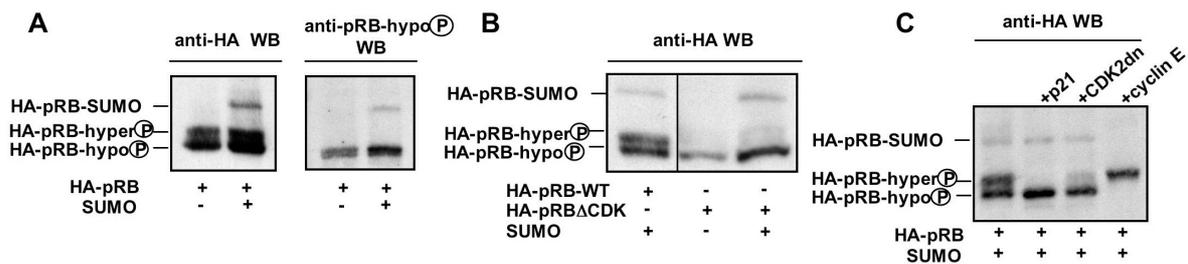


**Abbildung 14. pRB bindet Ubc9 *in vitro***

Durch *in vitro* Transkription/Translation hergestelltes <sup>35</sup>S-markiertes HA-pRB wurde entweder mit nur GST oder mit GST-Ubc9 beladenen Glutathion-Kügelchen inkubiert. Nach ausgiebigen Waschschrritten wurden die gebundenen Proteine durch Aufkochen in SDS-Puffer von den Glutathion-Kügelchen gelöst und in der SDS-PAGE aufgetrennt, gefolgt von einer Autoradiographie. Als Negativkontrolle diente die Bindung von Luziferase an GST bzw. GST-Ubc9.

## Die aktive Form pRBs wird bevorzugt durch SUMO modifiziert

Wie in der Einleitung beschrieben determiniert der Phosphorylierungsstatus die Aktivität von pRB. Deshalb sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, ob pRB-SUMO in der hypo- oder der hyperphosphorylierten Form vorliegt. Im Westernblot wird pRB hauptsächlich durch zwei Banden detektiert. Die höherlaufende Bande stellt dabei die hyperphosphorylierte, inaktive pRB-Spezies dar. Der Westernblot in Abbildung 15A (links) zeigt diese beiden Banden deutlich. Hierzu wurde erneut HA-epitopmarkiertes pRB alleine oder mit SUMO in C33a Zellen exprimiert und ein HA-Westernblot der Gesamtzellextrakte durchgeführt. Da aber HA-pRB-SUMO nur als eine Bande detektiert wurde, wurden diese beiden Proben erneut einem Westernblot unterzogen. Diesmal wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch die hypophosphorylierte Form pRBs erkennt. Wie in



### Abbildung 15. Hypophosphoryliertes pRB wird präferenziell SUMOyliert

(A) C33a Zellen wurden mit HA-pRB und SUMO wie angegeben transfiziert und die HA-pRB-Formen entweder mit einem HA-Antikörper oder mit einem Antikörper spezifisch für die hypophosphorylierte pRB-Spezies detektiert. (B) Entweder HA-pRB-WT oder eine nicht mehr phosphorylierbare Version (HA-pRB $\Delta$ CDK) wurde mit und ohne SUMO in C33a Zellen transfiziert und der Extrakt im HA-Westernblot analysiert. (C) p21, eine dominant negative Version von CDK2 und Cyclin E wurden wie angegeben mit HA-pRB und SUMO in C33a Zellen transfiziert und der Extrakt im HA-Westernblot auf HA-pRB-Spezies untersucht.

Abbildung 15A auf der rechten Seite klar zu erkennen ist, reagiert neben der hypophosphorylierten HA-pRB-Form auch die HA-pRB-SUMO Bande spezifisch mit diesem Antikörper. Dies impliziert, dass es sich bei HA-pRB-SUMO ebenfalls um eine hypophosphorylierte HA-pRB-Spezies handelt.

Dieses Ergebnis legt ferner nahe, dass auch nicht mehr phosphorylierbares pRB durch SUMO modifiziert werden sollte. Eine solche pRB-Version wurde in einer Studie der Arbeitsgruppe von Bartek für Versuche eingesetzt, die den Effekt

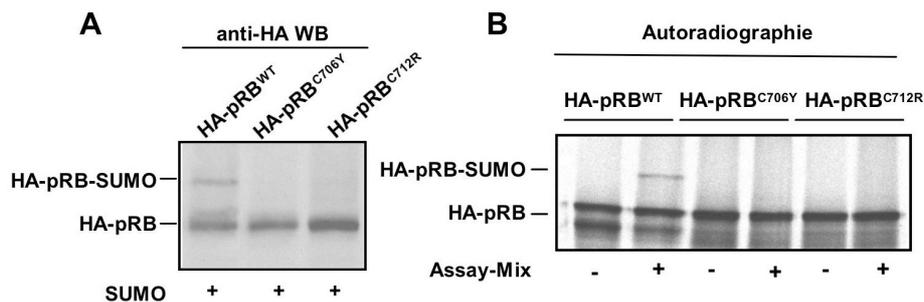
der Überexpression von Cyclin E auf den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase untersuchte. Dabei handelt es sich um HA-pRB, das durch Mutation von zehn CDK-Phosphorylierungsstellen konstitutiv aktiv ist (Lukas et al. 1997). Wird HA-pRB $\Delta$ CDK exprimiert, so führt dies nicht mehr zur Entstehung des für HA-pRB-WT typischen Dupletts im Westernblot (Abbildung 15B). Es ist nur noch die hypophosphorylierte, aktive HA-pRB-Form vorhanden. Diese wird durch SUMO modifiziert, wie sich im HA-Westernblot gegen Proteine eines Zellextrakts nach der Koexpression von HA-pRB $\Delta$ CDK und SUMO zeigt (Abbildung 15B, rechte Spur).

Wie in der Einleitung erwähnt, existieren Regulationsmechanismen, die die Phosphorylierung pRBs steuern. p21 stellt dabei einen Inhibitor für die Cyclin-abhängige Kinase CDK2 dar und sollte so zu einer Verstärkung der hypophosphorylierten HA-pRB-Bande führen. Exprimiert man eine inaktive Version der Kinase CDK2 (CDK2-dn), die durch Competition mit dem endogenen Protein einen dominant negativen Effekt auf die Gesamtaktivität ausübt, so erwartet man ebenfalls eine Verstärkung der hypophosphorylierten HA-pRB-Bande. Wie der Westernblot in Abbildung 15C zeigt, trifft dies in beiden Fällen zu. Für die p21-Koexpression ist der Effekt dabei noch ausgeprägter, da HA-pRB vollständig in die hypophosphorylierte Spezies überführt werden konnte. Diese hypophosphorylierte Form wird durch SUMO modifiziert, wie die Detektion der HA-pRB-SUMO Bande im Westernblot zeigt. Durch die Überexpression von Cyclin E und die damit verbundene Hyperphosphorylierung von pRB kann der Arrest durch pRB am Restriktionspunkt in bestimmten Zelllinien aufgehoben werden (Lukas et al. 1997). Die Überexpression von Cyclin E führt auch im hier durchgeführten Versuch zu einer vollständigen Phosphorylierung von HA-pRB (Abbildung 15C, rechte Spur). Nach einer Koexpression von SUMO kann aber keine höhermolekulare Bande mehr im Westernblot detektiert werden. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Phosphorylierung durch Cyclin E/CDK2 die SUMOylierung pRBs negativ beeinflusst.

Zusammenfassend konnte durch diese Versuche gezeigt werden, dass präferenziell aktives, hypophosphoryliertes pRB durch SUMO modifiziert wird.

### Tumorigene Mutationen von pRB verhindern die SUMOylierung

In der Einleitung wurden Mechanismen beschrieben, die in Tumoren zu einer Inaktivierung pRBs und damit zu einem unkontrollierten G1/S-Übergang führen. Dies wird unter anderem durch Mutationen von pRB erreicht, die wie erwähnt die Struktur der *pocket* Domäne zerstören. Um Klarheit darüber zu erlangen, ob die Struktur der *pocket* Region auch für den Prozess der SUMOylierung wichtig ist, wurden Versuche mit mutierten pRB-Versionen durchgeführt, die in Tumoren auf Keimbahnebene durch Sequenzieren identifiziert wurden. Dabei handelt es sich um Proteine, bei denen durch Punktmutationen einzelne Aminosäuren ausgetauscht sind. In einem Fall ist Cystein 706 zu Tyrosin ausgetauscht, in einem anderen Fall Cystein 712 zu Arginin. Beide Aminosäuren befinden sich in der *pocket* B Region und für beide Austausche wird angenommen, dass sie die Struktur der gesamten *pocket* Domäne zerstören (Lee et al. 2002). Abbildung 16 zeigt eindeutig, dass



#### Abbildung 16. In Tumoren mutierte pRB-Versionen werden nicht durch SUMO modifiziert

(A) C33a Zellen wurden entweder mit HA-pRB-WT oder mit den HA-pRB-Versionen C706Y und C712R sowie SUMO transfiziert. Zellextrakte wurden einer SDS-PAGE mit anschließendem HA-Westernblot unterzogen. (B) Analyse der entsprechenden Proteine in der *in vitro* SUMOylierungsreaktion. Durch *in vitro* Transkription/Translation hergestellte <sup>35</sup>S-markierte HA-pRB-Versionen WT; C706Y; C712R wurden mit und ohne Assay-Mix inkubiert. HA-pRB-Spezies wurden nach der Gelauf trennung in der Autoradiographie detektiert.

diese mutierten pRB-Versionen nicht mehr durch SUMO modifiziert werden können. Im Experiment von Abbildung 16A wurde das Modifikationsverhalten der beiden Versionen durch Expression in C33a Zellen *in vivo* untersucht. Sowohl bei HA-pRB-C706Y als auch bei HA-pRB-C712R kann nach einer Koexpression von SUMO keine höhermolekulare Bande mehr im Westernblot detektiert werden. Außerdem stellen beide Versionen keine Substrate der Phosphorylierung dar. Wie

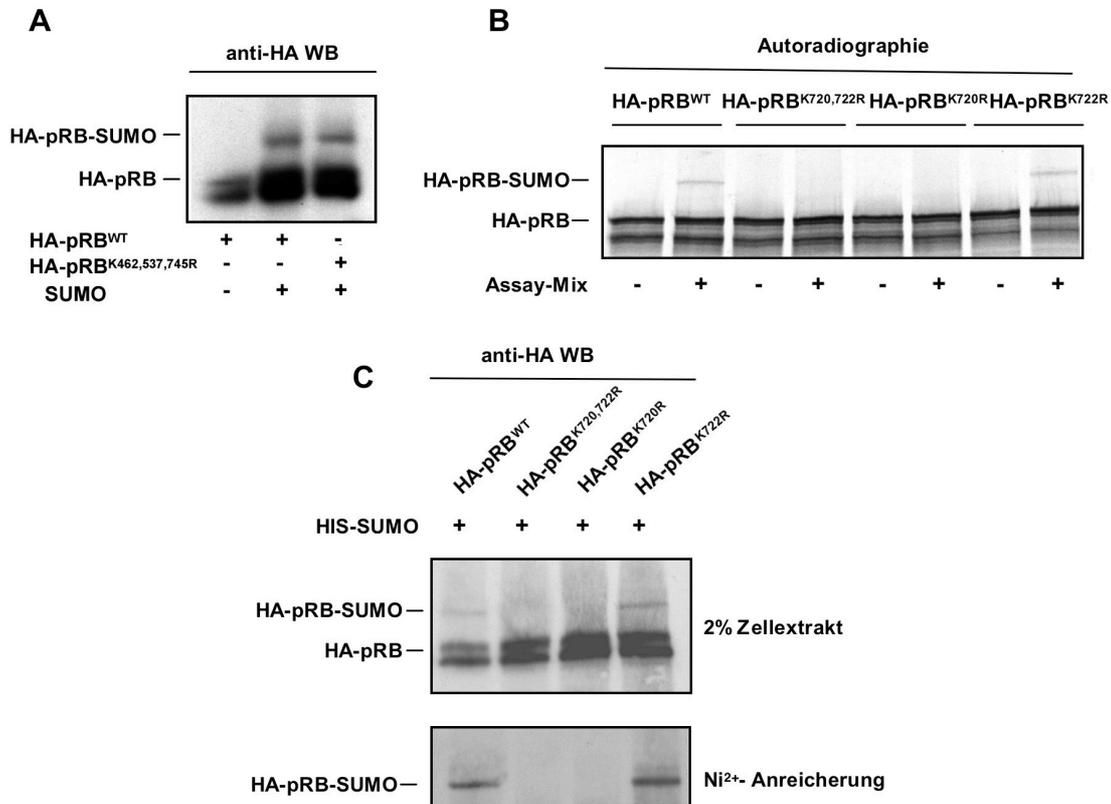
im obigen Fall des nicht mehr phosphorylierbaren HA-pRB $\Delta$ CDK werden im Westernblot nur noch die hypophosphorylierten Spezies detektiert. In Abbildung 16B ist das Ergebnis einer oben beschriebenen *in vitro* SUMOylierung dargestellt. Auch hier werden beide mutierten pRB-Versionen nicht mehr modifiziert. HA-pRB-WT wurde jeweils als Positivkontrolle eingesetzt.

Daraus ergibt sich, dass auch für den Prozess der Modifikation durch SUMO die *pocket* Region in einer intakten Struktur vorliegen muss. Weiterhin kann durch die bisherigen Ergebnisse abgeleitet werden, dass die SUMOylierung von pRB keinen Prozess darstellt, der unspezifisch abläuft. Sowohl der Phosphorylierungsgrad als auch die Integrität der *pocket* Struktur beeinflussen die posttranslationale Modifikation durch SUMO.

### **Lysin 720 dient als Konjugationsstelle**

Die Beobachtung, dass die Integrität der *pocket* Domäne für die SUMO-Modifikation entscheidend ist, legte die Vermutung nahe, dass auch das konjugierte Lysin in dieser Region liegt. In der *pocket* A Region existieren zwei Lysine in einer SUMO-Konsensussequenz, K462 und K537, während es in der *pocket* B Region nur ein Lysin, K745, in einer solchen Sequenz gibt. Ändert man diese drei Lysine zu Argininen und testet das entsprechende Protein auf eine Modifikation durch SUMO, so zeigt sich, dass diese Proteinversion weiterhin modifiziert wird (Abbildung 17A). Somit liegt das konjugierte Lysin nicht in einer Konsensussequenz und es wurden weitere Lysine in der *pocket* Region pRBs entweder alleine oder in Kombination zu Argininen mutiert und auf einen möglichen Verlust der SUMOylierung getestet. Setzt man solche HA-pRB-Versionen in *in vitro* SUMOylierungsexperimenten ein, so erhält man bei den Doppelaustauschen K720,722R und dem einfachen Austausch K720R keine höhermolekulare Bande mehr (Abbildung 17B). Dies konnte *in vivo* bestätigt werden, da sich für diese beiden mit HIS-SUMO koexprimierten Versionen weder eine höhermolekulare Bande im Gesamtzellextrakt noch nach der Ni<sup>2+</sup>-NTA Anreicherung ergab (Abbildung 17C).

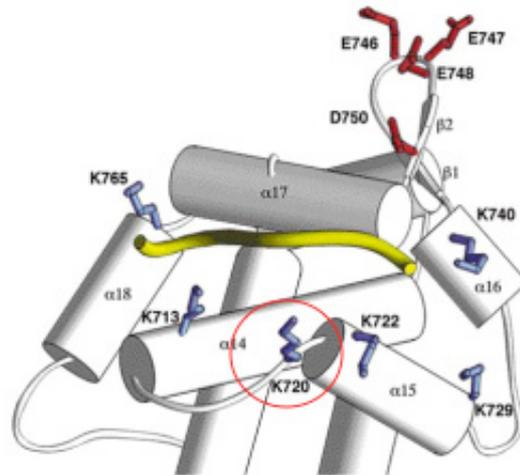
Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass das Lysin 720 eine Konjugationsstelle für SUMO-1 *in vivo* und *in vitro* darstellt. Das Lysin liegt nicht in einer SUMO-Konsensussequenz.



#### Abbildung 17. SUMO wird an Lysin 720 konjugiert

(A) C33a Zellen wurden entweder mit HA-pRB-WT oder HA-pRB-K462,537,745R und SUMO transfiziert und die Zellextrakte einer SDS-PAGE mit anschließendem HA-Westernblot unterzogen. (B) Die durch *in vitro* Transkription/Translation hergestellten <sup>35</sup>S-markierten HA-pRB-Versionen WT; K720,722R; K720R; K722R wurden einer *in vitro* SUMOylierung unterzogen und nach Auftrennung durch Autoradiographie detektiert. (C) C33a Zellen wurden mit HIS-SUMO und den HA-pRB-Konstrukten wie angegeben transfiziert. Der Gesamtzellextrakt und die Proteine nach der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Anreicherung wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und ein HA-Westernblot durchgeführt.

In der Einleitung wurde die Kristallstruktur der *pocket* Region vorgestellt (Lee et al. 1998). Wie man der Struktur in Abbildung 18 entnehmen kann, befindet sich Lysin 720 in der *pocket* B Region. Es ist nicht im Protein verborgen, sondern Teil einer Helix, die auf der Oberfläche angesiedelt ist. Damit ist das Lysin von außen zugänglich und für eine Modifikation geeignet. Weiterhin bildet es mit anderen Lysinen einen Art positiv geladenen Ring um die hydrophobe Grube für die LxCxE-Bindung in der *pocket* B Region. Daran sind noch die Lysine 713, 722, 729, 740 und 765 beteiligt, die zusammen den sogenannten *lysine patch* bilden.



**Abbildung 18. Pocket B Struktur mit E7 Peptid (Lee et al. 1998)**

Die Struktur zeigt die *pocket B* Region, die über eine hydrophobe Grube das in gelb dargestellte minimale E7 Peptid mit der LxCxE Sequenz bindet. Die diese Grube umgebenden Lysine 713, 720, 722, 729, 740 und 765 sind in blau dargestellt und bilden den sogenannten *lysine patch*. Das Lysin 720 als SUMOylierungsstelle ist rot eingekreist.

Der *lysine patch* spielt wie in der Einleitung erwähnt unter anderem bei der intramolekularen Konformationsänderung nach Phosphorylierung des C-Terminus pRBs eine entscheidende Rolle. Wie der Vergleich mit den pRB Homologen aus Maus, Ratte und der Fruchtfliege zeigt, ist das Lysin 720 in diesen Spezies konserviert (Abbildung 19). Im Gegensatz dazu befindet sich an der entsprechenden Position in der Sequenz von p130 ein Serin und von p107 ein Threonin. Damit ist das Lysin innerhalb der Familie der *pocket* Proteine nicht konserviert, sondern spezifisch für pRB. Interessanterweise sind die meisten anderen Lysine des *lysine patches* beim *Drosophila melanogaster* pRB Homolog RBF im Gegensatz zum Lysin 720 nicht konserviert, sondern gegen Arginine ausgetauscht. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Lysin 720 aus dem *lysine patch* für den Konjugationsprozess der SUMOylierung wichtig und deshalb konserviert ist, während bei den weiteren Vertretern des *patches* nur die positive Ladung von entscheidender Bedeutung ist. Dies ist bei Austauschen zu Argininen der Fall.

Um zu testen, ob pRB Homologe mit dem konservierten Lysin ebenfalls modifiziert werden, wurde RBF durch Transkription/Translation *in vitro* im Retikulozytenlysat hergestellt und dabei  $^{35}\text{S}$  markiert. Wenn man dieses Protein als

	accession #	Aminosäure
human pRB	NP_000312	695 MRDRHLDQIMMCSMYGICKVKN-IDL <b>K</b> FKI IVTAYKDLPHAVQETPKRVLIK
mouse pRB	NP_033055	688 MRDRHLDQIMMCSMYGICKVKN-IDL <b>K</b> FKI IVTAYKDLPHAAQETPKRVLIR
rat pRB	BAA04958	666 MKDRHLDQIMMCSMYGICKVKN-IDL <b>K</b> FKI IVTAYKDLPHAAQETPKRVLIR
droso RBF	Q24472	629 MKDRHLDQIMMCAIYIYIRVQRMEDP <b>K</b> FSDIMRAYRNQPVANSVYREVFID
human p130	Q08999	883 MMDRHLQQLLMCAIYVMKVTK-ED <b>K</b> SFQNIIMRCYRTQPQARSQVYRSVLIK
human p107	P28749	835 MKDRHLDQQLLLCAFYIMAKVTK-EER <b>T</b> PFQEIIMKSYRNQPVANSVYRSVLLK

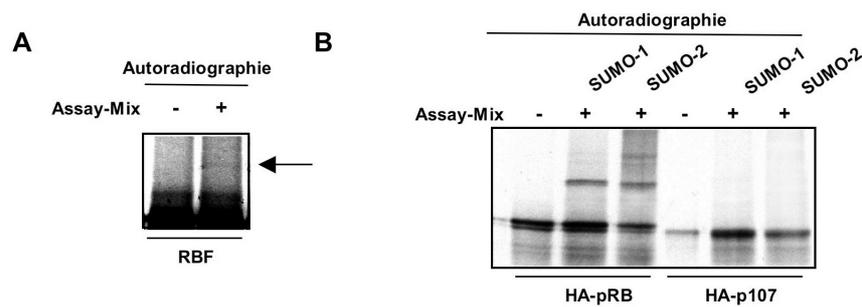
**Abbildung 19. Sequenzvergleich der pocket B Region**

Die Sequenz um das Lysin an Position 720 (rot) bei humanem pRB wurde mit den entsprechenden Sequenzen der pRB Homologen aus Maus, Ratte und *Drosophila melanogaster* verglichen. Außerdem sind die entsprechenden Sequenzen der beiden anderen Familienmitglieder der pocket Proteine, p130 und p107, mit in den Sequenzvergleich aufgenommen. Die accession Nummern stammen aus der Proteindatenbank des national centers for biotechnology information (NCBI).

Substrat in einer *in vitro* SUMOylierungsreaktion einsetzt, wird es tatsächlich auch durch die rekombinanten humanen Enzyme während der Inkubation modifiziert, allerdings mit einer geringen Effizienz, wie die Autoradiographie in Abbildung 20A zeigt.

Wird dagegen HA-p107 als Mitglied der humanen pocket Protein Familie einer *in vitro* SUMOylierungsreaktion unterzogen, so kann es im Gegensatz zu HA-pRB, das in diesem Versuch als Positivkontrolle diente, weder durch SUMO-1 noch durch SUMO-2 modifiziert werden (Abbildung 20B).

Durch diesen Befund wird die hohe Spezifität der Modifikation für das Lysin 720 deutlich. Auf der anderen Seite zeigt das Ergebnis mit RBF aus *Drosophila melanogaster*, dass die SUMO-Modifikation von pRB wohl konserviert ist.



**Abbildung 20. RBF wird im Gegensatz zu p107 durch SUMO modifiziert**

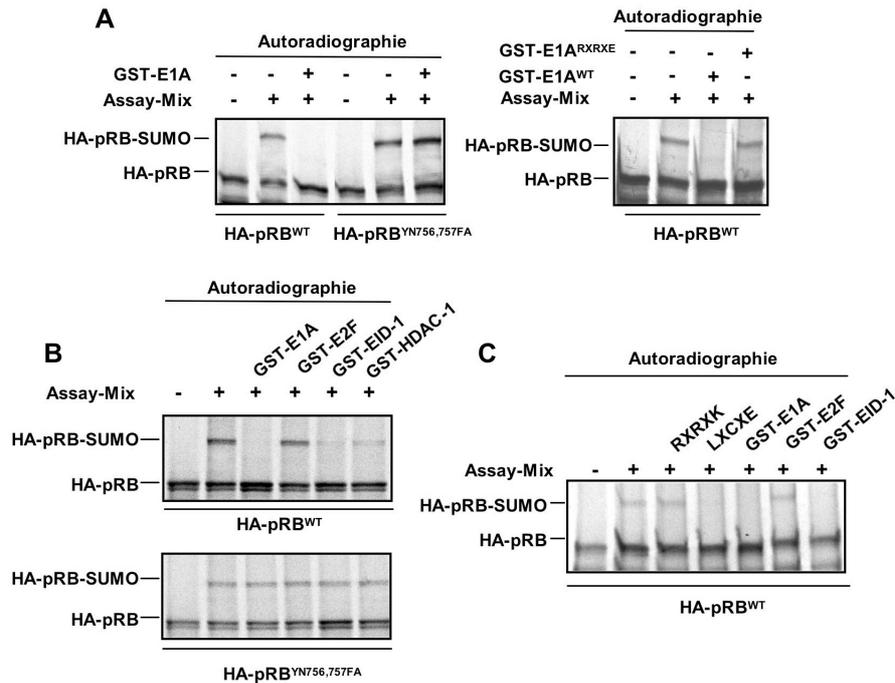
(A) Durch *in vitro* Transkription/Translation hergestelltes <sup>35</sup>S-markiertes RBF aus *Drosophila melanogaster* wurde ohne (-) oder mit (+) Assay-Mix inkubiert. Dieser bestand aus rekombinantem humanem E1 (GST-AOS1/HIS-UBA2), GST-Ubc9 und HIS-SUMO-1 sowie ATP. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und RBF-Spezies durch Autoradiographie detektiert. Der Pfeil kennzeichnet RBF-SUMO. (B) HA-p107 wurde einem Experiment wie in (A) unterzogen, mit dem Unterschied, dass im Assay-Mix entweder SUMO-1 oder SUMO-2 vorhanden war. HA-pRB diente als Positivkontrolle.

**LxCxE Proteine inhibieren die SUMOylierung *in vitro***

Die SUMO-Konjugationsstelle Lysin 720 ist wie oben erwähnt Teil des *lysine patches* (Abbildung 18). Für diese Lysine, die die LxCxE-Bindungsgrube von pRB umgeben, konnte eine Funktion bei der Bindung von bestimmten LxCxE-Proteinen nachgewiesen werden. Lysin 713 interagiert dabei direkt über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Peptidrückgrat eines minimalen E7 LxCxE-Peptids (Lee et al. 1998). Brown und Gallie untersuchten in einer Bindungsstudie den Einfluss weiterer pRB-Lysine auf die Bindung des Onkoproteins SV40 large T Antigen (TAg). Alle viralen Onkoproteine weisen nämlich saure Aminosäuren in ihrer Sequenz auf, die die LxCxE-Region umgeben und zur Bindung an pRB beitragen. In Koimmunpräzipitationsexperimenten konnten sie zeigen, dass murines pRB-WT an TAg bindet. Allerdings kopräzipitiert murines pRB nicht mehr mit TAg, wenn die pRB-Lysine 713, 715, 722, 733 und 758 zu Alaninen ausgetauscht wurden. Diese Lysine entsprechen den letzten fünf Lysinen des *lysine patches*, es handelt sich also um die Positionen 720, 722, 729, 740 und 758 bei humanem pRB. Die Bindung kann durch ein Protein, das an den genannten Positionen Arginine anstelle von Lysinen enthält, wiederhergestellt werden (Brown and Gallie 2002). Die Lysine tragen also nach diesen Daten zur Bindung an TAg durch ionische Bindungen bei. Auch für humanes pRB konnte diese Schlüsselrolle des *lysine patches* bei der Bindung viraler Onkoproteine gezeigt werden. Eine pRB-Version, in der alle sechs Lysine des *patches* zu Alaninen ausgetauscht wurden, interagiert *in vitro* nicht mehr mit dem viralen E7 Protein, während die Bindung an E2F nicht beeinträchtigt ist (Chan et al. 2001). Dick und Dyson konnten dies durch ein elegantes Experiment noch erweitern: Sie änderten die Lysine 722, 729 und 740 zu Asparaginsäuren und verloren dadurch im Vergleich zum Wildtyp-Protein die Bindung an E7 *in vitro*. Wenn sie aber auf Seiten des E7 Proteins sechs saure Aminosäuren, die auf die LxCxE Sequenz folgen, zu Lysinen änderten, interagierten die beiden Proteine wieder (Dick and Dyson 2002). Die Ladungen, die die Interaktion vermitteln, wurden also nur zwischen den beiden Proteinen ausgetauscht und dies zeigt erneut, dass den Lysinen eine wichtige Rolle bei der Bindung von viralen Onkoproteinen zukommt.

Wie aus der pRB-Struktur in Abbildung 18 klar zu erkennen ist, befindet sich Lysin 720 außerdem in unmittelbarer Nähe zur LxCxE-Bindungsgrube. Deshalb dienten die folgenden Experimente dazu, den Einfluss von zunächst E1A als Vertreter der LxCxE-Proteine auf die SUMOylierung pRBs zu untersuchen. Die Interaktion zwischen E1A und pRB wurde durch Experimente gefunden, in denen zelluläre Bindungsproteine E1As zur Analyse der Transformation durch Adenoviren identifiziert wurden (Whyte et al. 1989). Darauf beruhende spätere Studien führten dann zur Entdeckung des Zusammenspiels von pRB und dem Transkriptionsfaktor E2F (Kaelin et al. 1991).

Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse von verschiedenen *in vitro* SUMOylierungsreaktionen. Auf der linken Autoradiographie in Abbildung 21A wurde zunächst *in vitro* hergestelltes HA-pRB-WT modifiziert. Die Zugabe von rekombinantem GST-E1A zu diesem Ansatz inhibiert die Reaktion vollständig (Abbildung 21A, dritte Spur der linken Autoradiographie). Um zu testen, ob dies mit der direkten Bindung E1As an pRB zusammenhängt, wurden weitere Versuche durchgeführt. Zunächst wurde anstelle von HA-pRB-WT eine Version verwendet, bei der zwei Aminosäuren ausgetauscht sind: Tyrosin 756 zu Phenylalanin und Asparagin 757 zu Alanin. Diese pRB-Version wurde in einer Veröffentlichung der Arbeitsgruppe von Dyson beschrieben (Dick et al. 2000). Darin wurde untersucht, welchen Einfluss gerichtete Aminosäureaustausche auf Seiten pRBs, die die Interaktion mit viralen Onkoproteinen verhindern, auf die Funktionen pRBs im Zellzyklus haben. Die Auswahl der Mutationen beruht auf der Kristallstruktur von Lee *et al.*, aus der hervorgeht, dass die Aminosäuren Tyrosin 709, Tyrosin 756, Asparagin 757 und Lysin 713 direkten Kontakt durch Wasserstoffbrückenbindungen zum Peptidrückgrat des E7-Peptids haben. pRB-YN756,757FA bindet E1A nicht mehr. Wie man deutlich erkennen kann, hat die Zugabe von GST-E1A auf die SUMOylierung von HA-pRB-YN756,757FA keinen Einfluss (Abbildung 21A, rechte Spur der linken Autoradiographie). Wenn man andererseits das LxCxE-Motiv von E1A, das die Bindung an die *pocket B* Region vermittelt, ändert, so wird die Interaktion zwischen den beiden Proteinen ebenso gestört. Eine solche E1A-Version sollte keinen Einfluss mehr auf die pRB-SUMOylierung haben. Wie die



**Abbildung 21. Die Bindung von LxCxE-Proteinen inhibiert die SUMOylierung pRBs *in vitro***

(A) Durch *in vitro* Transkription/Translation hergestelltes <sup>35</sup>S-markiertes HA-pRB-WT sowie HA-pRB-YN756,757FA wurde ohne (-) oder mit (+) Assay-Mix inkubiert. Bei einigen dieser Reaktionen war wie angegeben entweder GST-E1A-WT oder GST-E1A-L122R,C124R (jeweils 10 pmol/ Reaktion) zugesetzt. (B) Die *in vitro* SUMOylierungsreaktionen wurden wie in (A) beschrieben durchgeführt und jeweils 10 pmol/ Reaktion von GST-E1A, GST-E2F, GST-EID-1 und GST-HDAC-1 wie angegeben zugesetzt. (C) GST-E1A, GST-E2F und GST-EID-1 wurden wie in (B) zugegeben und dienten als Kontrollen. Jeweils 300 pmol/ Reaktion des LxCxE-Peptids mit der Sequenz DLYCYEQLN und des entsprechenden Kontrollpeptids mit der Sequenz DRYRYKQLN wurden wie angegeben zugesetzt.

Autoradiographie in Abbildung 21A auf der rechten Seite zeigt, hat die Zugabe von GST-E1A mit den Aminosäureaustauschen Leucin 122 zu Arginin und Cystein 124 zu Arginin im Gegensatz zum Wildtyp-Protein tatsächlich keinen Effekt mehr.

Neben viralen LxCxE-Proteinen existieren wie in der Einleitung erwähnt auch zelluläre Proteine, die über dieses Motiv an pRB binden. Zu diesen gehört der *E1A-like inhibitor of differentiation 1* (EID-1), der die Sequenz LGCDE aufweist. EID-1 blockiert die pRB-induzierte Differenzierung von SAOS Zellen zu Osteoblasten und vermittelt diese Funktion wohl über die Inhibierung der HAT-Aktivität von p300 und CBP (Miyake et al. 2000). Auch ein Vertreter der mehrfach angesprochenen Korepressorfamilie der HDACs, HDAC-1, interagiert über ein LxCxE-ähnliches Motiv mit pRB und nimmt eine entscheidende Rolle bei der aktiven Repression ein (Brehm et al. 1998). Die Sequenz des Interaktionsmotivs lautet hier IACEE, das

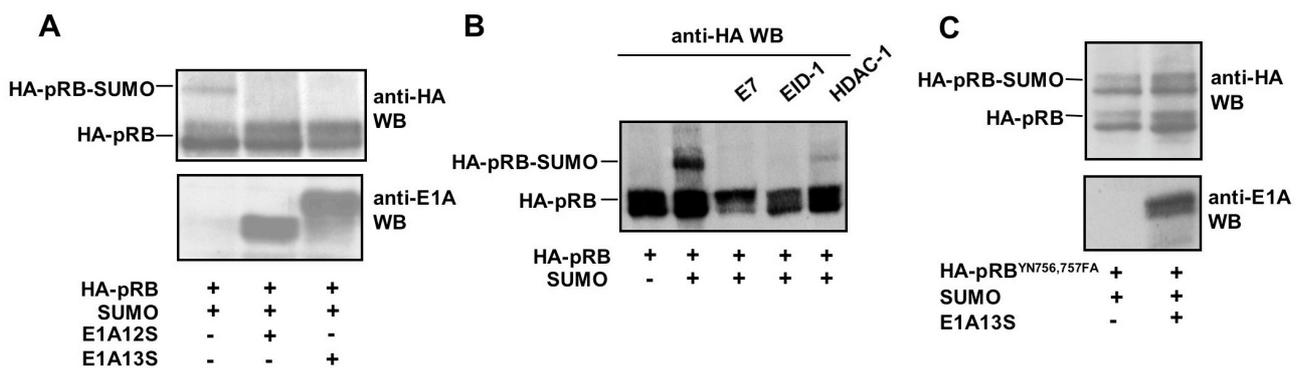
Leucin ist also gegen ein Isoleucin ausgetauscht (Magnaghi-Jaulin et al. 1998). Wie Abbildung 21B zeigt, inhibiert GST-EID-1 wie GST-E1A die SUMOylierung HA-pRBs vollständig. Die Zugabe von GST-HDAC-1 in gleicher Menge führt dagegen nur zu einer Reduktion der Modifikation. Als Kontrolle für ein Protein, das pRB nicht über die *pocket* B Region bindet und somit auch keinen Einfluss auf die *in vitro* SUMOylierung haben sollte, wurde GST-E2F verwendet. Als weitere Kontrolle der spezifischen Bindung über die *pocket* B Region und der damit einhergehenden Inhibition diente das oben eingeführte HA-pRB-YN756,757FA (Abbildung 21B, untere Autoradiographie). Um zu untersuchen, ob auch ein LxCxE-Peptid alleine in der Lage ist, die pRB-SUMOylierung zu unterbinden, wurde das minimale E7 Peptid, das auch in den Kristallstrukturstudien der Arbeitsgruppe Pavletich verwendet wurde, im folgenden Versuch eingesetzt. Die Sequenz lautet DLYCYEQLN. Als Kontrollpeptid diente ein Nonamer mit der Aminosäureabfolge DRYRYKQLN. Aus Abbildung 21C ist ersichtlich, dass auch die Zugabe des LxCxE-Peptids im Überschuss (300 pmol) zur Inhibierung der SUMO-Modifikation führt. Das Kontrollpeptid hatte keinen Effekt auf diese Reaktion (dritte Spur von links). Als weitere Kontrollen wurden die oben beschriebenen Proteine GST-E1A, GST-E2F und GST-EID-1 mit jeweils 10 pmol pro Reaktion zugegeben.

### **LxCxE-Proteine inhibieren die SUMOylierung *in vivo***

Die Ergebnisse des vorhergehenden Abschnitts belegen, dass die Bindung von LxCxE-Proteinen und sogar des E7-Minimalpeptids die SUMOylierung pRBs *in vitro* inhibiert. Damit stellt sich die Frage, ob dies auch im zellulären System zutrifft. Deshalb wurden erneut Transfektionsversuche in C33a Zellen durchgeführt.

Wie in Abbildung 22A zu sehen ist, führt die Koexpression von E1A neben HA-pRB und SUMO ebenfalls zu einer Inhibierung der pRB-SUMOylierung. Dabei spielt es keine Rolle, welche E1A-Spleißvariante verwendet wird (12S oder 13S), da beide das LxCxE-Motiv enthalten. Zur Expressionskontrolle der viralen Proteine in den sonst virusnegativen C33a Zellen wurde ein Westernblot mit einem E1A Antikörper durchgeführt (Abbildung 22A, unten). Der Westernblot in Abbildung 22B ergibt ebenso für das virale E7 Protein des humanen Papillomavirus eine

Inhibierung der Modifikationsreaktion. Um die *in vitro* Ergebnisse für EID-1 und HDAC-1 zu erweitern, wurden Konstrukte für diese beiden Proteine mit HA-pRB und SUMO in C33a Zellen koexprimiert (Abbildung 22B). Sowohl EID-1 als auch HDAC-1 vermindern die SUMOylierung HA-pRBs. Wie in der *in vitro* Reaktion inhibiert EID-1 die Modifikation dabei vollständig, während HDAC-1 nur zu einer Reduktion führt. Um wiederum zu bestätigen, dass die direkte Interaktion mit pRB für die beobachteten Ergebnisse entscheidend ist, wurde anstelle von HA-pRB-WT oben beschriebenes HA-pRB-YN756,757FA exprimiert. Die Koexpression von E1A führte wie erwartet in diesem Fall nicht zur Inhibierung der SUMOylierung (Abbildung 22C). Interessanterweise wird HA-pRB-YN756,7576FA eindeutig besser durch SUMO modifiziert als das Wildtyp-Protein und es dienen beide pRB-Spezies, die hypo- und die hyperphosphorylierten Form, als Substrate (Abbildung 22C). Dies konnte *in vitro* nicht beobachtet werden (vgl. Abbildung 22C und Abbildung 21B).



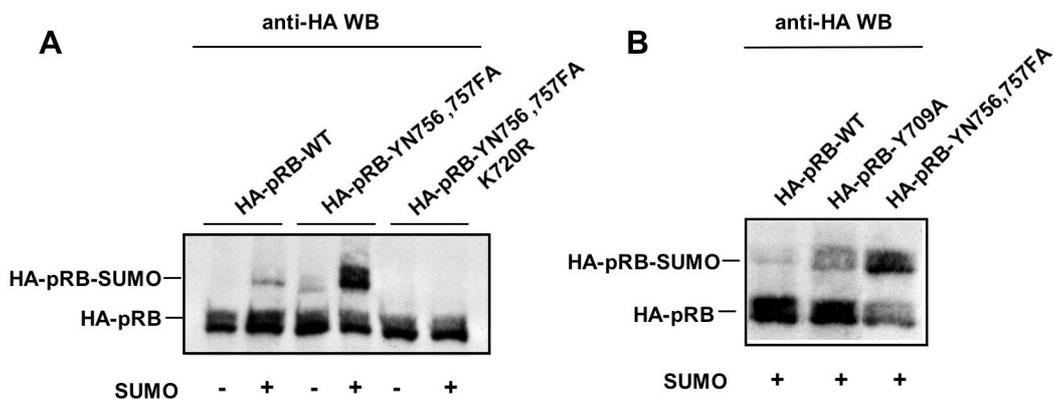
**Abbildung 22. LxCxE-Proteine inhibieren die SUMOylierung pRBs *in vivo***

(A) und (B) C33a Zellen wurden mit HA-pRB und SUMO und Konstrukten für E1A-12S, E1A-13S, E7, EID-1 und HDAC-1 wie angegeben transfiziert und die Zellextrakte anschließend einer SDS-PAGE unterzogen. Danach wurden HA- bzw. E1A-Westernblots wie angegeben durchgeführt. (C) C33a Zellen wurden mit HA-pRB-YN756,757FA und SUMO transfiziert sowie wenn angegeben mit E1A-13S. Die Proteine der Zellextrakte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und ein HA- sowie ein E1A-Westernblot durchgeführt.

Dadurch lag die Vermutung nahe, dass endogene Proteine der C33a Zellen, die über ein LxCxE-Motiv an HA-pRB binden, die SUMOylierung reduzieren. Wird nun HA-pRB-YN756,757FA exprimiert, so ist das Lysin 720 wohl besser für die SUMOylierungsmaschinerie zugänglich, da diese endogenen Proteine nicht binden können. Im Einklang mit dieser Interpretation wird HA-pRB-YN756,757FA sogar

ohne die Koexpression von SUMO durch endogenes SUMO modifiziert, wie die höhermolekulare Bande im Westernblot zeigt (dritte Spur der Abbildung 23A). Als Modifikationsstelle dient dabei weiterhin Lysin 720, wie das Kontrollexperiment, bei dem HA-pRB-YN756,757FA,K720R exprimiert wurde, ergibt (die letzten beiden Spuren der Abbildung 23A).

Neben pRB-YN756,757FA wurde eine weitere, auf der Struktur von Lee *et al.* basierende LxCxE-bindungsdefekte Version pRBs in einer Publikation näher charakterisiert (Dahiya et al. 2000). Dabei handelt es sich um eine pRB-Version mit dem Aminosäureaustausch Tyrosin 709 zu Alanin. Wie oben erwähnt macht dieses Tyrosin über eine Wasserstoffbrückenbindung direkten Kontakt zum Rückgrat des E7 Peptids. Um auszuschließen, dass das Ergebnis bei HA-pRB-YN756,757FA auf einem für diese Proteinversion spezifischen strukturellen Effekt beruht, wurde HA-pRB-Y709A in die Studien mitaufgenommen. Der Westernblot in Abbildung 23B (mittlere Spur) zeigt, dass auch diese pRB-Version *in vivo* verstärkt durch SUMO modifiziert wird, was für die oben genannte Interpretation der Zugänglichkeit von Lysin 720 spricht.



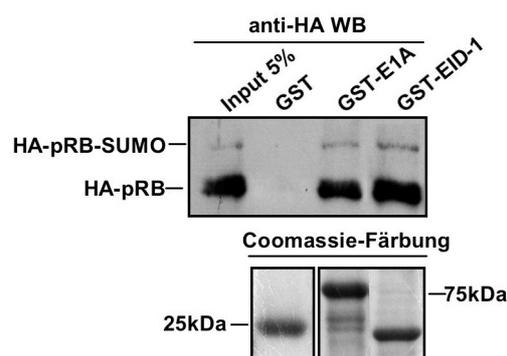
**Abbildung 23. pRB-Versionen ohne Bindung an LxCxE-Proteine werden verstärkt SUMOyliert**

C33a Zellen wurden mit und ohne SUMO wie angegeben und folgenden HA-pRB-Konstrukten transfiziert (von links nach rechts): **(A)** HA-pRB-WT; HA-pRB-YN756,757FA; HA-pRB-YN756,757FA,K720R und **(B)** HA-pRB-WT, HA-pRB-Y709A; HA-pRB-YN756,757FA. Die Proteine der Zellextrakte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und HA-Westernblots durchgeführt.

### pRB-SUMOylierung und LxCxE-Bindung schließen sich nicht aus

Nach diesen Resultaten der Inhibierung der pRB-SUMOylierung durch LxCxE-Proteine *in vivo* und *in vitro* stellte sich die Frage, ob umgekehrt pRB-SUMO noch in der Lage ist, LxCxE-Proteine zu binden.

Um dies zu untersuchen wurden HA-pRB und SUMO in C33a Zellen exprimiert und ein Zellextrakt unter Verwendung von NEM zur Inhibierung von SUMO-spezifischen Proteasen hergestellt. Ein Aliquot dieses Extrakts ist in Abbildung 24 als *input* gekennzeichnet aufgetragen und man erkennt im HA-Westernblot die unmodifizierte und die mit SUMO modifizierte HA-pRB-Spezies. Der Zellextrakt wurde dann geteilt und entweder mit GST, GST-E1A oder GST-EID-1 gekoppelt an Glutathion-Kügelchen inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde untersucht, welche HA-pRB-Spezies an die Proteine gebunden hatten. Die GST-Kontrolle ergab keine Bindung von HA-pRB-Spezies, während sowohl bei GST-E1A als auch bei GST-EID-1 eine Bindung von HA-pRB und HA-pRB-SUMO gegeben war. Das Verhältnis der Spezies zueinander ist im Vergleich zum *input* nicht verändert, was darauf hindeutet, dass die SUMOylierung pRBs eine Bindung an LxCxE-Proteine nicht ausschließt. Umgekehrt heißt das, dass weder GST-E1A noch GST-EID-1 eine in diesem Versuch vorhandene HA-pRB-Form bevorzugt bindet.



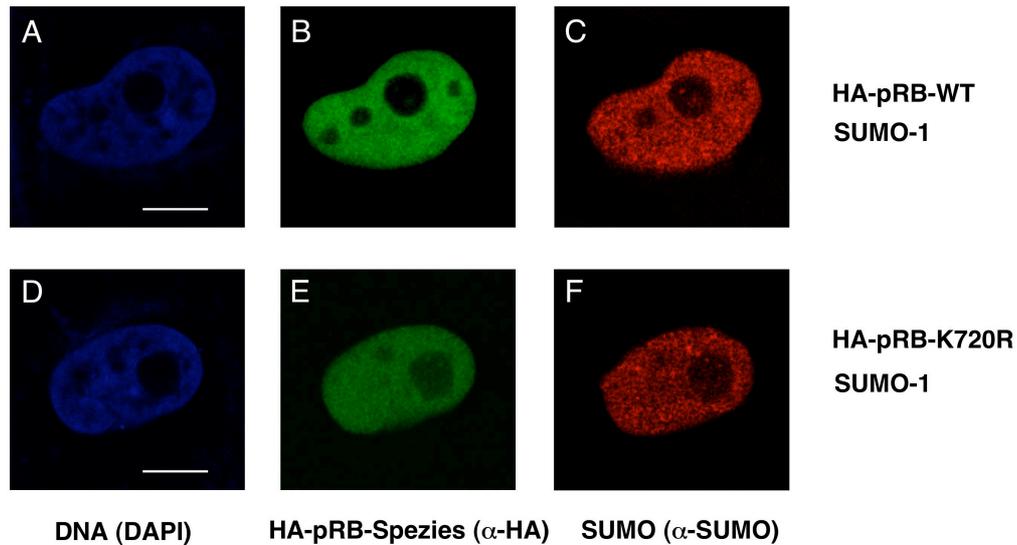
#### Abbildung 24. E1A und EID-1 binden sowohl pRB als auch pRB-SUMO

C33a Zellen wurden mit HA-pRB und SUMO transfiziert. Nach 48 h wurde ein Zellextrakt hergestellt und entweder mit GST, GST-E1A oder GST-EID-1 gekoppelt an Glutathion-Kügelchen inkubiert. Nach mehreren Waschschrritten wurden die gebundenen Proteine durch Aufkochen der Kügelchen in SDS-Puffer gelöst, in der SDS-PAGE aufgetrennt und ein HA-Westernblot durchgeführt. Unter den Spuren des HA-Westernblots sind die jeweils aufgereinigten Proteine GST, GST-E1A und GST-EID-1 in der Coomassie-Färbung gezeigt.

### **Funktionelle Untersuchungen zur SUMOylierung von pRB**

Die folgenden Experimente wurden mit dem Ziel durchgeführt, einen Hinweis auf die Funktion der pRB-SUMOylierung zu finden. Zu diesem Zweck wurden pRB-WT und die oben bereits beschriebene pRB-K720R-Version, die nicht mehr durch SUMO modifiziert werden kann, in pRB-negativen Zellen exprimiert und ihre Aktivitäten in verschiedenen Versuchsanordnungen analysiert. Neben den pRB-negativen C33a Zellen wurden hierzu auch die ebenfalls pRB-negativen SAOS Zellen verwendet, die von einem Osteosarkom abstammen.

Wie in der Einleitung erwähnt, dient die SUMOylierung in bestimmten Fällen als Regulationsmechanismus der subzellulären Lokalisation. So wurde für RanGAP die SUMO-abhängige Lokalisation zum NPC beschrieben (Mahajan et al. 1997). Bei CtBP-1 ist die SUMOylierung für die nukleäre Lokalisation essenziell, da eine nicht mehr SUMOylierbare CtBP-1-Version nur noch im Cytoplasma lokalisiert (Lin et al. 2003). Im Zellkern lokalisieren SUMOylierte Proteine häufig in der Struktur der distinkten PML-NBs. Auch pRB wurde als dynamische Komponente von PML-NBs beschrieben (Salomoni and Pandolfi 2002). Für entsprechende Lokalisationsstudien wurde entweder HA-pRB-WT oder HA-pRB-K720R jeweils zusammen mit SUMO-1 in SAOS Zellen exprimiert. Diese Zellen sind größer als C33a Zellen und eignen sich daher gut für die Immunfluoreszenzmikroskopie. Abbildung 25 zeigt die Lokalisation der Proteine. Zur Detektion von SUMO-1 wurde ein polyklonaler anti-SUMO-1 Antikörper verwendet. Hierbei zeigt SUMO-1 die beschriebene Lokalisation mit einer diffusen Verteilung im Zellkern und einigen distinkten, punktuellen Strukturen, bei denen es sich vermutlich um PML-NBs handelt (Abbildung 25C und F). HA-pRB-WT und HA-pRB-K720R wurden durch einen monoklonalen anti-HA Antikörper detektiert. Beide HA-pRB-Spezies befinden sich ausschließlich im Zellkern (Abbildung 25B und E). Die Kernlokalisierung pRBs ist nicht statisch, sondern über den Verlauf des Zellzyklus dynamisch (Barbie et al. 2005). So liegt unphosphoryliertes pRB in G0 und der frühen G1-Phase in primären Fibroblasten in distinkten perinukleolären *foci* vor. Die folgenden Phosphorylierungsereignisse führen zu einer langsamen Auflösung dieser *foci*, die gegen Mitte bis Ende der S-Phase vollständig verschwunden sind. pRB ist nun



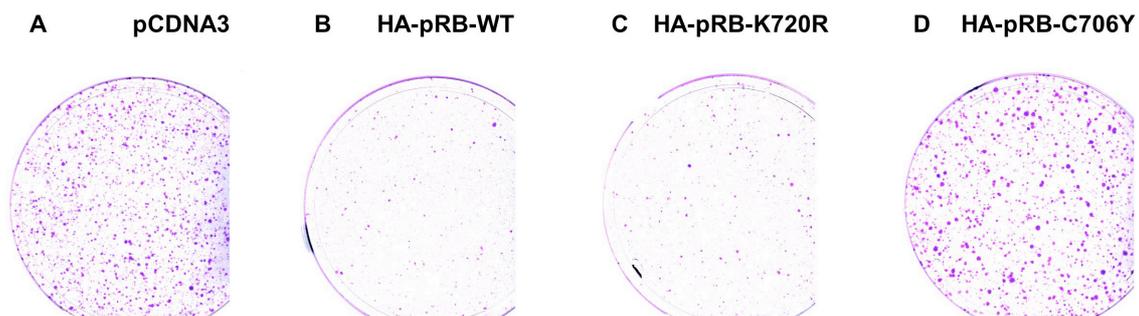
**Abbildung 25. pRB-WT und pRB-K720R lokalisieren beide im Zellkern**

SAOS Zellen wurden mit SUMO-1 und entweder HA-pRB-WT (A-C) oder HA-pRB-K720R (D-F) transfiziert. Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden anschließend mit DAPI gefärbt, um den Zellkern zu markieren (A und D). HA-pRB-Spezies wurden durch einen monoklonalen Maus anti-HA-Antikörper und anti-Maus FITC-gekoppelten Antikörper detektiert (B und E). SUMO-1 wurde durch einen polyklonalen Hase anti-SUMO-1-Antikörper und anti-Hase Cy3-gekoppelten Antikörper sichtbar gemacht (C und F). Der Balken steht für 4  $\mu\text{m}$ .

überall im Zellkern verteilt. Die Bilder der Immunfluoreszenzmikroskopie in Abbildung 25B und 25E zeigen eine solche unstrukturierte Verteilung im Zellkern sowohl für HA-pRB-WT als auch für HA-pRB-K720R. Zusammenfassend ist die SUMOylierung pRBs wohl nicht wie in anderen Fällen beschrieben für die nukleäre Lokalisation essenziell. Darüberhinaus sind auch keine offensichtlichen Unterschiede in der subnukleären Verteilung von HA-pRB-WT und HA-pRB-K720R zu erkennen. Wie in der Diskussion erwähnt, ist eine abschließende Beurteilung der spezifischen Lokalisierung pRB-SUMOs jedoch schwierig, da im gezeigten Experiment die Gesamtpopulation HA-pRBs detektiert wird und es insbesondere durch die Überexpression zu einer Maskierung der SUMOylierten Subpopulation pRBs kommen könnte.

Wie in der Einleitung beschrieben, arretiert funktionelles pRB Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Viele Krebszellen und davon abgeleitete Zelllinien exprimieren kein funktionelles pRB und wachsen somit ungehemmt. Dies trifft auch auf die C33a und SAOS Zelllinien zu. In SAOS Zellen führt die Expression von pRB-WT zu einem Proliferationsarrest (Huang et al. 1988). Dies kann in einem

sogenannten *colony formation assay*, bei dem das Zellwachstum bestimmt wird, analysiert werden. Zunächst werden dabei SAOS Zellen mit pRB transfiziert. Nach der Transfektion wird auf Zellen selektioniert, die die cDNA stabil in das Genom integriert haben. Da normalerweise mehrere Integrationen stattfinden, ist die Expression in diesem System relativ hoch. Die Expression findet über einen Zeitraum von ca. drei Wochen statt und anschließend werden Zellkolonien und damit proliferierende Zellen durch Färbung sichtbar gemacht. Wie der Vergleich der Abbildung 26A und B zeigt, führte die Expression von funktionellem HA-pRB-WT zu einem Wachstumsarrest im Vergleich zur Kontrolle mit Leervektor. Es waren in diesem Fall eindeutig weniger Kolonien vorhanden. Wurde dagegen eine pRB-Version exprimiert, dessen *pocket* Domäne durch den Austausch C706Y zerstört ist, so bildeten die Zellen wieder verstärkt Kolonien aus. Das Wachstum war nicht beeinträchtigt (vgl. Abbildung 26D und B). Bei pRB-C706Y handelt es sich um eine der weiter oben schon eingeführten tumorigenen Versionen von pRB. Die pRB-SUMOylierung scheint an dieser essenziellen Funktion pRBs nicht beteiligt zu sein, da die Expression von HA-pRB-K720R zu keinem Unterschied im Zellwachstum führte. Die Expression der nicht mehr durch SUMO modifizierbaren pRB-Spezies führte ebenso wie die von pRB-WT eindeutig zu einer Inhibierung des Zellwachstums (Abbildung 26C und B).



**Abbildung 26. pRB-K720R führt wie pRB-WT zu einem Wachstumsarrest**

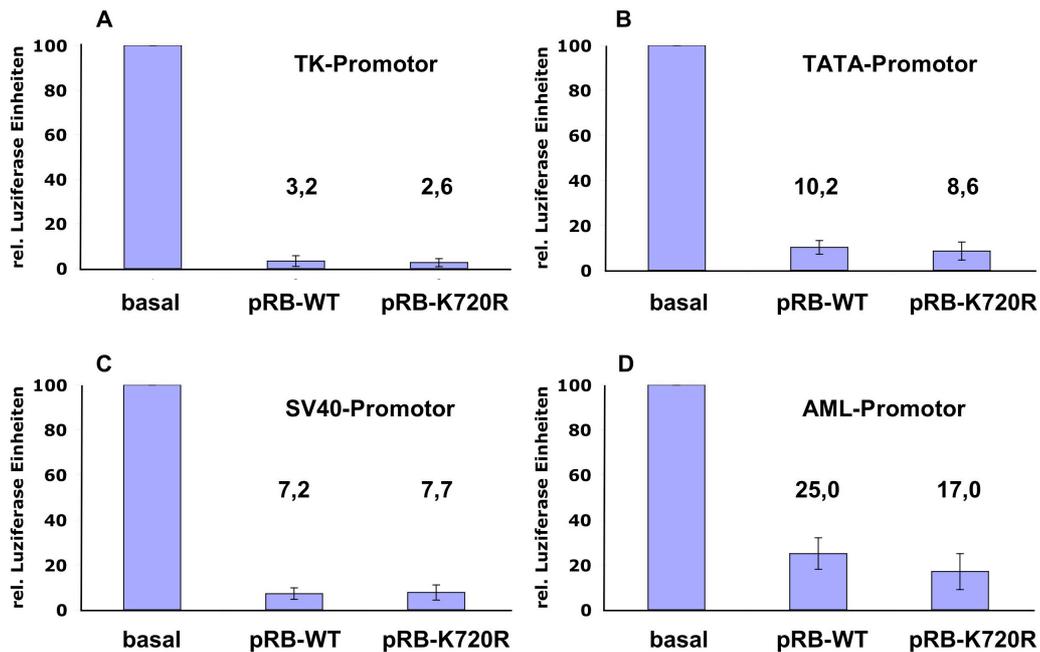
SAOS Zellen wurden mit folgenden pcDNA3-Vektoren transfiziert: **(A)** Leervektor, **(B)** HA-pRB-WT, **(C)** HA-pRB-K720R, **(D)** HA-pRB-C706Y. Anschließend erfolgte durch die Zugabe von G418 eine Selektion auf Zellen, die die pcDNA3-Konstrukte mit der Neomycin-Resistenz integriert hatten. Die Zellen wurden nach einem Inkubationszeitraum von drei Wochen mit regelmäßigen Mediumwechseln auf Zellkoloniebildung durch die Färbung mit Kristallviolett untersucht.

In vielen Arbeiten, die den Vorgang der Repression durch pRB oder koaktivierende Funktionen pRBs analysieren, wurden Reporter-genversuche durchgeführt (Zhang et al. 2000; Carreira et al. 2005). Dabei werden Zellen mit einem Reporterplasmid transfiziert, das die cDNA der *firefly* Luziferase enthält. Die Expression dieser cDNA steht unter der Kontrolle eines bestimmten Promotors. Für die hier vorgestellten Versuche wurden Promotoren verwendet, die jeweils vier GAL4-Bindungsstellen enthalten. Neben den GAL4-Bindungsstellen befinden sich weitere für die Transkription essenzielle Elemente in den Promotorsequenzen. Je nach Promotor handelt es sich hierbei um zelluläre oder virale Elemente. Fusioniert man nun cDNAs an die für die GAL4-DNA-Bindedomäne kodierende Sequenz, so werden diese Fusionsgenprodukte gezielt an die Promotoren rekrutiert und können dort Einfluss auf die Expression der Luziferase nehmen. Die Bestimmung der Luziferaseexpression erfolgt durch ein photometrisches Verfahren zur enzymatischen Aktivität der *firefly* Luziferase. Über die Luziferaseexpression kann also das transkriptionelle Verhalten des Fusionsproteins analysiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung der transkriptionellen Aktivität von pRB vier verschiedene Promotoren mit GAL4-Bindungsstellen eingesetzt (Abbildung 27). Einer davon enthält Elemente zellulärer Promotoren, nämlich die minimale TATA-Box. Die anderen Promotorelemente stammen von viralen Promotoren ab: vom viralen SV40, vom adenoviralen *major late* (AML) und vom Herpes simplex Thymidin Kinase (TK) Promotor. Durch diese verschiedenen Promotorelemente kommt es zur Rekrutierung und Assemblierung unterschiedlicher transkriptioneller Koaktivator- oder Korepressorkomplexe. In den folgenden Versuchen sollte nun bestimmt werden, welche transkriptionellen Auswirkungen die zusätzliche Rekrutierung von pRB an die verschiedenen Promotoren hat. Die *large pocket* Region pRBs wurde entweder in der WT-cDNA-Sequenz oder mit dem in K720R resultierenden Basenaustausch an die cDNA-Sequenz der GAL4-DNA-Bindedomäne fusioniert. Um den Effekt der Fusionsproteine auf die Expression der Luziferase bestimmen zu können, wurde in jedem Versuch für die unterschiedlichen Promotoren der Basalwert durch Kotransfektion der GAL4-DNA-Bindedomäne alleine ermittelt und als relativer Wert

100 festgesetzt. Für die in Abbildung 27 gezeigten Ergebnisse wurden die Daten von fünf unabhängigen Versuchsreihen ausgewertet. Wie eindeutig zu erkennen ist, führte die Expression von pRB *large pocket* WT in allen vier Fällen zu einer starken Repression der Luziferaseexpression. Dies wird im vorliegenden E2F-unabhängigen experimentellen System durch das Rekrutieren von Korepressoren erreicht. Je nach Promotorelement variiert der Grad der Repression. Der Effekt ist für pRB *large pocket* WT am stärksten für den TK-Promotor (Abbildung 27A), bei dem die Expression bis auf 3,2% reprimiert wird und am schwächsten für den AML-Promotor mit 25,0% Repression (Abbildung 27D). Beim TATA-Promotor (Abbildung 27B) reprimiert pRB *large pocket* WT die Luziferaseexpression auf 10,2% und beim SV40-Promotor (Abbildung 27C) auf 7,2%. Für pRB *large pocket* K720R ergab sich beim TK-Promotor eine Repression von 2,6% (Abbildung 27A) und beim SV40-Promotor von 7,7% (Abbildung 27C). Diese Werte unterschieden sich im Rahmen der Messgenauigkeit nicht von den durch pRB *large pocket* WT (3,2% am TK-Promotor bzw. 7,2% am SV40-Promotor) erreichten Repressionen. Die durch pRB *large pocket* K720R erhaltenen mittleren Repressionswerte am TATA-Promotor und am AML-Promotor sind im Vergleich zu pRB *large pocket* WT etwas niedriger (Abbildung 27B:  $8,6 \pm 4,0\%$  im Vergleich zu  $10,2 \pm 3,0\%$  und Abbildung 27D:  $17,0 \pm 8,0\%$  im Vergleich zu  $25,0 \pm 7,0\%$ ). Somit scheint das reprimierende Potenzial der SUMO-defizienten pRB-Version zumindest am TATA- und am AML-Promotor geringfügig stärker zu sein. In Anbetracht der relativ geringen Unterschiede und bei Berücksichtigung der Standardabweichungen bleibt die beobachtete Differenz allerdings gering.

Bei den in diesem Abschnitt vorgestellten Experimenten wurden die Konstrukte in allen Fällen relativ stark exprimiert. Dies liegt einerseits am System der transienten Transfektion allgemein. Auf der anderen Seite können dadurch in bestimmten Fällen Unterschiede zwischen einem WT-Protein und einer nicht mehr modifizierbaren Spezies leichter detektiert werden. Natürlich kann die Überexpression im Gegenteil auch dazu führen, dass Unterschiede nicht mehr auszumachen sind. Aus diesem Grund wurden die im nächsten Abschnitt beschriebenen stabilen Zelllinien hergestellt.



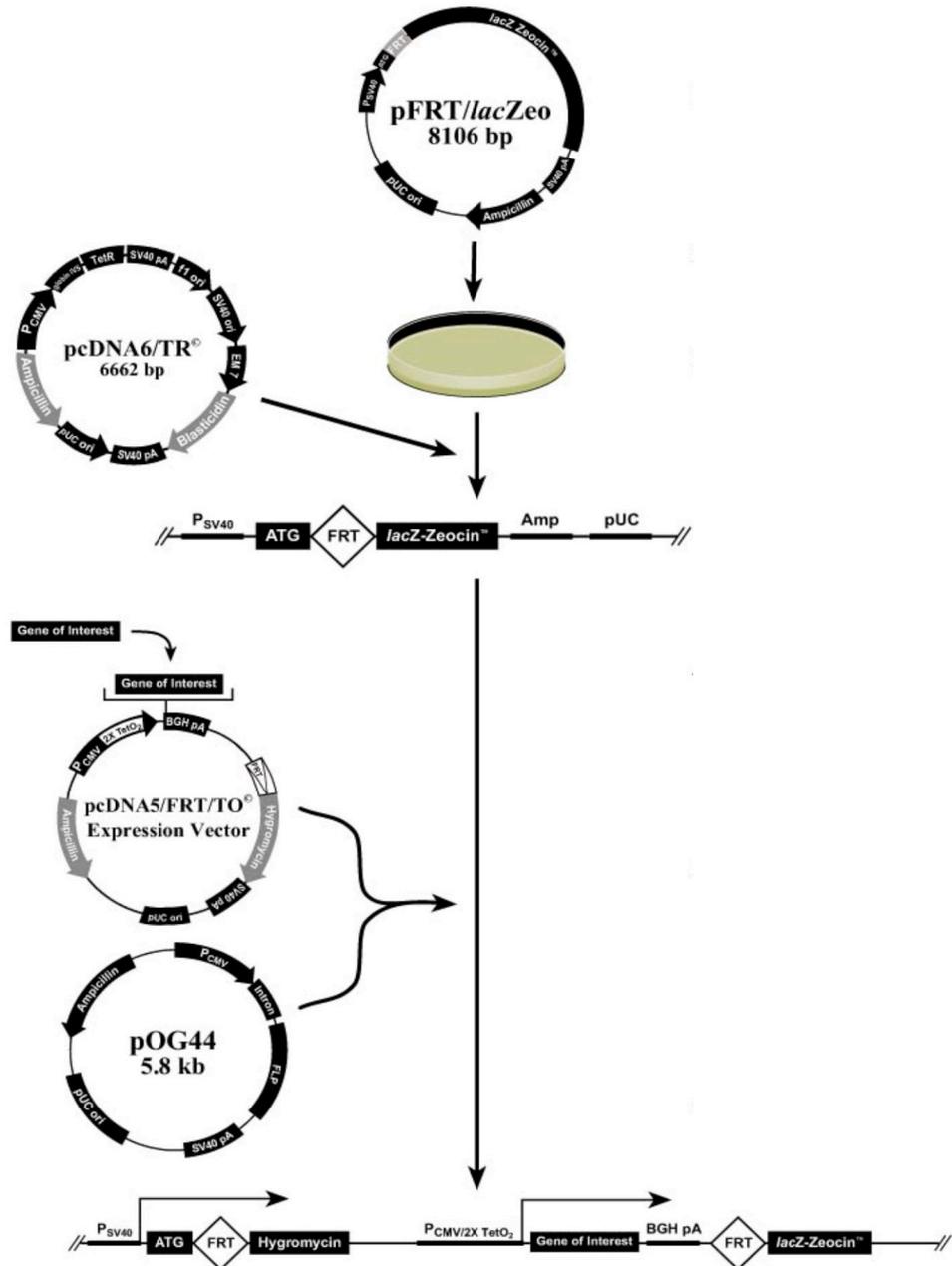
**Abbildung 27. pRB-WT und pRB-K720R reprimieren die Transkription als GAL4-Fusionen**

C33a Zellen wurden neben den weiter unten genannten Plasmiden mit folgenden Luciferase-Reporterplasmiden transfiziert: (A) pGL3-4xGAL4-TK-Luziferase (B) pGL3-4xGAL4-TATA-Luziferase (C) pGL3-4xGAL4-SV40-Luziferase (D) pGL5luc (AML). Für die Bestimmung der Basalwerte wurden sie jeweils mit pBIND (GAL4-Bindedomäne), für die Bestimmung der Repression entweder mit pBIND-pRB *large pocket* WT oder pBIND-pRB *large pocket* K720R kotransfiziert. Zur Normalisierung der Transfektion wurden die Zellen mit *renilla reniformis* (pRL-SV40-*renilla reniformis*) kotransfiziert.

### Die Etablierung stabiler, für pRB induzierbarer Zelllinien

Bei den bisher vorgestellten Transfektionsexperimenten kommt es wie beschrieben in der Regel zu einer Überexpression. Um in den folgenden Versuchen zur Funktion der pRB-SUMOylierung sicherzustellen, dass pRB-WT und pRB-K720R in gleicher Menge und möglichst nicht zu stark exprimiert werden, wurden stabile Zelllinien etabliert. Als Ausgangszelllinie diente erneut die für pRB und virale Proteine negative C33a Zelllinie, die nach einem Protokoll der Firma Invitrogen modifiziert wurde. Im Folgenden soll kurz das in Abbildung 28 gezeigte Prinzip erläutert werden.

Zunächst wurde eine FRT-Stelle (*Flp recombination target*) in das Genom integriert und kontrolliert, dass diese Integration ein singuläres Ereignis darstellt und die Zellen nicht in ihrem Wachstum hemmt. Anschließend wurde in einen solchen Zellklon in einem zweiten Insertionsschritt die cDNA kodierend für den



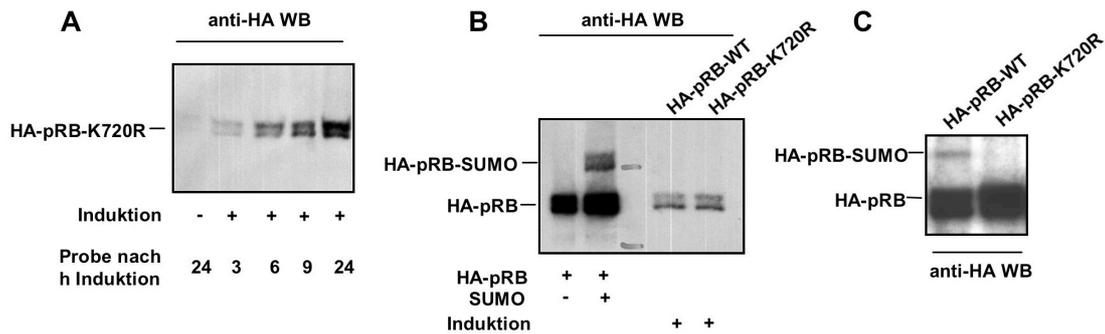
**Abbildung 28. Allgemeines Schema zur Herstellung einer Fip-In T-Rex Zelllinie (Invitrogen)**

Die Zellen werden zunächst mit pFRT//lacZeo transfiziert. Danach wird auf Zellen selektioniert, die das Konstrukt stabil integrierten und sichergestellt, dass es sich um eine singuläre Integration in das Genom handelt. Nach diesem Schritt werden sie mit pcDNA6/TR transfiziert und auf Zellen selektioniert, die das Konstrukt stabil integrierten und die Expression des Tet-Repressors überprüft. Anschließend kann durch Kotransfektion mit Flp-Rekombinase und der zu integrierenden cDNA auf pcDNA5/FRT/TO die cDNA gezielt über die FRT-Stelle integriert werden. Da der Promotor der cDNA unter der Kontrolle des Tet-Operators steht, kann die Genexpression durch die Zugabe von Tetracyclin induziert werden. Für Details siehe Material und Methoden.

Tetracyclin-Repressor (Tet) unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors integriert und überprüft, ob der Tet-Repressor tatsächlich vorhanden ist und die

Zellen normal wachsen. In diese sogenannte C33a Flp-In T-Rex Zelllinie können nun beliebige cDNAs über die FRT-Stelle durch Kotransfektion einer Flp-Rekombinase und der cDNA auf pcDNA5/FRT/TO in das Genom integriert werden. Der Vorteil im Vergleich zu normalen stabilen Zellen liegt in diesem System aber nun darin, dass die cDNA gezielt immer über die FRT-Stelle integriert wird und damit der genomische Hintergrund aller resultierenden Zelllinien gleich ist. Außerdem ist jeweils nur eine einzige Kopie der cDNA vorhanden, was eine identische, eher moderate Expression garantiert. Auch dies ist ein Vorteil gegenüber anderen stabilen Zellen, bei denen es durch Mehrfachintegrationen der cDNA in das Genom zu unterschiedlichen Expressionen kommen kann. Schließlich wird der Promotor zur Expression der cDNA, der auch über die FRT-Stelle mitintegriert wird, durch den Tet-Repressor reprimiert. Somit wird das integrierte Gen normalerweise nicht exprimiert, außer es wird durch die Zugabe von Tetracyclin gezielt angeschaltet. Dies bedeutet, dass die Expression des integrierten Gens zusätzlich noch induzierbar ist.

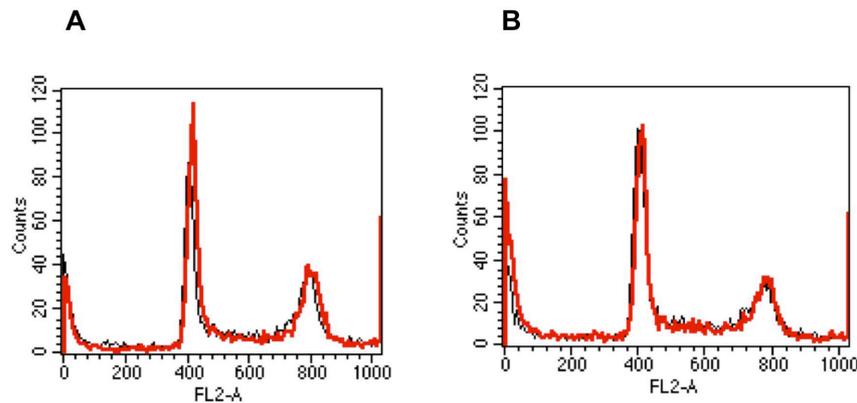
In diese C33a Flp-In T-Rex Zelllinie wurde nun in einem Fall die HA-pRB-WT-cDNA und im anderen Fall die HA-pRB-K720R-cDNA integriert. Zunächst wurde die Induktion getestet. Die Kinetik der Expression für die HA-pRB-K720R Zelllinie ist in Abbildung 29A gezeigt. Sie ergab einen deutlichen Konzentrationsanstieg nach der Induktion, wobei das Genprodukt das erste Mal nach drei Stunden detektiert werden konnte. Für HA-pRB-WT ergab sich eine identische Expressionskinetik. Anschließend wurden die Expression nach Induktion für beide Zelllinien mit der nach einer transienten Transfektion verglichen. Wie aus Abbildung 29B ersichtlich ist, werden die HA-pRB-Versionen der stabilen Zelllinien (die beiden rechten Spuren) wie erwartet weniger stark exprimiert. Weiterhin konnte durch diesen Versuch bestätigt werden, dass die Expression identisch ist. Wenn man in diesen Zelllinien SUMO exprimiert und die Expression der HA-pRB-Spezies induziert, so führt dies wie erwartet nur im Falle der HA-pRB-WT Zelllinie zum Auftreten einer HA-pRB-SUMO Bande (Abbildung 29C).



**Abbildung 29. Charakterisierung der stabilen, für pRB induzierbaren C33a Zelllinien**

(A) In der wie im Text beschriebenen hergestellten C33a HA-pRB-K720R Zelllinie wurde durch die Zugabe von Tetracyclin wie angegeben die Expression induziert. Nach 3, 6, 9 und 24 h wurden Zellextrakte hergestellt und durch Auftrennung in der SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot die Induktion von HA-pRB-K720R untersucht. (B) Die linken zwei Spuren zeigen die Expression von Konstrukten, mit denen C33a Zellen wie angegeben transient transfiziert wurden. Rechts dagegen sind Zellextrakte der stabilen C33a Zelllinien aufgetragen, bei denen die Expression von entweder HA-pRB-WT oder HA-pRB-K720R für 24 h induziert worden war. In der Mitte wurde ein Proteinmarker aufgetragen. (C) Die beiden C33a Zelllinien wurden mit SUMO transfiziert und die Expression von pRB-Spezies für 24 h induziert. Anschließend wurden die Proteine der Zellextrakte in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf HA-pRB-Spezies im HA-Westernblot untersucht.

In C33a Zellen führt das Wiedereinführen eines intakten pRB-Allels im Gegensatz zum oben gezeigten Versuch mit SAOS Zellen nicht zum Arrest der Zellen. Dies wird dem Fehlen von BRG-1 in C33a Zellen zugeschrieben, wodurch pRB wohl die Inhibierung des Cyclin A Promotors nicht mehr vermitteln kann (Strobeck et al. 2000). Die stabilen C33a Zelllinien wurden auf einen Zellzyklusarrest hin getestet. Dabei wurden FACS-Analysen von nichtinduzierten Zellen im Vergleich zu für die pRB-Expression induzierten C33a Zellen durchgeführt. Die Analyse ergab keinen Unterschied in der Zellzyklusverteilung zwischen induzierten und nichtinduzierten Zellen der HA-pRB-WT wie auch der HA-pRB-K720R Zelllinie, wie in Abbildung 30 gezeigt. Die Induktion von HA-pRB-K720R, nicht aber von HA-pRB-WT, führte allerdings zu einem leichten Anstieg apoptotischer Zellen (Abbildung 30B). Bei den nichtinduzierten Zellen beträgt der Anteil apoptotischer Zellen 6% (Abbildung 30B, schwarze Kurve), der nach der Induktion auf 10% steigt (Abbildung 30B, rote Kurve). Signifikanz und Ursache dieses leichten Anstiegs müssen weitere Untersuchungen klären.



**Abbildung 30. Die Induktion von pRB in den C33a Zelllinien führt zu keinem Zellzyklusarrest**  
 C33a Zellen der HA-pRB-WT (A) und der HA-pRB-K720R (B) Zelllinie wurden im FACS-Gerät auf ihren DNA-Gehalt und somit auf ihre Zellzyklusphase hin analysiert. Die Kurven zeigen die typische Zellzyklusverteilung von Zellkulturzellen mit dem größeren *peak* in der G1-Phase (einfacher DNA-Gehalt). Die schwarze Kurve zeigt die Verteilung von Zellen, bei denen die HA-pRB-Expression nicht induziert worden war. Die darübergelegte rote Kurve zeigt die Zellzyklusverteilung von Zellen, bei denen die HA-pRB-Expression durch die Zugabe von Tetracyclin für 24 h induziert worden war.

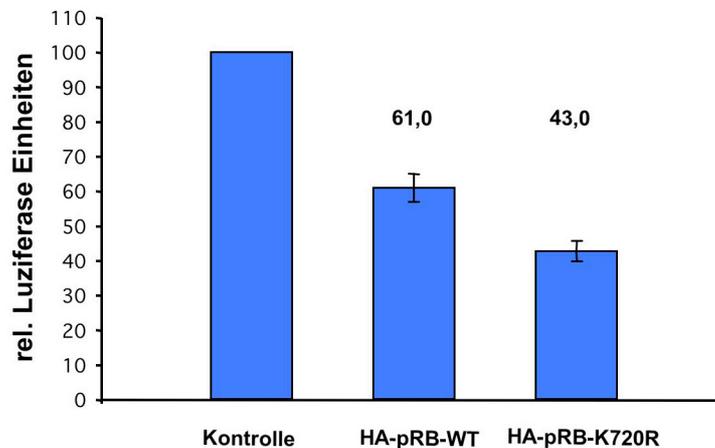
Somit waren zwei stabile und für die pRB-Expression durch die Zugabe von Tetracyclin induzierbare Zelllinien etabliert worden, die HA-pRB-WT und HA-pRB-K720R im gleichen genetischen Hintergrund und in identischer Menge exprimieren.

### Die SUMOylierung vermindert pRBs Potenzial zur E2F-Reprimierung

Die Versuche zur transkriptionellen Aktivität von pRB durch das GAL4-System ergaben nur geringfügige Unterschiede in der Repression zwischen pRB-WT und pRB-K720R (Abbildung 27). Beim GAL4-System handelt es sich um eine artifizielle Rekrutierung der pRB *large pocket* Domäne über die GAL4-DNA-Bindedomäne an die DNA und nicht wie in der Zelle über E2F. Aus diesem Grund konnte in den Versuchen der Abbildung 27 auch nur die aktive Repression pRBs mittels Rekrutierung von Korepressoren untersucht werden. Für die im Folgenden durchgeführten Reporter-genversuche wurde deshalb ein Reporterplasmid verwendet, das die *firefly* Luziferase unter der Kontrolle eines Promotors exprimiert, der sechs E2F-Bindungsstellen enthält. pRB wird in diesem Versuchsaufbau über endogenes E2F an den Promotor rekrutiert und somit vermittelt pRB hier seinen

reprimierenden Charakter einerseits über die Bindung von E2F und zusätzlich über die Rekrutierung von Korepressoren.

24 Stunden nach der Transfektion von HA-pRB-WT und die HA-pRB-K720R Zelllinien mit Reporterplasmid und SUMO-1 wurde durch die Zugabe von Tetracyclin die HA-pRB-Expression angeschaltet. Wiederum 24 Stunden später wurde dann die *firefly* Luziferaseaktivität bestimmt. Als Kontrolle dienten nichtinduzierte Zellen. Abbildung 31 zeigt das Ergebnis des Experiments. Die Luziferaseaktivität in der Kontrolle wurde als relativer Wert 100 festgesetzt, endogenes E2F führt hier zur Expression der Luziferase. Wird pRB induziert, so kommt es durch die E2F-Inhibition zur verminderten Expression der Luziferase. Im Falle von HA-pRB-WT wurde die Expression im Durchschnitt auf  $61,0 \pm 4,1\%$  im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Wurde der Versuch mit HA-pRB-K720R, das nicht mehr SUMOyliert wird (vgl. Abbildung 29C), durchgeführt, so ergab sich ein Reduktion der Luziferaseexpression auf  $43,0 \pm 2,7\%$  im Vergleich zur Kontrolle.



**Abbildung 31. SUMOylierung vermindert das reprimierende Potenzial pRBs gegenüber E2F**

Die für HA-pRB-WT bzw. HA-pRB-K720R induzierbaren C33a Zelllinien wurden mit SUMO-1 sowie einem Reporterplasmid (pGL3-6xE2F-Luziferase) transfiziert. Nach 24 h wurde die Expression der jeweiligen HA-pRB-Spezies durch die Zugabe von Tetracyclin induziert. Weitere 24 h später erfolgte die Bestimmung der Luziferaseaktivität im dualen Luziferase-assay. Als Kontrolle wurde die Luziferaseaktivität von nichtinduzierten Zellen auf 100 festgesetzt. Die Versuche wurden viermal in Duplikaten durchgeführt. Die statistische Auswertung wurde dabei nach dem sogenannten *paired student's t-test* durchgeführt und als P-Wert ergab sich  $P < 0,05$ . Eine Normalisierung der Transfektion wurde durch die Bestimmung der *renilla reniformis*-Luziferase (auf pRL-SV40-*renilla reniformis*) erreicht, mit der die Zellen ebenfalls kontransfiziert worden waren.

Diese Experimente wurden viermal in Duplikaten ausgeführt. Die Expression der HA-pRB-Versionen war, wie in Abbildung 29B gezeigt, identisch. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Differenz in der Repression zwischen HA-pRB-WT und HA-pRB-K720R auf eine unterschiedliche Expression der Zelllinien zurückzuführen ist. Damit bleibt als Interpretation des Ergebnisses von Abbildung 31, dass ein Verlust der SUMOylierung pRBs zu einer Erhöhung des repressiven Potenzials auf die E2F-abhängige Genexpression führt. Die SUMOylierung von pRB vermindert also dieses Potenzial, möglicherweise durch die Modulation der Bindung von noch nicht identifizierten Interaktionspartnern der *pocket B* Region.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass pRB ein Substrat für die posttranslationale Modifikation durch SUMO darstellt. Die SUMOylierung ist wohl ein spezifischer Prozess für pRB als Mitglied der *pocket* Protein Familie, da p107 nicht durch SUMO modifiziert wird und das konjugierte Lysin in p130 ebenso wie in p107 nicht konserviert ist. In den pRB Homologen anderer Spezies dagegen ist das Lysin konserviert, und auch die Modifikation scheint konserviert zu sein. So wird RBF aus *Drosophila* SUMOyliert. SUMO wird an Lysin 720 von pRB konjugiert, das nicht in einer SUMO-Konsensussequenz liegt. Da das Lysin in der Struktur pRBs direkt neben einer hydrophoben Bindungsgrube der *pocket* B Region auf der Oberfläche lokalisiert ist, beeinflussen Proteine, die über ein LxCxE-Motiv an diese hydrophobe Grube binden, den Prozess der SUMOylierung. Sowohl virale Onkoproteine als auch zelluläre Regulationsproteine wie EID-1 inhibieren die Reaktion *in vitro* und *in vivo*. Die SUMOylierung hat Einfluss auf die reprimierende Funktion pRBs bei der E2F-abhängigen Expression von Genen. Sie führt zu einer Abschwächung der pRB-induzierten Repression dieser Gene, möglicherweise durch die Modulation der Bindung spezifischer, noch nicht identifizierter Interaktionspartner pRBs.

### **Posttranslationale Modifikationen der *pocket* Proteine**

Wie in der Einleitung beschrieben, regulieren die *pocket* Proteine zelluläre Schlüsselfunktionen. Sie interagieren mit einer Vielzahl von Proteinen, die an unterschiedlichen Prozessen, wie etwa der Zellteilung, der Zelldifferenzierung oder der Apoptose beteiligt sind. Alleine für pRB sind bis heute über 100 Interaktionspartner beschrieben (Morris and Dyson 2001). Das Bindungsverhalten und die Aktivitäten der *pocket* Proteine werden zu einem großen Teil über posttranslationale Modifikationen gesteuert. Im Folgenden werden die entscheidenden Funktionen der posttranslationalen Modifikationen für die Regulation der *pocket* Proteine kurz beschrieben und anschließend ein mögliches Zusammenspiel mit der pRB-SUMOylierung diskutiert. Bei den Modifikationen handelt es sich um die Phosphorylierung, die Acetylierung und die Ubiquitinierung.

Die Phosphorylierung reguliert die Aktivitäten der *pocket* Proteine beim Übergang von der G1-Phase in die S-Phase (Adams 2001). In der hypophosphorylierten Form sind die Proteine aktiv und binden an die Vertreter der E2F-Transkriptionsfaktoren. Durch die Bindung wird die Expression von E2F-regulierten Genen verhindert. Mechanistisch geschieht dies über die Blockierung der Transaktivierungsdomäne E2Fs und die Rekrutierung von Korepressoren, den Vorgängen der passiven und aktiven Repression. Durch Proliferationssignale kommt es zu Phosphorylierungen der *pocket* Proteine, nach denen diese die Eigenschaft verlieren, E2F zu binden. Somit ist der G1/S-Übergang eingeleitet. Bei den Enzymen, die diese Phosphorylierungen katalysieren, handelt es sich um Cyclin-abhängige Kinasen, nämlich um Cyclin D/CDK4/6, Cyclin E/CDK2 und Cyclin A/CDK2. p107 ist neben pRB hauptsächlich an dem durch Phosphorylierung regulierten Ablauf des G1/S-Übergangs beteiligt.

Die Acetylierung spielt bei den differenzierungsspezifischen Funktionen pRBs eine entscheidende Rolle (Nguyen et al. 2004). Die Einleitung zellulärer Differenzierungsprogramme führt zur Assoziierung pRBs mit den p300-assoziierten Faktoren P/CAF oder CBP, die beide im Komplex mit p300 Acetyltransferaseaktivität besitzen. Dadurch wird pRB an den Lysinen 873 und 874 acetyliert. Acetyliertes pRB bindet verstärkt an die Ubiquitin-E3 Ligase Mdm2, was unter anderem zum Abbau des für die Differenzierung inhibitorischen und mit pRB komplexierten Proteins EID-1 führt (Chan et al. 2001; Nguyen et al. 2004). pRB ist danach in der Lage, seinen koaktivierenden Einfluss auf die Transkription differenzierungsspezifischer Gene auszuüben.

Die posttranslationale Modifikation durch Ubiquitin wurde für p130 als Mitglied der *pocket* Protein Familie eindeutig nachgewiesen (Tedesco et al. 2002). Hier führt die Phosphorylierung von Serin 672 zur Multiubiquitinierung durch die Ubiquitin-E3 Ligase SCF<sup>Skp2</sup> und anschließenden Degradation durch das 26S-Proteasom. p130 akkumuliert stark in der G0-Phase und wird über diesen Mechanismus beim Eintritt in die G1-Phase herunterreguliert. Dies trifft nicht auf p107 und pRB zu. Einige Publikationen beschreiben virale und zelluläre Proteine, die auf der einen Seite pRB und auf der anderen Seite Untereinheiten des

Proteasoms binden und somit pRB zum Proteasom rekrutieren. Es handelt sich dabei um das virale Tax Onkoprotein (Kehn et al. 2005) sowie pp71 des humanen Cytomegalovirus (Kalejta and Shenk 2003), Gankyrin (Higashitsuji et al. 2000) und Mdm2. Mdm2 bindet sowohl pRB als auch die C8-Untereinheit des Proteasoms (Sdek et al. 2005). Da Mdm2 in vielen Tumoren überexprimiert ist, könnte dieser Mechanismus wichtig bei der Inaktivierung pRBs und damit bei der Entstehung von Krebszellen sein. Diese Form des proteasomalen Abbaus ist nicht abhängig von Ubiquitin. Allerdings wird in einer Veröffentlichung von Uchida *et al.* eine Multiubiquitinierung pRBs durch Mdm2 beschrieben, wobei die Konjugationslysine in pRB nicht identifiziert wurden (Uchida et al. 2005). Der Ubiquitin-abhängige Abbau pRBs wurde auch in Zellen nachgewiesen, die mit dem HPV infiziert sind. pRB wird E7-abhängig ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut, wobei das virale E7 Onkoprotein selbst ein Substrat des Ubiquitin/Proteasom-Systems ist (Boyer et al. 1996; Wang et al. 2001). Im Gegensatz zu Tumorzellen mit einem erhöhten *Mdm2-level* oder mit HPV infizierten Zellen wird der *pRB-level* unter normalen Bedingungen in der Zelle wohl aber nicht über das Ubiquitin/Proteasom-System reguliert.

pRB wird neben den gerade beschriebenen posttranslationalen Modifikationen auch durch SUMO modifiziert, wie in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden konnte. Um ein Substrat für die SUMOylierungsmaschinerie darzustellen, muss die *pocket* Domäne pRBs in der korrekten Struktur vorliegen. Dies zeigten Versuche mit tumorigenen pRB-Proteinen, deren Integrität der *pocket* Struktur durch Mutationen nicht mehr gegeben ist und die nicht mehr durch SUMO modifiziert werden. Das Konjugationslysin ist in den beiden anderen Mitgliedern der *pocket* Protein Familie p107 und p130 nicht konserviert und für p107 konnte im Einklang damit keine SUMOylierung nachgewiesen werden. Die Modifikation durch SUMO ist also wohl für pRB spezifisch. Das Lysin 720 ist in pRB Homologen anderer Spezies wie *Drosophila melanogaster*, der Maus und der Ratte konserviert, und der Mechanismus der SUMOylierung von pRB scheint auch dort vorhanden zu sein, da in einem *in vitro* Modifikationsexperiment RBF aus *Drosophila* durch humane Enzyme mit SUMO-1 modifiziert werden konnte.

Experimente zur Untersuchung der Abhängigkeit von SUMOylierung und Phosphorylierung ergaben, dass bevorzugt die aktive, hypophosphorylierte pRB-Spezies SUMOyliert wird. Eine Modifikation der hyperphosphorylierten pRB-Spezies durch SUMO wurde nur beim Einsatz eines pRB-Proteins, das durch die Austausch YN756,757FA keine LxCxE-Proteine mehr binden kann *in vivo* beobachtet. Somit liegt pRB-WT in der hyperphosphorylierten, inaktiven Form wohl normalerweise im Komplex mit nicht näher identifizierten, mit hoher Affinität bindenden LxCxE-Proteinen vor und kann dadurch nicht SUMOyliert werden. Die SUMOylierung als reversible Reaktion könnte somit eine neue Regulationsebene speziell für aktives pRB darstellen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden keine eingehenden Versuche zur Klärung des Zusammenspiels zwischen SUMOylierung und Acetylierung durchgeführt. Durch den Einsatz der acetylierungsdefizienten pRB-Version KK873,874RR in den beschriebenen *in vivo* und *in vitro* Versuchen könnte untersucht werden, ob die Acetylierung eine Voraussetzung für die SUMOylierung bedeutet. Vorläufige Daten deuten darauf hin, dass dies in der Tat der Fall ist. Durch Antikörper, die spezifisch die acetylierte Form pRBs detektieren, könnte diese Analyse erweitert und auf Zelllinien mit funktionellem pRB ausgeweitet werden. Wie oben beschrieben wird pRB wohl nur unter bestimmten Bedingungen über das Ubiquitin/Proteasom-System abgebaut. In den benutzten C33a und SAOS Zelllinien finden sich keine viralen Proteine, die die Ubiquitinierung pRBs induzieren könnten und durch das Fehlen von p53 in beiden Zelllinien ist auch Mdm2 reprimiert. Deshalb wurde bei den Versuchen *in vivo* auch keine Ubiquitinierung pRBs detektiert. Durch Versuche in HPV-positiven Zelllinien, wie etwa der HeLa Zelllinie, sollte diese Detektion möglich sein und dadurch auch die Identifizierung einer eventuellen Rolle der SUMOylierung in diesem Zusammenhang. Bisher wurden in der Literatur keine Lysine in der pRB-Sequenz als Konjugationsstellen für Ubiquitin beschrieben und aus diesem Grund ist keine Aussage möglich, ob die SUMOylierung am Lysin 720 eine antagonistische Funktion zur Ubiquitinierung wie etwa bei I $\kappa$ B ausübt.

### **SUMO als Signal für die Rekrutierung von Proteinen**

Wie schon erwähnt konnten bisher vor allem Transkriptionsfaktoren oder mit der Transkription assoziierte Proteine als Substrate der SUMOylierung identifiziert werden. Für die meisten Transkriptionsfaktoren geht mit der SUMOylierung die Repression ihrer transkriptionellen Aktivität einher. Zwei gut untersuchte Beispiele hierfür stellen die Transkriptionsfaktoren p300 und Elk-1 dar. Für p300, das sowohl als Aktivator als auch als Repressor der Transkription fungieren kann, wurde eine SUMOylierung an zwei Lysinen in der Repressordomäne nachgewiesen, wodurch die Transkription reprimiert wird (Girdwood et al. 2003). Diese Repression wird durch die SUMO-spezifische Rekrutierung von HDAC-6 an p300 erreicht. Die Autoren zeigten dies durch einen *in vitro* Bindungsversuch mit der SUMOylierten Repressordomäne von p300 und HDAC-6. Auch für den Transkriptionsfaktor Elk-1 konnte ein solches Prinzip nachgewiesen werden (Yang and Sharrocks 2004). Die SUMOylierte Form inhibiert die Transkription bestimmter Gene. Hier führt die SUMOylierung zur Rekrutierung von HDAC-2. Durch MAP-Kinase Signalwege wird Elk-1 deSUMOyliert und die Genaktivierung eingeleitet. In diesem Fall wurden Interaktionspartner durch die Inkubation von *in vitro* SUMOyliertem Elk-1 mit Zellextrakten identifiziert. Allerdings stellt die HDAC-Rekrutierung kein allgemeines Prinzip dar, da es auch Beispiele gibt, in denen die SUMOylierung zu einer Verstärkung der transkriptionellen Aktivität führt (Gill 2005). Wahrscheinlich wird deshalb der durch SUMO vermittelte Effekt auch durch das modifizierte Protein selbst mitbestimmt. In der Einleitung wurden bereits zwei Beispiele vorgestellt, bei denen die SUMOylierung zu einer starken Affinitätserhöhung einer Bindung führt: SUMO-PPAR $\gamma$  bindet stärker an NCoR, SUMO-PCNA stärker an Srs2 und dies resultiert jeweils in einer spezifischen Rekrutierung.

Wie durch Reporter-genversuche gezeigt werden konnte, führt die pRB-SUMOylierung zu einer Abschwächung des reprimierenden Effekts von pRB auf die E2F-abhängige Genexpression (Ledl et al. 2005). Damit vermittelt die SUMOylierung von pRB offensichtlich nicht die oben für p300 und Elk-1 vorgestellte Rekrutierung von HDACs. Wie im nächsten Abschnitt beschrieben, inhibiert HDAC-1 die SUMOylierung pRBs und somit stellen die SUMOylierung und HDAC-Bindung

eher entgegengesetzte Ereignisse dar. Eventuell ist bei pRB also genau das Gegenteil zu p300 bzw. Elk-1 der Fall. Für den transkriptionellen Korepressor CtBP1 konnte beispielsweise eine SUMO-abhängige Regulation der Bindung an Repressoren gezeigt werden, die ebenfalls entgegengesetzt zu p300 und Elk-1 abläuft (Lin et al. 2003). Die SUMOylierung von CtBP1 blockiert in diesem Fall die Bindung an PDZ-Domänen von Repressoren und verhindert somit deren Rekrutierung. Alternativ könnte die SUMOylierung pRBs auch zur Rekrutierung von Faktoren führen, die die Expression zumindest nicht aktiv reprimieren. Damit könnte der SUMOylierung von pRB allgemein auch eine Rolle bei der Etablierung spezifischer Proteinkomplexe auf der *pocket B* Region oder eine Stabilisierung von bestehenden Komplexen zukommen. Allerdings sind für diese postulierten Funktionen der SUMOylierung bisher keine experimentellen Daten vorhanden. Vor allem durch biochemische Experimente könnte dies aufgeklärt werden. Dazu müssten wie bei p300 und Elk-1 beschrieben Versuche mit unmodifiziertem pRB sowie der SUMOylierten pRB-Spezies durchgeführt werden, um spezifisch Interaktoren zu identifizieren, die mit einer höheren Affinität an pRB-SUMO binden. Dies könnte durch die Inkubation von unmodifiziertem sowie *in vitro* SUMOyliertem pRB mit Zellextrakten und der anschließenden Identifizierung von stärker an pRB-SUMO gebundenen Proteinen in der Massenspektrometrie durchgeführt werden.

### **pRB-SUMO und LxCxE-Proteine**

Da das durch SUMO konjugierte Lysin 720 direkt neben der hydrophoben Grube der *pocket B* Region liegt, wurden Versuche mit Proteinen durchgeführt, die über ein LxCxE-Motiv an diese Grube pRBs in der *pocket B* Region binden. In Abhängigkeit eines intakten LxCxE-Motivs inhibierten sowohl virale als auch zelluläre Proteine die SUMOylierung *in vitro* und *in vivo* (Ledl et al. 2005).

Die viralen Proteine E1A und E7, die beide pRB mit hoher Affinität binden, inhibierten die Modifikation komplett. Die Bindung viraler Proteine führt allgemein zur Inaktivierung pRBs durch die Freisetzung von E2F. Ob speziell der Inhibierung der SUMOylierung pRBs durch bestimmte virale Proteine eine funktionelle Rolle bei der Infektion und Transformation von Zellen durch Viren zukommt, wurde in der

vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Experimentell kann diese Frage nur schwer beantwortet werden, da man eine Trennung der Funktionen von viralen Proteinen erreichen müsste. Falls ein bestimmtes virales Protein nur auf die SUMOylierung pRBs Einfluss hätte, so könnte dies aber beispielsweise zur Verdrängung von gebundenem Ubc9 führen und somit Auswirkungen auf eine mögliche Rekrutierungsfunktion pRBs für Ubc9 haben. Dies könnte in Wettbewerbs-Bindungsstudien zumindest *in vitro* relativ einfach untersucht werden.

Die zellulären Proteine HDAC-1 und EID-1 binden pRB ebenfalls über ein LxCxE- bzw. ein LxCxE-Motiv. HDAC-1 fungiert wie schon mehrfach erwähnt als transkriptioneller Korepressor (Luo et al. 1998). Für EID-1 wurde eine Funktion als Inhibitor der Differenzierung beschrieben (MacLellan et al. 2000; Miyake et al. 2000). Auf EID-1 und pRB-abhängige Differenzierungsprozesse wird in einem Kapitel weiter unten ausführlich eingegangen. EID-1 inhibiert die SUMOylierung pRBs komplett, während HDAC-1 nur zu einer Reduktion der Modifikation führt. Dies könnte die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der beiden Proteine widerspiegeln, die mit den Enzymen der SUMOylierung um die pRB-Bindung konkurrieren oder das Lysin 720 als Modifikationsstelle maskieren. HDAC-1 bindet pRB mit einer geringeren Affinität. Weitere zelluläre LxCxE-Proteine neben EID-1 und HDAC-1 inhibieren die SUMOylierung pRBs ebenso, wie *in vivo* Versuche mit mutierten pRB-Versionen, die generell keine LxCxE-Proteine mehr binden können, ergaben. Hier zeigte sich ein enormer Anstieg der SUMOylierung.

Umgekehrt konnte sowohl für E1A als auch für EID-1 *in vitro* keine bevorzugte Bindung an unmodifiziertes pRB nachgewiesen werden. Dies ist erstaunlich, da beide Proteine hauptsächlich über ihr LxCxE-Motiv an pRB binden und man erwarten würde, dass die SUMOylierung der *pocket* B Region diese Interaktion stört. Entweder ist dies nicht der Fall oder die Interaktionen werden doch stärker als bisher beschrieben über zusätzliche Regionen vermittelt. Generell kann aber die Regulation der Bindung zwischen der *pocket* B Region und spezifischen LxCxE-Interaktionspartnern pRBs durch die SUMOylierung nicht ausgeschlossen werden. Vielleicht betrifft diese Regulation eher Proteine, die pRB im Gegensatz zu E1A und EID-1 mit einer niedrigeren Affinität binden.

### **Der Einfluss der pRB-SUMOylierung auf E2F-abhängige Funktionen**

Um zu untersuchen, ob die pRB-SUMOylierung Einfluss auf die über E2F vermittelte transkriptionelle Aktivität hat, wurden Reporter-genversuche in den stabilen, für pRB-Spezies induzierbaren Zelllinien durchgeführt. pRB wurde im verwendeten experimentellen Ansatz durch endogenes E2F an den Promotor des Reportergens rekrutiert. Dabei zeigte sich durch den Vergleich von pRB-WT und pRB-K720R, dass die pRB-SUMOylierung zu einer leichten Abschwächung des reprimierenden Effekts von pRB auf die E2F-abhängige Genexpression führt, wobei die Bindung pRBs an E2F nicht durch SUMO moduliert wird (Ledl et al. 2005).

Für die Zellzyklusfunktion von pRB könnte die SUMOylierung somit eine Verminderung des reprimierenden Effekts beim G1/S-Übergang bedeuten. Allerdings ergab die Analyse der Auswirkungen der pRB-Expression in den normalerweise pRB-negativen SAOS Zellen auf die Zellproliferation keinen Unterschied zwischen pRB-WT und pRB-K720R. Die Expression führte in beiden Fällen zu einem identischen Proliferationsstopp im vorgestellten *colony formation assay*, der den Einfluss pRBs auf das Zellwachstum über einen längeren Zeitraum analysiert. Somit scheint die pRB-SUMOylierung keinen Einfluss auf diesen E2F-abhängigen Langzeiteffekt zu haben. Diese Versuche konnten nicht in den induzierbaren C33a-Zellen durchgeführt werden, da diese kein für einen Arrest notwendiges BRG-1 exprimieren. Im Einklang damit ergaben die FACS-Analysen der stabilen induzierbaren C33a-Zelllinien keinen Unterschied in der Zellzyklusverteilung für pRB-WT und pRB-K720R vor oder nach der Induktion.

Generell ist die Verwendung von Krebszelllinien für Experimente zur Untersuchung des Zellzyklus problematisch, da bei diesen wichtige Regulationsproteine zum Teil nicht funktionell exprimiert werden und sie auch in ihren Signalwegen sehr stark verändert sind. Somit sollten Versuche zur Funktion der pRB-SUMOylierung in Hinblick auf den Zellzyklus bzw. den G1/S-Übergang besser in Primärzellen durchgeführt werden, die in ihren Signalwegen nicht verändert sind.

Natürlich sind noch weitere E2F-abhängige Funktionen pRBs bekannt. Spezifische Experimente etwa im Hinblick auf die Apoptose oder Seneszenz

könnten unter Umständen einen Unterschied zwischen dem WT-Protein und der nicht mehr SUMOylierbaren Form aufdecken.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass die SUMOylierung von pRB möglicherweise einen Einfluss auf eine oder mehrere Funktionen hat, die über E2F vermittelt werden. Da pRB mit E2F je nach Zelltyp und Prozess, in dem sich die Zelle befindet, sehr unterschiedliche Komplexe entweder transient oder dauerhaft an den Promotoren bestimmter Gene bildet, könnte die pRB-SUMOylierung bei der Regulation ganz bestimmter Komplexe und damit der Genexpression mitentscheidend sein. Experimentell müsste man die in Frage kommenden Gene zunächst zum Beispiel durch *microarrays* eingrenzen und später versuchen, die modifizierte pRB-Form am identifizierten Promotor durch Chromatinimmunpräzipitationen nachzuweisen.

### **Eine mögliche Rolle der pRB-SUMOylierung in der Differenzierung**

Der Prozess der Differenzierung wurde in der Diskussion bereits zweimal im Zusammenhang mit pRB und SUMO erwähnt. So wurde EID-1 bei Versuchen eingesetzt, die den Einfluss von zellulären LxCxE-Proteinen auf die SUMOylierung pRBs aufklären sollten. Wie oben kurz erwähnt, fungiert EID-1 als Inhibitor der Differenzierung durch Bindung und Inaktivierung von pRB und p300, die als Koaktivatoren die gewebespezifische Genexpression einleiten. Diese inhibitorische Rolle für EID-1 wurde dabei eindeutig für die pRB- und MyoD-abhängige Muskeldifferenzierung (MacLellan et al. 2000) sowie die pRB-abhängige Knochendifferenzierung (Miyake et al. 2000) gezeigt. Verlassen Zellen als ersten Schritt der Differenzierung den Zellzyklus, so wird eine starke Ubiquitinierung EID-1s und der daraus resultierende proteasomale Abbau beobachtet. Im folgenden Schritt kommt es zur Expression spezifischer Gene je nach Art der Differenzierung, auf die pRB zum Teil koaktivierend wirkt. EID-1 kann aber nun diese koaktivierenden Eigenschaften pRBs und weiterer Koaktivatoren wie p300 oder CBP nicht mehr blockieren. Miyake *et al.* postulieren deshalb, dass EID-1 das Verlassen des Zellzyklus mit der transkriptionellen Aktivierung von Genen, die für die Differenzierung benötigt werden, koppelt. Dies wird durch die verstärkte

acetylierungsabhängige Rekrutierung von Mdm2 an den pRB-EID-1-Komplex erreicht, in dem Mdm2 dann als E3 Ligase die Ubiquitinierung und damit den Abbau EID-1s katalysiert (Nguyen et al. 2004). Wie oben beschrieben inhibiert EID-1 die SUMOylierung pRBs komplett *in vitro* und *in vivo*. Diese Daten verleiten zur Spekulation, dass SUMOylierung und EID-1-Bindung entgegengesetzte Prozesse darstellen. Obwohl die durchgeführten *in vitro* Bindungsversuche nicht auf eine spezifische Interaktion zwischen der unmodifizierten pRB-Spezies und EID-1 hindeuten, könnte die pRB-SUMOylierung dennoch entgegengesetzt zur Funktion von EID-1 stehen. So könnte der Abbau von EID-1 die nun folgende SUMOylierung pRBs erlauben, was im nächsten Schritt die Rekrutierung von differenzierungsspezifischen Kofaktoren ermöglicht. Somit würde sich die SUMOylierung positiv auf pRB-abhängige Differenzierungsprozesse auswirken.

Wie schon erwähnt weisen vorläufige Daten darauf hin, dass die Acetylierung pRBs eine Voraussetzung für die SUMOylierung darstellt. Sollte sich dieser Zusammenhang zwischen Acetylierung und SUMOylierung bestätigen, so würde das gut in die soeben vorgeschlagene Rolle der SUMOylierung bei Differenzierungsprozessen passen. Dies würde auch die Abwesenheit der SUMO-Modifikation bei p107 als weiterem Vertreter der *pocket* Proteine erklären, da bis jetzt nur eine Rolle für pRB in der Differenzierung, etwa in der Adipogenese, und nicht für p107 beschrieben wurde (Classon et al. 2000).

### **Modelle zur Vermittlung einer spezifischen Funktion durch pRB-SUMO**

Wie bei vielen anderen SUMO-Substraten auch wird nur ein relativ kleiner Teil pRBs durch SUMO modifiziert und es stellt sich die Frage, wie durch diesen geringen Anteil an modifiziertem Protein Funktionen vermittelt werden. Eine Möglichkeit besteht darin, dass die SUMOylierung zur Funktionsänderung einer bestimmten pRB-Fraktion führt. So könnte die SUMOylierung beispielsweise, wie im Kapitel über E2F-abhängige pRB-SUMO-Funktionen erwähnt, nur eine bestimmte Fraktion betreffen, die E2F an spezifischen Promotoren reguliert. Neben dieser Hypothese, bei der die SUMOylierung stöchiometrisch auftritt, existiert auch das Modell der zyklischen Modifikation durch SUMO (Johnson 2004). Darin hat die

SUMOylierung eines Proteins bestimmte Auswirkungen auf das Protein selbst, die auch nach der DeSUMOylierung noch bestehen bleiben. Johnson nimmt dabei die in der Einleitung beschriebene TDG als Beispiel (siehe auch Abbildung 9). Das unmodifizierte Enzym katalysiert die Entfernung einer falsch gepaarten Base und bleibt an die DNA gebunden. Die SUMOylierung führt zur Freisetzung und anschließende DeSUMOylierung macht das Enzym für eine weitere Katalyserunde bereit. Durch diesen Zyklus wurde die DNA-gebundene Spezies in die ungebundene Enzymform überführt. Diese unterschiedlichen Formen sind aber beide nicht durch SUMO modifiziert. Somit würde ein solcher Mechanismus die ganze Proteinpopulation betreffen, wenn auch immer nur ein sehr kleiner Teil zu einer bestimmten Zeit tatsächlich modifiziert ist. Ein solches Modell ist durchaus auch für pRB denkbar, da die SUMOylierung z.B. die Interaktion mit einem bestimmten Partner vermitteln könnte, die auch nach der DeSUMOylierung pRBs bestehen bleibt.

In den vorgestellten Lokalisierungen von pRB durch die Immunfluoreszenzmikroskopie konnte kein Unterschied zwischen pRB-WT und pRB-K720R in Bezug auf die Verteilung zwischen Cytoplasma und Zellkern beobachtet werden. Beide pRB-Spezies befinden sich ausschließlich im Zellkern. Aber auch hier tritt das Problem auf, dass nur ein bestimmter Teil pRBs durch SUMO modifiziert wird und nur diese Subpopulation in ihrer subnukleären Verteilung durch SUMO beeinflusst sein könnte. Das Experiment wurde unter Überexpressionsbedingungen durchgeführt und dabei könnte es leicht zu einer Maskierung der spezifischen Lokalisation dieser Subpopulation gekommen sein. Um dieses Problem zu umgehen, könnte die sogenannte Ubiquitin/SUMO-vermittelte Fluoreszenzkomplementation eingesetzt werden. Bei diesem System werden das Substratprotein und SUMO jeweils an ein bestimmtes inaktives Fragment eines fluoreszierenden Proteins fusioniert. Wird SUMO nun an das Substrat konjugiert, so befinden sich die beiden komplementären Fragmente in unmittelbarer Nähe und es kommt wieder zur Emission von Fluoreszenz. Entwickelt wurde dieses System zur subnukleären Lokalisationsbestimmung von c-jun-SUMO (Fang and Kerppola 2004). Eventuell führt dieses wesentlich sensitivere System

angewendet auf pRB auch vor einem großen Hintergrund an nichtmodifiziertem pRB zu Identifizierung einer distinkten Lokalisation von pRB-SUMO im Zellkern.

Ein weiteres Modell für die Rolle der Modifikation pRBs durch SUMO geht in eine andere Richtung. Die Hauptaufgabe pRBs liegt dabei in der Rekrutierung von Ubc9 und die pRB-SUMOylierung selbst stellt nur einen Nebeneffekt dar. Ubc9 katalysiert dann die Modifikation von im Komplex vorhandenen Proteinen, die durch SUMO in ihren Eigenschaften verändert werden. In diesem Zusammenhang ist es reizvoll, über die so gesteuerte SUMOylierung von Proteinen, die als Regulatoren der Chromatinstruktur fungieren, zu spekulieren. Was für eine entscheidende Rolle die Bindung von Ubc9 an Chromatin und die SUMOylierung für die Chromatinkonformation und stabile Markierung von Chromatinbereichen haben, wurde bereits in der Einleitung am Beispiel von *S. pombe* erwähnt (Shin et al. 2005). Eine Bindung pRBs an Ubc9 konnte gezeigt werden (Ledl et al. 2005) und eine Eigenmodifikation pRBs könnte in der Funktion als Rekrutierungsfaktor von Ubc9 nicht entscheidend sein und somit auch gering ausfallen.

Neben der Diskussion über den tatsächlich modifizierten Proteinanteil ist der Nachweis entscheidend, dass das endogene Protein modifiziert wird. Dies konnte durch die Überexpression von SUMO in U2OS Zellen, die funktionelles pRB exprimieren, gezeigt werden (Ledl et al. 2005). Die Überexpression von SUMO erhöht nur den Anteil von freiem SUMO in der Zelle, verändert aber sonst nichts am Ablauf der enzymatischen Kaskade. Weiterhin konnte bei einer mutierten pRB-Version, die keine LxCxE-Proteine mehr binden kann, eine direkte SUMOylierung in C33a Zellen nachgewiesen werden. Hier wurde durch die Transfektion dieser pRB-Version der Anteil an modifizierbarem pRB bei einer endogenen SUMO-Konzentration erhöht.

Es bleibt abzuwarten, in welchem Prozess die SUMOylierung pRBs eine Rolle spielt und welche Funktion speziell SUMO dort übernimmt. Nach der Interpretation der momentanen experimentellen Daten und Modellen für andere Substrate in der Literatur wird SUMO aber wahrscheinlich für die spezifische Rekrutierung von Proteinen und damit für die Regulation und/oder Komplexbildung von Bindungspartnern zuständig sein.

## 5. Material und Methoden

### Mikrobiologische Methoden

#### *E. coli* Stämme

TG1	supE thi-1 $\Delta$ (lac-proAB) $\Delta$ (mcrB-hsdSM)5 ( $r_K^-$ $m_K^-$ ) [F' traD36 proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15]
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10(Tet <sup>r</sup> )]
XL10-Gold	Tet <sup>r</sup> $\Delta$ (mcrA)183 $\Delta$ (mcrB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10(Tet <sup>r</sup> ) Amy Cam <sup>r</sup> ] <sup>a</sup>
BL21pLys	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> ompT hsdS( $r_B^-$ $m_B^-$ ) dcm EndA Hte [argU ileY leuW Cam <sup>r</sup> ]

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

Flüssigkulturen in LB-Medium (1% Trypton, 0.5% Hefeextrakt und 1% NaCl sterilisiert durch Autoklavieren) wurden bei 37°C geschüttelt (200 rpm) und Agarplatten (LB-Medium mit 1.5% Agar) bei 37°C inkubiert. Für die Selektion von transformierten Bakterien wurde dem Medium Antibiotikum in einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml (Ampicillin), 30  $\mu$ g/ml (Kanamycin) bzw. 34  $\mu$ g/ml (Chloramphenicol) zugefügt. Die Dichte von *E. coli* Kulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) bestimmt. Kurzfristig wurden Bakterien in Flüssigkultur oder Ausstriche auf Agarplatten für ca. eine Woche bei 4°C aufbewahrt. Für die langfristige Lagerung wurden stationäre Flüssigkulturen mit Glycerin versetzt (Endkonzentration 17%) und bei -80°C eingefroren.

#### Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Für alle Klonierungen wurden elektrokompetente XL1-Blue Zellen verwendet. Hierfür wurde mit einer frisch ausgestrichenen Einzelkolonie eine Übernachtskultur in Flüssigmedium angesetzt und mit 10 ml dieser Kultur 1 l LB-Medium angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.7 inkubiert. Nach Abkühlen der Kultur in Eiswasser für 1 h wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 5000 g und 4°C geerntet. Alle weiteren Schritte wurden unter Verwendung von vorgekühlten Materialien und eiskalten sterilen Lösungen durchgeführt. Die sedimentierten Zellen wurden vorsichtig in 1 l Wasser resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und der letzte Schritt mit 0.5 l 10% Glycerin wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 20 ml 10% Glycerin aufgenommen und wieder sedimentiert. Schließlich wurden die Zellen in 3 ml 10% Glycerin resuspendiert, in 40  $\mu$ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### Herstellung chemischkompetenter Bakterien

Für die zielgerichteten Mutagenesen und die Aufreinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli* wurden chemischkompetente XL10-Gold (Stratagene) bzw. BL21 Zellen verwendet. Für BL21 Zellen wurde mit einer frisch ausgestrichenen Einzelkolonie eine Übernachtskultur in Flüssigmedium angesetzt und mit 3 ml dieser Kultur 300 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.3 inkubiert. Nach Abkühlen der Kultur in Eiswasser für 10 min wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Alle weiteren Schritte wurden unter Verwendung von vorgekühlten Materialien und eiskalten sterilen Lösungen durchgeführt. Die sedimentierten Zellen wurden vorsichtig in 40 ml 100 mM MgCl<sub>2</sub> resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 80 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen sedimentiert, in 4 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>/15% Glycerin resuspendiert, in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

### Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

Kurz vor der Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Für eine Elektroporation wurden ca. 10 pg Plasmid-DNA bzw. 2-4 µl eines gegen Wasser dialysierten Ligationsansatzes mit 40 µl der elektrokompenten Zellen gemischt. Diese Suspension wurde in einer Elektroporationsküvette (0.1 cm Spaltbreite) mit einem Puls von 1.8 kV und 25 µF bei einem Widerstand von 200 Ω elektroporiert. Nach dem elektrischen Puls wurden die Zellen sofort in 1 ml LB-Medium/20 mM Glukose aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß transferiert und 1 h bei 37°C geschüttelt. Für die Transformation von chemischkompetenten oder ultrakompenten Zellen (XL10-Gold, Stratagene) wurden ca. 0.1 bis 500 ng Plasmid-DNA bzw. 2 µl eines Ligationsansatzes mit 50 µl der kompetenten Zellen gemischt und die Suspension in Falcon 2059 Röhrchen 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 sec bei 42°C und einer anschließenden Inkubation für 2 min auf Eis wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37°C geschüttelt. Transformierte Zellen wurden anschließend auf Selektionsplatten ausgestrichen und in der Regel über Nacht bei 37°C inkubiert.

## Zellbiologische Methoden

### Zelllinien

Es wurden Zelllinien von *The American Type Culture Collection* (ATCC) verwendet. Die Angabe in Klammer hinter der entsprechenden Zelllinie entspricht der jeweiligen ATCC-Referenznummer.

C33a	humane Cervixkarzinomzellen	ATCC (#HTB-31)
U2OS	humane Osteosarkomzellen	ATCC (#HTB-96)
HeLa	humane Cervix-Adenokarzinomzellen	ATCC (#CCL-2)
SAOS-2	humane Osteosarkomzellen	ATCC (#HTB-85)

### **Kultivierung von Säugerzellen**

Alle verwendeten Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen (Falcon) bei 37°C, 7.5% CO<sub>2</sub> und 96% Luftfeuchtigkeit in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (GIBCO-BRL) kultiviert. Das Nährmedium wurde mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (Biochrom) supplementiert. Bei Erreichen einer Dichte von ca. 80% wurden die Zellen geerntet. Hierfür wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit sterilem PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH 7.4]) gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Trypsin/EDTA Lösung (GIBCO-BRL) pro 150 cm<sup>2</sup> Flasche zugegeben und bis zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden 1:1 mit Medium verdünnt und für 4 min bei 400 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in frischem Nährmedium resuspendiert und je nach Bedarf zur weiteren Kultivierung 1:5 bis 1:10 verdünnt in frischen Kulturflaschen angesetzt oder für Experimente in Kulturschalen oder Platten ausgesät. Die Ermittlung der Zellzahl der Zellsuspension erfolgte durch Auszählen in einer Neubauerzählkammer.

### **Lagerung von Säugerzellen**

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

### **Transfektion von Säugerzellen**

C33a und SAOS Zellen wurden mittels der Calcium-Phosphat Methode transfiziert. Hierfür wurden 4x10<sup>6</sup> Zellen pro 10 cm Durchmesser großen Schale bzw. 5x10<sup>5</sup> Zellen pro 3.5 cm Durchmesser großen Vertiefung einer 6-*well* Platte ausgesät und am folgenden Tag transfiziert. Für einen Transfektionsansatz (1 ml Lösung pro 10 cm Durchmesser großen Schale bzw. 330 µl pro 3.5 cm großen Vertiefung einer 6-*well* Platte) wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß 12 µg Plasmid-DNA mit Wasser auf 450 µl aufgefüllt und mit 50 µl 2.5 M CaCl<sub>2</sub> Lösung gemischt. Dann wurden 500 µl 2x HBS Lösung (16.012 g NaCl, 0.744 g KCl, 9.532 g HEPES und 0.248 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pro Liter, auf pH 7.05 eingestellt) langsam tropfenweise am Rand des Gefäßes zugegeben, kurz durch Schütteln gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Transfektionslösung wurde nach kurzem Mischen tropfenweise gleichmäßig zum Medium der vorbereiteten Zellen gegeben und diese dann für 6 h im Brutschrank inkubiert. Nach Wechseln des Mediums wurden die Zellen zur Expression der cDNAs für weitere 36-48 h inkubiert.

U2OS Zellen wurden mit *Lipofectamine Plus* nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) in serumfreiem Medium transfiziert. Für eine 3.5 cm Durchmesser große Vertiefung einer 6-*well* Platte wurden 1.5 µg Plasmid-DNA verwendet.

### **Kolonieformationsstudien**

Um die Auswirkung der pRB-Expression auf das Wachstum von Zellen zu untersuchen, wurden 5x10<sup>5</sup> SAOS Zellen pro 3.5 cm Durchmesser großen Vertiefungen von 6-*well* Platten mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert

und nach 48 h im Verhältnis 1:3 auf 10 cm Durchmesser große Schalen überführt. Zellen, die die Konstrukte stabil integriert hatten, wurden ab dem folgenden Tag über drei Wochen mit 500 µg/ml G418 (PAA Laboratories) selektioniert, wobei alle 3-4 Tage das Medium gewechselt wurde. Die entstandenen Kolonien wurden mit Kristallviolett angefärbt, indem das Medium entfernt und die Zellen 20 min mit Kristallviolettlösung (0.5% Kristallviolett in 20% Methanol) inkubiert wurden. Nach gründlichem Waschen der Platten mit Wasser wurden die Platten mit den angefärbten Kolonien fotografiert.

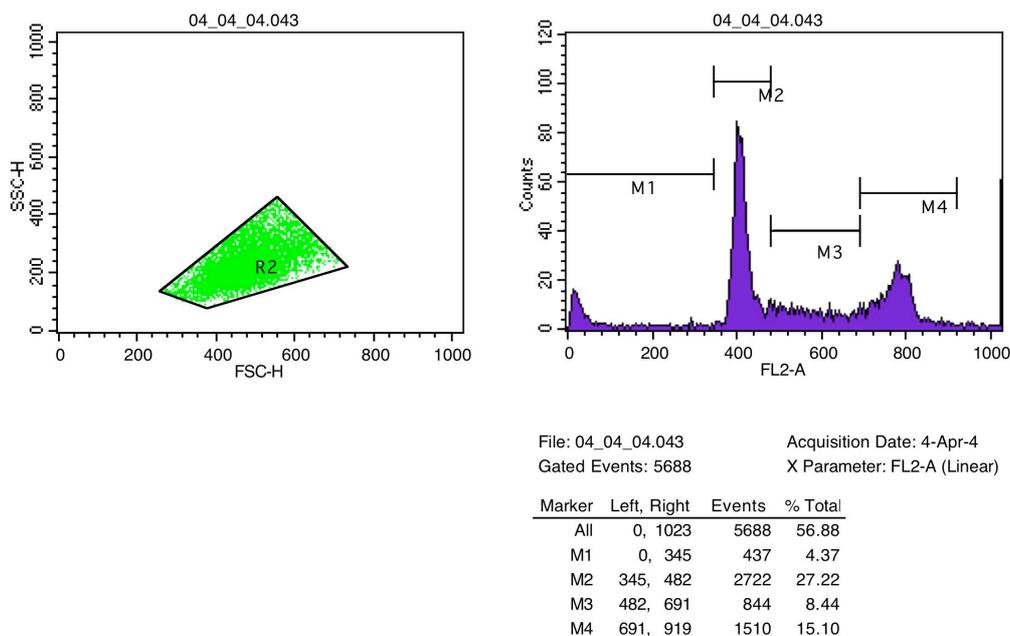
### **Herstellung der stabilen, für pRB-Konstrukte induzierbaren C33a Zelllinien**

Alle Schritte zur Herstellung der C33a Flp-In T-Rex Zelllinie wurden wie im Invitrogen-Protokoll angegeben durchgeführt. Zunächst wurde in einem ersten Schritt eine singuläre FRT-Stelle (*Flp recombination target*) stabil integriert. Hierzu wurden C33a Zellen mit dem Plasmid pFRT//lacZeo (Invitrogen) transfiziert und auf Zellen, die das Konstrukt stabil integriert hatten, durch die Zugabe von 0.15 mg/ml Zeocin zum Medium selektioniert. Über diese FRT-Stelle kann später gezielt cDNA durch Rekombination integriert werden. In einem zweiten Schritt wurden Zeocin-resistente Zellen mit dem Plasmid pcDNA6/TR (Invitrogen) transfiziert und auf Zellen selektioniert, die auch dieses Konstrukt stabil integriert hatten. Dies geschah durch die Zugabe von 7.5 µg/ml Blastocidin zum Medium. Diese Zellen exprimieren den Tet-Repressor unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors. Für den Integrationsschritt durch Rekombination an der FRT-Stelle wurden HA-pRB-WT und HA-pRB-K720R in den pcDNA5/FRT/TO-Vektor (Invitrogen) kloniert (siehe unten) und die oben beschriebenen stabilen C33a Flp-In T-Rex Zellen mit diesen Konstrukten jeweils zusammen mit einem Plasmid, das für die Flp-Rekombinase kodiert (pOG44, Invitrogen) transfiziert. Bei einer erfolgten Integration durch Rekombination an der FRT-Stelle kommt es zu einem Verlust der Zeocinresistenz und zur Entstehung von Hygromycinresistenz. Aus diesem Grund wurden die transfizierten Zellen auf Zeocinsensitivität und auf eine Resistenz gegenüber Hygromycin getestet. Hierzu wurde Hygromycin in einer Konzentration von 200 µg/ml eingesetzt. Anschließend wurden positive Klone expandiert und auf Induktion der HA-pRB-Spezies getestet. Da die Expression der entsprechenden HA-pRB-cDNAs durch den konstitutiv exprimierten Tet-Repressor reprimiert wird und somit durch Tetracyclin induzierbar ist, wurde im folgenden Schritt durch Zugabe von Tetracyclin (in einer Konzentration von 1 µg/ml) die Induktion der HA-pRB-Spezies im Westernblot getestet. Schließlich konnte eine für HA-pRB-WT und eine für HA-pRB-K720R induzierbare Zelllinie erhalten werden. Beide Zelllinien wurden immer in Anwesenheit von 7.5 µg/ml Blastocidin und 200 µg/ml Hygromycin kultiviert.

### **FACS-Analysen**

Für die Analyse der Zellzyklusverteilung wurden  $1 \times 10^6$  C33a Zellen durch Trypsinieren geerntet, einmal mit PBS gewaschen und in 0.5 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und durch die Zugabe von kaltem, 70%igen Ethanol für zwei Stunden auf Eis fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die fixierten Zellen in 1 ml Propidiumiodid-Lösung resuspendiert. Diese Lösung bestand aus 0.1% Triton-X-100, 20 µg/ml

Propidiumiodid und 20 µg/ml RNase in PBS. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurden die Zellen im Durchflußcytometer analysiert. Es wurde ein FACSCalibur 4CS-E1978 der Firma Becton Dickinson verwendet und folgende Einstellungen für das Cytometer vorgenommen: Als Detektionskanal diente FL2 mit der Einstellung *voltage* von 550, *ampGain* von 1.00 im linearen Modus. Pro FACS-Probe wurden 10000 Zellen gezählt, auf ihre Fluoreszenzsignale hin analysiert und diese Verteilung als graphische Auftragung der Fluoreszenzstärke pro Zelle (FL2) gegen die Zellzahl (*counts*) mit Hilfe von CellQuestPro (Becton Dickinson) dargestellt (vgl. Abbildung 30). Als Beispiel ist hier die Analyse von nichtinduzierten HA-pRB-WT C33a Zellen gezeigt (Abbildung 32, *file* 04\_04\_04.043). Zur Bestimmung der Zellzyklusphase wurde für jede FACS-Probe die Hauptzellpopulation ohne Aggregate und kleinere Partikel zur Analyse herangezogen (vgl. grüne R2-Population, Abbildung 32). Die gezeigte Population wurde für die restlichen Analysen ebenfalls angewendet. Anschließend wurde durch Integration unter den gesetzten M-Grenzen der Anteil der jeweiligen Zellpopulation bestimmt. M1 entspricht dabei apoptotischen Zellen, M2 entspricht Zellen in der G1-Phase, M3 entspricht Zellen in der S-Phase und M4 entspricht Zellen in der G2-Phase.



### Abbildung 32. Auswertung der FACS-Proben mit Hilfe von CellQuestPro (Becton Dickinson)

Wie im Text angegeben wurde zunächst die Zellpopulation eingegrenzt (linke Abbildung, grüne R2-Population). Anschließend erfolgte mit dieser Population die Analyse für die Zellzyklusphasen wie im Text angegeben (aufgetragen in der rechten Abbildung). Durch Integration unter den gesetzten M-Grenzen können die Zellen quantifiziert werden und die Population in den einzelnen Phasen, wie unter der rechten Abbildung angegeben, bestimmt werden. Als Beispiel ist hier die Analyse von nichtinduzierten C33a Zellen gezeigt. Somit ergab sich bei diesen Zellen folgende Aufteilung: 4,4% apoptotische Zellen, 27,2% Zellen in der G1-Phase, 8,4% Zellen in der S-Phase und 15,1% Zellen in der G2-Phase. Die anderen Proben wurden ebenso analysiert.

## Molekularbiologische Methoden

### Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde nach alkalischer Lyse von *E. coli* Zellen über Anionenaustauscher-Säulen der Firma Qiagen isoliert. Kleine DNA-Mengen (10-15  $\mu\text{g}$ ) wurden aus 4 ml Übernachtskultur und größere Mengen (500-800  $\mu\text{g}$ ) aus 250-ml-Kulturen isoliert. Die Reinigung der Plasmide mittels der Qiagen-Säulen erfolgte nach Angaben des Herstellers (Qiagen Plasmid-Handbuch).

### Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine optische Dichte von eins entspricht dabei einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  für doppelsträngige DNA.

### Restriktionsverdau von DNA

Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsenzymen wurde nach den allgemein üblichen Vorschriften durchgeführt. Die Restriktionsbedingungen für die jeweiligen Enzyme wurden den Empfehlungen der Hersteller (NEB) entsprechend gewählt, wobei die optimalen Salz-Konzentrationen und pH-Werte mit den 10x konzentrierten Puffern des Herstellers eingestellt wurden. Es wurden in der Regel 5 bis 10 U Enzym pro  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt. Die Restriktionsansätze wurden etwa 1 h für analytische und ca. 2 h für präparative Zwecke bei der für das jeweilige Enzym geeigneten Temperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 5x DNA-Probenpuffer (siehe unten) oder durch Hitzeinaktivierung des Enzyms abgestoppt.

### Dephosphorylierung von DNA

Um die Rezirkularisierung des Vektors in Ligationsreaktionen zu verhindern, wurden die 5'-Enden der DNA dephosphoryliert. Dies erfolgte in der Regel direkt nach dem Restriktionsverdau durch Zugabe von 5-10 U *Calf Intestine Phosphatase* (NEB) pro  $\mu\text{g}$  DNA zum Restriktionsansatz und Inkubation bei 37°C für 1 h. Es wurde darauf geachtet, dass die Pufferbedingungen im Ansatz für die Phosphatase geeignet waren.

### Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte über Gelelektrophorese, wobei je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente 0.7 bis 1.5%ige Agarosegele verwendet wurden. Die Agarose wurde in 1x TBE-Puffer (90 mM Tris/HCl [pH 8.3], 90 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA) aufgeköcht, nach Abkühlung mit Ethidiumbromid (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) versetzt und in Flachkammern mit Kämmen für die Geltaschen gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 10x DNA-Probenpuffer (0.5% SDS, 25% Glycerin, 25 mM EDTA und 0.25% Bromphenolblau) versetzt und je nach Gelgröße bei 90 bis 180 V Spannung mit 1x TBE als Laufpuffer aufgetrennt. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid kann die DNA auf einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und fotografiert werden. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte anhand eines parallel aufgetragenen Größenstandards (1 kb DNA-ladder, Invitrogen).

### Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Das zu isolierende DNA-Fragment wurde unter langwelligem UV-Licht (324 nm) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die DNA wurde mit Hilfe des *QiaExII Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus dem Gelstück isoliert und in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### Ligation von DNA

Die Mengen der für die Ligation eingesetzten DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen abgeschätzt. Für die Ligation wurden Fragment und Vektor in einem molaren Verhältnis von etwa 5:1 (ca. 100 ng Vektor) eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde mit 1 µl T4 DNA-Ligase (NEB) in 20 µl 1x Ligase-Puffer angesetzt und 2.5 h bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

### Sequenzieren von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden mit einem AbiPrism 377 DNA-Sequenzierer (Perkin Elmer) in der Arbeitsgruppe oder durch Firmen durchgeführt. Die Sequenzierreaktion sowie die nachfolgende Probenaufbereitung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit* (Amersham-Pharmacia). Ein Sequenzieransatz enthielt ca. 1 µg Plasmid-DNA und 20 pmol Primer.

### Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Standard-PCR-Reaktionen fanden in einem Volumen von 50 µl einfach konzentriertem PCR-Puffer (NEB ThermoPol Puffer) mit 50 ng Plasmid-DNA als Matrize, jeweils 0.2 mM dNTPs, 0.6 µM der entsprechenden Oligonukleotide (siehe Tabelle unten) und 0.5 U Vent-Polymerase (NEB) statt. Die Amplifikation wurde in einem *GeneAmp* Thermocycler der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Das Profil der Reaktion richtete sich nach der Länge und dem G/C-Gehalt der verwendeten Oligonukleotide und nach der Länge des zu erwartenden PCR-Fragments. In der Regel wurden, falls notwendig, lediglich die Temperaturen für die Primerbindung oder die Anzahl der Amplifikationszyklen optimiert.

Standard PCR-Reaktionen folgten dem Programm:

Initiale Denaturierung	5 min	94°C
25-40 Zyklen	30 sec	94°C
	30 sec	50°C bis 65°C
	1 min/1 kb	72°C
Endverlängerung	7 min	72°C
Lagerung	∞	4°C

PCR-Reaktionen wurden für die nachfolgende Verwendung entweder über ein Agarose-Gel oder mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### Zielgerichtete Mutagenese

Gezielte Austausch von Basen in cDNA-Sequenzen wurden über eine PCR-basierte Methode unter Verwendung des *QuickChange Kit* der Firma Stratagene vorgenommen. Hierzu wurden zwei komplementäre Oligonukleotide verwendet

(siehe Tabelle unten), die eine oder mehrere Punktmutationen gegenüber der Zielsequenz trugen und in die 5'- und 3'-Richtungen noch jeweils mindestens 15 bp der Zielsequenz aufwiesen, die vorzugsweise mit einem G oder C endeten. Es wurden 50  $\mu$ l Reaktionen mit 10 ng Plasmid-DNA und je 125 ng der entsprechenden Oligonukleotide wie vom Hersteller angegeben angesetzt und im Thermocycler wie folgt inkubiert: 1 min 95°C; 18 Zyklen (50 sec 95°C, 50 sec 58°C, 2 min/1 kb 68°C); 7 min 68°C;  $\infty$  4°C. Bei der Reaktion wurde das gesamte Plasmid amplifiziert. Die methylierte Plasmid-DNA der Matrize wurde anschließend durch einen DpnI-Verdau für 1 h bei 37°C beseitigt. Ein Aliquot des Ansatzes wurde anschließend direkt in *E. coli* XL10-Gold transformiert. Die eingefügten Mutationen wurden durch Sequenzierungen überprüft.

### **Konzentrationsbestimmung von RNA**

Die Bestimmung der RNA-Konzentration in wässrigen Lösungen erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine optische Dichte von eins entspricht dabei einer Konzentration von 40  $\mu$ g/ml RNA.

### **Isolierung von mRNA aus Säugerzellen**

Die Extraktion von polyadenylierter RNA (mRNA) aus Zellkulturen erfolgte mittels des *QuickPrep micro mRNA Purification Kit* (Amersham Pharmacia) wie vom Hersteller angegeben. Hierbei wurde gesamte RNA mit Guanidiniumthiocyanathaltigem Puffer aus den Zellen extrahiert und die polyadenylierte mRNA über Oligo(dT)-Zellulose isoliert. Nach mehreren Waschschrritten mit Hoch- und Niedrigsalzpuffer wurde die mRNA bei 65°C eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **RT-PCR**

Wie unten angegeben wurden einige cDNAs über RT-PCR aus mRNA von HeLa Zellen isoliert. Hierbei wurde mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden in einer reversen Transkriptionsreaktion zunächst einzelsträngige mRNA in DNA umgeschrieben und diese dann über eine PCR-Reaktion amplifiziert. Es wurde das *One-Step RT-PCR Kit* der Firma Qiagen verwendet. Die Reaktionen wurden, wie vom Hersteller angegeben, in 50  $\mu$ l mit 100 ng HeLa-mRNA als Matrize und jeweils 0.6  $\mu$ M der genspezifischen Oligonukleotide angesetzt. Zur Amplifikation im Thermocycler wurde folgendes Programm verwendet: 30 min 50°C (RT-Reaktion); 15 min 95°C (Inaktivierung der RT-Enzyme und Aktivierung der Taq-Polymerase); 35 Zyklen (30 sec 95°C, 30 sec 63°C, 1 min/1 kb 72°C); 10 min 72°C;  $\infty$  4°C. RT-PCR-Produkte wurden wie nach PCR-Reaktionen aufgereinigt, mit Restriktionsenzymen verdaut und in die entsprechenden Expressionsvektoren ligiert (siehe unten). Die Richtigkeit der RT-PCR Fragmente wurde durch Sequenzierungen überprüft.

## Plasmide, Klonierungen und Oligonukleotide

Plasmid	Herkunft
pSG5-HA-pRB	W. Kaelin, Howard Hughes Medical Institute, Dana-Farber Cancer Institute and Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts 02115, USA.
pGEX-pRB <i>large pocket</i>	W. Kaelin, Howard Hughes Medical Institute, Dana-Farber Cancer Institute and Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts 02115, USA.
pCMV-E2F	W. Kaelin, Howard Hughes Medical Institute, Dana-Farber Cancer Institute and Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts 02115, USA.
pRC-p53	Y. Haupt, Lautenberg Center for General and Tumor Immunology, Hadassah Medical School, The Hebrew University, Jerusalem, Israel.
pcDNA3-HA-pRB-ΔCDK	J. Bartek, Institute of Cancer Biology, Department of Cell Cycle and Cancer, Danish Cancer Society, Strandboulevarden 49, 2100 Copenhagen, Denmark.
pCMV-HA-p21	K. Helin, Biotech Research & Innovation Centre (BRIC) Fruebjergvej 3, 2100 Copenhagen O, Denmark.
pGL3-6xE2F-Luziferase	K. Helin, Biotech Research & Innovation Centre (BRIC) Fruebjergvej 3, 2100 Copenhagen O, Denmark.
pRSC-EGFP-DN-CDK2-HA	E. Nigg, Department of Cell Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany.
pRC-myc-Cyclin E	E. Nigg, Department of Cell Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany.
pSP73-RBF1	A. Brehm, Adolf-Butenandt-Institut, Lehrstuhl für Molekularbiologie, Ludwig-Maximilians-Universität, Schillerstrasse 44, 80336 München, Germany.
pcDNA3-HA-p107	M. Classon, MGH Cancer Center and Harvard Medical School, Bldg. 149, 13th St., Charlestown, MA 02129, USA.
pCMV-E7	M. Scheffner, Center for Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Cologne, Germany.
pCMV-E1A-12S	G. Akusjarvi, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala Biomedical Center, Husargatan 3, S-751 23 Uppsala, Sweden.
pCMV-E1A-13S	G. Akusjarvi, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala Biomedical Center, Husargatan 3, S-751 23 Uppsala, Sweden.
pGL3-4xGAL4-TATA-Luziferase	S. Souchelnytskyi, Uppsala University, Ludwig Institute for Cancer Research, Box 595, SE-75124, Uppsala, Sweden.
pGL3-4xGAL4-TK- Luziferase	S. Souchelnytskyi, Uppsala University, Ludwig Institute for Cancer Research, Box 595, SE-75124, Uppsala, Sweden.
pGL3-4xGAL4-SV40-Luziferase	S. Souchelnytskyi, Uppsala University, Ludwig Institute for Cancer Research, Box 595, SE-75124, Uppsala, Sweden.
pSG5-SUMO-1	S. Müller, Department of Molecular Cell Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany.
pSG5-HIS-SUMO-1	S. Müller, Department of Molecular Cell Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany.
pGEX-2TK-AOS1	S. Müller, Department of Molecular Cell Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany.
pET28a-UBA2	S. Müller, Department of Molecular Cell Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany.
pGEX-4T-1-Ubc9	S. Müller, Department of Molecular Cell Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany.
pQE-30-SUMO-1	S. Müller, Department of Molecular Cell Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany.
pQE-30-SUMO-2	S. Müller, Department of Molecular Cell Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany.
<i>pluciferase-T7-control</i>	Promega
pGL5 <i>luc (ami)</i>	Promega
pFRT/ <i>lacZeo</i>	Invitrogen
pcDNA6/TR	Invitrogen
pOG44	Invitrogen
pRL-SV40- <i>renilla reniformis</i>	Promega
pcDNA3-HA-pRB	diese Arbeit (siehe unten)
pcDNA3-HA-pRB-C706Y	diese Arbeit, zielgerichtete Mutagenese (siehe unten)
pcDNA3-HA-pRB-C712R	diese Arbeit, zielgerichtete Mutagenese (siehe unten)
pcDNA3-HA-pRB-K462,537,745R	diese Arbeit, zielgerichtete Mutagenese (siehe unten)
pcDNA3-HA-pRB-K720,722R	diese Arbeit, zielgerichtete Mutagenese (siehe unten)
pcDNA3-HA-pRB-K720R	diese Arbeit, zielgerichtete Mutagenese (siehe unten)
pcDNA3-HA-pRB-K722R	diese Arbeit, zielgerichtete Mutagenese (siehe unten)
pcDNA3-HA-pRB-YN756,757FA	diese Arbeit, zielgerichtete Mutagenese (siehe unten)
pcDNA3-HA-pRB-Y709A	diese Arbeit, zielgerichtete Mutagenese (siehe unten)
pcDNA3-HA-pRB-YN756,757FA,K720R	diese Arbeit, zielgerichtete Mutagenese (siehe unten)

pGEX-4T-1-E1A-13S	diese Arbeit (siehe unten)
pGEX-4T-1-E2F	diese Arbeit (siehe unten)
pGEX-4T-1-EID-1	diese Arbeit (siehe unten)
pCMV-Tag2B-EID-1	diese Arbeit (siehe unten)
pGEX-4T-1-HDAC-1	diese Arbeit (siehe unten)
pCMV-Tag2B-HDAC-1	diese Arbeit (siehe unten)
pBIND-pRB <i>large pocket</i>	diese Arbeit (siehe unten)
pBIND-pRB <i>large pocket</i> K720R	diese Arbeit (siehe unten)
pcDNA5/FRT/TO-HA-pRB	diese Arbeit (siehe unten)
pcDNA5/FRT/TO-HA-pRB-K720R	diese Arbeit (siehe unten)
pGEX-4T-1-E1A-13S-L122R,C124R	diese Arbeit, zielgerichtete Mutagenese (siehe unten)

pSG5-HA-pRB wurde mit HindIII und XhoI geschnitten um HA-pRB als Insert zu erhalten. pcDNA3 wurde mit HindIII und XhoI geschnitten und mit dem HA-pRB-Insert ligiert um pcDNA3-HA-pRB zu erhalten, das für die Transfektionen in Zellkulturzellen und für die *in vitro* Transkriptionen/ Translationen eingesetzt wurde.

Mit pCMV-E1A-13S als Matrize und den Oligonukleotiden #1 und #2 wurde eine PCR durchgeführt und das Produkt mit BamHI und EcoRI geschnitten um E1A-13S als Insert zu erhalten. pGEX-4T-1 wurde mit BamHI und EcoRI geschnitten und mit dem E1A-13S-Insert ligiert um pGEX-4T-1-E1A-13S zu erhalten, das für die Transformation von *E.coli* eingesetzt wurde.

Mit pCMV-E2F als Matrize und den Oligonukleotiden #3 und #4 wurde eine PCR durchgeführt und das Produkt mit BamHI und EcoRI geschnitten um E2F als Insert zu erhalten. pGEX-4T-1 wurde mit BamHI und EcoRI geschnitten und mit dem E2F-Insert ligiert um pGEX-4T-1-E2F zu erhalten, das für die Transformation von *E.coli* eingesetzt wurde.

Mit mRNA von HeLa Zellen und den Oligonukleotiden #5 und #6 wurde eine RT-PCR durchgeführt und das Produkt mit BamHI und EcoRI geschnitten um EID-1 als Insert zu erhalten. pGEX-4T-1 wurde mit BamHI und EcoRI geschnitten und mit dem EID-1-Insert ligiert um pGEX-4T-1-EID-1 zu erhalten, das für die Transformation von *E.coli* eingesetzt wurde. pCMV-Tag2B wurde mit BamHI und EcoRI geschnitten und mit dem EID-1-Insert ligiert um pCMV-Tag2B-EID-1 zu erhalten, das für die Transfektion von Zellkulturzellen eingesetzt wurde.

Mit mRNA von HeLa Zellen und den Oligonukleotiden #7 und #8 wurde eine RT-PCR durchgeführt und das Produkt mit BamHI und EcoRI geschnitten um HDAC-1 als Insert zu erhalten. pGEX-4T-1 wurde mit BamHI und EcoRI geschnitten und mit dem HDAC-1-Insert ligiert um pGEX-4T-1-HDAC-1 zu erhalten, das für die Transformation von *E.coli* eingesetzt wurde. pCMV-Tag2B wurde mit BamHI und EcoRI geschnitten und mit dem HDAC-1-Insert ligiert um pCMV-Tag2B-HDAC-1 zu erhalten, das für die Transfektion von Zellkulturzellen eingesetzt wurde.

Mit pcDNA3-HA-pRB-WT und pcDNA3-HA-pRB-K720R als Matrizen und den Oligonukleotiden #9 und #10 wurden PCRs durchgeführt und die Produkte mit BamHI und XbaI geschnitten um pRB *large pocket* WT und pRB *large pocket* K720R als Inserts zu erhalten. pBIND wurde mit BamHI und XbaI geschnitten und mit den pRB *large pocket* Inserts ligiert um pBIND-pRB *large pocket* WT und pBIND-pRB *large pocket* K720R zu erhalten, die für die Transfektion von Zellkulturzellen eingesetzt wurden.

pcDNA3-HA-pRB-WT und pcDNA3-HA-pRB-K720R wurden mit BamHI und XhoI geschnitten um HA-pRB-WT und HA-pRB-K720R als Inserts zu erhalten. pcDNA5/FRT/TO wurde mit BamHI und XhoI geschnitten und mit den HA-pRB-

Inserts ligiert um pcDNA5/FRT/TO-HA-pRB-WT und pcDNA5/FRT/TO-HA-pRB-K720R zu erhalten, die für die Integrationen über die FRT-Stelle in die C33a Flp-In T-Rex Zelllinie eingesetzt wurden.

Tabelle der für die PCR-Reaktionen eingesetzten Oligonukleotide:

#	Name	Sequenz (5'-3')
1	BamHI_E1A_13S_fw	cgcgatccatgagacataattatctgccac
2	E1A_13S_EcoRI_rev	cggaattcaataccggaccccgcaatg
3	BamHI_E2Faa88_fw	tatggatccgatggtgaagcggaggctggacctg
4	E2F_EcoRI_rev	cggaattctcagaaatccaggggggtg
5	BamHI_EID-1_fw	tatggatccatgtcggaaatggctgagttg
6	EID-1_EcoRI_rev	cggaattcctactctctatcaataatc
7	BamHI_HDAC-1_fw	tatggatccatggcgcagacgcagggcacc
8	HDAC-1_EcoRI_rev	cggaattctcaggccaacttgacctcc
9	BamHI_RB_lp_fw	acgcgatccgatgaacactatccaacaattaatg
10	RB_XbaI_rev	atgctctagatcatttctctctgtttgagg

Tabelle der zum Klonieren eingesetzten Plasmide:

Name	Herkunft
pGEX-4T-1	Amersham
pCMV-Tag-2	Stratagene
pcDNA3(+)	Invitrogen
pcDNA5/FRT/TO	Invitrogen
pBIND	Promega

Tabelle der für die zielgerichteten Mutagenesen eingesetzten Oligonukleotide:

Name	Sequenz (5'-3')	Matrizenplasmid	Entstandenes Plasmid
pRB-C706Y	gaccaaattatgatgtattccatgtatggcatatg	pcDNA3-HA-pRB	pcDNA3-HA-pRB-C706Y
pRB-C712R	ccatgtatggcatacgcgaaagtgaagaatatag	pcDNA3-HA-pRB	pcDNA3-HA-pRB-C712R
pRB-K462R	ggaatccatgcttagatcagaagaagaacg	pcDNA3-HA-pRB	pcDNA3-HA-pRB-K462R
pRB-K537R	gatcgaaagtattatcagagcagaaggcaacttg	pcDNA3-HA-pRB-K462R	pcDNA3-HA-pRB-K462,537R
pRB-K745R	caaacgtgtttgatcagagaagaggatgattc	pcDNA3-HA-pRB-K462,537R	pcDNA3-HA-pRB-K462,537,745R
pRB-K720,722R	gaatatagaccttagattcagaatcattgtaacagc	pcDNA3-HA-pRB	pcDNA3-HA-pRB-K720,722R
pRB-K720R	gaatatagaccttagattcagaatcattgtaacagc	pcDNA3-HA-pRB	pcDNA3-HA-pRB-K720R
pRB-K722R	gacctaaattcagaatcattgtaacag	pcDNA3-HA-pRB	pcDNA3-HA-pRB-K722R
pRB-YN756,757FA	gattctattatagtattcttgcctcggcttcatgcagag	pcDNA3-HA-pRB	pcDNA3-HA-pRB-YN756,757FA
pRB-Y709A	ttatgatgttccatggctgcatatgcaaaagtg	pcDNA3-HA-pRB	pcDNA3-HA-pRB-Y709A
pRB-K720R	gaatatagaccttagattcagaatcattgtaacagc	pcDNA3-HA-pRB-YN756,757FA	pcDNA3-HA-pRB-YN756,757FA, K720R
E1A-L122R,C124R	gaggatgatcgatccgcccacaaggctggcttt	pGEX-4T-1-E1A-13S	pGEX-4T-1-E1A-13S-L122R,C124R

Für jede PCR-Reaktion zur zielgerichteten Mutagenese (siehe oben) wurde neben dem hier aufgeführten Oligonukleotid jeweils ein zweites, genau umgekehrt komplementäres Oligonukleotid eingesetzt.

## Proteinbiochemische Methoden

### Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinbestimmungen wurden mit dem *Biorad-Proteinassay* (Biorad) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Standard wurde eine wässrige BSA-Lösung bekannter Konzentration verwendet.

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

Für die Auftrennung von Proteinen über denaturierende SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli wurden 7.5 -15%ige Trenngellösungen hergestellt (Angabe pro Gel: 3.12- 6.25 ml 30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamid, 3 ml 1.5 M Tris/HCl [pH 8.8], 125  $\mu$ l 10% SDS, auf 12.5 ml mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt, 75  $\mu$ l 10% APS, 30  $\mu$ l TEMED) und in hausgefertigte Gießkammern gegossen. Nach dem Gießen wurden die Trenngele mit 500  $\mu$ l Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde der Alkohol entfernt und ein 4%iges Sammelgel (Angabe pro Gel: 1.25 ml 30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamid, 1.87 ml 0.5 M Tris/HCl [pH 6.8], 75  $\mu$ l 10% SDS, 4.25 ml H<sub>2</sub>O, 50  $\mu$ l APS, 25  $\mu$ l TEMED) gegossen und die Geltaschen mit einem geeigneten Kamm gesteckt. Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer (6x Probenpuffer: 310 mM Tris/HCl [pH 6.8], 10% SDS, 3.5 M 2-Mercaptoethanol, 50% Glycerin, 1% Bromphenolblau) versetzt, durch Erhitzen für 5 min bei 95°C denaturiert, auf das Gel aufgetragen und bei einer Stromstärke von 140 V aufgetrennt (Molekulargewichtsstandard: *Precision Plus All blue Standards*, Biorad). Als Laufpuffer diente 60 mM Tris, 0.55% Glycin, 0.1% SDS.

### **Coomassiefärbung von Proteingelen**

Um Proteinbanden sichtbar zu machen wurden Polyacrylamidgele für 1 h bei RT in Coomassie-Lösung (0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 in 25% Methanol und 10% Essigsäure) gefärbt und anschließend durch wiederholtes Waschen mit Entfärbelösung (25% Methanol, 8% Essigsäure) entfärbt, bis der Hintergrund klar wurde.

### **Transfer auf Nitrocellulose-Membran**

Proteine wurden unmittelbar nach der Elektrophorese in einer hausgefertigten *Semidryblot*-Apparatur auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond-C Extra, Amersham) überführt. Hierzu wurden drei Whatman-Papiere in Gelgröße in Transferpuffer (250 mM Tris, 1.92 M Glycin, 0.1% SDS, 20% Methanol) getränkt und mit der in Wasser äquilibrierten und anschließend ebenfalls in Transferpuffer getränkten Membran, dem in Transferpuffer getränkten Gel und wiederum drei getränkten Whatman-Papieren überschichtet. Zum Entfernen von Luftblasen wurde einige Male mit einer Glaspipette über den Aufbau gerollt. Der Transfer erfolgte 1.5 h bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA.

### **Westernblot**

Zur Besetzung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulose-Membran mit den immobilisierten Proteinen 30 min bei RT in *blocking*-Puffer (Tropix) geschwenkt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte 1 h bei RT in PBS 0.1% Tween (PBS-T). Die Membran wurde dreimal für 10 min mit PBS-T gewaschen und anschließend mit einem sekundären, alkalische Phosphatase (AP)-markierten Antikörper in *blocking*-Puffer für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS-T wie oben erfolgte ein zweimaliger Waschschrift von je 2 min mit *assay*-Puffer (20 mM Tris/HCl [pH 9.8], 1 mM MgCl<sub>2</sub>) und anschließend die Detektion mittels Chemolumineszenz (*CDP-Star Western Kit*, Tropix) nach Herstellerangaben auf ECL-Hyperfilm (Amersham).

## Antikörper

Es wurden folgende Antikörper für Westernblots (WB) und die Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) eingesetzt:

Antikörper	Firma, Bestellnummer	Eingesetzte Verdünnung
Maus-Antikörper anti-HA (16B12)	Covance, MMS-101R	1:7500 für WB, 1:500 für IF
Maus-Antikörper anti-E1A	PharMingen, 554155	1:5000 für WB
Maus-Antikörper anti-pRB (4H1)	Cell Signaling, 9309	1:7500 für WB
Maus-Antikörper anti-pRB (hypoph.)	PharMingen, 554164	1:5000 für WB
Hase-Antikörper anti-SUMO-1 (FL-101)	Santa Cruz Biotechnology, sc-9060	1:200 für IF
Ziege-Antikörper anti-Maus-AP	Tropix, AC32ML	1:15000 für WB
Pferd-Antikörper anti-Maus-FITC	Vector Laboratories, FI-2000	1:300 für IF
Ziege-Antikörper anti-Hase-Cy3	Jackson, 111-165-003	1:200 für IF

### Nachweis von SUMO-Modifikation *in vivo* (direkte SDS-Lyse)

Die Modifikation von Proteinen mit SUMO wurde an exogen oder endogen exprimierten Substraten gezeigt. Dabei wurde wenn angegeben transfiziert und nach 36 bis 48 h durch direkte Zugabe von 250  $\mu$ l 1x SDS-Probenpuffer pro 3.5 cm Durchmesser großen Vertiefung einer 6-*well* Platte lysiert, das Lysat in ein Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei 95°C aufgeköcht. 20  $\mu$ l des Zelllysats wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Modifikation durch Westernblot gegen das Substrat nachgewiesen.

### Nachweis von SUMO-Modifikation *in vivo* (Anreicherung von Konjugaten)

Zellen wurden in 6 cm Durchmesser großen Schalen transfiziert und die mit HIS-SUMO konjugierten Proteine über Ni-NTA Agarose angereichert. Hierzu wurden die Zellen 48 h nach Transfektion mit 800  $\mu$ l denaturierendem Nickel-Lysepuffer (6 M Guanidiniumhydrochlorid, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris/HCl [pH 8.0]) versetzt, in ein FACS-Röhrchen überführt und 3 x 15 sec bei 20% sonifiziert (Sonopuls HD2200, Bandelin). Nach Überführen in ein Eppendorfgefäß und einer einminütigen Zentrifugation bei 13000 g wurde der Überstand für die Anreicherung verwendet. 50  $\mu$ l davon wurden zunächst einer TCA-Präzipitation unterzogen und später als *input* mit aufs Gel aufgetragen. Die restlichen 750  $\mu$ l wurden über Nacht mit 20  $\mu$ l magnetischen Ni-NTA Agarose Kügelchen (Qiagen) bei RT inkubiert. Die magnetischen Kügelchen wurden je dreimal mit 800  $\mu$ l Waschpuffer A (8 M Harnstoff, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris/HCl [pH 8.0]) und B (8 M Harnstoff, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris/HCl [pH 6.8]) sowie einmal mit PBS gewaschen und für fünf min in 60  $\mu$ l 1x SDS-Probenpuffer aufgeköcht. Anschließend erfolgte eine Gelelektrophorese sowie ein Westernblot.

### Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus *E. coli*

*E. coli* BL21 Zellen wurden mit pGEX-Vektoren, die für die eingesetzten GST-Fusionen kodieren, transformiert und die Genexpression bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 0.5 mit 1 mM IPTG induziert. Die Expression fand für 3 h bei 30°C statt. Die abgeernteten Zellen wurden in 5 ml GST-Lysepuffer (PBS, 1 mM PMSF, 1mM DTT und 1 mg/ml Lysozym) pro Gramm Feuchtwicht resuspendiert und 30 min bei 4°C inkubiert. Nach einem 2 minütigen Zellaufschluss durch Sonifizieren (Sonopuls HD2200, Bandelin) wurde die Zellsuspension erneut für 30 Minuten bei 4°C nach Zugabe von Triton zu einer Endkonzentration von 1% unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation für 40 min bei 20000 g und

4°C entfernt und das Lysat mit Glutathion-Sepharose Kügelchen (Amersham) für mehrere Stunden oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschschrritten mit Waschpuffer (wie Lysepuffer ohne Lysozym) wurden gebundene Proteine in GST-Elutionspuffer (10 mM Tris/HCl [pH 8.0], 10 mM Glutathion) eluiert, gegen PBS dialysiert, gegebenenfalls mit einer *speed-vac* Zentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf) einkonzentriert und in PBS/10% Glycerin bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **Native Aufreinigung von HIS-Fusionsproteinen aus *E. coli***

*E. coli* BL21 Zellen wurden mit pQE-30-Vektoren, die für die eingesetzten HIS-Fusionen kodieren, transformiert und die Genexpression bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 0.5 mit 1 mM IPTG induziert. Die Expression fand für 3 h bei 30°C statt. Die abgeernteten Zellen wurden in 5 ml Ni-NTA-Reinigungspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH 8.0], 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) mit 2 mM PMSF, *Complete EDTA-free* Proteaseinhibitoren (Boehringer) und 1 mg/ml Lysozym pro Gramm Feuchtgewicht resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 2 minütigen Zellaufschluss durch Sonifizieren (Sonopuls HD2200, Bandelin) wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 40 min bei 20000 g und 4°C entfernt. Das Lysat wurde mit Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose (Qiagen) für mehrere Stunden oder über Nacht bei 4°C inkubiert und gebundene Proteine nach drei Waschschrritten mit Ni-NTA-Reinigungspuffer in Ni-NTA-Elutionspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH 8.0], 150 mM NaCl, 250 mM Imidazol) eluiert. Die Proteine wurden gegen PBS dialysiert, gegebenenfalls mit einer *speed-vac* Zentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf) einkonzentriert und in PBS/10% Glycerin bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

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

Substrate wurden entweder durch *in vitro* Transkription/Translation (*TNT quick coupled reticulocyte lysate system Kit*, Promega) hergestellt und bei der Translation durch die Zugabe von <sup>35</sup>S-Methionin mit <sup>35</sup>S markiert. Alternativ wurde rekombinantes GST-pRB *large pocket* verwendet. Die Detektion von SUMO-Konjugaten erfolgte dementsprechend entweder durch Autoradiographie oder durch Coomassie-Färbung. Die *in vitro* Modifikation erfolgte in einem 20 µl Ansatz mit 2 µl Translationsprodukt bzw. 50 ng rekombinantem Protein und 100 ng E1 bestehend aus GST-AOS1 und HIS-UBA2, 50 ng Ubc9, 3 µg HIS-SUMO-1 oder HIS-SUMO-2 wie angegeben in Modifikationspuffer (50 mM Tris/HCl [pH 7.5], 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP) für 2 h bei 30°C. Bei den Inhibitionsstudien wurden 10 pmol des entsprechenden GST-Proteins bzw. 300 pmol des jeweiligen Peptids pro Ansatz zugegeben. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 6x SDS-Probenpuffer abgestoppt, für 5 min bei 95°C aufgeköcht und durch Gelelektrophorese aufgetrennt.

### **GST-Bindungsstudien (*pulldowns*)**

Für GST-Bindungsstudien mit Zellextrakt wurden transfizierte C33a Zellen durch Trypsinieren geerntet und nach Waschen in eiskaltem PBS/20 mM NEM für 20 min auf Eis in Lysepuffer (50 mM HEPES [pH 7.4], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,1% NP-40, 20 mM NEM, *Complete EDTA-free* Proteaseinhibitoren (Boehringer)) lysiert. Zelltrümmer wurden für 20 min bei 20000 g und 4°C abzentrifugiert und der

Überstand für Bindungsstudien eingesetzt. Für *in vitro* Bindungsstudien wurden <sup>35</sup>S-markierte, durch *in vitro* Transkription/Translation hergestellte (*TNT quick coupled reticulocyte lysate system Kit*, Promega) Proteine eingesetzt. Diese wurden in Bindungspuffer (50 mM Tris/HCl [pH 8.0], 120 mM NaCl, 0,25% NP-40, 1 mM PMSF, 1 mM DTT) mit den entsprechenden GST-Fusionsproteinen auf Glutathion-Sepharose Kügelchen für mindestens 4 h bei 4°C inkubiert. Wurde Zellextrakt eingesetzt, so fand die Inkubation zur Bindung in Lysepuffer statt. Nach dreimaligem Waschen in entsprechendem Puffer für 15 min wurden gebundene Proteine durch Kochen für 5 min bei 95°C in 1x SDS-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie bzw. Westernblot analysiert.

### Reportergenexperimente

Für die Experimente mit den Reporterplasmiden mit GAL4-Bindungsstellen in den Promotoren zur Expression der *firefly* Luziferase (pGL3-4xGAL4-TATA-Luziferase, pGL3-4xGAL4-TK-Luziferase, pGL3-4xGAL4-SV40-Luziferase, pGL5/*luc*) wurden C33a Zellen transient transfiziert. Es wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen in 1.8 cm Durchmesser großen Vertiefungen von 12-*well* Platten ausgesät und wie angegeben entweder mit 750 ng pBIND, pBIND-pRB-WT oder pBIND-pRB-K720R sowie mit 750 ng des jeweiligen Reporterplasmids (siehe oben) transfiziert. Zur Normalisierung der Transfektion wurden die Zellen mit 150 ng eines Kontrollvektors kotransfiziert (pRL-SV40-*renilla reniformis*, Promega). 48 h nach Transfektion wurden die Zellen in 150 µl passivem Lysepuffer lysiert, von denen 20 µl mit dem *Dual Luziferase Reporter Assay* (Promega) nach Angaben des Herstellers in einem Berthold Lumat LB9507 analysiert wurden.

Das Transaktivierungspotenzial von E2F und der Einfluss von pRB darauf wurde durch ein anderes Reporterplasmid bestimmt. Hierzu wurden  $3 \times 10^5$  entweder mit HA-pRB-WT oder mit HA-pRB-K720R induzierbare C33a Zellen in 3.5 cm Durchmesser großen Vertiefungen von 6-*well* Platten mit 500 ng pSG5-SUMO-1 und 500 ng eines *firefly* Luziferase-Reporterplasmids (pGL3-6xE2F-Luziferase) transfiziert. Zur Normalisierung der Transfektion wurden die Zellen mit 50 ng eines Kontrollvektors kotransfiziert (pRL-SV40-*renilla reniformis*, Promega). 24 h nach Transfektion wurde die HA-pRB-Expression durch Zugabe von Tetracyclin zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml induziert und wiederum 24 h später wurden die Zellen in 300 µl passivem Lysepuffer lysiert und davon 20 µl wie oben angegeben mit dem *Dual Luziferase Reporter Assay* (Promega) nach Angaben des Herstellers in einem Berthold Lumat LB9507 analysiert.

### Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden SAOS Zellen in 3.5 cm Durchmesser großen Vertiefungen von 6-*well* Platten auf sterilen Deckgläschen ausgesät und wie angegeben transfiziert. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung durch Zugabe von 4% para-Formaldehyd in PBS für 10 min bei RT. Permeabilisiert wurden die Zellen danach durch die Zugabe von 0.5% Triton X-100 in PBS für 15 min bei RT. Anschließend wurde zweimal mit PBS und einmal mit PBS-T gewaschen. Die Zellkerne wurden durch eine Inkubation von 2 min bei RT mit 50 µg/ml 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI, Merck) in PBS angefärbt und

wiederum dreimal mit PBS und einmal mit PBS-T gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe des ersten Antikörpergemisches in PBS für 1.5 h bei RT. Der monoklonale HA-Antikörper wurde hierzu 1:500, der polyklonale SUMO-1-Antikörper 1:200 verdünnt (siehe Antikörpertabelle oben). Anschließend wurde erneut zweimal mit PBS und einmal mit PBS-T gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe der zweiten Antikörper. Das anti-Maus-FITC-Konjugat bzw. das anti-Hase-Cy3-Konjugat (siehe Antikörpertabelle oben) wurde hierbei 1:300 bzw. 1:200 in PBS verdünnt. Zum Schluss wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden dann mit *mounting* Medium (0,5% para-Phenyldiamin in 20 mM Tris/HCl [pH 9.0], 90% Glycerin) auf Objektträger aufgebracht und mit Nagellack fixiert.

Die Objektive wurden anschließend an einem digitalen *imaging* System (Openlab, Version 4.0.3, Improvion Systems, Heidelberg) analysiert. Hierzu wurde ein Leica Mikroskop (DM RXA) mit einem plan-achromatischen Phasenkontrastobjektiv (PL APO, PH3) mit einer Vergrößerung von 63x bei Verwendung von Immersionsöl benutzt. Zur Fluoreszenzanregung wurde das polychromatische Anregungslicht einer Xenon-Bogenlampe über einen Monochromator (Photonics) gelenkt. Das vom Objektiv emittierte Fluoreszenzlicht wird dabei über einen dichroischen Spiegel und durch einen Emissionsfilter gelenkt. Dabei wurden folgende Anregungswellenlängen und Filtersets benutzt:

Fluorophor	Anregungs- wellenlänge	Emissions- wellenlänge	Filtersets	Hersteller
DAPI	359 nm	461 nm	49000	Chroma Technology Corp.
Cy3	558 nm	568 nm	41007	Chroma Technology Corp.
FITC	495 nm	519 nm	41012	Chroma Technology Corp.

Bilder wurden mit einer Digitalkamera (Hamamatsu C4742-95) aufgenommen und mit der Openlab Software (Improvion) bearbeitet. Zur Unschärfeseitigung wurde der *nearest neighbour* Algorithmus benutzt. Hierzu werden Daten dreier Bilder entlang einer z-Achse (*z-spacing* 0.5  $\mu\text{m}$ ) zur Berechnung verwendet (gewählte Parameter: *Auto Gain*, *Removal* 0.25).

## Computeranalysen

Datenbankrecherchen (Sequenzsuche und Sequenzvergleiche sowie Literaturrecherchen) wurden mit Hilfe des *national centers for biotechnology information* (ncbi, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt. Für Sequenzanalysen (Erstellen von Restriktionskarten, Auswertung von DNA-Sequenzierungen, Vergleiche von DNA- und Proteinsequenzen und Oligonukleotiddesign) wurde das Programmpaket DNA-Star (DNA-Star Inc.) verwendet. Gelfilme wurden mit einem AGFA Scanner (Arcus II) digitalisiert und mit dem Programm Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.) bearbeitet. Die Erstellung von Texten, Tabellen, Graphiken und Abbildungen sowie die Auswertung von Messdaten erfolgte mit Hilfe des Microsoft Office Pakets (Microsoft Corp.).

## 6. Literatur

Adams, P. D. (2001). Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochim Biophys Acta* 1471, M123-33.

Ait-Si-Ali, S., V. Guasconi, L. Fritsch, H. Yahy, R. Sekhri, I. Naguibneva, P. Robin, F. Cabon, A. Poleskaya and A. Harel-Bellan (2004). A Suv39h-dependent mechanism for silencing S-phase genes in differentiating but not in cycling cells. *Embo J* 23, 605-15.

Alexander, K. and P. W. Hinds (2001). Requirement for p27(KIP1) in retinoblastoma protein-mediated senescence. *Mol Cell Biol* 21, 3616-31.

Baba, D., N. Maita, J. G. Jee, Y. Uchimura, H. Saitoh, K. Sugasawa, F. Hanaoka, H. Tochio, H. Hiroaki and M. Shirakawa (2005). Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1. *Nature* 435, 979-82.

Barbie, D. A., L. A. Conlan and B. K. Kennedy (2005). Nuclear tumor suppressors in space and time. *Trends Cell Biol* 15, 378-85.

Bayer, P., A. Arndt, S. Metzger, R. Mahajan, F. Melchior, R. Jaenicke and J. Becker (1998). Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280, 275-86.

Bernier-Villamor, V., D. A. Sampson, M. J. Matunis and C. D. Lima (2002). Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* 108, 345-56.

Boyer, S. N., D. E. Wazer and V. Band (1996). E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* 56, 4620-4.

Brehm, A., E. A. Miska, D. J. McCance, J. L. Reid, A. J. Bannister and T. Kouzarides (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391, 597-601.

Brown, V. D. and B. L. Gallie (2002). The B-domain lysine patch of pRB is required for binding to large T antigen and release of E2F by phosphorylation. *Mol Cell Biol* 22, 1390-401.

Carreira, S., J. Goodall, I. Aksan, S. A. La Rocca, M. D. Galibert, L. Denat, L. Larue and C. R. Goding (2005). Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature* 433, 764-9.

Cavenee, W. K., T. P. Dryja, R. A. Phillips, W. F. Benedict, R. Godbout, B. L. Gallie, A. L. Murphree, L. C. Strong and R. L. White (1983). Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305, 779-84.

Chan, H. M., M. Krstic-Demonacos, L. Smith, C. Demonacos and N. B. La Thangue (2001). Acetylation control of the retinoblastoma tumour-suppressor protein. *Nat Cell Biol* 3, 667-74.

Chan, H. M., L. Smith and N. B. La Thangue (2001). Role of LXCXE motif-dependent interactions in the activity of the retinoblastoma protein. *Oncogene* 20, 6152-63.

Chau, B. N. and J. Y. Wang (2003). Coordinated regulation of life and death by RB. *Nat Rev Cancer* 3, 130-8.

Chellappan, S., V. B. Kraus, B. Kroger, K. Munger, P. M. Howley, W. C. Phelps and J. R. Nevins (1992). Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4549-53.

Chen, P. L., D. J. Riley, Y. Chen and W. H. Lee (1996). Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. *Genes Dev* 10, 2794-804.

Classon, M. and N. Dyson (2001). p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp Cell Res* 264, 135-47.

Classon, M., B. K. Kennedy, R. Mulloy and E. Harlow (2000). Opposing roles of pRB and p107 in adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10826-31.

Cobrinik, D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 24, 2796-809.

Dahiya, A., M. R. Gavin, R. X. Luo and D. C. Dean (2000). Role of the LXCXE binding site in Rb function. *Mol Cell Biol* 20, 6799-805.

Desterro, J. M., M. S. Rodriguez and R. T. Hay (1998). SUMO-1 modification of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell* 2, 233-9.

Dick, F. A. and N. J. Dyson (2002). Three regions of the pRB pocket domain affect its inactivation by human papillomavirus E7 proteins. *J Virol* 76, 6224-34.

Dick, F. A. and N. Dyson (2003). pRB contains an E2F1-specific binding domain that allows E2F1-induced apoptosis to be regulated separately from other E2F activities. *Mol Cell* 12, 639-49.

Dick, F. A., E. Sailhamer and N. J. Dyson (2000). Mutagenesis of the pRB pocket reveals that cell cycle arrest functions are separable from binding to viral oncoproteins. *Mol Cell Biol* 20, 3715-27.

Dohmen, R. J. (2004). SUMO protein modification. *Biochim Biophys Acta* *1695*, 113-31.

Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* *12*, 2245-62.

Enenkel, C., A. Lehmann and P. M. Kloetzel (1999). GFP-labelling of 26S proteasomes in living yeast: insight into proteasomal functions at the nuclear envelope/rough ER. *Mol Biol Rep* *26*, 131-5.

Fang, D. and T. K. Kerppola (2004). Ubiquitin-mediated fluorescence complementation reveals that Jun ubiquitinated by Itch/AIP4 is localized to lysosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 14782-7.

Fattman, C. L., S. M. Delach, Q. P. Dou and D. E. Johnson (2001). Sequential two-step cleavage of the retinoblastoma protein by caspase-3/-7 during etoposide-induced apoptosis. *Oncogene* *20*, 2918-26.

Fischle, W., Y. Wang and C. D. Allis (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* *15*, 172-83.

Francke, U. and F. Kung (1976). Sporadic bilateral retinoblastoma and 13q-chromosomal deletion. *Med Pediatr Oncol* *2*, 379-85.

Friend, S. H., R. Bernards, S. Rogelj, R. A. Weinberg, J. M. Rapaport, D. M. Albert and T. P. Dryja (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* *323*, 643-6.

Gill, G. (2005). Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev* *15*, 536-41.

Girdwood, D., D. Bumpass, O. A. Vaughan, A. Thain, L. A. Anderson, A. W. Snowden, E. Garcia-Wilson, N. D. Perkins and R. T. Hay (2003). P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* *11*, 1043-54.

Gocke, C. B., H. Yu and J. Kang (2005). Systematic identification and analysis of mammalian small ubiquitin-like modifier substrates. *J Biol Chem* *280*, 5004-12.

Goldknopf, I. L. and H. Busch (1977). Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24. *Proc Natl Acad Sci U S A* *74*, 864-8.

Goldstein, G., M. Scheid, U. Hammerling, D. H. Schlesinger, H. D. Niall and E. A. Boyse (1975). Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *72*, 11-5.

Guo, A., P. Salomoni, J. Luo, A. Shih, S. Zhong, W. Gu and P. P. Pandolfi (2000). The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 2, 730-6.

Guo, D., J. Han, B. L. Adam, N. H. Colburn, M. H. Wang, Z. Dong, D. L. Eizirik, J. X. She and C. Y. Wang (2005). Proteomic analysis of SUMO4 substrates in HEK293 cells under serum starvation-induced stress. *Biochem Biophys Res Commun* 337, 1308-18.

Hang, J. and M. Dasso (2002). Association of the human SUMO-1 protease SENP2 with the nuclear pore. *J Biol Chem* 277, 19961-6.

Hannich, J. T., A. Lewis, M. B. Kroetz, S. J. Li, H. Heide, A. Emili and M. Hochstrasser (2005). Defining the SUMO-modified proteome by multiple approaches in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280, 4102-10.

Harbour, J. W. and D. C. Dean (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 14, 2393-409.

Harbour, J. W., R. X. Luo, A. Dei Santi, A. A. Postigo and D. C. Dean (1999). Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* 98, 859-69.

Hardeland, U., R. Steinacher, J. Jiricny and P. Schar (2002). Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *Embo J* 21, 1456-64.

Hay, R. T. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18, 1-12.

Helin, K., E. Harlow and A. Fattaey (1993). Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 13, 6501-8.

Helt, A. M. and D. A. Galloway (2003). Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins. *Carcinogenesis* 24, 159-69.

Hicke, L. and R. Dunn (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 141-72.

Hietakangas, V., J. Anckar, H. A. Blomster, M. Fujimoto, J. J. Palvimo, A. Nakai and L. Sistonen (2006). PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 45-50.

Higashitsuji, H., K. Itoh, T. Nagao, S. Dawson, K. Nonoguchi, T. Kido, R. J. Mayer, S. Arii and J. Fujita (2000). Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. *Nat Med* 6, 96-9.

- Hoege, C., B. Pfander, G. L. Moldovan, G. Pyrowolakis and S. Jentsch (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* *419*, 135-41.
- Huang, H. J., J. K. Yee, J. Y. Shew, P. L. Chen, R. Bookstein, T. Friedmann, E. Y. Lee and W. H. Lee (1988). Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. *Science* *242*, 1563-6.
- Jentsch, S. and G. Pyrowolakis (2000). Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol* *10*, 335-42.
- Johnson, E. S. (2004). Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* *73*, 355-82.
- Johnson, E. S. and G. Blobel (1997). Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J Biol Chem* *272*, 26799-802.
- Johnson, E. S., I. Schwienhorst, R. J. Dohmen and G. Blobel (1997). The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *Embo J* *16*, 5509-19.
- Kaelin, W. G., Jr., D. C. Pallas, J. A. DeCaprio, F. J. Kaye and D. M. Livingston (1991). Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell* *64*, 521-32.
- Kagey, M. H., T. A. Melhuish and D. Wotton (2003). The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* *113*, 127-37.
- Kalejta, R. F. and T. Shenk (2003). Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of the Rb family of tumor suppressors by the human cytomegalovirus pp71 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 3263-8.
- Kannouche, P. L., J. Wing and A. R. Lehmann (2004). Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Mol Cell* *14*, 491-500.
- Kehn, K., L. Fuente Cde, K. Strouss, R. Berro, H. Jiang, J. Brady, R. Mahieux, A. Pumfery, M. E. Bottazzi and F. Kashanchi (2005). The HTLV-I Tax oncoprotein targets the retinoblastoma protein for proteasomal degradation. *Oncogene* *24*, 525-40.
- Klionsky, D. J. and Y. Ohsumi (1999). Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* *15*, 1-32.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* *68*, 820-3.

Korenjak, M. and A. Brehm (2005). E2F-Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development. *Curr Opin Genet Dev* 15, 520-7.

Kovesdi, I., R. Reichel and J. R. Nevins (1987). Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 2180-4.

Kuo, H. Y., C. C. Chang, J. C. Jeng, H. M. Hu, D. Y. Lin, G. G. Maul, R. P. Kwok and H. M. Shih (2005). SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-binding protein via the recruitment of Daxx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16973-8.

La Thangue, N. B. and P. W. Rigby (1987). An adenovirus E1A-like transcription factor is regulated during the differentiation of murine embryonal carcinoma stem cells. *Cell* 49, 507-13.

Lammer, D., N. Mathias, J. M. Laplaza, W. Jiang, Y. Liu, J. Callis, M. Goebel and M. Estelle (1998). Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin-related protein rub1p affects function of the SCFCdc4 complex. *Genes Dev* 12, 914-26.

Ledl, A., D. Schmidt and S. Muller (2005). Viral oncoproteins E1A and E7 and cellular LxCxE proteins repress SUMO modification of the retinoblastoma tumor suppressor. *Oncogene* 24, 3810-8.

Lee, C., J. H. Chang, H. S. Lee and Y. Cho (2002). Structural basis for the recognition of the E2F transactivation domain by the retinoblastoma tumor suppressor. *Genes Dev* 16, 3199-212.

Lee, C. and Y. Cho (2002). Interactions of SV40 large T antigen and other viral proteins with retinoblastoma tumour suppressor. *Rev Med Virol* 12, 81-92.

Lee, J. O., A. A. Russo and N. P. Pavletich (1998). Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature* 391, 859-65.

Lei, M. and B. K. Tye (2001). Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci* 114, 1447-54.

Li, H., C. Leo, J. Zhu, X. Wu, J. O'Neil, E. J. Park and J. D. Chen (2000). Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol Cell Biol* 20, 1784-96.

Li, S. J. and M. Hochstrasser (1999). A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* 398, 246-51.

- Li, T., E. Evdokimov, R. F. Shen, C. C. Chao, E. Tekle, T. Wang, E. R. Stadtman, D. C. Yang and P. B. Chock (2004). Sumoylation of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, zinc finger proteins, and nuclear pore complex proteins: a proteomic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 8551-6.
- Lin, X., B. Sun, M. Liang, Y. Y. Liang, A. Gast, J. Hildebrand, F. C. Brunicardi, F. Melchior and X. H. Feng (2003). Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. *Mol Cell* *11*, 1389-96.
- Lindahl, T. and R. D. Wood (1999). Quality control by DNA repair. *Science* *286*, 1897-905.
- Ludlow, J. W., C. L. Glendening, D. M. Livingston and J. A. DeCarrio (1993). Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* *13*, 367-72.
- Lukas, J., T. Herzinger, K. Hansen, M. C. Moroni, D. Resnitzky, K. Helin, S. I. Reed and J. Bartek (1997). Cyclin E-induced S phase without activation of the pRb/E2F pathway. *Genes Dev* *11*, 1479-92.
- Luo, R. X., A. A. Postigo and D. C. Dean (1998). Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* *92*, 463-73.
- MacLellan, W. R., G. Xiao, M. Abdellatif and M. D. Schneider (2000). A novel Rb- and p300-binding protein inhibits transactivation by MyoD. *Mol Cell Biol* *20*, 8903-15.
- Magnaghi-Jaulin, L., R. Groisman, I. Naguibneva, P. Robin, S. Lorain, J. P. Le Villain, F. Trouche, D. Trouche and A. Harel-Bellan (1998). Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* *391*, 601-5.
- Mahajan, R., C. Delphin, T. Guan, L. Gerace and F. Melchior (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* *88*, 97-107.
- Matunis, M. J., E. Coutavas and G. Blobel (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*, 1457-70.
- Melchior, F., M. Schergaut and A. Pichler (2003). SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends Biochem Sci* *28*, 612-8.
- Mendoza, H. M., L. N. Shen, C. Botting, A. Lewis, J. Chen, B. Ink and R. T. Hay (2003). NEDP1, a highly conserved cysteine protease that deNEDDylates Cullins. *J Biol Chem* *278*, 25637-43.

Minty, A., X. Dumont, M. Kaghad and D. Caput (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, 36316-23.

Miyake, S., W. R. Sellers, M. Safran, X. Li, W. Zhao, S. R. Grossman, J. Gan, J. A. DeCaprio, P. D. Adams and W. G. Kaelin, Jr. (2000). Cells degrade a novel inhibitor of differentiation with E1A-like properties upon exiting the cell cycle. *Mol Cell Biol* 20, 8889-902.

Morris, E. J. and N. J. Dyson (2001). Retinoblastoma protein partners. *Adv Cancer Res* 82, 1-54.

Muller, S., C. Hoege, G. Pyrowolakis and S. Jentsch (2001). SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 202-10.

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

Muller, S., M. J. Matunis and A. Dejean (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 W. P. Tansey (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 192-201.

Nacerddine, K., F. Lehembre, M. Bhaumik, J. Artus, M. Cohen-Tannoudji, C. Babinet, P. P. Pandolfi and A. Dejean (2005). The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell* 9, 769-79.

Nahle, Z., J. Polakoff, R. V. Davuluri, M. E. McCurrach, M. D. Jacobson, M. Narita, M. Q. Zhang, Y. Lazebnik, D. Bar-Sagi and S. W. Lowe (2002). Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol* 4, 859-64.

Narita, M., S. Nunez, E. Heard, A. W. Lin, S. A. Hearn, D. L. Spector, G. J. Hannon and S. W. Lowe (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703-16.

Nguyen, D. X., L. A. Baglia, S. M. Huang, C. M. Baker and D. J. McCance (2004). Acetylation regulates the differentiation-specific functions of the retinoblastoma protein. *Embo J* 23, 1609-18.

Nielsen, S. J., R. Schneider, U. M. Bauer, A. J. Bannister, A. Morrison, D. O'Carroll, R. Firestein, M. Cleary, T. Jenuwein, R. E. Herrera and T. Kouzarides (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 412, 561-5.

Pascual, G., A. L. Fong, S. Ogawa, A. Gamliel, A. C. Li, V. Perissi, D. W. Rose, T. M. Willson, M. G. Rosenfeld and C. K. Glass (2005). A SUMOylation-dependent

pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 437, 759-63.

Pennaneach, V., I. Salles-Passador, A. Munshi, H. Brickner, K. Regazzoni, F. Dick, N. Dyson, T. T. Chen, J. Y. Wang, R. Fotedar and A. Fotedar (2001). The large subunit of replication factor C promotes cell survival after DNA damage in an LxCxE motif- and Rb-dependent manner. *Mol Cell* 7, 715-27.

Pfander, B., G. L. Moldovan, M. Sacher, C. Hoege and S. Jentsch (2005). SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* 436, 428-33.

Pichler, A., A. Gast, J. S. Seeler, A. Dejean and F. Melchior (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 108, 109-20.

Qin, X. Q., T. Chittenden, D. M. Livingston and W. G. Kaelin, Jr. (1992). Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product. *Genes Dev* 6, 953-64.

Reverter, D. and C. D. Lima (2005). Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex. *Nature* 435, 687-92.

Richly, H., M. Rape, S. Braun, S. Rumpf, C. Hoege and S. Jentsch (2005). A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell* 120, 73-84.

Rosas-Acosta, G., W. K. Russell, A. Deyrieux, D. H. Russell and V. G. Wilson (2005). A universal strategy for proteomic studies of SUMO and other ubiquitin-like modifiers. *Mol Cell Proteomics* 4, 56-72.

Rubin, E., S. Mitnacht, E. Villa-Moruzzi and J. W. Ludlow (2001). Site-specific and temporally-regulated retinoblastoma protein dephosphorylation by protein phosphatase type 1. *Oncogene* 20, 3776-85.

Rubin, S. M., A. L. Gall, N. Zheng and N. P. Pavletich (2005). Structure of the Rb C-terminal domain bound to E2F1-DP1: a mechanism for phosphorylation-induced E2F release. *Cell* 123, 1093-106.

Sage, J., A. L. Miller, P. A. Perez-Mancera, J. M. Wysocki and T. Jacks (2003). Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* 424, 223-8.

Salomoni, P. and P. P. Pandolfi (2002). The role of PML in tumor suppression. *Cell* 108, 165-70.

Scheffner, M., K. Munger, J. C. Byrne and P. M. Howley (1991). The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 5523-7.

Schmidt, D. and S. Muller (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*, 2872-7.

Sdek, P., H. Ying, D. L. Chang, W. Qiu, H. Zheng, R. Touitou, M. J. Allday and Z. X. Xiao (2005). MDM2 promotes proteasome-dependent ubiquitin-independent degradation of retinoblastoma protein. *Mol Cell* *20*, 699-708.

Seeler, J. S. and A. Dejean (2003). Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 690-9.

Sherr, C. J. (2000). The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* *60*, 3689-95.

Sherr, C. J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* *116*, 235-46.

Sherr, C. J. and F. McCormick (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* *2*, 103-12.

Shiio, Y. and R. N. Eisenman (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 13225-30.

Shim, J., H. S. Park, M. J. Kim, J. Park, E. Park, S. G. Cho, S. J. Eom, H. W. Lee, C. O. Joe and E. J. Choi (2000). Rb protein down-regulates the stress-activated signals through inhibiting c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase. *J Biol Chem* *275*, 14107-11.

Shin, J. A., E. S. Choi, H. S. Kim, J. C. Ho, F. Z. Watts, S. D. Park and Y. K. Jang (2005). SUMO modification is involved in the maintenance of heterochromatin stability in fission yeast. *Mol Cell* *19*, 817-28.

Song, J., L. K. Durrin, T. A. Wilkinson, T. G. Krontiris and Y. Chen (2004). Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 14373-8.

Stade, K., F. Vogel, I. Schwienhorst, B. Meusser, C. Volkwein, B. Nentwig, R. J. Dohmen and T. Sommer (2002). A lack of SUMO conjugation affects cNLS-dependent nuclear protein import in yeast. *J Biol Chem* *277*, 49554-61.

Steinacher, R. and P. Schar (2005). Functionality of human thymine DNA glycosylase requires SUMO-regulated changes in protein conformation. *Curr Biol* *15*, 616-23.

Stelter, P. and H. D. Ulrich (2003). Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* *425*, 188-91.

Sterner, J. M., S. Dew-Knight, C. Musahl, S. Kornbluth and J. M. Horowitz (1998). Negative regulation of DNA replication by the retinoblastoma protein is mediated by its association with MCM7. *Mol Cell Biol* *18*, 2748-57.

Strobeck, M. W., A. F. Fribourg, A. Puga and E. S. Knudsen (2000). Restoration of retinoblastoma mediated signaling to Cdk2 results in cell cycle arrest. *Oncogene* *19*, 1857-67.

Tatham, M. H., E. Jaffray, O. A. Vaughan, J. M. Desterro, C. H. Botting, J. H. Naismith and R. T. Hay (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* *276*, 35368-74.

Tedesco, D., J. Lukas and S. I. Reed (2002). The pRb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF(Skp2). *Genes Dev* *16*, 2946-57.

Trimarchi, J. M., B. Fairchild, J. Wen and J. A. Lees (2001). The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 1519-24.

Trimarchi, J. M. and J. A. Lees (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 11-20.

Trouche, D. and T. Kouzarides (1996). E2F1 and E1A(12S) have a homologous activation domain regulated by RB and CBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 1439-42.

Trouche, D., C. Le Chalony, C. Muchardt, M. Yaniv and T. Kouzarides (1997). RB and hbrm cooperate to repress the activation functions of E2F1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 11268-73.

Ulrich, H. D. (2005a). Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: a plea of no contest. *Trends Cell Biol* *15*, 525-32.

Ulrich, H. D. (2005b). SUMO modification: wrestling with protein conformation. *Curr Biol* *15*, R257-9.

Vertegaal, A. C., S. C. Ogg, E. Jaffray, M. S. Rodriguez, R. T. Hay, J. S. Andersen, M. Mann and A. I. Lamond (2004). A proteomic study of SUMO-2 target proteins. *J Biol Chem* *279*, 33791-8.

Vijay-Kumar, S., C. E. Bugg, K. D. Wilkinson, R. D. Vierstra, P. M. Hatfield and W. J. Cook (1987). Comparison of the three-dimensional structures of human, yeast, and oat ubiquitin. *J Biol Chem* *262*, 6396-9.

Wang, J., A. Sampath, P. Raychaudhuri and S. Bagchi (2001). Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene* *20*, 4740-9.

Welch, P. J. and J. Y. Wang (1993). A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell* *75*, 779-90.

Whyte, P., N. M. Williamson and E. Harlow (1989). Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell* *56*, 67-75.

Wu, C. L., L. R. Zukerberg, C. Ngwu, E. Harlow and J. A. Lees (1995). In vivo association of E2F and DP family proteins. *Mol Cell Biol* *15*, 2536-46.

Xiao, B., J. Spencer, A. Clements, N. Ali-Khan, S. Mitnacht, C. Broceno, M. Burghammer, A. Perrakis, R. Marmorstein and S. J. Gamblin (2003). Crystal structure of the retinoblastoma tumor suppressor protein bound to E2F and the molecular basis of its regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 2363-8.

Xirodimas, D. P., M. K. Saville, J. C. Bourdon, R. T. Hay and D. P. Lane (2004). Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell* *118*, 83-97.

Yang, S. H. and A. D. Sharrocks (2004). SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Mol Cell* *13*, 611-7.

Yang, S. H., E. Jaffray, R. T. Hay and A. D. Sharrocks (2003). Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol Cell* *12*, 63-74.

Yee, A. S., H. H. Shih and S. G. Tevosian (1998). New perspectives on retinoblastoma family functions in differentiation. *Front Biosci* *3*, D532-47.

Zhang, H. S., M. Gavin, A. Dahiya, A. A. Postigo, D. Ma, R. X. Luo, J. W. Harbour and D. C. Dean (2000). Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* *101*, 79-89.

Zhong, S., S. Muller, S. Ronchetti, P. S. Freemont, A. Dejean and P. P. Pandolfi (2000). Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* *95*, 2748-52.

## **Danksagung**

Ganz herzlich möchte ich mich bei Stefan „Doc“ Müller für das interessante Projekt, seine ständige Unterstützung und seine Bereitschaft zur Diskussion bedanken. Er hat ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Stefan Jentsch möchte ich mich ebenfalls für die Unterstützung, das anhaltende Interesse am Rb-Projekt und die sehr angenehme und produktive Atmosphäre in seiner Abteilung bedanken.

Zudem möchte ich den Mitgliedern der Prüfungskommission an der Ludwig-Maximilians-Universität meinen Dank aussprechen.

Ganz besonders danke ich auch den aktuellen und früheren Mitgliedern der Abteilung für Molekulare Zellbiologie für die Hilfe bei kleineren und grösseren Problemen. Insbesondere sind hier die Mitglieder der AG Müller Darja, Jochen, Per und Markus zu nennen.

# LEBENS LAUF – ANDREAS LEDL

---

**Name** Andreas Ledl  
**Adresse** Pestalozzistr. 9  
80469 München  
Tel.: 0173/3794038  
**Geburtsdatum** 19. November 1974  
**Geburtsort** München

---

## Schulbildung

1985-1989 Gymnasium Tutzing  
1989-1994 Karlsruhgymnasium Stuttgart  
Abschluss mit Abitur im Juni 1994

## Zivildienst

1994-1995 BUND für Umwelt und Naturschutz in Stuttgart

## Studium

1995-2001 Universität Regensburg  
Studium der Biochemie  
Diplomarbeit über "Untersuchungen zur Aktivierung von Polymalatase aus *Physarum polycephalum*" am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie (AG Prof. Dr. Holler)  
Abschluss als Diplom-Biochemiker im Januar 2001  
1998-1999 Austauschstudent an der Wesleyan University, Middletown, Connecticut, USA

## Doktorarbeit

Seit Juli 2002 Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried  
Abteilung für Molekulare Zellbiologie (Prof. Dr. Stefan Jentsch)  
Arbeitsgruppe Dr. Stefan Müller