

Posttranslationale Modifikation des Proteins der
Promyelozytenleukämie (PML) nach unterschiedlicher
Stressinduktion

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Anke Krause

aus Merzig

Köln, 2014

Diese Arbeit widme ich meinem geliebten Papa Willi Meinecke.

Berichtersteller: Prof. Dr. Jürgen Dohmen
Institut für Genetik, Zülpicher Str. 47, 50674 Köln

Dr. Gerrit Praefcke
Institut für Genetik, Zülpicher Str. 47, 50674 Köln

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 18.10.2013

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Promyelozytenleukämie (PML) – Kernkörper	2
1.2	Das PML-Protein	6
1.3	Biogenese und Struktur von PML-Kernkörpern	8
1.4	Posttranslationale Modifikation mit SUMO	9
1.5	Mechanismus der SUMOylierung	12
1.6	Funktion der SUMOylierung in der Zelle	14
1.7	Modifikation von Proteinen mit Ubiquitin	15
1.8	Zusammenhang zwischen Ubiquitinierung und SUMOylierung	18
1.9	Die humane Ubiquitinligase RNF4	20
1.10	Mitogen aktivierte Proteinkinasen	22
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Reagenzienkits	25
2.1.2	Enzyme	25
2.1.3	Antikörper	26
2.1.4	Größenmarker	27
2.1.5	Proteaseinhibitoren	27
2.1.6	Puffer	27
2.1.7	Verbrauchsmaterialien	28
2.1.8	Bakterienstämme und Konstrukte	29
2.1.9	Nährmedien	30
2.2	Molekularbiologische Methoden	31
2.2.1	Kultivierung von Bakterien	31
2.2.2	Herstellung kompetenter Bakterien	32
2.2.3	Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA	32
2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
2.2.5	DNA-Präparation	33

2.2.6	5'- Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	34
2.2.7	Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten	34
2.2.8	Restriktion	35
2.2.9	Ligation	35
2.2.10	Agarosegelelektrophorese	35
2.2.11	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	35
2.2.12	DNA-Sequenzierung	36
2.2.13	DNA-Quantifizierung	36
2.3	Proteinbiochemische Methoden	36
2.3.1	SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2.3.2	Transfer und Immobilisierung von Proteinen (<i>Western-Blot-Analyse</i>)	37
2.3.3	Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine	38
2.4	Zellkultur	39
2.4.1	Herstellung stabiler Zelllinien	39
2.4.2	Kultivierung der Zellen	40
2.4.3	Lagerung der Zellen	40
2.4.4	Zellaufschluss	41
2.4.5	Immunfluoreszenz	41
2.4.6	Immunpräzipitation (IP) von endogenem PML	42
2.4.7	Microarrayverfahren	44
3	Ergebnisse	46
3.1	Charakterisierung stabiler SUMO-Zelllinien	46
3.2	Auswirkung unterschiedlicher Stressfaktoren auf transfiziertes PML in der stabilen SUMO2-Zelllinie	47
3.3	Auswirkung von unterschiedlichen, stabil exprimierten SUMO Isoformen auf PML	49

3.4	Die humane Ubiquitinligase RNF4 führt gemeinsam mit dem ubiquitinkonjugierenden Enzym Ubch5b zum Abbau von transient transfiziertem PML	51
3.5	Die humane Ubiquitinligase RNF4 führt gemeinsam mit ATO zum Zerfall von PML-Kernkörpern	52
3.6	Einfluss der RNF4 SIM Mutanten auf PML-Kernkörper	53
3.7	Einfluss unterschiedlicher Stressfaktoren auf PML-Kernkörper	
3.8	Analyse von endogenem PML in HS27- und HeLa B- Zelllysaten nach unterschiedlicher Stressinduktion	56
3.9	Einfluss von RNF4 auf endogenes PML unter verschiedenen Stressbedingungen in HS27 Zellen	57
3.10	Einfluss von RNF4 auf endogenes PML unter verschiedenen Stressbedingungen in HeLa B Zellen	59
3.11	Analyse von HeLa B Zelllysaten nach unterschiedlicher Stressinduktion	60
3.12	Analyse von HeLa B Zelllysaten mittels Immunpräzipitation (IP) von endogenem PML	61
3.13	Auswirkung unterschiedlicher Stressfaktoren auf die Signaltransduktion in HeLa B - und NB4 – Zellen	64
4	Diskussion	85
4.1	Einfluss von Arsentrioxid auf Proteinubiquitinierung	85
4.2	Charakterisierung stabiler SUMO-Zelllinien	85
4.3	Für den Abbau von transfiziertem PML ist eine SUMO2-Überexpression notwendig aber nicht ausreichend	86
4.4	RNF4 und Ubch5b sind gemeinsam am Abbau von überexprimiertem PML beteiligt	87
4.5	RNF4 führt gemeinsam mit ATO zum Zerfall von PML-Kernkörpern	88
4.6	RNF4 benötigt seine zwei essentiellen SIMs (SIM2 und SIM4) um endogenes PML abzubauen	89

Inhalt

4.7	ATO induziert im Gegensatz zu Sorbitol den Abbau von endogenem PML und schließlich den Zerfall von PML-Kernkörpern	90
4.8	Einfluss von RNF4 auf endogenes PML unter verschiedenen Stressbedingungen	92
4.9	Analyse der Modifikation von endogenem PML nach verschiedenen Stressbedingungen	94
4.10	Auswirkung unterschiedlicher Stressfaktoren auf die Signaltransduktion in HeLa B- und NB4-Zellen	96
4.10.1	Quantifizierung der aktivierten Caspase 3 in HeLa B- und NB4-Zellen nach ATO- oder Sorbitol-Stressinduktion	97
4.10.2	osmotischer Stress führt im Gegensatz zu ATO zur Aktivierung der SAPK/JNK-Signalkaskade	98
4.10.3	osmotischer Stress führt im Gegensatz zu ATO zur Aktivierung der ERK-Signalkaskade	101
4.10.4	RSK ist ein Substrat von ERK und weniger von der p38 MAP-Kinase	103
	Literatur.....	105
	Abstract.....	124
	Zusammenfassung.....	125
	Danksagung.....	126
	Erklärung.....	127
	Lebenslauf.....	128

Abkürzungen

aa	Aminosäuren (engl.: amino acids)
Abb.	Abbildung
AML	Akute Myeloische Leukämie
Aos1	<i>Activation of Sentrin 1</i>
APL	Akute promyelozytische Leukämie
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
ATO	Arsentrioxid
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATRA	<i>All-Trans-Retinsäure</i>
B1/B2	B-Box 1/B-Box 2
BSA	Albumin aus Rinderserum (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
C- / c-	Carboxy- / carboxy-
cDNA	komplementäre DNA (engl.: <i>complementary DNA</i>)
Chk2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CK2	<i>Caseinkinase 2</i>
CMVP	Cytomegalovirus-Promotor
Daxx	<i>Death-associated Protein</i>
ddNTP	2', 3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
DMEM	<i>Dulbecco' s modified Eagles medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DUBs	Deubiquitinierungsenzyme
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1	Ubiquitin / SUMO aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin / SUMO konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin / SUMO Ligase
EDTA	Ethylendiamintetracetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -aminoethylether)-N,N'-tetracetat
EMEM	<i>Earl' s modified Eagles medium</i>
EMCV	Encephalomyocarditisvirus

Abkürzungen

ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase 2</i>
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)piperazino]-ethansulfonsäure
Hex3	<i>hexose metabolism-related protein</i>
HIPK2	<i>Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2</i>
His-	Hexahistidin, in Zusammenhang mit Fusionsproteinen
ICP0	<i>HSV1-Infected Cell Polypeptide 0</i>
IFN γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalaktopyranosid
ISG20	<i>Interferon Stimulated Gene 20 kDa</i>
JN-Kinase	<i>Jun N-terminal Kinases</i>
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
M	molar (Mol / l)
MDM2	Mouse Double Minute 2 homolog
MDMX	Mouse Double Minute X
N- / n-	Amino- / amino-
NEM	N-Ethylmaleimid
NES	<i>Nuclear Export Signal</i>
ND10	<i>Nuclear Domain 10</i>
Nup358	<i>Nuclear Pore Complex Protein 358</i>
OH	Hydroxy
Orf61p	<i>Varizella-Zoster Virus (VZV) <u>O</u>pen <u>R</u>eadin<u>G</u> <u>F</u>rame 61</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PIAS	<i>Protein Inhibitor of STAT</i>
PEFA	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid·Hydrochlorid

Abkürzungen

p53	Protein 53
PML	Promyelozytische Leukämie Protein
PML-NBs	PML-Kernkörper (engl.: PML <i>nuclear bodies</i>)
PML RBI	PML RING B1 (aa 49-179)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PODs	PML <i>oncogenic domain</i>
RanBP2	<i>Ran Binding Protein 2</i>
RAR α	Retinsäure Rezeptor α
RIPA	<i>radioimmune precipitation assay</i>
Ris1	<i>ras induced senescence 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
RNAse	Ribonuklease
RNF4	RING Finger Protein 4
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
SAE1	SUMO1 <i>Activating Enzyme Subunit 1</i>
SAE1	SUMO1 <i>Activating Enzyme Subunit 1</i>
SAP-Kinasen	<i>stress-activated protein kinases</i>
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl.: <i>Sodiumdodecylsulfat</i>)
SENP	<i>sentrin/SUMO-specific protease</i>
SIM	<i>Interacting Motif</i>
Slx8	<i>synthetic lethal of unknown [x] functi)</i>
Sp100	<i>Speckled 100 kDa</i>
STUbL	<i>SUMO-Targeted Ubiquitin Ligase</i>
SUMO	<i>small Ubiquitin like modifier</i>
TAE	Tris / Acetat / EDTA
TE	Tris / EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>tabacco etch virus</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton	X100 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylenglykol
Tween-20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaureat
TRIM	<i>Tripartite Motif</i>

Abkürzungen

UBA2	<i>putative ubiquitin-associated protein</i>
UBC9	<i>ubiquitin conjugating enzyme</i>
Ube2Z	<i>Ubiquitin-conjugating Enzyme 2Z</i>
ULS	Ubiquitin Ligase für SUMO-Konjugate
UPS	Ubiquitin/Proteasom-System
USP	Ubiquitin spezifische Protease
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
v/v	Volumen pro Volumen (engl.: <i>volume per volume</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (engl.: <i>weight per volume</i>)
XPC	Xeroderma Pigmentosum C

Präfixe

c-	Centi-
k-	Kilo-
m-	Milli-
μ-	Mikro-
n-	Nano-
p-	Piko-

Physikalische Größen

A	Ampere
g	Erdbeschleunigung (im Kontext von Zentrifugation)
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
m	Meter
min	Minute
OD	optische Dichte
sec	Sekunde (engl.: <i>seconds</i>)
V	Volt

Abkürzungen

Ein- und Dreibuchstabencode für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
x		beliebig
Ψ		aliphatisch

1.1 Der Zellkern

Der Zellkern (Nukleus) ist das markanteste Organell in einer Eukaryotenzelle und hat typischerweise einen Durchmesser von 5 bis 16 μm . Zwei konzentrische Membranen bilden die Kernhülle und trennen das Genom vom Zytoplasma. Die beiden Membranen sind typische Lipidmembranen, wobei die äußere Membran Bestandteil des endoplasmatischen Retikulums ist, an dem ortständige Ribosomen die Synthese von Proteinen durchführen. Die innere Membran ist mit der Kernlamina, einem Maschenwerk fadenförmiger Proteinstrukturen verbunden, die der Kernhülle ihre Festigkeit verleiht. Auffallend in der Kernhülle sind die Kernporenkomplexe. Diese gewährleisten einen selektiven Transport von Molekülen aus dem Kern heraus und in ihn hinein (Stoffler *et al.*, 1999).

Der Zellkern ist zwar zum größten Teil von Chromatin ausgefüllt, ein Komplex aus Desoxyribonukleinsäure (DNA), Histonen und anderen Kernproteinen (z.B. DNA-Polymerasen, RNA-Polymerasen und Transkriptionsfaktoren), aber er beinhaltet auch zahlreiche morphologisch sowie funktionell unterschiedliche Domänen bzw. subnukleäre Kompartimente wie zum Beispiel Nukleoli, PML-Kernkörper (PML = promyelozytische Leukämie Protein), Nuclear Speckles, Cajal Bodies, Gems und andere (siehe Abbildung 1.1). Diese subnukleären, dynamischen Strukturen stehen in direktem Kontakt mit dem Nukleoplasma wodurch ein stetiger Austausch von Proteinen möglich ist (Dundr und Misteli, 2001; Matera *et al.*, 1999; Spector, 1993; Lamond und Earnshaw, 1998).

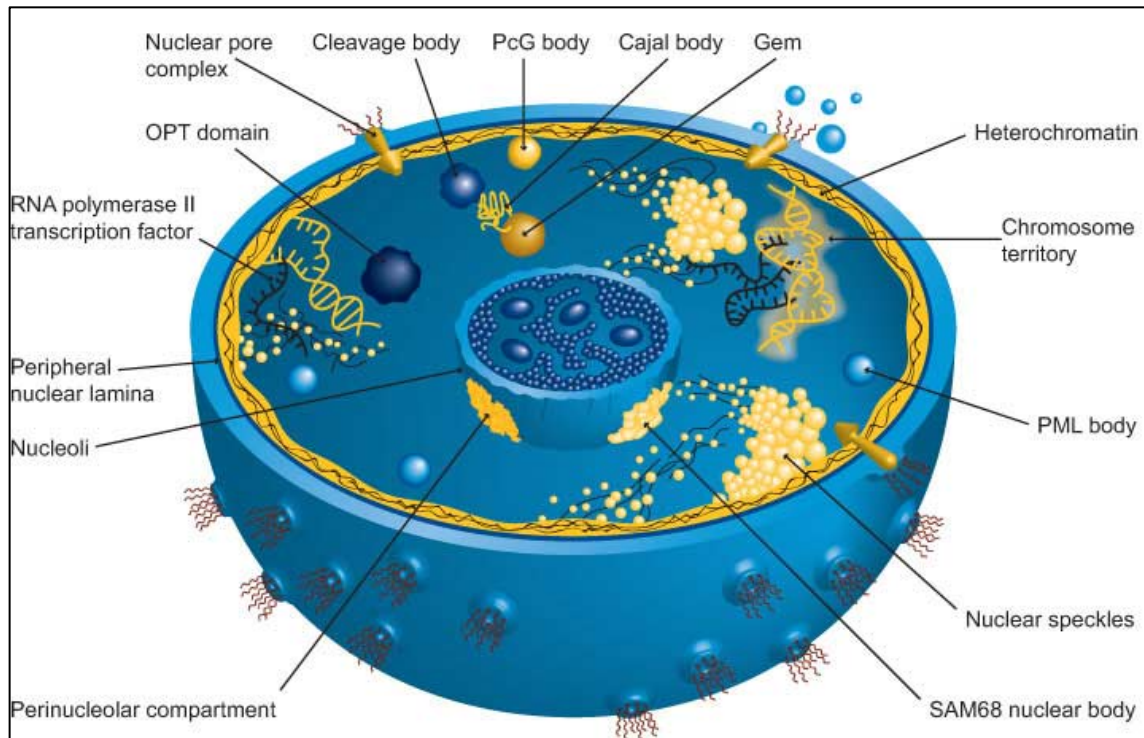


Abbildung 1.1: Schematische Übersicht des Zellkerns

Diese Abbildung zeigt den Zellkern mit einigen bekannten Kernkompartimenten (Abcam; www.abcam.com).

1.2 Promyelozytenleukämie (PML) - Kernkörper

PML-Kernkörper, auch bekannt unter den Namen *Kremer Bodies*, *Nuclear Domain 10* (ND10) oder *PML oncogenic domain* (PODs), sind dynamische, intranukleäre Strukturen, die unter anderem das PML-Protein für ihre Bildung benötigen (Borden *et al.*, 2002, Pandolfi 2007). Aufgrund von alternativem Spleißen gibt es eine Vielzahl verschiedener Isoformen des PML-Proteins, die alle an ihrem N-Terminus drei Cystein reiche Zink-Bindedomänen beinhalten. Einen RING-Finger und zwei *B-boxes* (B1 und B2). Diesen folgt eine α -helikale *Coiled-coil* Domäne. Zusammen gewährleisten diese RBCC-Domänen, auch bekannt unter dem Namen TRIM (*Tripartite Motif*), die Homooligomerisierung von PML und die Interaktion mit anderen Proteinen. Diese ist essentiell für die Bildung von PML-Kernkörpern (Jensen *et al.*, 2001; Borden, 1998; Huang *et al.*, 2007; Häkli *et al.*, 2005). Das RING-Motiv (*Really Interesting New Gene*) gehört zu den Zink-Finger-Motiven, die zunächst als DNA-Bindemotive identifiziert wurden. Aber sie binden auch an RNA, an Proteine und Lipide (Berg und Shi, 1996). RING-Finger-Proteine sind an vielen zellulären Prozessen wie der Transkription, Signaltransduktion und Rekombination beteiligt. Die meisten

RING-Finger Proteine sind E3 Ubiquitinligasen (Kraft *et al.*, 2005), die den Transfer von Ubiquitin zum Substrat vermitteln (Ciechanover, 1998; Hershko und Ciechanover, 1998; Callis und Vierstra, 2000; Ben-Neriah, 2002).

Die *B-Boxes* treten nur in RBCC/TRIM-Proteinen auf. Sie scheinen für die korrekte Orientierung der α -Helices in der *Coiled-Coil*-Domäne wichtig zu sein, die ähnlich wie das RING-Motiv Homo- und Heterodimerisierung von PML, aber auch die Multimerisierung mit anderen Proteinen vermittelt (Reymond *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2000).

Im Zellkern einer Säugerzelle befinden sich im Durchschnitt 10 – 30 PML-Kernkörper, die in ihrer Größe von 0,2 bis 1 μm variieren. Eine Stimulation mit Interferonen des Typs I oder II induziert direkt die Transkription der Gene, die für PML und Sp100 (*Speckled 100 kDa*; eine der Hauptkomponenten in PML-Kernkörper) kodieren.

Bisher erwies es sich als schwierig den PML-NBs eine konkrete Funktion zuzuschreiben, da sie mit den unterschiedlichsten Proteinen interagieren (insgesamt ca. 166 verschiedene Interaktionspartner) und demzufolge an vielen zellulären Prozessen beteiligt sind (Borden, 2002; Chen *et al.*, 2012; Rabellino und Scaglioni, 2013; Weisshaar *et al.*, 2008).

PML-Kernkörper nehmen durch die Interferonbehandlung letztendlich in ihrer Größe und Anzahl zu (Guldner *et al.*, 1992; Lavau *et al.*, 1995). Diese und andere Beobachtungen bestärken die Hypothese, dass PML, PML-Kernkörper und andere in diesen Strukturen befindlichen Proteine an antiviralen Abwehrmechanismen beteiligt sind (Everett und Chelbi-Alix, 2007; Tavalai *et al.*, 2011). Es konnte zum Beispiel gezeigt werden dass das Genom unterschiedlicher Virusfamilien (z.B. Herpes Simplex Virus1, HSV1; das humane Cytomegalovirus, HCMV und das Adenovirus) nach der Infektion entweder an oder in PML-Kernkörpern lokalisiert ist. Viren wie das HSV oder HCMV sind in PML-Kernkörpern inaktiviert. In diesem Fall wirken PML-Kernkörper antiviral. Das Polyomavirus *Simian-Virus 40* (SV-40) übt dagegen die Replikation seines Genoms in und an PML-Kernkörpern aus (Ishov *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 1995; Jul-Larsen *et al.*, 2004; Tang Q *et al.*, 2000; Everett *et al.*, 2006; Tavalai *et al.*, 2008). PML-*Knock-Down*-Versuche zeigten eine Inaktivierung viraler Replikation vom *Simian-Virus 40 in vivo* (Boichuk *et al.*, 2011).

Darüber hinaus spielen PML-NBs eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose, der Transkription, der DNA-Replikation, dem Abbau von Proteinen und der Tumorsuppression.

Entscheidend für die Bildung von PML-Kernkörpern ist, dass PML mit dem Protein SUMO (*Small Ubiquitin-related Modifier*) posttranslational modifiziert wird (Sternsdorf *et al.*, 1997). Die kovalente Modifikation von PML mit SUMO ist essentiell für die Aufrechterhaltung der PML-Kernkörper und ebenso für die PML abhängige Rekrutierung von Proteinen wie zum Beispiel Daxx (*Death-associated Protein*), ISG20 (*Interferon Stimulated Gene 20 kDa*) oder SP100 (*Speckled 100 kDa*). Daxx bindet im Nukleus an SUMOyliertes PML oder fungiert als Transkriptionsrepressor indem es an SUMOylierte Transkriptionsfaktoren bindet (Kumar *et al.*, 2013; Winkler *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2011; Zhong *et al.*, 2000; Doucas *et al.*, 1999; Matunis *et al.*, 2006; Bernardi und Pandolfi, 2007; Eskiw *et al.*, 2003, Ishov *et al.*, 1999). Darüber hinaus nimmt die SUMO-Modifikation Einfluss auf die Funktion von PML (Boddy *et al.*, 1996; Duprez *et al.*, 1999). Die ubiquitinspezifische Hydrolase HAUSP (*Herpes Virus-associated Ubiquitin-specific Protease*), die in PML-NBs lokalisiert ist, hydrolysiert ausschließlich Ubiquitinkonjugate und unterstützt durch die damit verbundene Ubiquitineliminierung die Modifizierung von PML mit SUMO (Everett *et al.*, 1998).

Die akute Promyelozytenleukämie (APL) ist selten und macht etwa 5% der Patienten mit neu diagnostizierter akuter myeloischer Leukämie (AML) aus. Eine höhere Inzidenz wird in Italien, Spanien, Nord-, Mittel- und Südamerika beobachtet. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 40 und 50 Jahren. Männer und Frauen sind etwa gleich häufig betroffen. Die Ursache der APL ist bei den meisten Patienten nicht geklärt, auch nicht die unterschiedlichen regionalen und ethnischen Häufigkeiten. Das Hauptmerkmal der Promyelozytenleukämie auf zellulärer Ebene ist der Zerfall von PML-Kernkörpern (Dyck *et al.*, 1994). Klinisch besteht eine erhöhte Neigung zu plötzlich auftretenden Blutungen in Gehirn, Gastrointestinaltrakt oder Lunge, die auf eine Störung im Gerinnungssystem zurückzuführen sind. Trotz unkritischen Thrombozytenzahlen führt die Promyelozytenleukämie daher immer noch in etwa 10 - 20% der Fälle zum Tod. APL wird meist durch eine Translokation zwischen den Chromosomen 15 und 17, t(15;17) verursacht, die zur Fusion der

beiden Gene PML und RARalpha (*retinoic acid receptor* alpha) führt. Etwa 1% der APL-Patienten haben andere Translokationen, wobei das Gen des Retinsäurerezeptors auf Chromosom 17 immer involviert ist (1(11;17); t(5;17)) (Morrison *et al.*, 1991; Kakizuka *et al.*, 1991; Pandolfi *et al.*, 1991; Borrow *et al.*, 1992; Rowley *et al.*, 1977). RARalpha bindet in Abwesenheit von RA (*Retinoic Acid*, Retinsäure) an die DNA und interagiert mit einem Komplex zur Transkriptionsunterdrückung der wiederum Histonacetylasen rekrutiert. Das durch die Translokation entstandene onkogene Fusionsprotein (PML/RARalpha) hält diese Interaktion nun auch in Anwesenheit des Liganden aufrecht, wodurch die RARalpha-regulierte Genexpression unterdrückt und schließlich die Zellreifung der Promyelozyten gestört wird (Pandolfo *et al.*, 1990; Melnick und Licht, 1999).

Durch die Therapie der APL mit *all-trans*-Retinsäure (ATRA) konnte die Heilungsrate gegenüber alleiniger Chemotherapie verdoppelt werden. Mit der Kombination von ATRA und anthrazyklinhaltiger Chemotherapie werden Remissionsraten von 80 bis 90% und Langzeitüberlebensraten von über 75% erreicht. ATRA, ein Derivat der Retinsäure (Vitamin A-Säure), verhindert auf molekularer Ebene die Differenzierung von Promyeloblasten und induziert die Ausreifung in reife Granulozyten innerhalb weniger Tage. ATRA bindet an RAR-Rezeptoren und führt zum proteasomalen Abbau des onkogenen Fusionsproteins PML-RAR α (siehe Abb.1.2). Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Studien konnten belegen, dass eine Behandlung von APL-Zellen mit ATRA zu einer Relokalisation von PML und schließlich zur Neubildung von PML-Kernkörpern führt. Da die chemotherapieinduzierte Toxizität von anthrazyclinhaltige Chemotherapeutika vor allem bei Patienten mit einem Rezidiv vermieden werden muss, wird dann ATRA in Kombination mit Arsentrioxid (Arsen(III)-oxid, As₂O₃, Diarsentrioxid, Arsenik, ATO) verabreicht. ATO stellt die effektivste Monosubstanz im Kampf gegen APL dar. Wird ATO in niedrigen Konzentrationen verabreicht (0,15 mg pro kg Körpergewicht und Tag; höhere Konzentrationen führen nicht mehr zur Differenzierung von Promyelozyten zu Granulozyten, sondern zur Apoptose), so lassen sich Remissionsraten von 80 – 90% und Überlebensraten von 64 – 74% erzielen (Mathews *et al.*, 2010). ATO begünstigt die SUMOylierung von PML und fördert zugleich die Interaktion mit der poly-SUMO-abhängigen E3 Ubiquitinligase

RNF4 (*RING-Finger Protein 4*), die wiederum den Abbau von PML über das 26S-Proteasom gewährleistet (Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2008; Tatham *et al.*, 2008; Weisshaar *et al.*, 2008). ATO führt also zum Abbau von PML-RAR α und folglich zur Neubildung intakter PML-Kernkörper (Zhu *et al.*, 1997).

In den letzten Jahren wurde zunehmend therapieassoziierte APL nach Chemotherapie, vor allem nach Einsatz von Topoisomerase II Inhibitoren beobachtet (Beaumont *et al.*, 2003; Ades *et al.*, 2008; Hasan *et al.*, 2010; Ni *et al.*, 1997; Onkopedia Leitlinien).

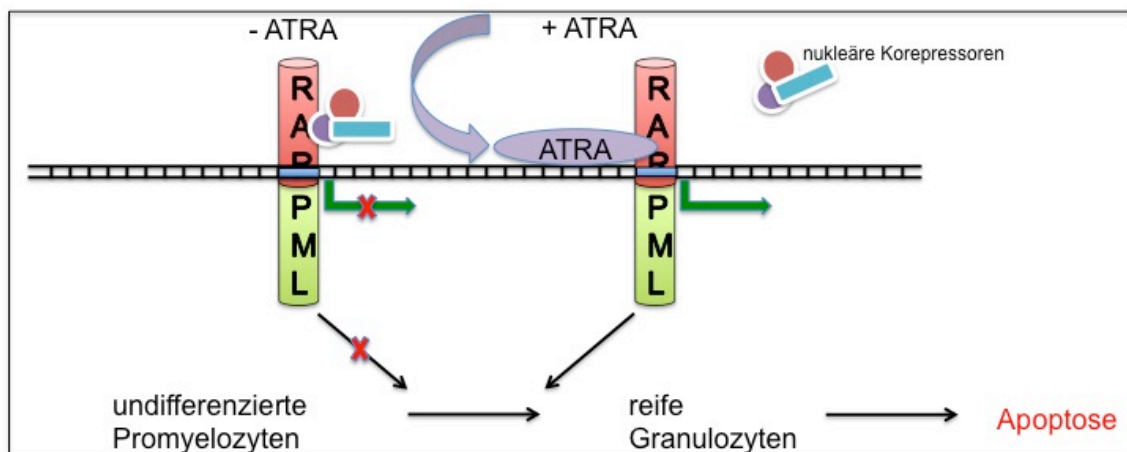


Abbildung 1.2: Schematische Übersicht über den Wirkmechanismus von ATRA

Die Differenzierung von Promyelozyten in reife Granulozyten wird durch die Bindung nukleärer Repressoren an das onkogene Fusionsprotein PML-RAR α verhindert. Durch die Therapie der APL unter anderem mit ATRA kommt es zum proteasomalen Abbau von PML-RAR α und schließlich zur Differenzierung von Promyelozyten in Granulozyten.

1.3 Das PML-Protein

Das PML-Protein wird durch das PML-Gen kodiert, das etwa 35 kb groß ist und 9 Exons beinhaltet. Aufgrund des alternativen Spleißens werden unterschiedliche Transkripte von PML synthetisiert und deshalb variieren sie in ihrer Größe von etwa 48-97 kDa (Nisole *et al.*, 2013). Alternatives Spleißen der Exone 4 bis 9 in PML führen zu unterschiedlichen PML-Isoformen, die meist nukleär lokalisiert sind (siehe Tabelle 1). PML III und IV fehlt Exon 5 (de Thé *et al.*, 1991; Fagioli *et al.*, 1992) und PML V fehlen Exon 5 und 6 oder 4,5 und 6 (Fagioli *et al.*, 1992). Die Funktion der unterschiedlichen Isoformen von PML ist noch relativ unklar. Dennoch haben alle PML-Isoformen drei charakteristische SUMO-Modifizierungsstellen an Position 65 im RING-Finger, an Position 160 in der *B1-Box* und je nach Spleißform eine in der Kernlokalisationssequenz (NLS = *Nuclear Localization Signal*). Zudem besitzen sie alle ein *Bipartite Nuclear*

Localization Signal. Die zytoplasmatischen Isoformen von PML bilden allerdings eine Ausnahme. Diese beinhalten lediglich zwei SUMOylierungsstellen.

Es ist auch wichtig darauf hinzuweisen, dass die unterschiedlichen PML-Isoformen in humanen Zellen etwa gleichermaßen exprimiert werden. In vielen entarteten humanen Krebszellen jedoch wird PML nicht exprimiert (Fagioli et al., 1992; Daniel et al., 1993; Chang et al., 1995; Bernardi und Pandolfi, 2007). PML Kernkörper werden durch zellulären Stress wie zum Beispiel virale Infektionen (Everett 2006), DNA-Schäden (Koken et al., 1995; Terris et al., 1995; Gurrieri et al., 2006) und oxidativen Stress reguliert (Yamada et al., 2001; Villagra et al., 2006). Die Transkription des PML-Gens kann durch Interferon α , β und γ aber auch durch aktives p53 (Protein 53; ein Protein mit einem Molekulargewicht von 53 kDa) induziert werden. Beides führt jeweils dazu, dass die PML Kernkörper in Anzahl und Größe zunehmen (Stadler et al., 1995; de Stanchina et al., 2004). Zusätzlich zur Kernlokalisationssequenz (NLS) beinhaltet PML I als einzige Isoform im Exon 9 (Aminosäuren 704 – 713) auch ein *Nuclear Export Signal* (NES). Durch dieses können alle PML-Isoformen sowohl im Nukleus aber auch aufgrund der Fähigkeit Heterodimere zu bilden außerhalb des Zellkerns im Zytoplasma gefunden werden (Condemine et al., 2006). Die am meisten studierte Isoform PML IV wird in primären humanen Fibroblasten mit Seneszenz (Alterung) in Verbindung gebracht (Bischof et al., 2002; Guo et al., 2000). Außerdem scheint PML IV die einzige Isoform zu sein, die an der antiviralen Abwehr gegen das Varizella-Zoster-Virus (VZV) oder das Encephalomyocarditisvirus (EMCV) mitwirkt (Reichelt et al., 20011; Maroui et al., 2011).

Proteinkinasen wie ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*), Chk2 (*Checkpoint kinase 2*), HIPK2 (*Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2*), CK2 (*Caseinkinase 2*) oder ERK (*Extracellular-signal Regulated Kinase 2*) phosphorylieren PML posttranslational und regulieren so seine Stabilität und Assoziation mit anderen Interaktionspartnern. Auf diesem Weg begünstigen sie die DNA-Reparatur oder kontrollieren Apoptose. (Engelhardt et al., 2003; Hayakawa und Privalsky, 2004; Scaglioni et al., 2006; Gresko et al., 2009).

Name	Alternative Namen	Länge Aminosäuren	Größe (kDa)	Zelluläre Lokalisation
PML1	PML I, TRIM19 α^2	882	97,5	nukleär
PML2	PML V, TRIM19 β , PML12	611	67,4	nukleär
PML3	PML II, TRIM 19 γ	824	90,2	nukleär
PML4	-	-	-	-
PML5	PML VI, TRIM19 ϵ	560	62,0	nukleär
PML6	PML IV, TRIM19 ζ , PML3	633	70,0	nukleär
PML7	PML VIb, TRIM19 η	423	47,6	zytoplasmatisch
PML8	PML VIIb, TRIM19 θ	435	48,6	zytoplasmatisch
PML9	PML II, TRIM19 κ	829	90,7	nukleär
PML10	PML IVa, TRIM19 λ	585	65	nukleär
PML11	-	781	85,7	nukleär
PML-L	PML III	641	70,4	nukleär

Tabelle1: Überblick über die verschiedenen humanen PML-Isoformen

Die unterschiedlichen PML-Bezeichnungen kommen durch verschiedene Publikationen zustande (Jensen, 2001; Nisole, 2005; Fogal, 2000; Nisole *et al.*, 2013).

1.4 Biogenese und Struktur von PML-Kernkörpern

Die Studien zur Biogenese von PML-Kernkörpern wurden durch den Einsatz von Arsentrioxid (ATO) erheblich einfacher. ATO, ein sehr wirksames Therapeutikum gegen die APL (akute Promyelozytenleukämie, siehe oben), führt zur Phosphorylierung von PML an seinem N-Terminus (T28, S36, S38 und

S40) durch ERK1/2 (*Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2*; = *Mitogen Activated Protein Kinase*) (Hayakawa und Privalski; 2004). Phosphoryliertes PML wandert dann vom Nukleoplasma zur nukleären Matrix, wobei dieser Transfer unabhängig von der SUMOylierung von PML ist (Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2001). Darüberhinaus bindet ATO an Cysteinreste im RING-Motiv von PML wodurch PML oligomerisiert und die Interaktion mit dem SUMO-konjugierenden Enzym Ubc9 erleichtert wird (Zhang *et al.*, 2010). SUMOyliertes PML rekrutiert schließlich weitere Interaktionspartner über dessen SIM wodurch Proteinagglomerate entstehen, die wir PML-Kernkörper nennen (siehe Abb.: 1.3) (Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2008; Weisshaar *et al.*, 2008; Maroui *et al.*, 2012; Muller *et al.*, 1998; El Mchichi *et al.*, 2010).

Mit Ausnahme des zytoplasmatischen PML VII, können alle PML-Isoformen ATO-abhängig mit SUMO1, -2 und -3 SUMOyliert werden (Maroui *et al.*, 2012).

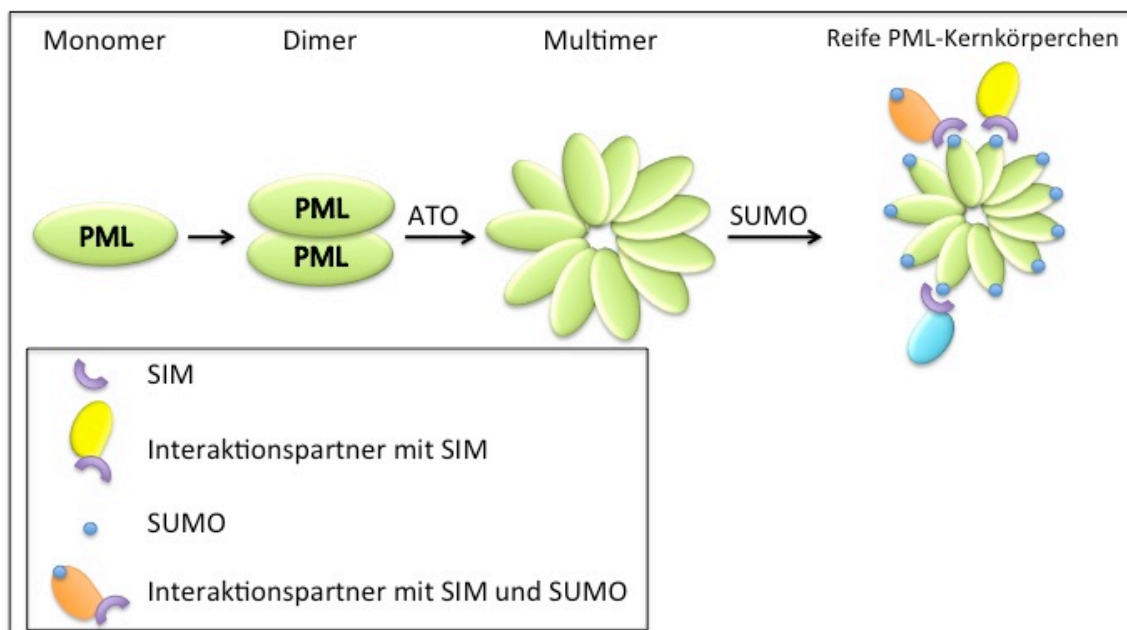


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Biogenese von PML-Kernkörpern
PML-Proteine dimerisieren zunächst über ihre RBCC-Domäne und bilden dann Multimere. Die posttranslationale Modifikation von PML mit SUMO führt zur Organisation kugelförmiger *Bodies*. Interaktionspartner mit integriertem SIM oder SUMOylierte Proteine (oder beides) führen schließlich zur Bildung von reifen PML-Kernkörpern.

1.5 Posttranslationale Modifikation mit SUMO

Das Protein SUMO hat ein Molekulargewicht von 11 kDa und ist mit einer Übereinstimmung von ca. 20 % ein entfernter Verwandter des Ubiquitins. SUMO wird an eine Vielzahl von Proteinen kovalent gebunden, typischerweise

über das Lysin in der Konsensussequenz ψ KxE (ψ steht für eine große hydrophobe und x für eine beliebige Seitengruppe).

In niederen Eukaryoten, wie der Bäckerhefe, sowie Insekten und Nematoden wird nur ein SUMO-Gen, in Pflanzen dagegen bis zu acht Paraloge von SUMO exprimiert (Kurepa *et al.*, 2003). Beim Menschen gibt es vier SUMO-Isoformen, SUMO1 - SUMO4. Obwohl SUMO2 und SUMO3 zu fast 50 % identisch zu SUMO1 sind (siehe Abb. 1.5), unterscheiden sie sich von diesem. SUMO2 und SUMO3 besitzen an ihrem N-Terminus ein SUMO-Polymerisierungsmotiv (VKTE) und sind darum in der Lage polymere SUMO-Ketten zu bilden. SUMO1 fehlt dieses Motiv und deshalb ist es nicht zur Kettenbildung befähigt (Tatham *et al.*, 2001; Matic *et al.*, 2008). Es ist aber möglich dass SUMO1 das Ende einer SUMO2/3-Kette markiert (Matic *et al.*, 2008).

SUMO4 ist zu 86 % homolog zu SUMO2 und unterscheidet sich von den anderen SUMO-Isoformen insofern, als dass der Prozess der Reifung von SUMO4 zur aktiven Form mit zwei Glycinresten am C-Terminus durch ein einziges Prolin an Position 90 inhibiert wird. Das native SUMO4 ist dadurch nicht in der Lage kovalente Isopeptidbindungen zu einem Substrat aufzubauen (Owerbach *et al.*, 2005; Bohren *et al.*, 2004). Früher glaubte man, dass es sich bei der vierten SUMO-Isoform um ein nicht exprimiertes Pseudogen handeln könnte (Su und Li, 2002). Neuere Ergebnisse demonstrieren jedoch, dass in der asiatischen Bevölkerung, ein Polymorphismus im SUMO4-Gen sowohl mit dem Typ I Diabetes als auch mit dem Typ II Diabetes in Verbindung gebracht werden kann. Deswegen ist SUMO4 auch unter dem Namen Diabetesempfindlichkeitsgen bekannt (Noso *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2004).

SUMO-spezifische Proteasen (SENP = *Sentrin Specific Peptidase*; SUSP = *SUMO-specific protease*) entfernen SUMO wieder (Mukhopadhyay *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2001). Insgesamt gibt es sechs unterschiedliche SENPs (SENP 1-3 und 5-7), die weniger substratspezifisch sind, als dass sie viel mehr eine bestimmte SUMO-Isoform bevorzugen. Alle SENPs mit Ausnahme von SENP1 präferieren SUMO2/3-modifizierte Substrate (Di Bacco und Gill, 2006; Shen *et al.*, 2006 und 2009). SENP1 und SENP2 sind darüber hinaus an der Prozessierung von unreifen SUMO-Vorläuferproteinen (Pre-SUMOs) beteiligt (Shen *et al.*, 2006). Außerdem sind die SENPs subzellulär unterschiedlich

lokalisiert. SENP1 und SENP2 befinden sich bevorzugt am Kernporenkomplex und im Nukleoplasma. Dennoch sind sie von Zeit zu Zeit auch im Zytoplasma zu finden (Bailey and O'Hare, 2002; Hang and Dasso 2002; Zhang *et al.*, 2002; Itahana *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008). SENP3 und SENP5 sind direkt am Nukleolus (Cheng *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2009; Kuo *et al.*, 2008; Yun *et al.*, 2008), SENP6 und SENP7 ausschließlich im Nukleoplasma zu finden (Lee *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2009).

Die posttranslationale Modifikation mit SUMO führt oft zu neuen Protein-Protein-Interaktionen (Hay *et al.*, 2005). Dabei spielen SUMO-Interaktionsmotive (*SUMO Interacting Motifs* = SIMs) im SUMOylierungssystem eine wichtige Rolle (Hannich *et al.*, 2005; Uzunova *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2006). Lange Zeit wurden nur die beiden Motive SIM-a und SIM-r (= invers orientiertes SIM-a; zum Beispiel in RanBP2 (*Ras like nuclear binding Protein 2*)) unterschieden (Minty *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2004). Diese SIMs bestehen aus drei hydrophoben (I, L oder V) und 3-4 sauren Resten (Uzunova *et al.*, 2007). Die hydrophoben Reste können auf mehrere Arten arrangiert sein (V/I-V/I-X-V/I/L oder V/I-X-V/I-V/I). Sie formen einen β -Strang, können mit dem zweiten β -Strang eines SUMOs interagieren und bilden entweder ein paralleles (SIM-a) oder antiparalleles β -Faltblatt (SIMr) (Song *et al.*, 2005; Hecker *et al.*, 2006). Zusätzliche Reste, die außerhalb der eigentlichen SIM-Sequenz liegen können die spezifische Bindung zu den SUMO-Isoformen durch elektrostatische Wechselwirkungen beeinflussen (Hecker *et al.*, 2006).

Später wurde ein weiteres Motiv als SIM-b mit der Konsensussequenz: I/V D L T definiert. Dieses Motiv repräsentiert die Kernsequenz des SIMs in PIAS (*Protein Inhibitor of STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription)*) (Uzunova *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2004; Miteva *et al.*, 2010). Ob die verschiedenen SIMs auch unterschiedliche SUMOs bevorzugen, ist noch unklar. Aber es sieht so aus, als würde SIMb mit einer stärkeren Affinität SUMO2/3 binden als SUMO1 (Sekiyama *et al.*, 2008).

SIM a	$\Psi\Psi\Psi\text{AcAcAcAcAc}$	(ΨΨΨ = V,I oder L)
SIM b	$\Psi\Psi\text{DLT}$	
SIM r	$\text{AcAcAcAcAc}\Psi\Psi\Psi$	(Ac = D,E oder S)

Abbildung 1.4: Überblick über die drei unterschiedlichen SIMs:

Ψ kennzeichnet allgemein hydrophobe Reste, Ac steht für saure Reste (verändert nach Praefcke *et al.*, 2012)

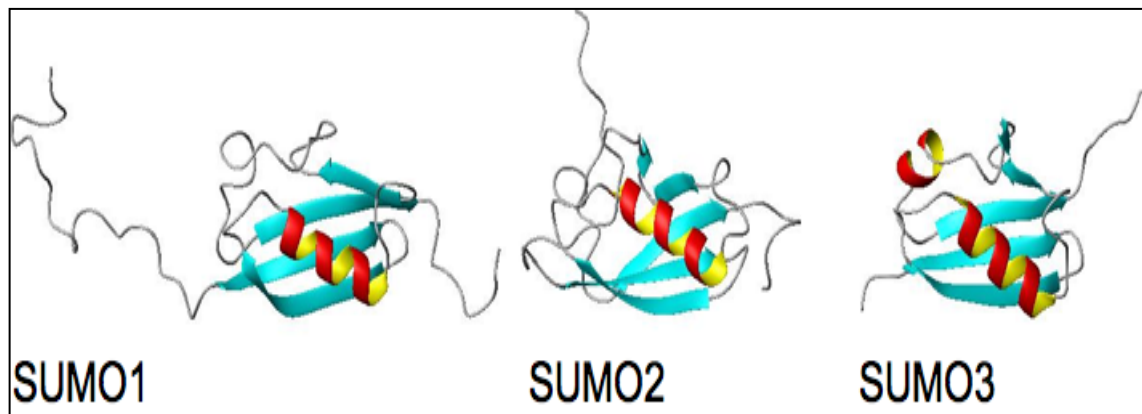


Abbildung 1.5: 3D-Strukturen der drei Isoformen von SUMO (*small ubiquitin-related modifier*)

Der Vergleich der Strukturen zeigt einen deutlichen Unterschied der beiden Isoformen SUMO2 und SUMO3 zu SUMO1. SUMO2 und SUMO3 dagegen lassen sich kaum voneinander unterscheiden (Bayer *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2005; Ding *et al.*, 2005).

1.6 Mechanismus der SUMOylierung

Vor der Konjugation von SUMO an ein Substrat wird das noch unreife SUMO-Vorläuferprotein (Pre-SUMO) von einem SENP (SENP1 oder SENP2) C-terminal prozessiert, dann durch den E1-Proteinkomplex (ein Heterodimer aus SAE1 und SAE2 (SUMO1 *Activating Enzyme Subunit 1* bzw. *Subunit 2*, aus der Hefe bekannt als *Aos1 (Activation of Sentrin/SUMO Protein)* und *Uba2 (Ubiquitin-Associated Protein2)*) unter ATP-Verbrauch aktiviert und anschließend auf das SUMO-konjugierende Enzym *Ubc9 (Ubiquitin Conjugating Enzyme)* übertragen (Desterro *et al.*, 1997). Das beladene Ubc9 bindet an das Substrat und bildet eine Isopeptidbindung zwischen der C-terminalen Carboxylgruppe von SUMO und der ε-Aminogruppe des Lysins am Substrat. Dieses Lysin ist Teil der SUMOylierungssequenz. Obwohl die meisten Substrate innerhalb dieser Konsensussequenz SUMOyliert werden, gibt es auch Substrate, die an Lysinen SUMOyliert werden, deren umgebende Aminosäuren nicht mit der Konsensussequenz übereinstimmen. Die

SUMOylierungsprozesse werden durch SUMO-Ligasen (E3) verstärkt. Die Funktion der meisten SUMO-Ligasen besteht darin, als Adaptoren zu wirken, welche das SUMO-konjugierende Enzym (E2) und das zu SUMOylierende Substrat binden (siehe Abb.: 1.6). Dies bringt die Reaktionspartner in räumliche Nähe und erleichtert die Ausbildung der Isopeptidbindung (Melchior *et al.*, 2003). Hierzu gehören unter anderem die Mitglieder der PIAS-Proteinfamilie oder das Nukleoporin RanBP2/Nup358 (*Ran Binding Protein 2 / Nuclear Pore Complex Protein 358*).

Andere posttranslationale Modifikationen wie zum Beispiel Acetylierung oder Phosphorylierung induzieren ebenfalls die SUMOylierung von Substraten wie z.B. PML und demzufolge indirekt die Bildung von PML-Kernkörpern (Hayakawa *et al.*, 2008; Scaglioni *et al.*, 2008; Stehmeier und Müller, 2009). Auch das Vorhandensein eines SIMs in PML führt zu intermolekularen beziehungsweise intramolekularen Interaktionen zwischen PML-SUMO und SIM und schließlich zur Biogenese von PML-Kernkörpern. Zudem bindet die RING-Finger Domäne von PML an Ubc9 (Matunis *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2006).

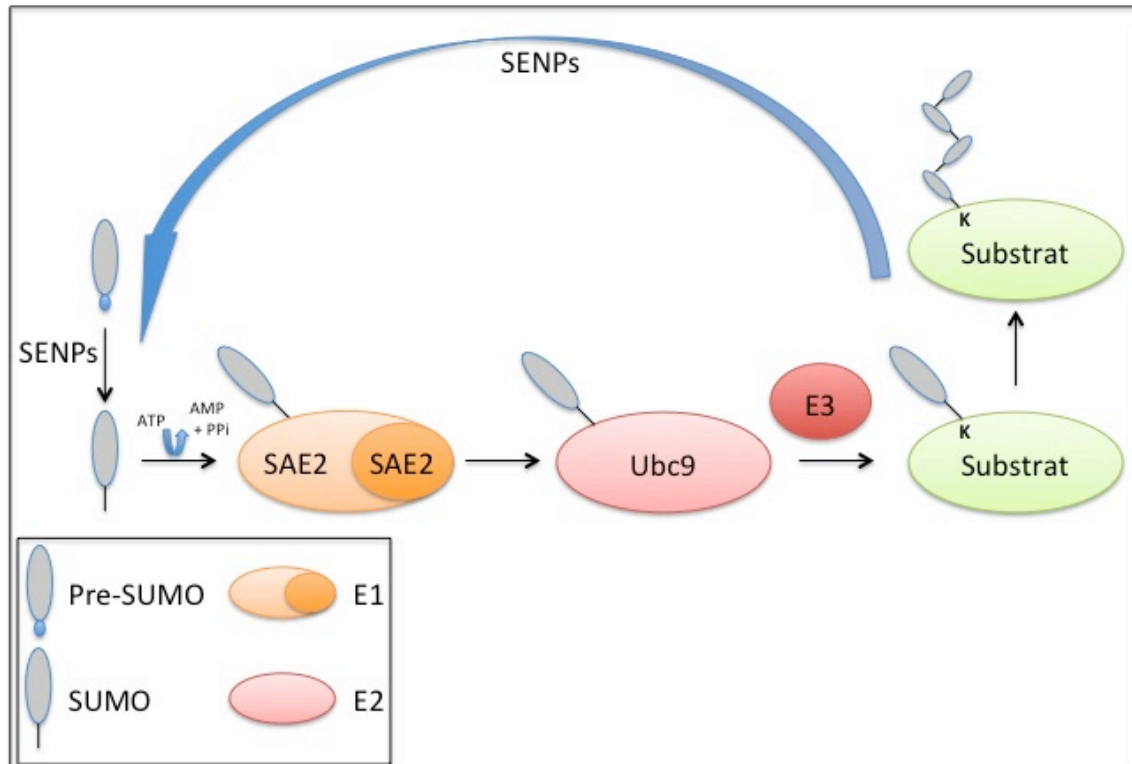


Abbildung 1.6: Schematische Übersicht der SUMOylierung von Substraten

Die Abbildung zeigt die ATP-abhängige SUMOylierung von Substraten mit Hilfe von drei Enzymen (E1, E2, E3). Bevor SUMO an ein Substrat konjugiert werden kann, muss es zunächst mit Hilfe einer Protease (SENPs) zu seiner reifen Form prozessiert werden. Das SUMO-E1-Heterodimer SAE1/SAE2 aktiviert SUMO und überträgt es vom Cystein in SAE2 auf ein Cystein des SUMO-E2-Enzyms Ubc9. Das SUMO-konjugierende Enzym Ubc9 erkennt sein SUMOyliertes Substrat anhand der Konsensussequenz ψ KxE (ψ steht für eine große hydrophobe und x für eine beliebige Seitengruppe). Die E3-Ligase beschleunigt die Übertragung von SUMO an einen Lysinrest des Substrates. Das E2 wird frei und steht für erneute SUMOylierungsreaktionen zur Verfügung. Im Gegensatz zu SUMO1, können SUMO2 und SUMO3 Ketten bilden, die wiederum durch SENPs abgespalten werden und für weitere Reaktionen zur Verfügung stehen. (verändert nach Miteva *et al.*, 2010).

1.7 Funktion der SUMOylierung in der Zelle

Der Modifikation von Proteinen mit SUMO eine konkrete Rolle zuzuschreiben gestaltet sich als schwierig. Es werden viele unterschiedliche, darunter zytosolische aber zum größten Teil nukleäre Proteine SUMOyliert. Die SUMOylierung nimmt Einfluss auf die DNA-Reparatur, die Transkription, die Mitose, die Lokalisation von Proteinen im Kern und Zytosol und somit auf die gesamte nukleäre Organisation (Gill *et al.*, 2005; Ulrich *et al.*, 2005; Matunis *et al.*, 2006; Heun *et al.*, 2007; Palvimo *et al.*, 2007; Dasso *et al.*, 2008; Tempe *et al.*, 2008; Bergink und Jentsch, 2009). Fehler im SUMOylierungssystem führen zu Krebs und neurodegenerativen Erkrankungen (Kim und Baek, 2006). Darüberhinaus zerfallen sowohl Nukleoli, als auch PML-Kernkörper wenn die

SUMOylierungskaskade gestört wird (Nacerddine *et al.*, 2005; Heun *et al.*, 2007). Die meisten nukleären Proteine, wie zum Beispiel RanGAP1 und PML werden entweder mit SUMO1 monoSUMOyliert oder an mehreren Stellen mit SUMO1 multiSUMOyliert und interagieren dann über SIMs mit ihren Interaktionspartnern (Matunis *et al.*, 2006). Viele Transkriptionsfaktoren reassemblieren sich mit PML-Kernkörpern wenn sie SUMOyliert werden (Johnson *et al.*, 2004; Palvomo *et al.*, 2007). Die Dynamik zwischen SUMOylierung bzw. DeSUMOylierung ist vor allem während der Mitose, speziell bei der Trennung von Schwesterchromatiden unabdingbar. Auch wenn dieser Prozess noch in vielerlei Hinsicht unklar ist, so werden einige im Zentromer liegende Proteine SUMOyliert (Dasso *et al.*, 2008).

PML-Kernkörper beinhalten in ihrer Proteinagglomeration unter anderem Proteasomen und Ubiquitin (Fabunmi *et al.*, 2001; Lafarga *et al.*, 2002; Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2008). ATO induziert den Abbau von PML durch die vorherige SUMOylierung am Lysin 160 im PML-Protein. SUMOyliertes PML wird dann von der humanen Ubiquitinligase RNF4 (*RING finger protein 4*) erkannt und für den Abbau über das 26S-Proteasom ubiquitiniert. Demzufolge führt die SUMOylierung zur Ubiquitinierung von Proteinen und schließlich zu deren proteasomalen Abbau (Geoffroy und Hay, 2009; Häkli *et al.*, 2005; Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2008; Tatham *et al.*, 2008; Weisshaar *et al.*, 2008).

1.8 Modifikation von Proteinen mit Ubiquitin

Eine Zelle muss in der Lage sein auf äußere Einflüsse, wie Hunger oder Stress zu reagieren. Aus diesem Grund werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten auch unterschiedliche Proteine benötigt, die wiederum kurze Zeit später unbrauchbar werden. Ubiquitin dient dazu diese Proteine für den Abbau zu kennzeichnen. Es ist ein vergleichsweise kleines Protein aus nur 76 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 8,5 kDa. Die Ubiquitinierung erfordert ähnlich wie die SUMOylierung ein Zusammenspiel von drei Enzymen, die Ubiquitin zunächst aktivieren (E1) und dann auf das abzubauende Substrat übertragen (E2 + E3) (siehe Abb.: 1.7). In Vertebraten gibt es zwei unterschiedliche E1-Enzyme, Ube1 (oder UBA1, *Ubiquitin-like Modifier Activating Enzyme 1*) und Ube1L2

(oder UBA6, *Ubiquitin-like Modifier Activating Enzyme 6*). Diese zeigen in ihrer Sequenz eine Homologie von etwa 40% (Ciechanover *et al.*, 1981 und 1982; Chiu *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2007; Pelzer *et al.*, 2007). Ube1 ist am häufigsten an Ubiquitinierungsprozessen beteiligt während Ube1L2 selektiv für das E2-Enzym Ube2Z ist (*Ubiquitin-conjugating Enzyme 2Z*, oder Use1) (Jin *et al.*, 2007). Ein E1-Enzym aktiviert Ubiquitin unter Verbrauch von ATP durch Adenylierung seines C-Terminus. Danach entsteht eine reaktive Thioesterbindung zwischen dem Cystein im E1 und dem C-terminalen Glycin in Ubiquitin. So überträgt es das aktive Ubiquitin auf das Ubiquitin konjugierende Enzym E2. (Ciechanover *et al.*, 1981 und 1982; Hershko *et al.*, 1981). Ubiquitin konjugierende Enzyme sind für den zweiten Schritt in Ubiquitinierungsreaktionen zuständig. Sie bilden eine Thioesterbindung zwischen ihrem aktiven Cystein und dem C-terminalen Glycin des zuvor aktivierten Ubiquitins aus (Pickart und Rose, 1985; Haas und Bright, 1988) und binden dann über strukturell konservierte Bindungsstellen an eine bestimmte Ubiquitin E3-Ligase (van Wijk und Timmers, 2009). Es gibt insgesamt drei Klassen von Ubiquitinligasen. Die SCF (Skp1-Cullin-F *box*)-Familie formt eine Plattform mit vielen Untereinheiten um die E2-katalysierte Ubiquitinierung zu gewährleisten. Sie spielen bei der Ligation von Ubiquitin an ein Substrat nur eine indirekte Rolle und unterstützen die Ubiquitinkonjugation, indem sie die Reaktionspartner (Substrat, Ubiquitin und E2) in räumliche Nähe bringen. In ähnlicher Weise arbeiten auch die Mitglieder der RING-Finger-Proteine. Sie binden über ein spezifisches Bindungsmotiv an ein Substrat und interagieren durch die RING-Domäne mit dem E2, das wiederum die Ubiquitinierung des Substrates katalysiert. Die Ubiquitinligasen, die zur HECT (*Homology to the E6-AP Carboxyl Terminus*)-Familie gehören, besitzen im Gegensatz zu den anderen beiden Familien eine eigene katalytische Aktivität um den Transfer von Ubiquitin zum Substrat zu ermöglichen (Joazeiro und Weissman, 2000). Die große Anzahl an E2- und E3-Enzymen (im Menschen etwa 100 verschiedene E2- und E3-Enzyme) gewährleistet die hohe Spezifität der Ubiquitinierung. Eine Kette von mindestens vier Ubiquitin-Molekülen kann ein Protein zum Beispiel für den Abbau über das 26S-Proteasom kennzeichnen. Ubiquitin spielt aber auch eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus, beim Proteintransport in der Zelle und bei der Aktivierung bzw. Inaktivierung von

Enzymen (Hershko *et al.*, 1983; Ciechanover *et al.*, 2005; Mukhopadhyay und Riezman *et al.*, 2007). Diese vielfältigen Aufgaben werden dadurch möglich, dass Ubiquitin auf mehrere Arten sein Substrat modifizieren kann. Es kann über spezielle Enzymkaskaden entweder an freie Lysinreste, Cysteine, aber auch an andere N-terminale Reste posttranslational angefügt werden. Wird zum Beispiel nur ein Ubiquitin-Molekül (Monoubiquitinierung) angehängen, so wird unter anderem der Transport von Zellmembranproteinen ins Zellinnere oder die DNA-Reparatur gewährleistet (Haglund *et al.*, 2003; Ulrich *et al.*, 2005; Acconcia *et al.*, 2009; Thompson und Hinz, 2009). Darüberhinaus kann Ubiquitin unterschiedliche Ketten ausbilden, je nachdem über welche seiner sieben Lysin-Reste es verknüpft wird. Die vielleicht prominenteste Lysin48-Kette (K48-Kette) führt zum proteasomalen Abbau, Lysin63-Ketten (K63-Ketten) dagegen sind an der Weiterleitung von zellulären Signalen beteiligt (Windheim *et al.*, 2008). Egal auf welche Weise ein Protein mit Ubiquitin posttranslational modifiziert wird, dieser Prozess ist immer reversibel. Deubiquitinierungsenzyme (DUBs) bauen die Ketten wieder ab (Chung und Baek, 1999).

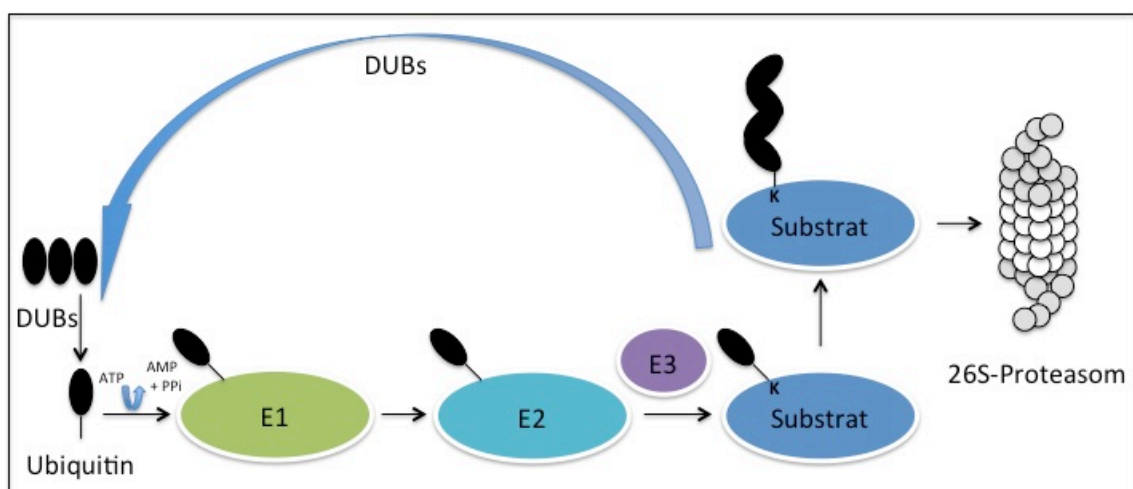


Abbildung 1.7: Schematische Übersicht der Ubiquitinierung von Substraten

E1 = Ubiquitin aktivierendes Enzym, E2 = Ubiquitin konjugierendes Enzym, E3 = Ubiquitinligase
 Ubiquitin wird in einem dreistufigen Prozess an ein Substrat gebunden. Zunächst wird das Ubiquitin mit Hilfe des E1 und unter ATP-Verbrauch aktiviert. Im zweiten Schritt wird das aktivierte Ubiquitin auf das E2 übertragen. Diese Konstellation wird schließlich von der E3-Ligase erkannt, was zur Ubiquitinierung des Substrates führt. Wiederholt sich diese Reaktionsfolge mehrere Male, so wird das Substrat durch eine K48-Ubiquitinkette markiert, vom Proteasom erkannt und abgebaut.

1.9 Zusammenhang zwischen Ubiquitinierung und SUMOylierung

Die posttranslationale Modifikation von Proteinen durch SUMO beeinflusst unter anderem deren Lokalisation, Aktivität und Interaktionsbereitschaft mit anderen Makromolekülen (Xie *et al.*, 2007; Matunis *et al.*, 2006; Heun *et al.*, 2007; Palvimo *et al.*, 2007; Dasso *et al.*, 2008). Unter normalen Bedingungen werden Proteine meist durch SUMO1 modifiziert, wohingegen zellulärer Stress zu einer Modifizierung mit SUMO2 bzw. SUMO3 (SUMO2/3) führt (Saitoh und Hinchey; 2000). Einige Substrate können am gleichen Lysin alternativ mit Ubiquitin oder mit SUMO modifiziert werden. Zum Beispiel führt die Modifikation eines spezifischen Lysinrestes von PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen / Polymerase 30*) mit Ubiquitin zur DNA-Reparatur (Ulrich 2005; Hoege *et al.*, 2002). Eine SUMOylierung desselben Restes führt dagegen zu einer Interaktionsbereitschaft mit einer Helikase und resultiert in einer Inhibition der Rekombination während der DNA-Replikation (Pfander *et al.*, 2005; Papouli *et al.*, 2005).

Wie bereits erwähnt, sind die humanen Vertreter SUMO2 und SUMO3 genau wie Ubiquitin in der Lage Ketten zu bilden. SUMO1 dagegen ist aufgrund fehlender Lysinreste im N-Terminus nicht befähigt Ketten auszubilden (Tatham *et al.*, 2001). Die physiologische Rolle von SUMO-Ketten in sich teilenden Zellen war lange Zeit ungeklärt, aber sie scheinen unter anderem an der Ausbildung des synaptonemalen Komplexes während der Meiose beteiligt zu sein (Cheng *et al.*, 2006). Entgegen der früheren Vermutung, SUMOylierung habe keinen Einfluss auf proteasomalen Abbau konnte vor nicht allzu langer Zeit gezeigt werden, dass eine SUMO-Modifizierung mit SUMO2/3 den Ubiquitin abhängigen Abbau von Proteinen initiiert (siehe Abb.: 1.8). Eine Inhibition des 26S-Proteasoms führt sowohl in Hefen, als auch in humanen Zellen zur Akkumulation von SUMO-Konjugaten die gleichzeitig auch Ubiquitin tragen (Uzunova *et al.*, 2007). Außerdem konnte eine Akkumulation von hochmolekularen Konjugaten in Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) nachgewiesen werden, deren RING-Finger-Proteine Ris1 (= *Role in silencing protein 1*) und Hex3/Slx8 (= *Hexose Metabolism-related Protein/Synthetic Lethal of Unknown [x] Function*) mutiert wurden (Uzunova *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2007; Prudden *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008). Das Heterodimer Hex3/Slx8

ist eine Ubiquitinligase für SUMO-Konjugate (STUbL, *SUMO-Targeted Ubiquitin Ligase*), die über SIMs an SUMOylierte Substrate bindet und von diesen stimuliert wird. Beide Proteine beinhalten eine RING-Domäne an ihren C-Termini, die für E3-Ligasen charakteristisch ist. In diesem E3-Komplex scheint Slx8 hauptsächlich an der Ubiquitinligation beteiligt zu sein, wird aber von Hex3 wirkungsvoll unterstützt. SUMOylierte Substrate stimulieren die Hex3/Slx8-abhängige Ubiquitinierung, indem sie eine nicht kovalente Bindung mit Hex3 eingehen (Xie *et al.*, 2007; Freemont *et al.*, 2000).

Das humane RNF4 (*RING finger protein 4*) ist funktionell homolog zum Heterodimer Hex3/Slx8. Auch dieses Protein zeichnet sich als Ubiquitinligase (E3) aus und bindet nicht kovalent an SUMO-Konjugate (Häkli *et al.*, 2005). Die beiden aus der Spaltheife (*Schizosaccharomyces pombe*) bekannten RING-Finger-Proteine Rfp1 und Rfp2 (*RING finger protein 1/2*) tragen an ihrem N-terminalen Ende ein SIM und sind funktionell ortholog zum humanen RNF4. Genetische Analysen haben gezeigt, dass Rfp1 und Rfp2 redundante Funktionen haben und keine E3-Aktivität aufweisen. Sie interagieren jedoch mit der aktiven Ubiquitinligase Slx8 und formen somit einen funktionsfähigen Ubiquitinligasekomplex (Chen *et al.*, 2007; Kosoy *et al.*, 2007; Prudden *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008).

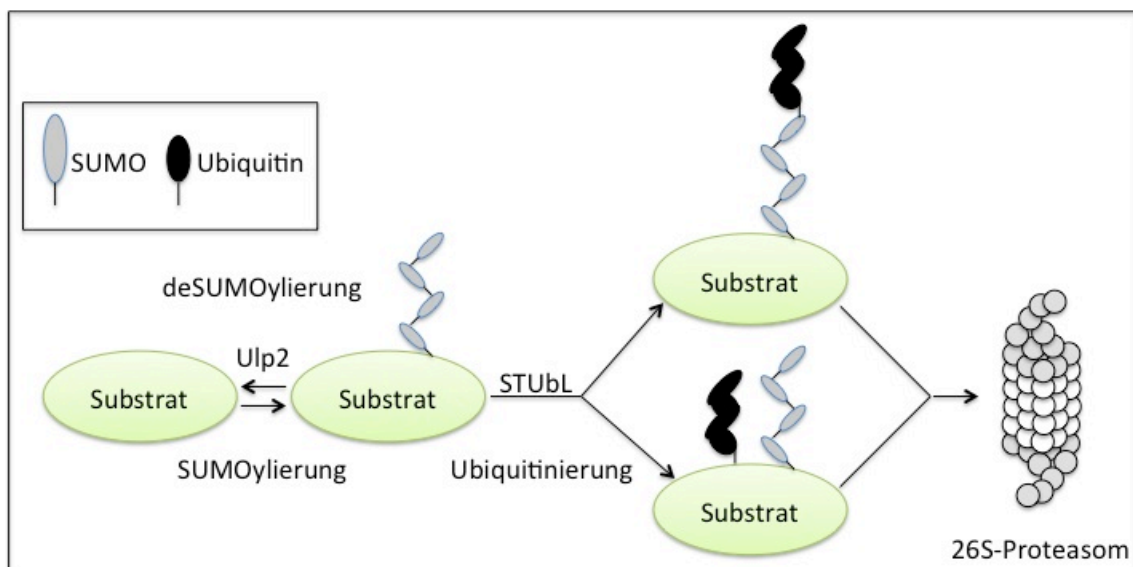


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung über die Ubiquitin abhängige Proteolyse von SUMO-Konjugaten

Diese Abbildung zeigt, wie SUMOylierte Proteine über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut werden können. Es ist möglich, dass entweder die SUMO-Kette selbst oder das SUMOylierte Substrat ubiquitiniert wird. Das SUMO-Konjugat wird dann von einer STUbL (*SUMO-Targeted Ubiquitin Ligase*) ubiquitiniert und schließlich vom 26S-Proteasom erkannt und abgebaut (verändert nach Uzunova *et al.*, 2007, Weisshaar *et al.*, 2008; Miteva *et al.*, 2010).

1.10 Die humane Ubiquitinligase RNF4

RNF4 (SNURF oder RES 4-26) ist ein 21 kDa großes, nukleäres RING-Finger-Protein vom Typ C3HC4 das unter anderem bei der Regulation der Transkription, dem Zellwachstum und der DNA-Reparatur mitwirkt. Es koordiniert zum Beispiel in DNA-Bereichen mit Doppelstrangbrüchen die Lokalisation und SUMO-abhängige Ubiquitinierung von Proteinen (Vyas *et al.*, 2012; Galanty Y. *et al.*, 2012; Yin Y. *et al.*, 2012). Endogenes RNF4 ist hauptsächlich in PML-Kernkörpern zu finden, wobei diese Assoziation abhängig von der PML-Isoform zu sein scheint. Darüber hinaus erleichtert die nicht kovalente Bindung zwischen SUMO1 und RNF4 die RNF4-PML-Komplexbildung. Das RING-Finger-Motiv im RNF4-Protein führt zur Interaktion mit PML (Häkli *et al.*, 2004). RNF4 bindet, genau wie die Heterodimere Hex3/Slx8 (*Saccharomyces cerevisiae*) und Rfp/Slx8 (*Schizosaccharomyces pombe*) nicht kovalent über SIMs an SUMO-Konjugate (Perry *et al.*, 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Expression des humanen RNF4 die Defekte der rfp1rfp2-, slx8-, und rfp1rfp2slx8-Mutationen in *Schizosaccharomyces pombe* (Xie *et al.*, 2007; Prudden *et al.*, 2007), sowie die hex3- und slx8- Mutationen in *Saccharomyces cerevisiae* komplementiert und der Akkumulation hochmolekularer SUMO-Konjugate entgegen wirkt (Uzunova *et al.*, 2007). In rfp1rfp2-Doppelnulzellen konnten Akkumulationen von SUMOylierten Proteinen nachgewiesen werden, was den Schluss zulässt, dass Rfp/Slx8 und RNF4 für den Ubiquitin abhängigen Abbau SUMOylierter Proteine zuständig ist (Xie *et al.*, 2007; Prudden *et al.*, 2007). Demnach ist SUMO neben Ubiquitin an der Regulation des Protein-Abbaus über das 26S-Proteasom beteiligt (Uzunova *et al.*, 2007).

RNF4 besitzt an seinem N-Terminus vier potentielle SIMs. Es homodimerisiert über seine RING-Domäne und ist in der Lage sich *in vitro* selbst zu ubiquitinieren (Häkli *et al.*, 2004). Das RNF4-RING-Dimer destabilisiert die Thioesterbindung der E2-Ubiquitinkonjugate und scheint Voraussetzung für den Ubiquitintransfer zu sein. Gleichzeitig unterstützt RNF4 die Substratubiquitinierung, indem es nichtkovalent über seine SIMs ans Substrat bindet. Die Orientierung der RING-Domänen im RNF4-Homodimer ist ähnlich zu der anderer Ubiquitinligasen mit C-terminalem RING. Dies zeigt der

Vergleich der beiden Strukturen des RNF4-Homodimers und des MDM2-MDMX-Heterodimers (MDM = Mouse Double Minute 2 homolog; MDMX = Mouse Double Minute X, eine andere RING-Finger Ligase; Abbildung 1.9) (Liew *et al.*, 2010).

Wie bereits beschrieben induziert ATO die Phosphorylierung und folglich PolySUMOylierung von PML (Isoformen I – VI). PolySUMOyliertes PML interagiert mit RNF4, woraufhin PML ubiquitiniert und proteasomal abgebaut wird (Weisshaar *et al.*, 2008). Vergleicht man den Effekt von ATO auf die einzelnen PML-Isoformen so wird deutlich, dass die Isoform ohne SIM (PML VI) im Gegensatz zu den anderen nukleären PML-Isoformen (PML I-V) nicht abgebaut wird. Obwohl PML VI nach seiner Phosphorylierung polySUMOyliert wird, ist kein ATO-abhängiger Abbau erkennbar. Wird jedoch zusätzlich zum ATO-Stress RNF4 überexprimiert so wird auch PML VI proteasomal abgebaut. PML VI ist demnach trotz fehlenden SIMs in der Lage mit RNF4 zu interagieren. Der ATO-induzierte Abbau von PML setzt aber voraus, dass das abzubauende PML-Protein mit Komponenten des Proteasoms interagiert. PML VI ist nicht in der Lage mit dem 20S katalytischen Zentrum und der β regulatorischen Untereinheit des 11S-Komplexes zu interagieren und kann deshalb auch nicht ohne Mitwirkung von RNF4 abgebaut werden (Maroui *et al.*, 2012). Die etwa 55 kDa große, im Zytoplasma vorkommende PML-Isoform VII wird nicht SUMOyliert und folglich auch nicht ATO-abhängig abgebaut. Dies ist auch nicht durch zusätzliche RNF4-Überexpression der Fall.

RNF4 war die erste identifizierte humane Ubiquitinligase die SUMO-abhängig ihre Substrate ubiquitiniert. Mittlerweile wurden aber noch weitere STUbL identifiziert, darunter zum Beispiel RNF111 (Arkadia), Orf61p (*Varizella-Zoster Virus* (VZV) *Open Reading Frame* 61) und ICP0 (*HSV1-Infected Cell Polypeptide* 0). Alle drei STUbL besitzen 3 SIMs, die es ihnen ermöglichen polySUMOylierte Substrate zu binden. RNF111 bildet allerdings keine K48-Ubiquitinketten die das Substrat für den proteasomalen Abbau über das 26S-Proteasom kennzeichnen, sondern K63-Ketten. Es ubiquitiniert zum Beispiel SUMOyliertes XPC (Xeroderma Pigmentosum C) und nimmt auf diesem Weg Einfluss auf die DNA-Reparatur (Poulsen *et al.*, 2013).

ORF61p ist das Ortholog des Herpes Simplex Virus - Protein ICP0, kann aber dessen Funktion nicht vollständig komplettieren (Moriuchi *et al.*, 1992; Matthew

et al., 2010). ICP0 ubiquitiniert zum Beispiel PML und Sp100 sodass PML- und Sp100-Kernkörper zerfallen (Chelby-Alix und de The, 1999). ORF61p ist zwar in der Lage sich selbst und Sp100 SUMO-abhängig zu ubiquitinieren (K48-Ketten), PML ist jedoch keines seiner Substrate. Trotzdem zerfallen PML-Kernkörper in Anwesenheit von ORF61p. Dies liegt daran, dass ORF61p über seine drei SIMs mit SUMO1 in PML-Kernkörpern interagiert (Kyratsous *et al.*, 2009).

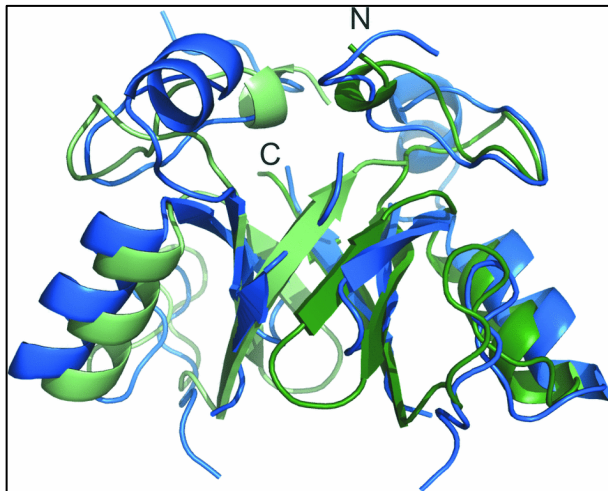


Abbildung 1.9: 3D-Struktur des RNF4-Homodimers (blau) verglichen mit dem Heterodimer MDM2-MDMX (grün) (Liew *et al.*, 2010)

Sowohl RNF4 als auch MDM2 und MDMX bilden über ihre RING-Domänen Dimere aus. RNF4 bildet Homodimere und MDM2 und MDMX Heterodimere. Allerdings ist die Homodimerisierung von RNF4 Voraussetzung für seine Ligaseaktivität. Das Heterodimer MDM2-MDMX dagegen verhindert die Ubiquitinierung von p53 und MDM2.

1.11 Mitogen aktivierte Proteinkinasen

Mitogen aktivierte Proteinkinasen auch bekannt unter dem Namen MAP-Kinasen sind Serin/Threonin-Kinasen die unter anderem durch osmotischen Stress, Hitzeschock und Cytokine aktiviert werden. Sie sind an regulatorischen Prozessen wie zum Beispiel der Regulation der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und der Apoptose beteiligt (Pearson *et al.*, 2002). Die erste in humanen Zellen entdeckte MAP-Kinase war ERK1 (*Extracellular-signal Regulated Kinase 1*, MAPK3). Sein naher Verwandter ERK2 (MAPK1) gehört genau wie die mitogenaktivierte Proteinkinase p38 (p38 MAPK) und SAP- (*Stress-activated Protein Kinases* = SAPKs) beziehungsweise JN-Kinase (*Jun N-terminal Kinases* = JNKs) zur Familie der MAP-Kinasen. Damit deren Kinasedomänen katalytisch aktiv werden, müssen MAP-Kinasen in der Regel an ihrem Threonin und Tyrosin im sogenannten Threonin-x-Tyrosin-

Motiv phosphoryliert werden. Diese duale Phosphorylierung wird durch MAP2-Kinasen (MAPKK) gewährleistet, die wiederum durch MAP3-Kinasen (MAPKKK, zum Beispiel c-Raf = *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*, MEKK4, MAP3K4 oder MLK3 = *Mixed Lineage Kinase-3*) phosphoryliert und aktiviert werden (Deleris *et al.*, 2011).

p38 und JNK können von den gleichen MAP3-Kinasen (MEKK1, MEKK4, ASK1, TAK1, MLK3, TAOK1 usw.) und MAP2-Kinasen (MKK4) phosphoryliert und aktiviert werden. Die MAP2-Kinase MKK7, die es in sechs verschiedenen Spleißvarianten gibt, aktiviert jedoch nur JNK. MKK3 oder MKK6 aktivieren ausschließlich p38 (Cargnello *et al.*, 2011). SAP-Kinasen (*stress-activated protein kinases* = SAPKs) und JN-Kinasen werden von drei SAPK/JNK Genen (JNK1, JNK2, JNK3) kodiert. SAPK/JNKs phosphorylieren c-Jun an den beiden Serinen 64 und 73 (Derijard *et al.*, 1994), daher auch der Name *Jun N-terminal kinases* (JNKs) (Abb.: 1.10).

Eine Inaktivierung der MAP-Kinasen wird durch Dephosphorylierung erreicht. Spezielle MAP-Kinase-Phosphatasen (MKPs) können Phosphate sowohl vom Tyrosin als auch vom Threonin hydrolysieren (Theodosiou *et al.*, 2002).

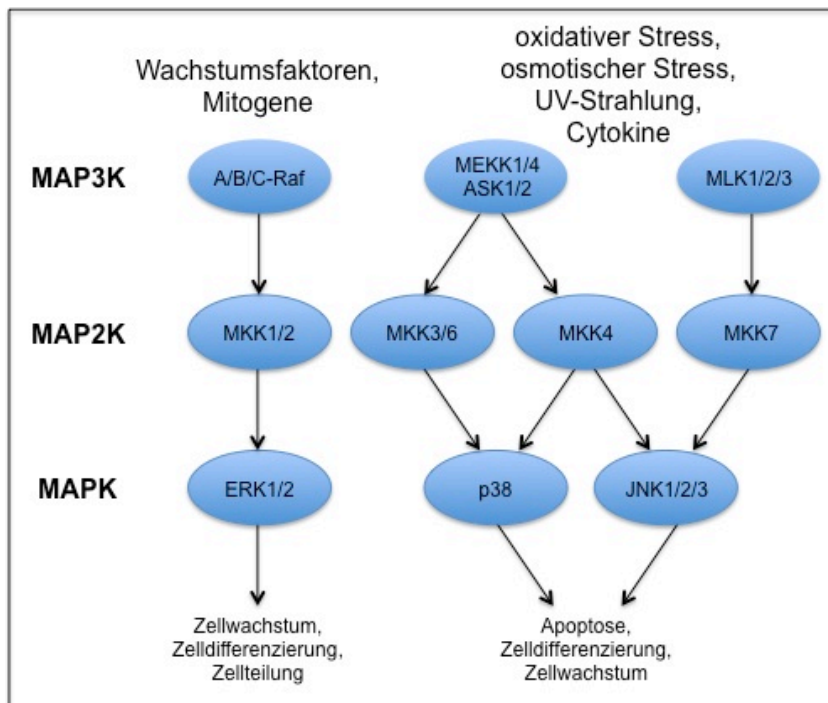


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung unterschiedlicher Signalwege der MAP-Kinasen

In diesem Schema ist die Signalkaskade der MAP-Kinasen vereinfacht dargestellt. ERK1/2 werden durch die MAP2-Kinasen MKK1/2 phosphoryliert und aktiviert, die wiederum von den MAP3-Kinasen A-, B- oder C-Raf phosphoryliert und aktiviert werden. Die MAP3-Kinasen MEKK1/4 und ASK1/2 können über die MAP2-Kinase MKK4 sowohl p38 als auch JNK1/2/3 phosphorylieren und aktivieren.

Zielsetzung

Die ubiquitin abhängige Proteolyse von SUMO-Konjugaten ist ein von der Hefe bis zum Menschen konservierter Prozess. Zudem zeigten bereits frühere Studien, dass PML in humanen Zellen SUMO-abhängig abgebaut wird und nach Behandlung mit ATO vorzugsweise mit SUMO2/3 modifiziert wird (Saitoh *et al.*, 2000; Uzunova *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 1998; Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2001).

Das Ziel dieser Arbeit bestand zunächst darin, eine Ubiquitinligase zu identifizieren, die SUMOylierte Substrate ubiquitiniert und somit für den Abbau über das 26S-Proteasom kennzeichnet. Weiterhin sollte nach der Identifikation von RNF4 als STUbL geprüft werden, ob PML ein Substrat für RNF4 sein könnte, da RNF4 hauptsächlich in PML-Kernkörpern lokalisiert ist und dort mit PMLIII interagiert. Sollte sich diese Vermutung bewahrheiten, so sollten schließlich SIM-Mutanten von RNF4 hergestellt werden, um herauszufinden, welche von dessen SIMs für seine Funktion essentiell sind. Mit Hilfe von zuvor etablierten stabilen SUMO-Zelllinien (stabile SUMO1-, SUMO2- und SUMO3-Zelllinien) sollte die subnukleäre Lokalisation von RNF4, aber auch der Einfluss der drei SUMO-Isoformen auf PML-NBs und die Stabilität von endogenem PML analysiert werden. Darüber hinaus sollte gezeigt werden, wie sich ATO auf die SUMOylierung und Stabilität von PML-Kernkörpern auswirkt und ob dieser Effekt durch RNF4 moduliert wird.

Außerdem sollten unterschiedliche Stressfaktoren miteinander verglichen werden um eventuelle Unterschiede in der Regulation des STUbL-Signalwegs zu entschlüsseln. Hierfür sollten primäre humane Zelllinien unter anderem einem osmotischen Stress durch Sorbitol ausgesetzt werden. Es galt herauszufinden, ob dieser zelluläre Stress genau wie ATO zu Veränderungen im SUMOylierungssystem führt und ob RNF4 in diesem Zusammenhang Einfluss auf endogenes PML oder PML-Kernkörper hat.

Sollten sich nach den unterschiedlichen Stressbedingungen Unterschiede im STUbL-Signalweg herauskristallisieren, so waren Proteinmikroarray-Versuche in Zusammenarbeit mit Zeptosens geplant, um die quantitative Analyse posttranslatonaler Ereignisse zu vereinfachen.

2.1.3 Antikörper

Primäre Antikörper:

Anti-SUMO1 (33-2400)	Zymed Laboratories (San Francisco, USA), monoklonales Antiserum aus Maus
Anti-GMP-1	Invitrogen (Karlsruhe), monoklonales Antiserum aus Maus
Anti-SUMO2 (ab22654)	Abcam (Cambridge, GB), polyklonales Antiserum aus Kaninchen
Anti-PML (PG-M3): sc-966	Santa Cruz Biotechnology, INC. (Santa Cruz, USA) monoklonales Antiserum aus Maus
Anti-PML (A301-167A, -168A)	Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA), polyklonales Antiserum aus Kaninchen
Anti-PML RINGB1 (3004)	Biogenes (Berlin), polyklonales Antiserum aus Kaninchen
Anti-Ubiquitin (P4D1): sc-8017	Santa Cruz Biotechnology, INC. (Santa Cruz, USA), monoklonales Antiserum aus Maus
Anti-FLAG (M2): F3165	Sigma-Aldrich (Steinheim), monoklonales Antiserum aus Maus
Anti-FLAG	Sigma-Aldrich (Steinheim), polyklonales Antiserum Nr. (F7425) aus Kaninchen
Anti-c-Myc (Klon 9E10)	Abcam (Cambridge, GB), monoklonales Antiserum aus Kaninchen
Anti-c-Myc (M 4439)	Sigma-Aldrich (Steinheim), monoklonales Antiserum aus Maus (Klon 9E10)
Anti-HA (3F10)	Roche (Penzberg) , monoklonales Antiserum aus Ratte
Anti-RGS-His	Qiagen (Hilden), monoklonales Antiserum aus Maus
Anti-Tubulin (Klon DM1A)	Sigma-Aldrich (Steinheim), monoklonales Antiserum aus Maus
Anti- β -Aktin (AC-15)	Sigma-Aldrich (Steinheim), monoklonales Antiserum aus Maus

Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz:

Alexa Fluor 546 *Ziege-anti-Kaninchen* IgG (Molecular Probes, Invitrogen)

Alexa Fluor 546 *Ziege-anti-Maus* IgG (Molecular Probes, Invitrogen)

Alexa Fluor 555 *Esel-anti-Maus* IgG (Molecular Probes, Invitrogen)

Alexa Fluor 546 *Esel-anti-Ziege* IgG (Molecular Probes, Invitrogen)

Alexa Fluor 546 *Ziege-anti-Ratte* IgG (Molecular Probes, Invitrogen)

Alexa Fluor 488 *Esel-anti-Ziege* IgG (Molecular Probes, Invitrogen)

Alexa Fluor 488 *Esel-anti-Kaninchen* IgG (Molecular Probes, Invitrogen)

Alexa Fluor 488 *Esel-anti-Maus* IgG (Molecular Probes, Invitrogen)

Sekundärantikörper für Western-Blot-Analyse:

Ziege-anti-Maus IgG HRP (*horseradish peroxidase*) - konjugiert, Bio-Rad (München)

Ziege-anti-Kaninchen IgG -HRP (*horseradish peroxidase*) - konjugiert, Bio-Rad (München)

2.1.4 Größenmarker

- 1 kb DNA-Ladder (39314.01); Serva (Darmstadt)
- 100 bp Ladder equim. (39311.01); Serva (Darmstadt)
- Prestained SDS-PAGE-Ruler; Fermentas (St. Leon-Rot)
- Unstained SDS-PAGE-Ruler; Fermentas (St. Leon-Rot)

2.1.5 Proteaseinhibitoren

- PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid); Sigma-Aldrich (Steinheim)
- Pefabloc; Roth (Karlsruhe)
- Aprotinin; Roth (Karlsruhe)
- Leupeptin Hemisulfat; Roth (Karlsruhe)
- Pepstatin A; Serva (Darmstadt)

2.1.6 Puffer

- SDS-Laufpuffer: 250 mM Glycin
 25 mM Tris Base
 0,1 % (w/v) SDS

-
- PBS-Puffer: 136,9 mM NaCl
2,7 mM KCl
8,1 mM Na₂HPO₄
1,76 mM KH₂PO₄

 - PBST-Puffer: 136,9 mM NaCl
2,7 mM KCl
8,1 mM Na₂HPO₄
1,76 mM KH₂PO₄
0,1 % Tween 20

 - Urea-Puffer: 2 x SDS-PP
7 % β-MeOH
8M Urea

 - RIPA-Puffer 50 mM Tris pH 7,5
150 mM NaCl
5 mM EDTA
1 % Triton X-100
0,1 % Protease Inhibitor Mix
20 mM NEM

 - RIPA-Waschpuffer RIPA-Puffer mit 0,1 % SDS

Alle weiteren in der Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen wurden im Methodenteil an der jeweils entsprechenden Stelle aufgeführt.

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

- PVDF-Membran Millipore, Schwalbach
- Röntgenfilme Super RX (Fujifilm), Düsseldorf
- Reaktionsgefäße Sarstedt, Nümbrecht
- 15 bzw. 50 ml Röhren Sarstedt, Nümbrecht
- Zellkulturschalen (6 Well, 24 Well) Sarstedt, Nümbrecht
- Zellkulturschalen (100 x 20 mm) Sarstedt, Nümbrecht

2.1.8 Bakterienstämme und Konstrukte

Bakterienstämme:

Zellstamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) DH5 α	$\Phi 80dlacZM\Delta M15$, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r_K^- , m_K^+), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , $\Delta(lacZYA-$ <i>argF)U169 (Woodcock <i>et al.</i>, 1989)</i>
<i>Escherichia coli</i> Rosetta 2 (DE3) pLysS	<i>F ompT hsdS_B</i> (r_B^- , m_B^-) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysSpRARE (Cam ^R) Novagen (Schwalbach)

Konstrukte:

RNF4

Aminosäuresequenz von RNF4 und dessen Domänen:

MSTRKRRGGAINSRQAQKRTREATSTPE ISLE AE PIELV ETAGDEIVDLT CESLE
PVVVDLTHNDSVVIVDERRRPRRNARRLPQDHADSCVVSSDDEELSRDRDYYVTTH
TPRNARDEGATGLRPSGTVSCPICMDGYSEIVQNGRLIVSTECGHVFCSQCLRDSLK
NANTCPTCRKKINHCRYHPIYI

SIM 1: E ISLE AE PIELV

SIM 2: IVDLT

SIM 3: VVDLT

SIM 4: VVIVDE

RING-Motif: CPICMDGYSEIVQNGRLIVSTECGHVFCSQCLRDSLKNANTCPTC

Kernlokalisierungssignale: RRRGGAINSRQAQKRTRE

RRRPRR

RKKI

pCMV-TagB-HA-RNF4 (WT)

pCMV-TagB-HA-RNF4-I11 (WT) I11 = ATA \rightarrow ATC (Die DNA wurde mutiert um
einen möglichen Transkriptionsstopp zu vermeiden)

pCMV-TagB-HA-RNF4-I11-SIM1-Mutante

pCMV-TagB-HA-RNF4-I11-SIM1-Mutante

pCMV-TagB-HA-RNF4-I11-SIM2-Mutante

pCMV-TagB-HA-RNF4-I11-SIM3-Mutante

pCMV-TagB-HA-RNF4-I11-SIM2/3-Mutante

pCMV-TagB-HA-**RNF4**-I11-SIM4-Mutante

PML

pCMV-TAG2B-FLAG-**PML**11 (1-522)

SUMO1 - 3

pCDNA/TO/N-MRGS-6His-**SUMO1**

pCDNA/TO/N-MRGS-6His-**SUMO2**

pCDNA/TO/N-MRGS-6His-**SUMO3**

SUMOK11R-Mutanten → können aufgrund ihres fehlenden Lysins an Position 11 keine SUMO-Ketten bilden

pCDNA/TO/N-MRGS-6His-**SUMO2K11R**

pCDNA/TO/N-MRGS-6His-**SUMO3K11R**

2.1.9 Nährmedien

Medium zur Aufzucht von *E.coli*-Stämmen

LB (*Luria-Bertani*)-Medium

1 % Baktotrypton

0,5 % Hefeextrakt

1 % NaCl

Für LB-Agar-Platten wurde 2 % Agar zugesetzt.

Alle Flüssigmedien wurden autoklaviert (20 min; 121 °C) und bei RT gelagert. Medien mit Agar wurden autoklaviert und in sterile Petrischalen gegossen (25-30 ml/Schale). Zur Selektion auf plasmidkodierte Antibiotikaresistenz wurde dem LB-Medium Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml), Chloramphenicol (Endkonzentration 30µg/ml) oder Kanamycin (Endkonzentration 30 µg/ml) zugesetzt. Die Platten wurden bei 4 °C gelagert.

Medien für Zellkultur

EMEM (*Eagle's minimal essential medium*) für die Aufzucht von T-REx™-HeLa Zellen

- + 10 % FCS (*foetal calf serum*)
- + 1 % *non-essential amino acids* (NAA) → (100 x)
- + 1 % Penicillin / Streptomycin → (100 x)
- + 0,15 % Zeocin → (100 mg/ml Socklösung)
- + 0,05 % Blastocidin → (10 mg/ml Stocklösung)

EMEM (*Eagle's minimal essential medium*) für die Aufzucht von HeLa B Zellen

- + 10 % inaktiviertes FCS (*foetal calf serum*)
- + 1 % *non-essential amino acids* (NAA) → (100 x)
- + 1 % Penicillin / Streptomycin → (100 x)

DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*) für die Aufzucht von primären HS27 Zellen

- + 10 % inaktiviertes FCS (*foetal calf serum*)
- + 1 % *non-essential amino acids* (NAA) → (100 x)
- + 1 % Penicillin / Streptomycin → (100 x)
- + 20 µM L-Glutamin

RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) für die Aufzucht von NB4 Zellen

- + 2 mM L-Glutamin
- + 10 % inaktiviertes FCS (*foetal calf serum*)
- + 1 % *non-essential amino acids* (NAA) → (100 x)
- + 1 % Penicillin / Streptomycin → (100 x)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von Bakterien

Kloniert wurde allgemein mit dem *E.coli* Bakterienstamm DH5α. Die Bakterien wurden entweder in einem entsprechenden Volumen an LB-Medium in einem

Heißluftschüttler oder auf Agarplatten im Brutschrank bei 37 °C über Nacht (ÜN) kultiviert.

2.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Zellen wurden Bakterien vom DH5 α -Stamm nach dem Protokoll von (Hanahan, 1983) behandelt. Hierfür wurden 4 ml LB⁺⁺ Medium (LB-Medium mit zusätzlich 20 mM MgSO₄ und 10 mM KCl) mit einer DH5 α -Kolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C im Heißluftschüttler kultiviert. Dann wurden 100 ml LB⁺⁺-Medium mit 1 ml Vorkultur, die über mindestens 16 h bei 37 °C kultiviert wurde beimpft und bei 37 °C in einem Heißluftschüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,5 wachsen gelassen. Nach Abkühlung der Kultur über 20 min auf Eis wurden die Zellen bei 4000 x g und 4 °C für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zweimal in 15 ml eiskaltem TFB I (30 mM Kaliumacetat, pH 5,8, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 15 % (w/v) Glycerin) resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden dann weitere 10 min auf Eis gestellt und erneut sedimentiert. Anschließend wurde das Zellsediment in 4 ml TFB II (10 mM MOPS/NaOH, pH 7,0, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % (w/v) Glycerin) resuspendiert und in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt (100 μ l / Reaktionsgefäß). Die Aliquots wurden dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Transformationseffizienz der kompetenten Zellen wurde durch die Transformation von 1 ng DNA in 100 μ l kompetente DH5 α Zellen getestet. Die errechnete Transformationsrate sollte bei gut einsetzbaren kompetenten Zellen anschließend bei mindestens $10^3 - 10^4$ gewachsenen Kolonien liegen.

2.2.3 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Die kompetenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden entweder 0,5 μ g Plasmid-DNA oder 20 μ l Ligationsansatz (s.u.) dazugegeben und 20 min auf Eis inkubiert, wobei die Zellen alle 5 min vorsichtig gemischt wurden. Nach 45 s Hitzeschock bei 42 °C wurde der Ansatz zur Erholung für weitere 2 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen mit 500 μ l LB-Medium versehen und 1 h bei 37 °C auf einen Schüttler gestellt. Danach

wurden die Zellen bei 5000 x g für 5 min sedimentiert, mit 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf Agar-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausgestrichen.

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von Nukleinsäuren

Die Standard-PCR diente zur *in vitro* Amplifizierung linearisierter DNA (Mullis *et al.*, 1986) für Subklonierungen, wobei sowohl neue Restriktionsstellen eingeführt als auch verkürzte Genfragmente erzeugt werden konnten. Der 50 µl Standard-Ansatz beinhaltete 5 µl 10 x KOD HiFi DNA Polymerase-Puffer, 0,2 mM dNTPs, 1 mM MgCl₂, 0,4 µM 3'- und 5'-Primer, 2,5 U/µl KOD HiFi DNA Polymerase (Novagen, Schwalbach) und 0,05 - 0,1 mg Matritze in Wasser. Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 15 s bei 98 °C denaturiert und dann 25 - 30 Zyklen folgenden Bedingungen ausgesetzt:

Denaturierung: 98 °C, 15 - 30 s

Hybridisierung: 50 - 68 °C, 1 - 30 s

Der Primer mit der niedrigsten Schmelztemperatur (T_m) bestimmte die Hybridisierungstemperatur, die nicht über der Schmelztemperatur des Primers liegen darf. Die Schmelztemperaturen von Oligonukleotiden wurden mit folgender Formel bestimmt:

$$T_m = \Sigma (G + C) \times 4 \text{ °C} + \Sigma (A + T) \times 2 \text{ °C}$$

Elongation: 72 °C, 20 - 60 s

2.2.5 DNA-Präparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels alkalischer Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Von einer kleinen Übernachtskultur (3ml) wurden 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und bei Raumtemperatur (RT) mit einer Geschwindigkeit von 10000 x g für 1 min sedimentiert. Die Zellen wurden dann in 100 µl P1-Puffer (62,6 mM Tris/HCl - pH 8,0, 12,5 mM EDTA/NaOH - pH 8,0, 100 mg/ml RNaseA) resuspendiert. Im Anschluss daran wurde der Suspension

100 µl P2-Puffer (210 mM NaOH, 1 % SDS) zugegeben. Der Ansatz wurde nach vorsichtigem Mischen über einen Zeitraum von 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl P3-Puffer (3 M Kaliumacetat - pH 5,5) wurde der Ansatz erneut vorsichtig gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz 30 min zentrifugiert (10000 x g, RT). Im Anschluss daran wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 700 µl 100 % Ethanol zugegeben. Durch weitere 15 min Zentrifugation (10000 x g, RT) wurde die Plasmid-DNA gefällt. Die DNA wurde schließlich mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, erneut 5 min zentrifugiert (10000 x g, RT), der Überstand verworfen und die DNA bei geöffnetem Reaktionsgefäß über 5 min bei 62 °C getrocknet. Anschließend konnte die Plasmid-DNA in 50 µl H₂O resuspendiert und bei -20 °C gelagert werden. Für den Restriktionsverdau wurden 5 µl Plasmid-DNA eingesetzt.

Die Isolierung größerer Plasmidmengen erfolgte aus 100 ml Übernachtskultur mit Hilfe des „Qiagen *Plamid Midi Kit*“ der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers.

2.2.6 5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Glatte oder kompatible Enden geschnittener Vektor-DNA wurden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Dazu wurden 5 µg Vektor-DNA, 4 µl 10 x Phosphatase-Puffer und 2 U alkalische Phosphatase mit H₂O auf 40 µl aufgefüllt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 70 °C (10 min) gestoppt.

2.2.7 Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten

PCR-Fragmente haben keine endständigen 5'-Phosphat-Gruppen. Vor der Ligation (s. u.) in Vektoren wurden die 5'-Enden der Fragmente schließlich phosphoryliert. Die DNA wurde mit 5 - 10 U T4-Polynucleotid-Kinase (New England Biolabs, Schwalbach) in dem mitgelieferten Puffer und 10 mM ATP 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Inaktivierung der Kinase bei 70 °C über 10 min wurden die Fragmente mit Hilfe des *Nucleo Spin Extraction Kit* (Macherey-Nagel, Düren) gereinigt und für Ligation eingesetzt.

2.2.8 Restriktion

1 µg DNA wurde mit 1 - 3 U Restriktionsenzym 60 min in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer bei 37 °C inkubiert.

2.2.9 Ligation

DNA-Fragmente wurden in 3-fach molarem Überschuss zur Vektor-DNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit 1 U T4-DNA-Quick-Ligase (New England Biolabs, Schwalbach) in dem mitgelieferten Ligase-Puffer 5 - 10 min bei RT inkubiert.

2.2.10 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in Agarosegelen (0,7 - 2 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer mit 1 µg/ml Ethidiumbromid) getrennt. Die Fragmentgrößen, die getrennt werden sollten, bestimmten die Agarosekonzentration des Gels.

Agarosekonzentration (%)	Fragmentlängen (Bp)
0,7	1000 - 9000
1,0	300 - 1000
1,5 - 2,0	< 300

Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1/10 Volumen Probenpuffer (50 % (w/v) Glycerin, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Je nach Fragmentgröße wurden unterschiedliche Längenstandards verwendet. Die angelegte Spannung während der Elektrophorese betrug 90 V. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE benutzt.

2.2.11 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Ethidiumbromid-gefärbte DNA-Fragmente fluoreszieren im Agarosegel wenn sie mit UV-Licht (302 nm) angeregt werden. Auf einem Transilluminator konnte die Position der DNA-Fragmente im Gel identifiziert werden. Mit einem Skalpell wurden Gelstücke, die die DNA-Fragmente enthielten, ausgeschnitten und in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA aus dem

Gel erfolgte mit dem *Nucleo Spin Extraction Kit* (Macherey-Nagel, Düren) nach dem Protokoll des Herstellers.

2.2.12 DNA-Sequenzierung

Sequenziert wurde allgemein nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger und Coulson, 1975). Die Sequenzierung erfolgte im *Cycle-Sequencing*-Verfahren nach dem *BigDye-Terminator-Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Darmstadt) mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden. Ein einzelner Sequenzierungsansatz beinhaltete in 10 µl Gesamtvolumen 300 ng Plasmid-DNA, 10 pmol eines geeigneten Oligonukleotids, 0,7 µl Terminator-Lösung (*BigDye Terminator-Sequencing Kit*) und 2 µl *BigDye*-Puffer (5 x). Das PCR-Programm bestand aus einer initialen Denaturierung bei 96 °C (1 min), 25 Zyklen mit je 30 s Denaturierung bei 96 °C, 15 s Hybridisierung bei 50 °C und 4 min Elongation bei 60 °C. Schließlich wurden die Ansätze nach der PCR auf 20 µl Endvolumen mit Millipore-Wasser aufgefüllt.

2.2.13 DNA-Quantifizierung

Photometrische Bestimmung:

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurden diese zunächst mit Millipore-Wasser verdünnt. Danach konnte die Absorption bei 260 nm in einer Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm) gegen Millipore-Wasser gemessen werden. Bei der Berechnung der Konzentration wurde folgender Wert zugrunde gelegt.

- **doppelsträngige DNA** **50 µg/ml bei $OD_{260} = 1$**

Der Quotient OD_{260} / OD_{280} ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurepräparationen.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Die SDS-PAGE wurde in einer

BioRad-Kammer durchgeführt. Meist wurden 10 %-ige Trenn- und 4 %-ige Sammelgele verwendet.

	4 % Sammelgel	10 % Trenngel
30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid	0,5 ml	2,5 ml
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	-	2,6 ml
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	1,3 ml	-
H ₂ O	3,14 ml	4,8 ml
10 % SDS	49,4 µl (1:100)	99 µl (1:100)
APS	49,4 µl (1:100)	99 µl (1:100)
TEMED	4,94 µl (1:1 000)	9,9 µl (1:1000)

Tabelle I: Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen

Die Proben wurden mit 1 x SDS-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in 1 x SDS-Laufpuffer bei 32 mA. Als Protein-Marker wurde stets *Unstained SDS-PAGE Standards* oder *Prestained SDS-PAGE Standards* von Fermentas verwendet.

10 x SDS-Laufpuffer:

250 mM Tris Base
1 % (w/v) SDS
2,5 M Glycin

5 x SDS-Probenpuffer:

10 % (w/v) SDS
200 mM Tris/HCl pH 6,8
50 % (v/v) Glycerin
7 % (v/v) β-Mercaptoethanol
0,05 % (w/v) Bromphenolblau

2.3.2 Transfer und Immobilisierung von Proteinen (*Western-Blot-Analyse*)

Nach der Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE (s.o.) wurden die Proteine aus dem Gel auf eine immobilisierende PVDF-Membran (Polyvinylidenfluoridmembran von Millipore; Schwalbach) transferiert (Towbin *et al.*, 1979).

Die benötigten Komponenten (Gel-*Blot*-Papier von Schleier & Schüll) wurden im Halbtrockenverfahren zunächst in Transferpuffer gebadet und anschließend luftblasenfrei auf der planaren Kathode der *Blot*-Aparatur gestapelt. Darauf wurde dann die PVDF-Membran, die zuvor mit Methanol benetzt und aktiviert

wurde, das Polyacrylamidgel und abschließend eine weitere Schicht Gel-*Blot*-Papier gelegt. Nach Aufsetzen der Anode erfolgt der Transfer bei konstantem Strom von 4 mA / cm² *Blot*-Fläche über 30 min.

Nach dem Elektrotransfer wurden die Banden von dem Protein-Marker (*Prestained SDS-PAGE Standards*, Fermentas) auf der Membran sichtbar. Durch diese Färbung ist erkennbar, ob der Transfer erfolgreich war oder nicht.

Transferpuffer:

10% (v/v) MeOH

1,5% (v/v) Glycin

25 mM Tris

2.3.3 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine

Der immunologische Nachweis immobilisierter Proteine erfolgte in drei Schritten. Im ersten Schritt wurden die unspezifischen Bindestellen auf der PVDF-Membran mit 3 % Magermilchpulver in PBST blockiert (1 h, RT). Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper inkubiert (1 h, RT) und dann dreimal über 15 min mit 1 x PBST gewaschen. Der spezifische Antigen-Antikörperkomplex konnte mit dem Sekundärantikörper nachgewiesen werden (30 min, RT), an den Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt war. Danach wurde die Membran wieder dreimal über 15 min mit 1 x PBST gewaschen. Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten auf einem Taumler bei Raumtemperatur.

Die spezifischen Antigen / Primärantikörper / Sekundärantikörper-Komplexe wurden mit dem „*Chemiluminescence Detection Kit*“ von Pierce (Rockford, USA) nach Herstellerangaben detektiert.

Blockieren	1 h (RT)	1 x PBST + 3 % Magermilchpulver
Primärantikörper	1 h (RT)	Erst-Antikörper in 1 x PBST + 5 % Magermilchpulver
Waschen	3 x 15 min (RT)	1 x PBST
Sekundärantikörper	30 min (RT)	Zweit-antikörper in 1 x PBST + 5 % Magermilchpulver
Waschen	3 x 15 min (RT)	1 x PBST
Waschen	1 x 20 min (RT)	1 x PBS

Tabelle II: Anleitung zum immunologischen Nachweis immobilisierter Proteine

2.4 Zellkultur

2.4.1 Herstellung stabiler Zelllinien

Für die Herstellung von Zelllinien, die Gene für preSUMO2K11R und preSUMO3K11R (SUMO = *small ubiquitin-related modifier*) induktiv exprimieren, wurden T-REx-HeLa Zelllinien von Invitrogen verwendet, die bereits den Tetracyclin-Repressor (Tet-Repressor) stabil exprimieren. Die Regulation dieses Systems über Tetracyclin basiert auf der Bindung zwischen Tetracyclin und Tet-Repressor. Durch diese Bindung löst sich der Repressor vom Tet-Operon der Promotorregion und das gewünschte Gen wird exprimiert (Yao *et al.*, 1998).

Das T-REx™ System umfasst folgende Komponenten:

- einen Expressionsvektor, in den das gewünschte Gen kloniert werden kann und dessen Expression unter der Kontrolle des humanen Cytomegalovirus-Promotors (CMV-Promotor) und zwei Tetracyclin-Operatoren (TetO₂) steht
- ein regulatorisches Plasmid, welches den Tet-Repressor, der ebenfalls unter der Kontrolle des CMV-Promotors steht, exprimiert
- Tetracyclin, um die Expression des gewünschten Gens zu induzieren

Um bestmögliche Erfolge bei der Herstellung stabiler Zelllinien, die sowohl den Tet-Repressor als auch das gewünschte Gen exprimieren, zu erzielen musste zunächst festgelegt werden, welche Mindestkonzentration an Antibiotika (Blasticidin und Zeocin) notwendig waren um transfizierte von nicht-transfizierten Zellen zu selektieren.

Zur stabilen Transfektion der SUMO-Gene im pcDNA4/TO-N-MRGS6His-Vektor wurde zunächst der Vektor im bakteriellen Resistenzgen linearisiert und mittels *GeneJuice Transfection Reagent* (Novagen, Darmstadt), nach Angaben des Herstellers, in die T-REx-HeLa-Zelllinien transfiziert.

24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen gewaschen (1 x PBST) und mit frischem Medium, welches das selektive Antibiotikum Zeocin enthielt, versehen. Nach ca. zwei Wochen konnten schließlich Klone isoliert und auf ihre Induzierbarkeit mit Tetracyclin bzw. dessen Derivat Doxycyclin getestet werden.

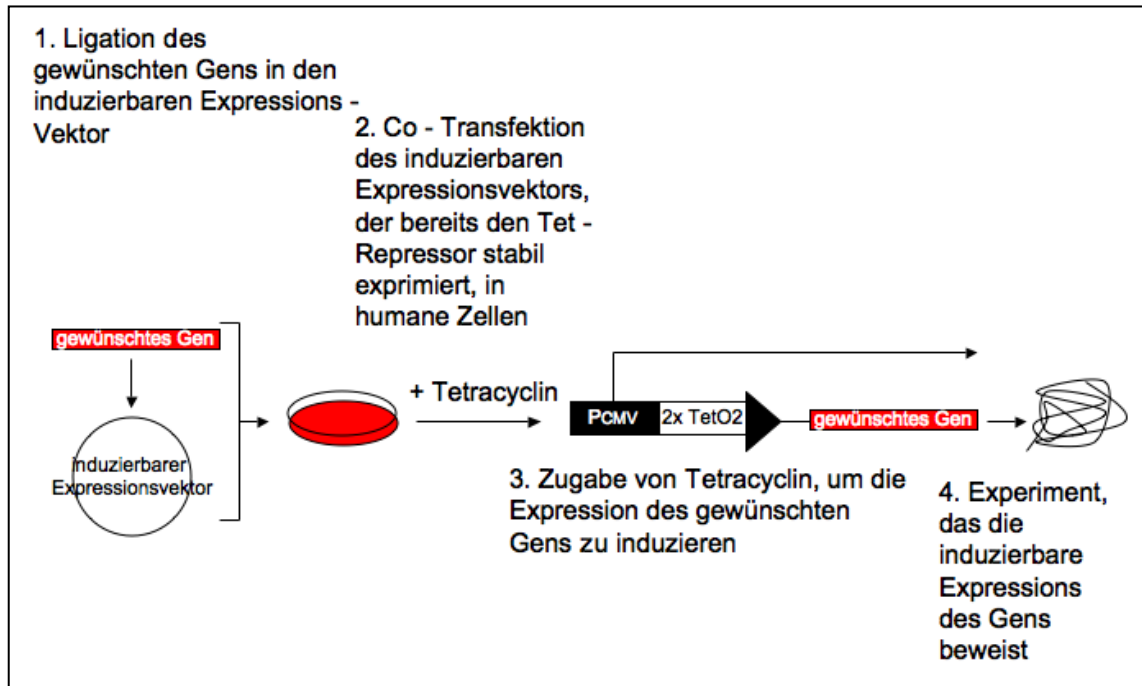


Abb.2.4.1.1: Schematische Übersicht über die Herstellung stabiler Zelllinien

Die Abbildung beschreibt die Vorgehensweise bei der Herstellung stabiler Zelllinien (verändert nach Invitrogen, 2006).

2.4.2 Kultivierung der Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden im geeigneten Medium mit 10 % FCS und den entsprechenden Antibiotika in einem mit Wasserdampf gesättigten und 5 % Kohlendioxid haltigen Inkubator bei 37 °C kultiviert. Das im FCS enthaltene Komplementsystem wurde durch eine 20-minütige Inkubation bei 56 °C inaktiviert. Die Antibiotika Penicillin und Streptomycin schützen die Zellen vor bakterieller Kontamination.

2.4.3 Lagerung der Zellen

Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte in 45 % gebrauchtem und 45 % frischem Medium dem 10 % DMSO beigefügt wurde. DMSO verhindert die zellschädigende Kristallisierung des Wassers während des Einfrierens. Die Zellen wurden langsam eingefroren, indem sie zunächst in Styroporbehältern bei -80 °C ein bis zwei Wochen zwischengelagert und dann in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden. Das Auftauen der Zellen erfolgte aufgrund der toxischen Wirkung von DMSO wesentlich schneller (z.B. durch Anwärmen in

der Hand). Dann wurden die Zellen so schnell wie möglich, auf Kulturplatten mit frischem Medium ausplattiert.

2.4.4 Zellaufschluss

Zellaufschluss mit 2 x SDS-Probenpuffer

Die T-REx-HeLa Zellen wurden mit 1 x PBS gewaschen und dann in 2 x SDS-Probenpuffer (+ Benzonase, 1:10000) lysiert. Danach wurden sie für 5 min bei 95 °C gekocht und auf ein analytisches Gel aufgetragen.

Wenn die Zellen auf eine andere Weise aufgeschlossen wurden, dann ist der Puffer bei der entsprechenden Methode beschrieben.

2.4.5 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz beschreibt eine Methode, bei der Proteine durch immunhistochemische Färbung mit Hilfe von fluoreszierenden Farbstoffen sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurden Proteine gefärbt, die ausschließlich im Zellkern lokalisiert sind. Es handelt sich bei der in dieser Arbeit beschriebenen Methode um die indirekte Immunfluoreszenz, bei der nicht der primäre Antikörper, sondern der sekundäre Antikörper markiert ist.

Zunächst wurden $2 - 3 \times 10^5$ Zellen (\rightarrow Konfluenz von ca. 50 %) auf Kulturplatten (6 Well von Sarstedt; Nürnberg) plattiert, in die zuvor mit Ethanol sterilisierte Deckgläschen gelegt wurden. Nach ca. 12 h sind die Zellen auf der Oberfläche der Deckgläschen gewachsen (Konfluenz von ca. 70 %) und konnten je nach Experiment weiter behandelt werden.

Schließlich folgte nach dreimaligem Waschen mit PBS eine Fixierung der Zellen mit Fixierpuffer (PBS + 3 % Paraformaldehyd (PFA)) über 20 min bei RT. Nachdem der Fixierpuffer abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen wurden, konnten diese in PBS und bei 4 °C gelagert werden.

Nach der Fixierung der Zellen folgte deren Permeabilisierung und Blockierung. Die Zellen wurden von überschüssigem PBS befreit und über 10 min in Waschpuffer (PBS + 0,2 % Saponin) bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen über einen Zeitraum von 1 h mit Blockpuffer (PBS + 0,2 % Saponin + 3 % Rinderserumalbumin (BSA)) überschichtet.

Die Antikörperfärbung erfolgte in einer Feuchtkammer (Wanne + feuchtes *Whatman*-Papier + Parafilm (eine dehnbare Wachsfolie)). Zunächst wurden die Zellen mit dem Erstantikörper (verdünnt in Blockpuffer) über 1 h inkubiert. Dann folgte nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer die Inkubation mit dem Zweitantikörper (verdünnt in Blockpuffer) über 30 min. Der Zweitantikörper ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Um ein Ausbleichen der Farbstoffe zu vermeiden, wurde die Antikörperfärbung der Zellen bei Dunkelheit durchgeführt.

Nachdem auch der Zweitantikörper gebunden hat, wurden die Zellen dreimal in Waschpuffer gewaschen und mit einem Tropfen ProLong Gold *antifade reagent* (ein „Einbett-Gel“ von Invitrogen) auf die Objektträger gebettet. Danach folgte die Analyse der Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie (Axioplan 2 *imaging* von Zeiss; Objektiv Plan-Apochromat 63 x).

2.4.6 Immunpräzipitation (IP) von endogenem PML

1. Cross Linking

Zunächst mussten die Antikörper (PML) *in vitro* an die Protein A Sepharose gekoppelt werden. Hierfür wurden zwei 15 ml Reaktionsgefäße vorbereitet. In das eine wurde das gewünschte PML-Serum (RINGB1-Serum 3004 von August 2008 aus eigener Herstellung) und in das andere zur Kontrolle ein Präimmunserum mit je 1 ml Protein A Sepharose gegeben. Danach wurden die Reaktionsgefäße mit PBS aufgefüllt und über Nacht bei 4°C auf einem Rollrad inkubiert. Für das sogenannte *Cross Linking* (der Antikörper soll kovalent mit der Sepharose verbunden sein) wurden die Proben zunächst 3 x mit 4°C kaltem 0,2 M Borat-Puffer (10 mM Natriumborat, 150 mM NaCl, pH 9,0) gewaschen. Danach wurde der Suspension 20 mM Dimethylpimelimidat (DMP) zugemischt und über 30 min bei Raumtemperatur auf einem Rollrad inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Proben 2 x mit 0,2 M Ethanolamin (pH 8,0) gewaschen und mit demselben 2 h auf dem Rollrad bei Raumtemperatur inkubiert. Ethanolamin reagiert mit überschüssigem DMP. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben zunächst 2 x mit PBS dann 1 x mit 100 mM Glycin (pH 3,0) und wieder 3 x mit PBS gewaschen. Schließlich konnten die Proben bei 4°C gelagert und für die eigentliche IP verwendet werden.

2. Immunpräzipitation

Die Lyse der zu untersuchenden Zellen wurde in RIPA-Puffer + 8M Urea durchgeführt. Falls sich die Zellen in diesem Puffer nicht vollständig aufschließen ließen, wurden die Lysate zusätzlich sonifiziert.

RIPA: 50 mM Tris (pH 7,5)
150 mM NaCl
1 % Triton X-100
0,5 % NaDOC
0,1 % SDS
+ 8 M Urea

Danach wurden die Zelltrümmer bei 10000 x g und 4°C sedimentiert und der Überstand auf die mit dem Antikörper gekoppelten Protein A Sepharosekügelchen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 2 Stunden bei 4°C auf dem Rollrad (hier eignet sich auch eine Übernachtinkubation), wurden die Protein A Sepharosekügelchen 5 x mit PBS + 0,1 % Triton X-100 gewaschen und in geeignete Reaktionsgefäße mit Zentrifugationsfilter, die die Spharosekügelchen zurückhalten überführt. Danach wurden die Proben zentrifugiert (3000 x g, 30 sek). Die auf diese Weise getrockneten Sepharosekügelchen mit den gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexen wurden im Anschluss mit einem Elutionspuffer über 30 min inkubiert.

Elutionspuffer: 50 mM Tris (pH 6,8)
150 mM NaCl
0,5 % Triton X-100
6 M Urea

Danach wurden die Zellen sedimentiert (5000 x g; RT), mit 5 x SDS-Probenpuffer versehen und mittels SDS-PAGE analysiert.

Für die endogene PML-IP wurde demnach PML *in vitro* an ein freies Substrat (Protein A Sepharosekügelchen) gekoppelt und mit Hilfe des Westernblotverfahrens konnten die Antigene SUMO1, SUMO2 und Ubiquitin nachgewiesen werden.

2.4.7 Microarrayverfahren

Microarray beschreibt ein molekularbiologisches Untersuchungsverfahren, das die parallele Analyse von mehreren tausend Einzelereignissen mit geringem Probenmaterial erlaubt. Bei dem in dieser Arbeit genutzten Protein-Microarray-Verfahren wurden Proteinproben aus Zelllysaten gewonnen und von der Firma Zeptosens auf ein Trägermaterial fixiert und ähnlich wie beim Westernblotverfahren analysiert. Mit Hilfe dieser Methode konnte die Aktivität diverser Kinasen nach unterschiedlicher Stressinduktion von HeLa B- und NB4-Zellen mit ATO und Sorbitol untersucht werden.

1. Herstellung der Zelllysate

Die untersuchten HeLa B- und NB4-Zellen wurden in der Zellkultur im entsprechenden Medium kultiviert und unterschiedlichen Stressen ausgesetzt. Beide Zelllinien wurden mit 1 μ M und 10 μ M ATO oder 0,25 M und 1 M Sorbitol über einen Zeitraum von 5 min bis 720 min gestresst. Die ungestressten Kontrollzelllinien wurden einfach im geeigneten Medium kultiviert. Die Lyse der Zellen erfolgte nach Angaben von Zeptosens in einem von ihnen gelieferten Lysepuffer (ZeptoMARK Reverse Array Lysis Buffer CLB1).

2. Quantifizierung der Proteinmenge

Nach der Zelllyse im CLB1-Puffer von Zeptosens wurden die Zelltrümmer sedimentiert (10000 x g, 1 min) und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt.

Für die photometrische Proteinmengenbestimmung wurde jede Probe 1:20 mit PBS verdünnt und als Duplikat in *96-Well* Platten pipettiert. Danach wurde das Bradfordreagenz (Coomassie Plus – The better Bradford Assay Reagent) hinzugegeben und die Proteinkonzentration konnten mit Hilfe eines *Plate-Readers* bei 595 nm gemessen werden. Die Kalibrierung erfolgte mittels BSA-Konzentrationsreihe.

Die Analyse der Proben wurde von Zeptosens durchgeführt.

3.1 Ubiquitinierung von Proteinen nach Stressinduktion mit Arsentrioxid

Da Arsentrioxid im Kampf gegen die APL ein wirksames Therapeutikum ist und generell in Zellexperimenten zur Akkumulation SUMOylierter sowie ubiquitiniertes PML-Konjugate führt (Weisshaar *et al.*, 2008), sollte der Effekt von ATO auf die Akkumulation von Ubiquitinkonjugaten in primären Vorhautfibroblasten (HS27 Zellen) untersucht werden (Abb.: 3.1.1). Mit steigender Konzentration und Inkubationsdauer nimmt die Akkumulation von Ubiquitinkonjugaten zu.

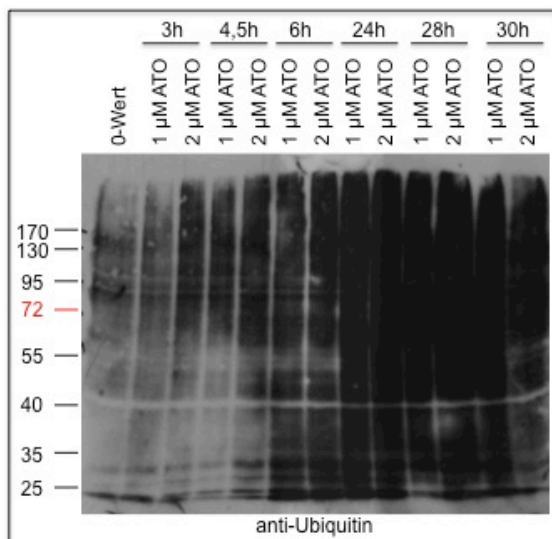


Abb. 3.1: Nachweis von Ubiquitin-Konjugaten nach Stressinduktion mit Arsentrioxid

Westernblotanalyse von HS27 Zellen mit anti-Ubiquitin Antikörper nach Behandlung mit 1 bzw. 2 μM ATO. Die Zellen wurden nach den angegebenen Zeitpunkten in 2 x SDS-Probenpuffer lysiert. Hochmolekulare Ubiquitinkonjugate (> 170 kDa) sind bereits nach 3 h erkennbar.

3.2 Charakterisierung stabiler SUMO-Zelllinien

Mit Hilfe des T-Rex-Systems, einem Tetracyclin regulierten Expressionssystem für humane Zellen von der Firma Invitrogen, wurden stabile RGS-His-SUMO-Zelllinien (SUMO1- SUMO2- und SUMO3-Zelllinien \rightarrow Krause *et al.*, 2008) und RGS-His-SUMOK11R-Zelllinien hergestellt (siehe Abschnitt 2). Die K11RMutanten von SUMO2 bzw. SUMO3 sind im Gegensatz zu den SUMO2-/3-Wildtypen nicht mehr in der Lage über ihr Lysin11 SUMO-Ketten auszubilden. Die Mutanten führen ähnlich wie SUMO1 zu MonoSUMOylierungs- bzw. MultiSUMOylierungsprozessen. Die folgende Abbildung zeigt eine Auswahl von getesteten SUMO2K11R- und SUMO3K11R-Klonen, die alle positiv auf SUMOK11R-Expression nach Induktion mit

Doxycyclin getestet wurden. Für weitere Experimente wurden die Klone A5 der SUMO2K11R-Zelllinie und D5 der SUMO3K11R-Zelllinie verwendet.

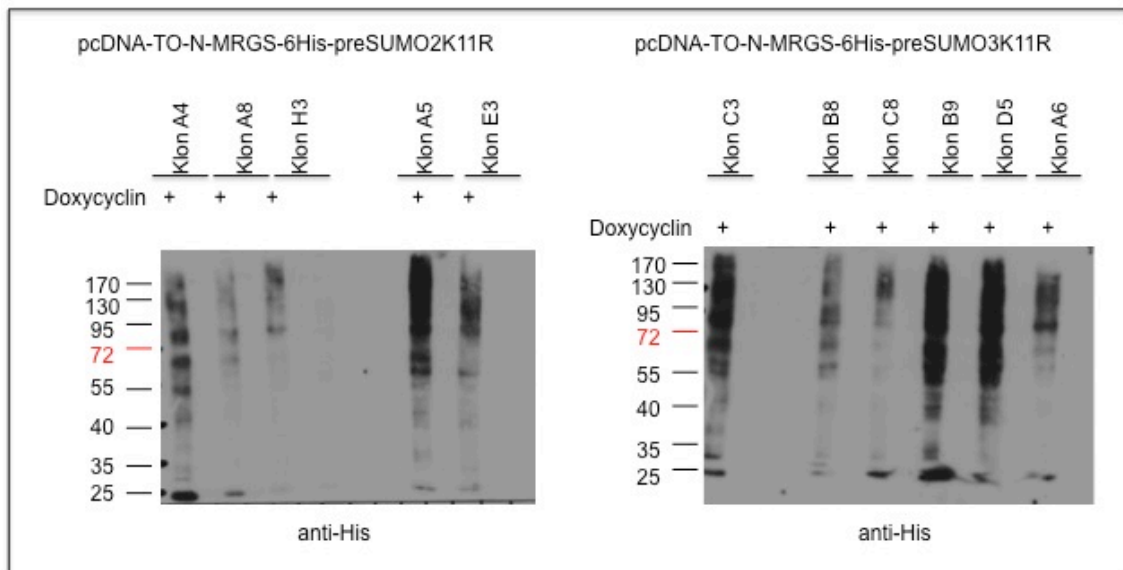


Abb. 3.2: Nachweis stabiler Expression von SUMO2K11R und SUMO3K11R

Die mit Doxycyclin behandelten Zellen überexprimieren die RGS-His-SUMO-Mutanten stabil. Verschiedene Klone der stabilen SUMO-Zelllinien (+) wurden über einen Zeitraum von 24 h mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert, wohingegen die SUMO-Zelllinien (-) unbehandelt blieben. Nach 24 h wurden die Zellen in 1x PBS gewaschen und anschließend in 2xSDS-Probenpuffer lysiert. Nach SDS-PAGE und Western Blot-Analyse wurde durch den RGS-His-Antikörper überexprimiertes SUMOK11R nachgewiesen.

3.3 Auswirkung unterschiedlicher Stressfaktoren auf transfiziertes PML in der stabilen SUMO2-Zelllinie

In diesem Experiment wurde die stabile SUMO2-Zelllinie nach einer Kotransfektion mit FLAG-PML (Aminosäuren 1-522 der Spleißvariante PML11) unterschiedlichen Stressfaktoren ausgesetzt. Das transfizierte PML-Konstrukt hat ein Molekulargewicht von 85,7 kDa und läuft im SDS-PAGE als Bande bei 70 kDa. In unbehandelten Zellen ist außerdem eine weitere Bande bei etwa 100 kDa und eine sehr schwache Doppelbande zwischen 130 und 170 kDa erkennbar.

Die Analyse des Westernblots gegen FLAG-PML zeigt deutlich eine Akkumulation hochmolekularer Komplexe zwischen 130 und 170 kDa nach ATO-Stress (Doppelbande in Abbildung 3.3, A). Die Bande bei ca. 100 kDa wird schwächer und die bei 70 kDa bleibt unverändert. In den Lysaten der Sorbitol gestressten Zellen lässt sich eine Stabilisierung der Doppelbande zwischen 130 und 170 kDa nicht beobachten. Nach 3 h H₂O₂ (0,3 mM) ist die Doppelbande

zwischen 130 und 170 kDa nur schwach erkennbar. Das bedeutet ATO führt im direkten Vergleich mit H₂O₂ oder Sorbitol zu einer stärkeren Modifikation von transfiziertem PML, bei der es sich vermutlich um SUMO2 handelt.

Darüber hinaus wurden die Zellen mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelt. Dieser ist reversibel, spezifisch, zellpermeabel und reduziert den Abbau von ubiquitinkonjugierten Proteinen in humanen Zellen, ohne die ATPase oder Isopeptidaseaktivität des 26S-Komplexes im Proteasom zu stören (Roca *et al.*, 1994). Allerdings ist es in diesem Experiment nicht gelungen einen Effekt der Proteasominhibition auf transfiziertes PML nach ATO oder Sorbitolstress zu zeigen. Nur in den mit H₂O₂ (0,3 mM, 3 h) gestressten Zelllysaten kann die schwach nachweisbare Doppelbande zwischen 130 und 170 kDa durch MG132 stabilisiert werden. Die Westernblotanalyse gegen Ubiquitin (Abb.: 3.3 B) zeigt aber eine vergleichsweise starke Stabilisierung von Ubiquitinkonjugaten nach ATO-Stressinduktion und gleichzeitiger Inhibition des Proteasoms. Dieser Effekt ist nach der Stressinduktion mit 0,3 mM H₂O₂ (3 h und 6 h) und 0,5 M Sorbitol ebenfalls schwach erkennbar. Werden die Zellen aber mit 1 M Sorbitol behandelt, so sind Ubiquitinkonjugate gleichermaßen mit und ohne MG132 nachweisbar. Zudem fällt auf, dass die Doppelbande zwischen 130 und 170 kDa nach ATO-Stressinduktion auch im Ubiquitinblot stabilisiert werden kann. Das bedeutet, diese Konjugate sind ubiquitiniert.

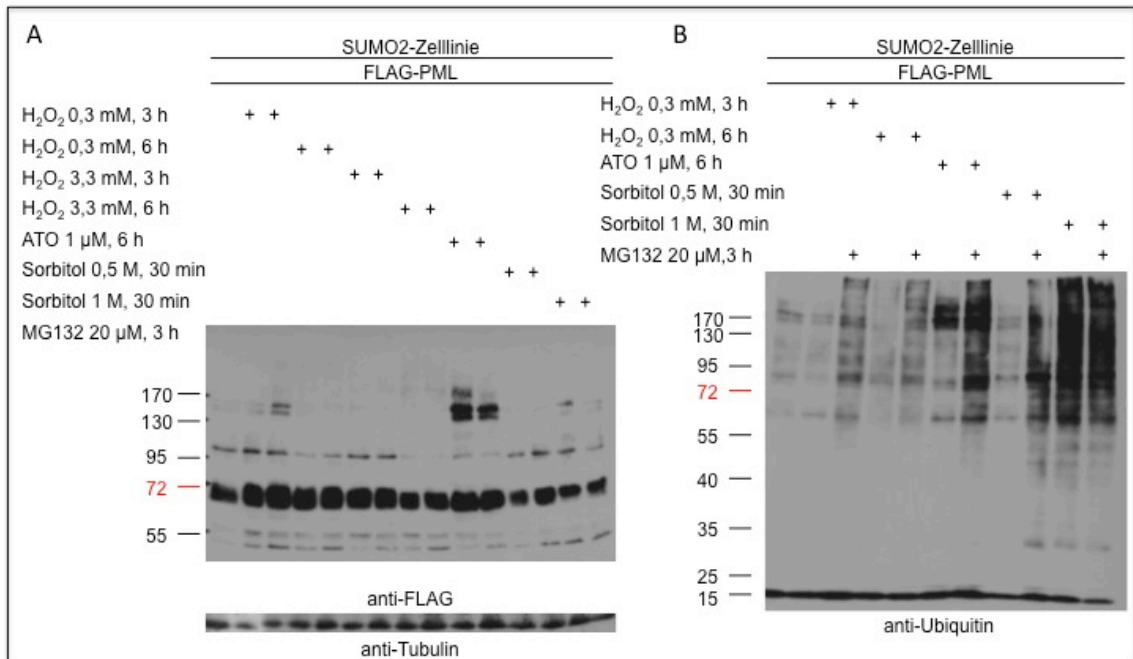


Abb. 3.3: Modifikation von überexprimiertem PML nach Stressinduktion

Nachdem die stabile SUMO2-Zelllinie mit FLAG-PML transient transfiziert wurde, wurden die Zellen mit Hilfe von Doxycyclin induziert und anschließend mit ATO, H₂O₂ bzw. Sorbitol unterschiedlichen Stressfaktoren ausgesetzt. Danach wurden die Zellen in PBS gewaschen, mit 2xSDS-Probenpuffer lysiert und mit Hilfe des Westernblottverfahrens analysiert. Verglichen mit H₂O₂ und Sorbitol, zeigt die Stressinduktion mit ATO eine verstärkte Modifikation von transfiziertem PML (A). Außerdem hat die Inhibition des Proteasoms mit MG132 den größten Einfluss auf die mit ATO behandelten Zellen. Hier ist eindeutig eine Stabilisierung von Ubiquitinkonjugaten nachweisbar. Die mit 0,5 M Sorbitol behandelten Zellen zeigen diesen Effekt nur leicht. Werden die Zellen mit 1 M Sorbitol gestresst, so hat MG132 keinen Einfluss auf die Akkumulation der Ubiquitinkonjugate. Diese sind mit und ohne MG132 gleichermaßen stark nachweisbar (B).

3.4 Auswirkung von unterschiedlichen, stabil exprimierten SUMO-Isoformen auf PML

Um den Einfluss der Überexpression von SUMO2 auf die Modifikation von PML im Vergleich zu SUMO1 oder den Kontrollzellen ohne SUMO-Überexpression zu bestimmen, wurden im folgenden Experiment die stabilen SUMO-Zelllinien, sowie deren Kontrollzelllinie (Empty-Zelllinie) mit FLAG-PML (1-522) transient transfiziert. Darüberhinaus wurden die Zellen mit ATO gestresst und das 26S-Proteasom mit MG132 inhibiert. In der SUMO2-Zelllinie treten im Bereich zwischen 95 und 170 kDa Banden von FLAG-PML auf, die nach Behandlung der Zellen mit ATO deutlich verstärkt werden. Dabei handelt es sich vermutlich um SUMO2 modifiziertes PML. In der Kontrollzelllinie und der SUMO1-Zelllinie treten diese Banden nicht auf (siehe Abbildung 3.4 A). Sowohl der anti-RGSHis als auch der anti-Ubiquitin-Westernblot zeigen eine Akkumulation von

Konjugaten nach Proteasominhibition und keine Unterschiede zwischen den Zelllinien (Abb.:3.4 B und C). Die FLAG-PML Banden zeigen jedoch nur nach Behandlung mit ATO eine leichte Verstärkung (Abb.: 3.4. A)

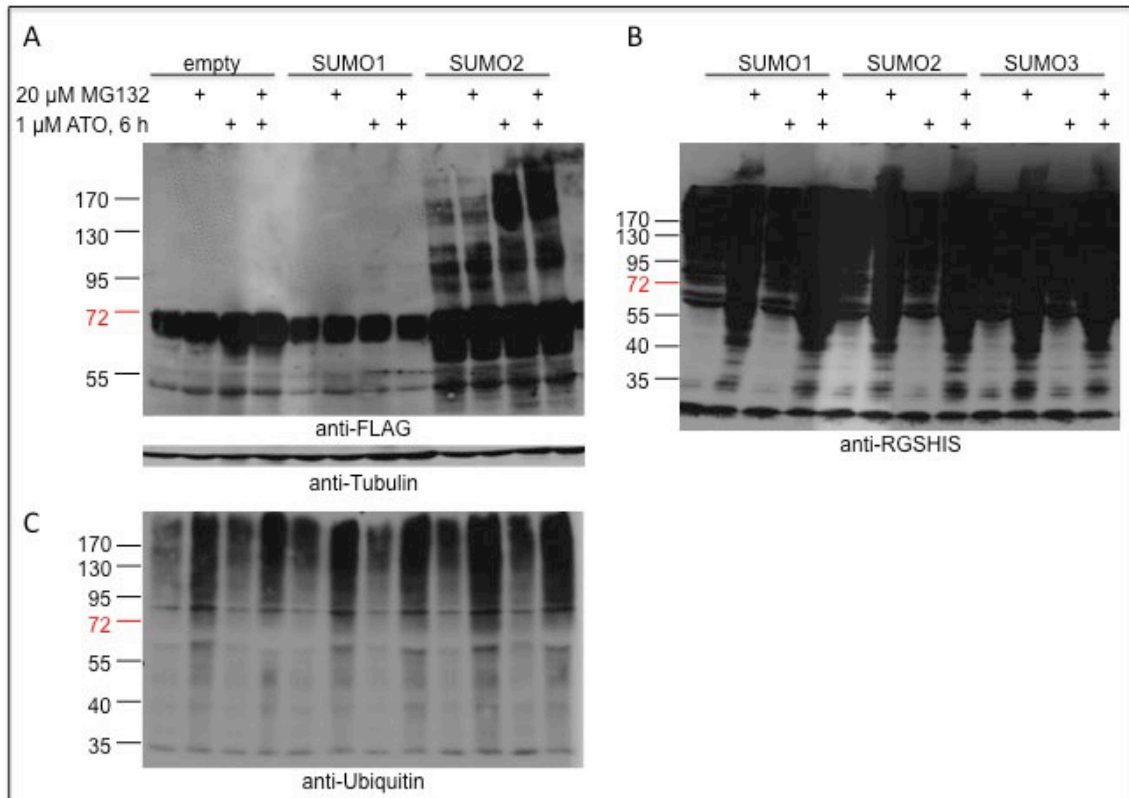


Abb. 3.4 a): Posttranslationale Modifikation von FLAG-PML mit SUMO2

Westernblotanalyse von Lysaten unterschiedlicher SUMO-überexprimierender Zelllinien. Diese wurden über einen Zeitraum von 12 h mit Doxycyclin induziert. Die Empty-Kontrollzelllinie sowie die SUMO1- und SUMO2-Zelllinie wurde mit FLAG-PML (1-522) transient transfiziert (A, B und C). Im Anschluss daran wurden die Zellen über 6 h mit 1 μ M ATO gestresst und mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelt.

In Abbildung 3.4 b) wurde die SUMO2-Zelllinie mit der SUMO2K11R-Zelllinie verglichen. In der SUMO2-Zelllinie treten analog zu 3.4 a) im Bereich zwischen 95 und 170 kDa Banden von transfiziertem PML auf, die in der SUMO2K11R-Zelllinie nicht erkennbar sind.

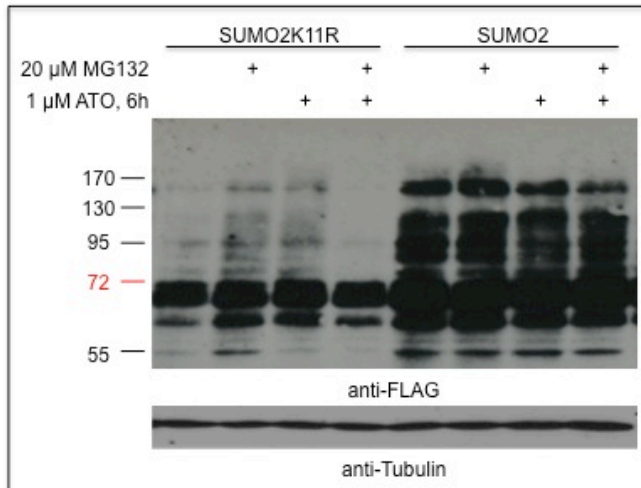


Abb. 3.4 b): Posttranslationale Modifikation von FLAG-PML mit SUMO2

Vergleich der SUMO2K11R-Zelllinie mit der SUMO2-Zelllinie. Die Zellen wurden über 12 h mit Doxycyclin induziert und danach über 6 h mit 1 μ M ATO gestresst und mit MG132 behandelt. Analysiert wurde überexprimiertes FLAG-PML mittels Westernblotanalyse.

3.5 Die humane Ubiquitinligase RNF4 führt gemeinsam mit dem ubiquitinkonjugierenden Enzym Ubch5b zum Abbau von transient transfiziertem PML

In den vorangegangenen Experimenten wurde eine verstärkte Modifikation von transfiziertem PML nach Behandlung mit ATO nachgewiesen, bei der es sich vermutlich um polymere SUMO2-Ketten oder um hybride Ketten von SUMO2 und Ubiquitin handelt. Ein Abbau von transfiziertem PML wurde jedoch nicht beobachtet. Um zu testen, ob überexprimiertes PML in Anwesenheit einer SUMO-abhängigen Ubiquitinligase abgebaut werden kann, wurde im folgenden Experiment die SUMO2-Zelllinie mit FLAG-PML (1-522), Myc-RNF4 und His-Ubch5b kotransfiziert. Deutlich erkennbar ist, dass das ubiquitinkonjugierende Enzym Ubch5b alleine nicht in der Lage ist überexprimiertes PML abzubauen. Transfiziert man jedoch die humane Ubiquitinligase RNF4, werden alle PML Banden schwächer. Unter Bedingungen von PML- und gleichzeitiger SUMO2-Überexpression ist RNF4 limitierend. Bei zusätzlicher Überexpression von RNF4 wird Ubch5b limitierend. Die Koexpression von RNF4 und Ubch5b führt schließlich zu einem vollständigen Abbau von FLAG-PML.

Werden die stabilen SUMO2-Zellen mit ATO gestresst, so wird FLAG-PML trotz Ubch5b oder RNF4 nicht vollständig abgebaut.

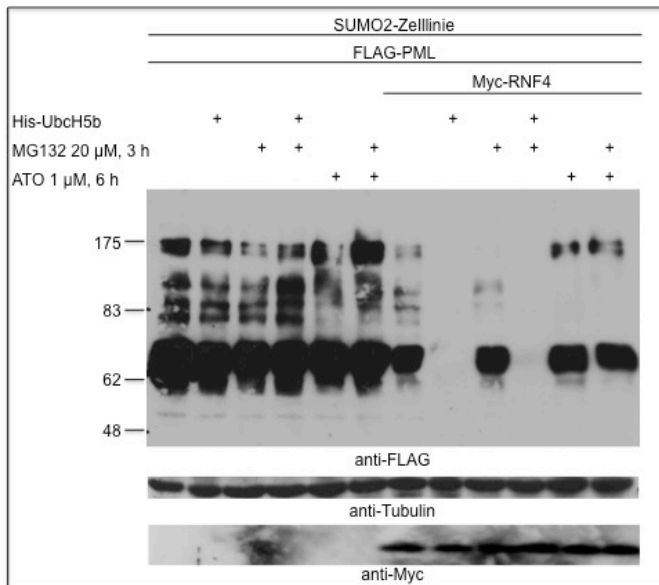


Abb. 3.5: RNF4 und UbcH5b sind gemeinsam am Abbau von überexprimiertem PML beteiligt

Westernblotanalyse von Lysaten der SUMO2-Zelllinie, die mit FLAG-PML, Myc-RNF4 und His-UbcH5b kotransfiziert wurde. Die Zellen wurden mit Doxycyclin induziert, mit ATO gestresst und das Proteasom mit MG132 inhibiert. RNF4 führt gemeinsam mit UbcH5b zum Abbau von überexprimiertem PML.

3.6 Die humane Ubiquitinligase RNF4 führt gemeinsam mit ATO zum Zerfall von PML-Kernkörpern

Um untersuchen zu können, ob der Abbau von endogenem und überexprimiertem PML sich auf die Anzahl und Größe von PML-Kernkörpern auswirkt, wurde die stabile SUMO2-Zelllinie induziert (Doxycyclin), mit FLAG-PML und Myc-RNF4 transfiziert, mit ATO gestresst und mit Hilfe der Immunfluoreszenzmethode analysiert. MitoDsRed, ein fluoreszierendes Protein von Clontech, wurde als Transfektionskontrolle eingesetzt. Um den Abbau von PML zu unterdrücken wurde das Proteasom durch MG132 inhibiert.

Die mit ATO gestressten Zellen enthielten im Gegensatz zu den ungestressten Zellen kaum noch intakte PML-Kernkörper. Das bedeutet, selbst wenn nach Abbildung 3.5 in den mit ATO gestressten Lysaten noch PML-Protein nachweisbar bleibt, so scheinen sich nach Abbildung 3.6 kaum noch PML-Kernkörper bilden zu können. Myc-RNF4 und FLAG-PML kolokalisieren immer vollständig.

Die Behandlung der stabilen SUMO2-Zellen mit MG132 führt zu einer Größenzunahme der PML-Kernkörper. Stresst man die Zellen mit ATO (1 µM, 6 h), so verschwindet sowohl PML, als auch RNF4. Dieser Effekt wird nicht erzielt wenn man zusätzlich zum ATO-Stress das Proteasom inhibiert. Wird RNF4 nicht überexprimiert, dann sind trotz ATO-Stress noch PML-Kernkörper im

Nukleus erkennbar. Das bedeutet RNF4 und ATO führen gemeinsam zum Zerfall von PML-Kernkörpern.

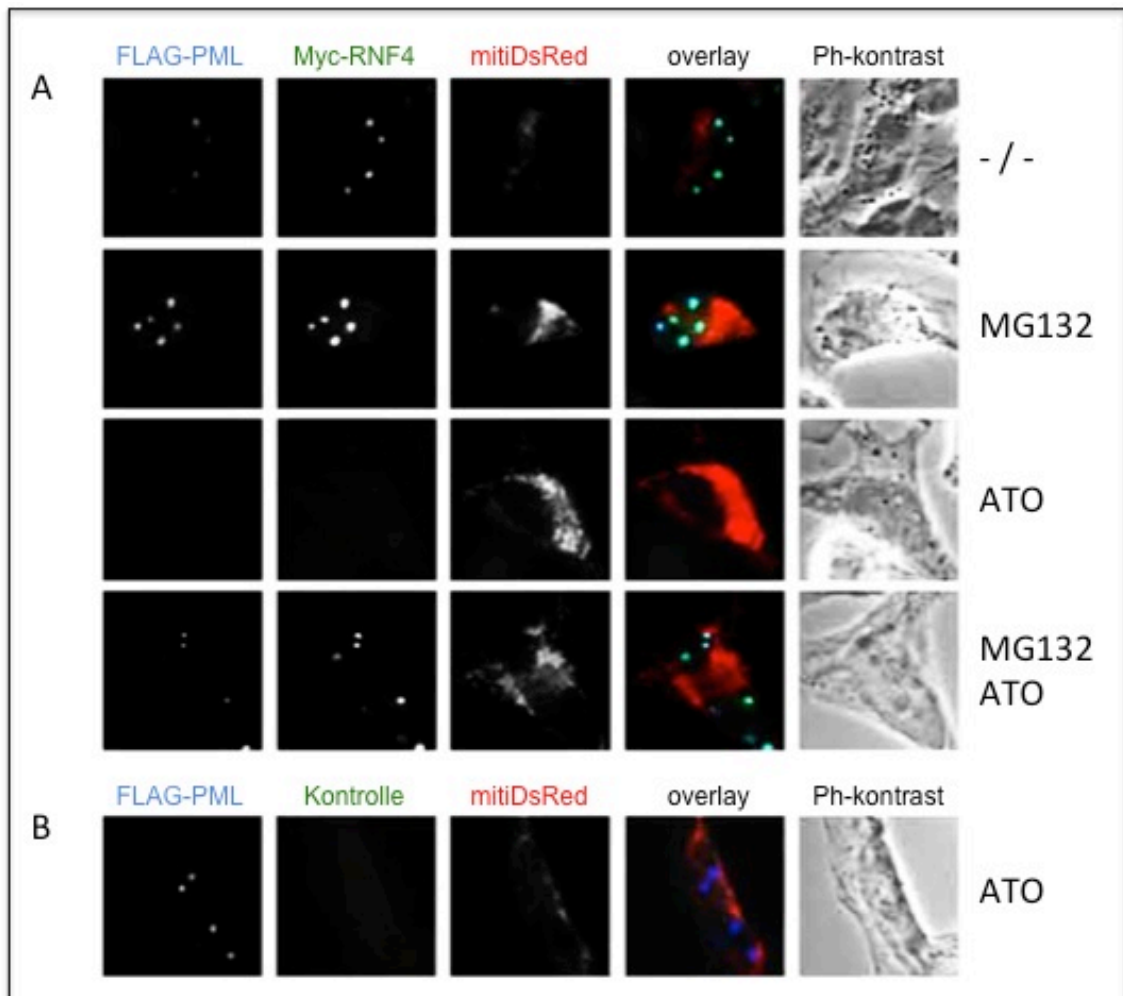


Abb. 3.6: RNF4 führt unter ATO-Stress zum Abbau von PML-Kernkörpern

Stabile SUMO2-Zellen wurden transient mit FLAG-PML (1-522), Myc-RNF4 und mitoDsRed (Transfektionskontrolle) transfiziert und mit Doxycyclin induziert. Danach wurden die Zellen mit ATO (1 μ M, 6 h) und MG132 behandelt. Mittels Immunfluoreszenz wurde schließlich die Anzahl und Größe der PML-Kernkörper untersucht (Weisshaar *et al.*, 2008).

3.7 Einfluss der RNF4 SIM Mutanten auf PML-Kernkörper

Die humane Ubiquitinligase RNF4 besitzt an ihrem N-Terminus vier potentielle SIMs. Um die Rolle der einzelnen SIMs für ihre Ligaseaktivität untersuchen zu können wurden vier Einzelmutanten (SIM1-, SIM2-, SIM3-, SIM4-Mutanten) und eine Doppelmutante (SIM 2/3-Mutante) von RNF4 hergestellt. Diese und der RNF4-Wildtyp (RNF4-WT) wurden in Hela B Zellen transient transfiziert und mittels Immunfluoreszenzmethode analysiert. Anders als im vorangegangenen Experiment wurde hier der Abbau von endogenen PML-Kernkörpern

untersucht. Zudem wurde auf eine Stressinduktion mit ATO und die Überexpression von SUMO2 verzichtet.

Auffällig ist, dass in den RNF4-WT überexprimierenden Zellen kaum noch endogene PML-Kernkörper nachweisbar sind. Zellen die entweder die RNF4-SIM1- oder SIM3-Mutante überexprimieren haben ebenfalls nur noch wenige PML-Kernkörper. Mutiert man jedoch SIM2, SIM2/3 oder SIM4, so lassen sich relativ viele PML-Kernkörper im Zellkern nachweisen. RNF4 ist demnach ohne seine essentiellen SIMs (SIM2 und SIM4) nicht mehr in der Lage PML-Kernkörper zu spalten oder abzubauen.

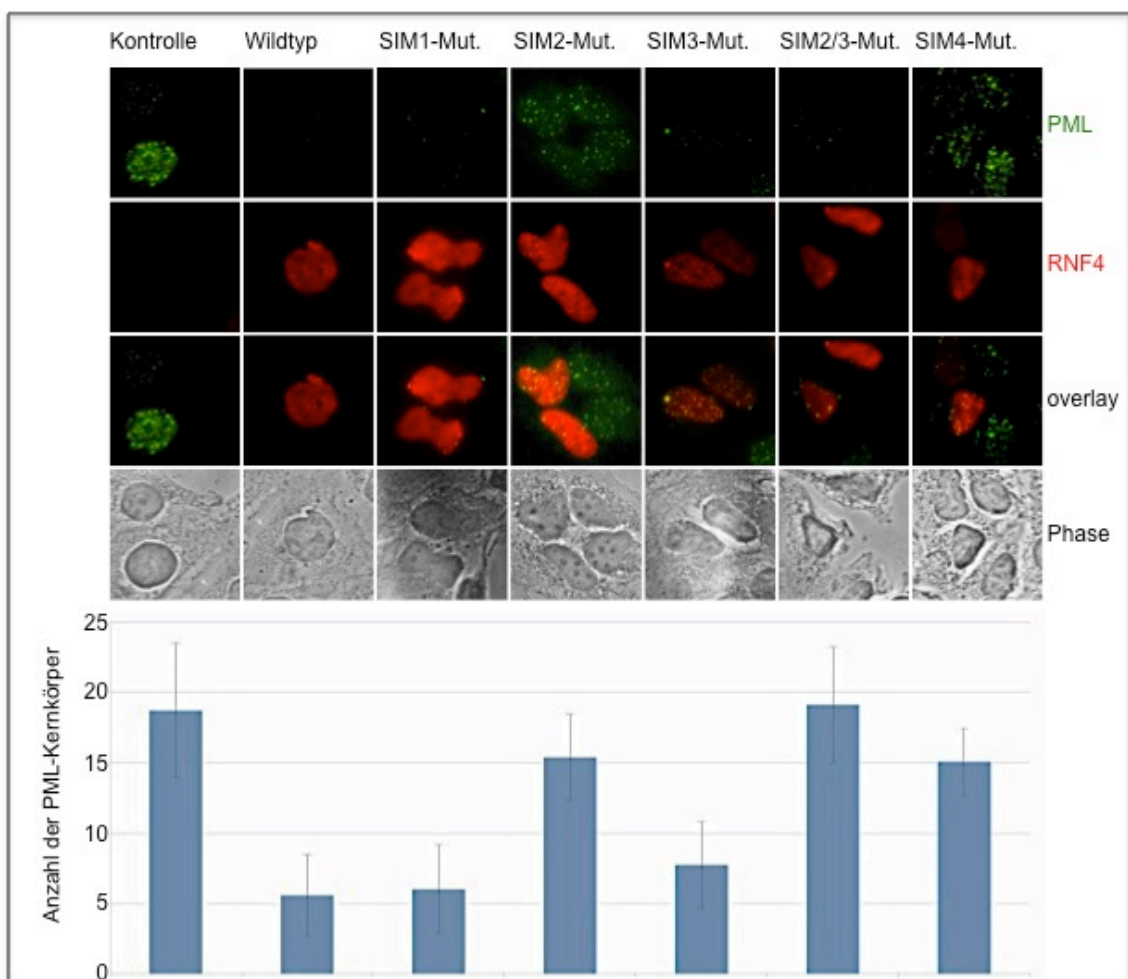


Abb.3.7: Einfluss der RNF4-SIM Mutanten auf die Anzahl von PML-Kernkörpern

Immunfluoreszenzanalyse von HeLa B Zellen transient transfiziert mit RNF4-Wildtyp (RNF4-WT) und verschiedenen RNF4-SIM Mutanten (SIM1-, SIM2-, SIM3-, SIM2/3-, SIM4-Mutanten) (oben). Der Wildtyp von RNF4 ist in der Lage endogene PML-Kernkörper zu zerstören. (unten) Quantifizierung der PML-Kernkörper (die Beschriftung der y-Achse repräsentiert die Anzahl der PML-Kernkörper, auf der x-Achse sind der RNF4-WT und die verschiedenen RNF4-SIM Mutanten aufgetragen).

3.8 Einfluss unterschiedlicher Stressfaktoren auf PML-Kernkörper

Da ATO vermutlich zur SUMO2/3-Modifikation von PML und schließlich zur Zerstörung von PML-Kernkörpern führt sollte im folgenden Experiment untersucht werden ob osmotischer Stress ähnliche Effekte hervorruft. Darum wurden primäre Vorhautfibroblasten (HS27 Zellen) unterschiedlichen Stressfaktoren ausgesetzt (ATO, 3 μ M, 3 h; Sorbitol, 1 M, 3 h) und mit Hilfe der Immunfluoreszenzmethode analysiert.

Deutlich erkennbar ist, dass in den ATO gestressten Zellen die PML-Kernkörper vollständig mit SUMO2 kolokalisieren und verglichen mit den ungestressten Zellen etwas weniger PML-Kernkörper enthalten. In den mit Sorbitol behandelten Zellen sind viel mehr und größere PML-Kernkörper erkennbar, in denen nur zum Teil SUMO2 dafür aber SUMO1 zu finden ist. Demzufolge führt ATO, nicht aber osmotischer Stress zum Zerfall von PML-Kernkörpern.

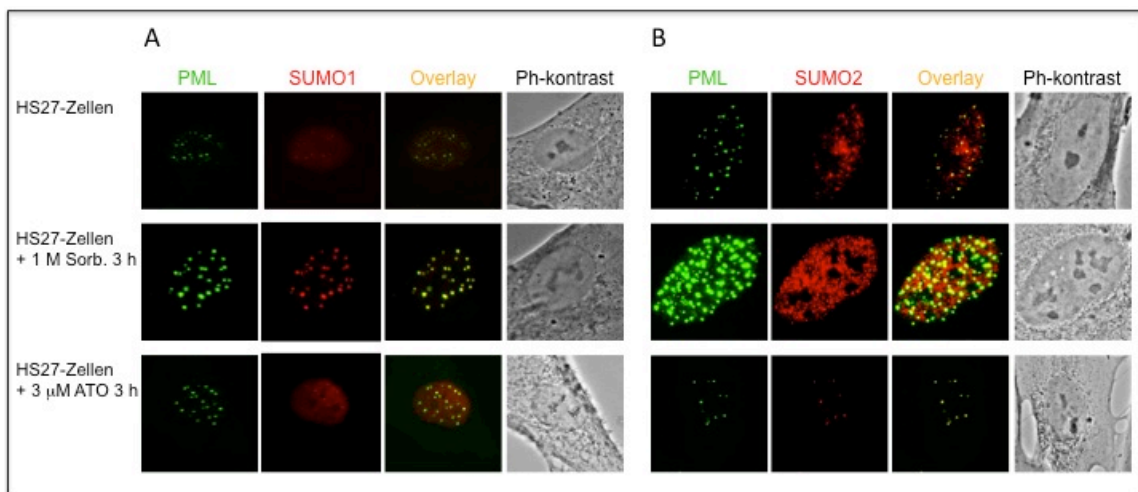


Abb. 3.8.1: Auswirkung unterschiedlicher Stressfaktoren auf die Anzahl von PML-Kernkörpern

Primäre Fibroblasten (HS27 Zellen) wurden entweder mit Sorbitol oder ATO gestresst und mittels Immunfluoreszenzmethode analysiert. In diesem Experiment wurden ausschließlich endogene Proteine gefärbt (PML = grün, SUMO1 bzw. SUMO2 = rot).

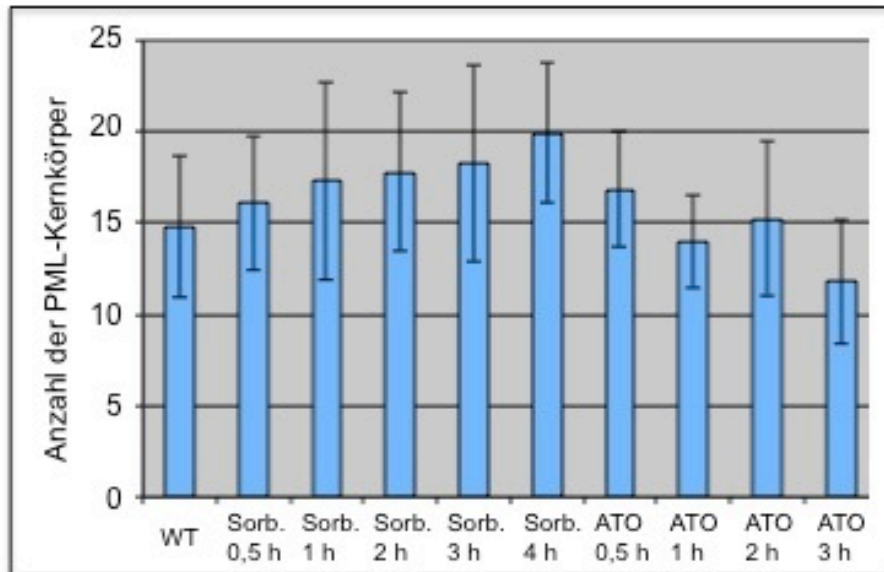


Abb. 3.8.2: Auswirkung unterschiedlicher Stressfaktoren auf die Anzahl von PML-Kernkörpern

Quantifizierung von endogenen PML-Kernkörpern mittels Immunfluoreszenzmikroskopie. Die y-Achse repräsentiert die Anzahl der PML-Kernkörper. Auf der x-Achse sind die Zeitreihen von Sorbitol und ATO aufgetragen. Nach 4 h Sorbitol-Stress (1 M) sind etwa 20 PML-Kernkörper pro Zelle nachweisbar. Nach 3 h ATO-Stress (3 μ M) im Mittel nur noch 11-12.

3.9 Analyse von endogenem PML in HS27- und HeLa B- Zelllysaten nach unterschiedlicher Stressinduktion

In diesem Experiment wurden HS27 Zellen und HeLa B Zellen ähnlich wie im vorherigen Experiment mit ATO oder Sorbitol behandelt. Da es von PML eine Vielzahl von Splicevarianten gibt (Jensen, 2001; Condemine, 2006) und PML posttranslational unterschiedlich modifiziert werden kann, zeigt die Westernblotanalyse von endogenem PML eine Vielzahl von Banden. In unbehandelten HS27 Zellen ist eine einzige PML-Bande bei 130 kDa prominent. In den unbehandelten HeLa B Zelllysaten sind dagegen insgesamt 5 Banden nachweisbar, zwei relativ starke Banden bei 130 kDa bzw. zwischen 130 und 170 kDa sowie drei schwache Banden bei 95 kDa, unterhalb von 170 kDa und eine hochmolekulare PML-Bande. Nach Behandlung der Zellen mit MG132 sieht das Bandenmuster in beiden Zelllinien fast identisch aus, es unterscheidet sich aber von dem nach ATO- oder Sorbitol-Stress. Hier können insgesamt 7 Banden nachgewiesen werden, eine bei 95 kDa, zwei relativ starke Banden bei 130 bzw. zwischen 130 und 170 kDa, eine etwas unterhalb von 170 kDa und 3 oberhalb von 170 kDa. Die Stressinduktion mit ATO führt in beiden

Zelllinien zum Verlust der Banden bei 130 kDa und zwischen 130 und 170 kDa. Nach der ATO-Stressinduktion und gleichzeitiger Inhibition des Proteasoms werden in beiden Zelllinien gleichermaßen sowohl die Bande bei 130 kDa, als auch die Banden zwischen 130 und 170 kDa und darüber stabilisiert. Werden die Zellen mit Sorbitol gestresst, so ändert sich verglichen mit den unbehandelten und den ATO gestressten Zelllysaten das Bandenmuster. Hier wird endogenes PML bei ca. 130 kDa unabhängig von der Inhibition des Proteasoms in beiden Zelllinien stabilisiert. Zwischen 130 und 170 kDa sind keine Banden erkennbar. In beiden Zelllinien akkumulieren hochmolekulare Konjugate weit über 170 kDa.

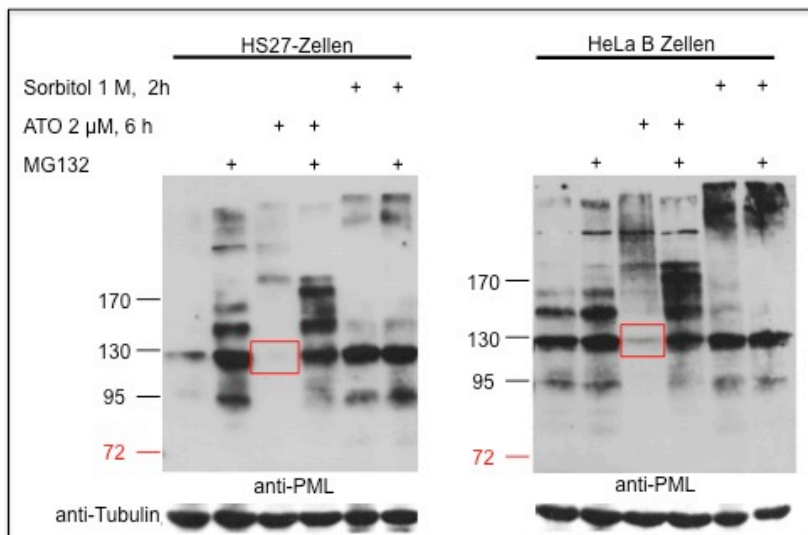


Abb.3.9: Analyse von endogenem PML in HS27- und HeLa B-Zellen nach ATO- bzw. Sorbitol-Stress

Westernblotanalyse von primären Fibroblasten und HeLa B Zellen nach Stressinduktion mit ATO (2 μ M, 6 h) oder Sorbitol (1 M, 2 h). In beiden Zelllinien verschwinden Banden nach ATO-Stressinduktion, die durch die Inhibition des Proteasoms wieder stabilisiert werden können. Auf die Sorbitol gestressten Zellen hat MG132 keinen Einfluss.

3.10 Einfluss von RNF4 auf endogenes PML unter verschiedenen Stressbedingungen in HS27 Zellen

Abbildung 3.10 zeigt das Ergebnis der transienten Transfektion von RNF4 in HS27 Zellen die entweder mit ATO oder Sorbitol gestresst wurden. Deutlich erkennbar ist, dass in den Lysaten mit ATO gestressten Zellen unabhängig von der RNF4-Überexpression Banden bei 130 kDa und zwischen 130 und 170 kDa verschwinden (rotes Kästchen; vgl. Abb.: 3.9). Dieser Effekt kann durch MG132 verhindert werden.

Bei Betrachtung der Zellysate nach osmotischem Stress, verändert sich das Bandenmuster von endogenem PML. In diesen Lysaten tauchen neue hochmolekulare Banden über 170 kDa auf (blau hervorgehoben). Die Banden zwischen 95 und 170 kDa werden stabilisiert. Eine zusätzliche Inhibition des Proteasoms hat keine Auswirkungen. Dies korreliert mit den vorangegangenen Immunfluoreszenzversuchen, bei denen nach osmotischem Stress mehr und größere PML-Kernkörper beobachtet wurden als in den ungestressten oder noch deutlicher in den ATO gestressten Zellen.

Nach der Transfektion der Zellen mit RNF4 fällt auf, dass PML zwischen 95 und 130 kDa bereits ohne ATO-Stress stark reduziert wird. Dieser Effekt konnte in Abbildung 3.5 nicht nachgewiesen werden. Dort mussten die SUMO2 und PML überexprimierenden Zellen zusätzlich mit Ubch5b transfiziert werden. Darüber hinaus zeigt die Westernblotanalyse gegen HA-RNF4, dass osmotischer Stress zum Abbau von RNF4 führt und nicht durch MG132 stabilisiert werden kann. Die Westernblotanalyse gegen SUMO2/3 zeigt eine von der Inhibition des Proteasoms abhängige Akkumulation von SUMO-Konjugaten in unbehandelten sowie ATO gestressten Zellen. Werden die Zellen mit Sorbitol gestresst, so hat MG132 wenig Einfluss.

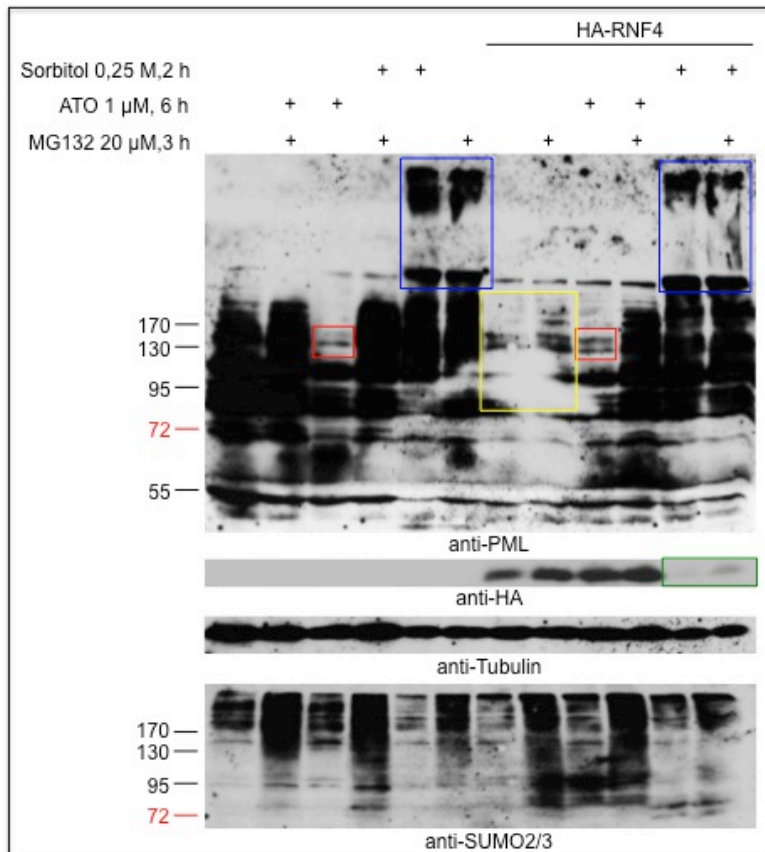


Abb. 3.10: Einfluss von ATO und Sorbitol in Kombination mit transfiziertem HA-RNF4 auf endogenes PML

Hier wurden HS27 Zellen unterschiedlich gestresst (ATO, 1 µM, 6 h; Sorbitol, 0,25 M, 2 h) und zusätzlich mit HA-RNF4 transfiziert. Zu beobachten ist, dass ungestresste Zellen, die mit HA-RNF4 transient transfiziert wurden, einen Rückgang von endogenem PML zwischen 95 und 130 kDa zeigen (gelbes Kästchen). Der Effekt von ATO ist eindeutig abhängig von MG132. Eine Stressinduktion mit Sorbitol zeigt ein anderes Bandenmuster von endogenem PML. Hier sind vor allem Veränderungen im hochmolekularen Bereich zu beobachten. Der Effekt von Sorbitol ist unabhängig von einer Inhibition des 26S-Proteasoms.

3.11 Einfluss von RNF4 auf endogenes PML unter verschiedenen Stressbedingungen in HeLa B Zellen

In diesem Experiment wurden HeLa B Zellen zunächst transient mit HA-RNF4 transfiziert und dann mit ATO oder Sorbitol gestresst. Die Westernblotanalyse gegen endogenes PML zeigt genau wie die vorangegangenen Experimente (Abb.: 3.10 und 3.9), ein Verschwinden der Banden bei 130 kDa und zwischen 130 und 170 kDa nach ATO-Stress. Dieser Effekt kann durch die Inhibition des 26S-Proteasoms verhindert werden. Werden die Zellen aber mit Sorbitol gestresst, so bleibt die Bande bei 130 kDa deutlich nachweisbar. Die Banden zwischen 130 und 170 kDa können nicht eindeutig detektiert werden. Der Sorbitolstress führt zusätzlich zu einer Akkumulation hochmolekularer

Konjugate weit über 170 kDa. Der Effekt der Sorbitol-Stressinduktion wird nicht durch MG132 beeinflusst. Zudem fällt auf, dass in den Sorbitol gestressten Zellen kaum noch HA-RNF4 nachweisbar ist. Dies korreliert mit dem Ergebnis in Abbildung 3.10. Auch hier führt der osmotische Stress durch Sorbitol zum Abbau von RNF4, der durch MG132 nicht verhindert werden kann.

Verglichen mit dem vorangegangenen Experiment (Abb.: 3.10) in HS27 Zellen, bei dem bereits eine RNF4-Überexpression zum Rückgang von endogenen PML-Banden zwischen 95 und 170 kDa führte, scheint die Überexpression von RNF4 in den ungestressten HeLa B Zellen mit und ohne MG132 keinen Effekt zu haben (vgl. Abb.: 3.9).

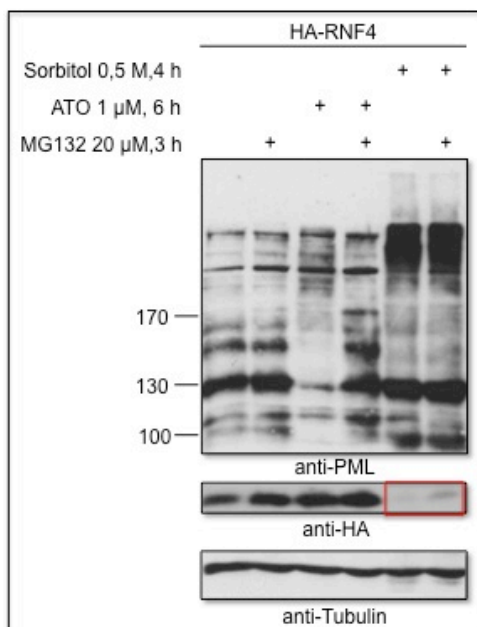


Abb. 3.11: Einfluss von RNF4 auf endogenes PML in HeLa B Zellen

Hier wurden HeLa B Zellen stressinduziert (ATO, 1 µM, 6 h; Sorbitol, 0,5 M, 4h) und mit dem reversiblen Proteasominhibitor MG132 behandelt. Nach Lyse der Zellen in 2 x SDS-Probenpuffer und nach Westernblotanalyse wird deutlich, dass ATO zum Abbau von endogenem PML bei 130 kDa und zwischen 100 und 170 kDa führt. Die Behandlung der Zellen mit MG132 zeigt, dass der Effekt von ATO im Vergleich zum Effekt von Sorbitol abhängig von der Proteasominhibition ist. Die Westernblotanalyse gegen HA-RNF4 zeigt ein Verschwinden von transfiziertem RNF4 nach Sorbitolstress.

3.12 Analyse von HeLa B Zelllysaten nach unterschiedlicher Stressinduktion

In Abbildung 3.12 wurden HeLa B Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von ATO oder Sorbitol behandelt und im Anschluss mittels Westernblot-Methode analysiert. Analog zu den vorangegangenen Experimenten mit HS27- und HeLa B-Zellen kann man erkennen dass der ATO-Stress (10 µM) zur Abnahme von endogenem PML bei 130 kDa führt (rotes Kästchen). Darüber hinaus führt ATO zu einer Akkumulation von SUMO2- und Ubiquitinkonjugaten. Die Behandlung mit Sorbitol dagegen hat eine Stabilisierung von endogenem PML bei 130 kDa zufolge. Zudem sind in diesen Zelllysaten, verglichen zu den

unbehandelten und ATO gestressten Zellen, kaum SUMO2-Konjugate nachweisbar. Der osmotische Stress durch Sorbitol führt dagegen zu einer Akkumulation von SUMO1-Konjugaten.

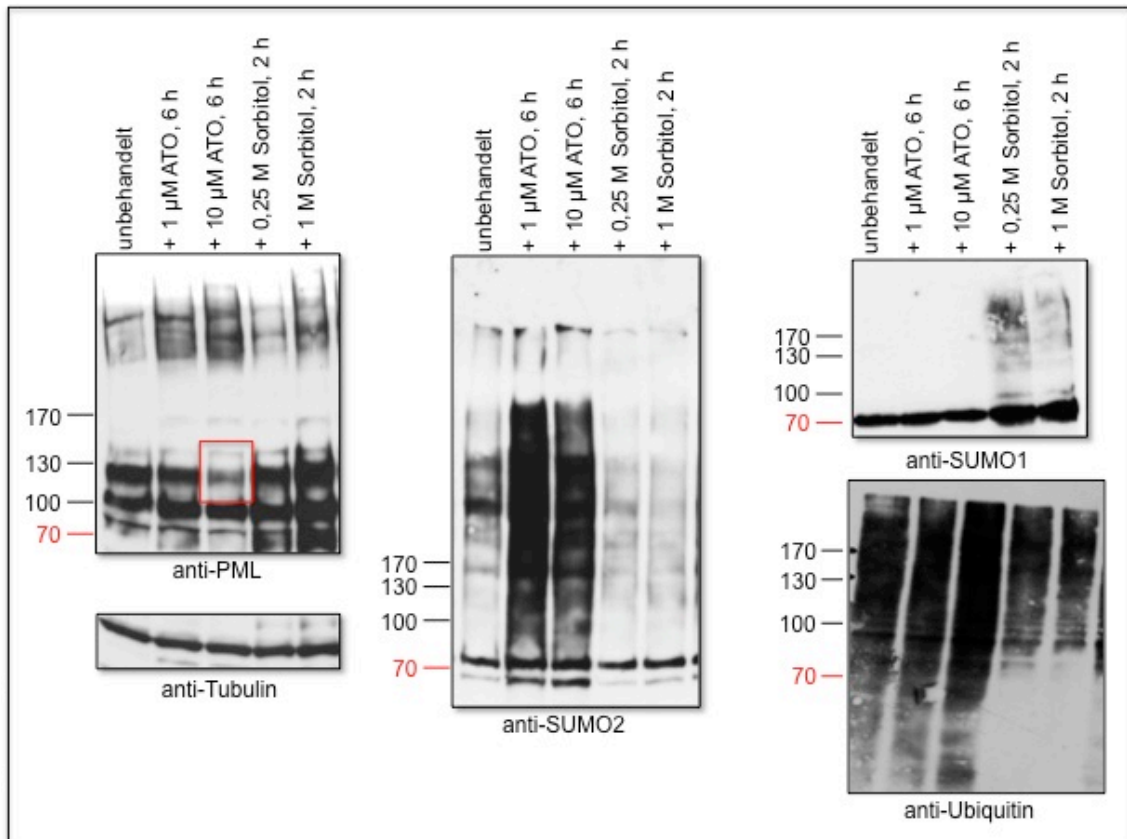


Abb. 3.12: Einfluss von ATO und Sorbitol auf endogenes PML in HeLa B Zellen

Hier wurden HeLa B Zellen mit ATO (1 μ M bzw. 10 μ M ATO, 6 h) und Sorbitol (0,25 M bzw. 1 M, 2 h) behandelt, danach mit 2 x SDS-Probenpuffer lysiert und mit Hilfe des Westernblotverfahrens analysiert. Auffällig ist, dass endogenes PML bei ca. 130 kDa nach 10 μ M ATO-Stress im Gegensatz zum Sorbitolstress verschwindet. Der ATO-Stress führt darüberhinaus zur Akkumulation von SUMO2- und Ubiquitinkonjugaten. Der Sorbitolstress führt nicht zur Akkumulation von SUMO2-, sondern zur Akkumulation von SUMO1-Konjugaten.

3.13 Analyse von HeLa B Zelllysaten mittels Immunpräzipitation (IP) von endogenem PML

Um zu klären, ob die Stabilisierung beziehungsweise der Abbau von PML nach den unterschiedlichen Stressinduktionen mit Sorbitol oder ATO auf die Akkumulation von SUMO1- bzw. SUMO2-Konjugaten zurückzuführen ist, wurde im folgenden Experiment eine IP von endogenem PML durchgeführt. Mit Hilfe des Westernblotverfahrens wurde SUMO1, SUMO2 und Ubiquitin nachgewiesen.

Auffällig ist, dass die Inhibition des 26S-Proteasoms durch MG132 in den Präzipitaten ohne Stressinduktion und mit ATO eine Akkumulation von sowohl SUMO2- als auch Ubiquitin-modifiziertem PML nach sich zieht. Deshalb sieht man in diesen Präzipitaten eine Akkumulation und Stabilisierung von endogenem PML bei 130 kDa, dessen Abbau folglich verhindert wird. Die Westernblotanalyse gegen PML zeigt ähnlich wie die vorangegangenen Experimente eine nur noch schwach nachweisbare Bande bei 130 kDa nach ATO-Stress (rotes Kästchen), die wie bereits erwähnt durch MG132 stabilisiert werden kann.

Bei Betrachtung der Immunpräzipitate nach osmotischem Stress wird deutlich, dass eine Proteasominhibition keine signifikanten Auswirkungen auf SUMOylierungs- oder Ubiquitinierungsprozesse hat. Man sieht, verglichen mit den anderen Präzipitaten, eine schwache Anhäufung hochmolekularer SUMO1- und nach 1 M Sorbitol eine starke Akkumulation von SUMO2-modifizierten PML-Konjugaten, die nicht durch MG132 beeinflusst werden. Eine verstärkte Modifikation von PML mit Ubiquitin kann nicht nachgewiesen werden. Darüberhinaus wird die Bande bei 130 kDa nach Sorbitolstress stabilisiert. Des Weiteren führt die Behandlung der Zellen mit 1 M Sorbitol zu einer Anreicherung von endogenem PML zwischen 130 und 170 kDa und im hochmolekularen Bereich weit über 170 kDa. Diese lassen sich in diesem Experiment durch MG132 stabilisieren (blaues Kästchen).

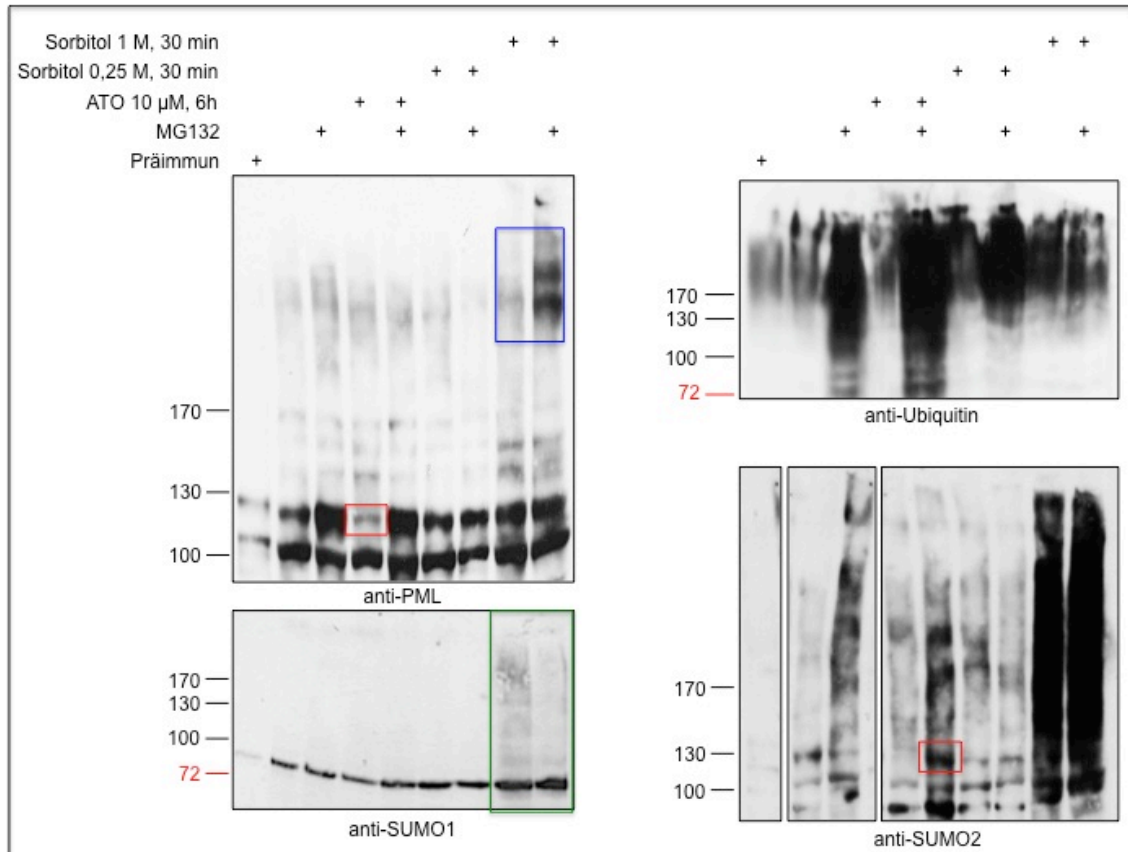


Abbildung 3.13.1: Immunpräzipitation von endogenem PML aus HeLa B Zellen

Westernblotanalyse von gereinigtem endogenem PML. HeLa B Zellen wurden mit ATO (10 µM ATO, 6 h) oder Sorbitol (0,25 M bzw. 1 M, 30 min) gestresst und das 26S Proteasom mit MG132 inhibiert. Die Präzipitate wurden gegen endogenes PML, SUMO1, SUMO2 und Ubiquitin gefärbt. Deutlich erkennbar ist die Akkumulation hochmolekularer Ubiquitin- und SUMO2-Konjugaten nach Proteasominhibition in den ungestressten und ATO behandelten Zellen. MG132 hat keinen Einfluss auf Ubiquitinierung oder SUMOylierung in Sorbitol gestressten Zellen. MG132 stabilisiert aber hochmolekulare PML-Konjugate nach 1 M Sorbitol.

Die Kontrolle der Immunpräzipitation von endogenem PML ist in Abbildung 3.13.2 gezeigt. Hier wurden die Zelllysate vor der IP mittels Westernblotanalyse gegen PML, SUMO1, SUMO2 und Ubiquitin gefärbt. Insgesamt bestätigen die *Blots* der Zelllysate den Effekt, der nach der IP erkennbar wird. Auch hier wird deutlich, dass die Proteasominhibition keinen Einfluss auf die Akkumulation von SUMO1, SUMO2 oder Ubiquitin in osmotisch gestressten Zellen hat. Wird das Proteasom aber in den ungestressten Zellen oder mit ATO gestressten Zellen inhibiert, so folgt eine Anreicherung hochmolekularer SUMO2- und Ubiquitin-Konjugaten. Außerdem kann der Rückgang von endogenem PML nach ATO-Stress durch MG132 verhindert werden. Die Zelllysate zeigen allerdings anders als die IP keine Akkumulation hochmolekularer PML-Konjugaten über 170 kDa nach der Stressinduktion mit 1 M Sorbitol und gleichzeitiger Inhibition des Proteasoms. Werden die Zellen aber mit 0,25 M Sorbitol gestresst, so können

unabhängig von MG132 PML-Agglomerate nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist in den Lysaten, anders als in den Präzipitaten nach 1 M Sorbitol keine Akkumulation von SUMO2 nachweisbar. Eine Anreicherung von SUMO1 nach 1 M Sorbitolstress kann sowohl in den Präzipitaten (3.13.1) als auch in den Lysaten (3.13.2) nachgewiesen werden.

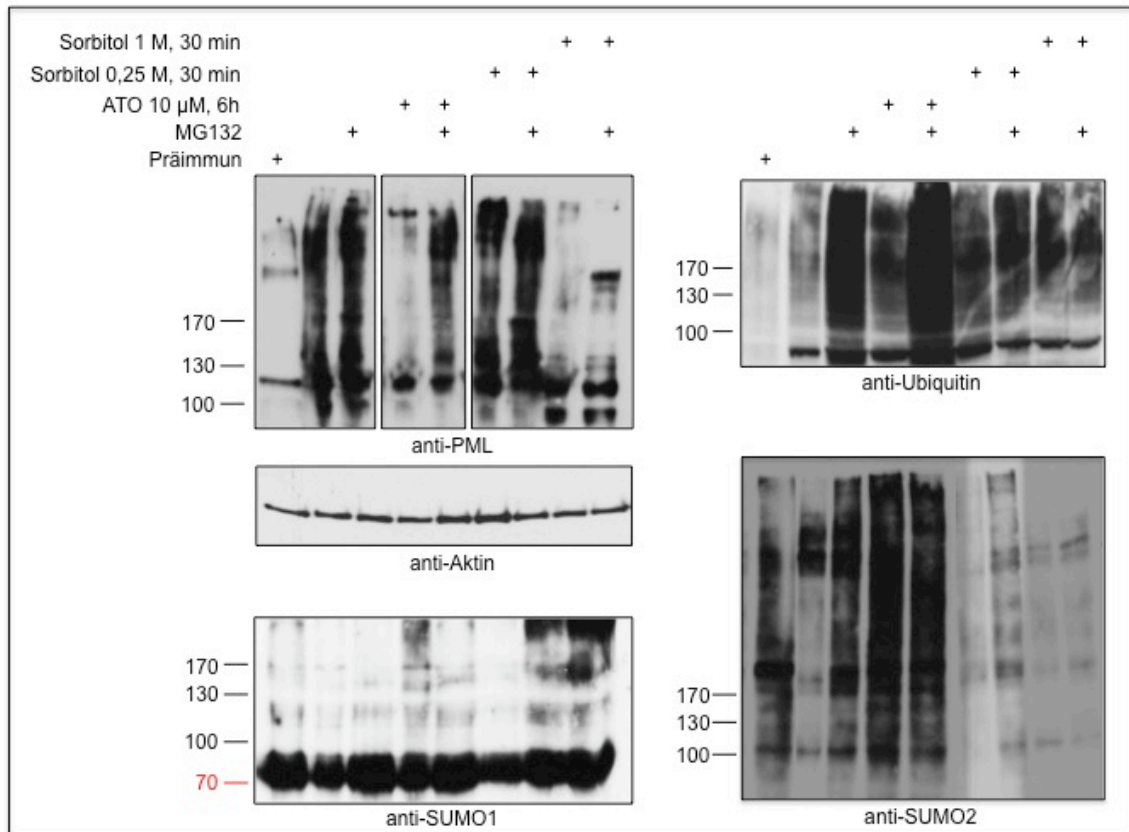


Abbildung 3.13.2: Westernblotanalyse von HeLa B Zellen als Kontrolle der Immunpräzipitation von endogenem PML

HeLa B Zellen wurden mit ATO, Sorbitol und MG132 behandelt und im Anschluss gegen endogenes PML, Ubiquitin, SUMO1 oder SUMO2 gefärbt. Erkennbar ist die Anreicherung von SUMO2- bzw. Ubiquitin-Konjugaten in unbehandelten und ATO-gestressten Zellen bei zusätzlicher Proteasominhibition. Der Verlust von endogenem PML nach ATO-Stress kann durch MG132 verhindert werden. In den Sorbitol gestressten Zellen hat MG132 keinen Einfluss auf endogenes PML oder die Anreicherung von SUMO2- bzw. Ubiquitin- Konjugaten. Der osmotische Stress führt aber zu einer Akkumulation von SUMO1-Konjugaten.

3.14 Auswirkung unterschiedlicher Stressfaktoren auf die Signaltransduktion in HeLa B - und NB4 - Zellen

Eine humane Zelle beinhaltet rund 520 unterschiedliche Kinasen, die wiederum 30 % aller Proteine phosphorylieren und dadurch aktivieren oder inaktivieren (Manning et al., 2002). Sie bilden Signaltransduktionsketten, die in der Zelle Prozesse wie die Apoptose, Zelldifferenzierung, Zellteilung und vieles mehr

beeinflussen. Da Kinasen durch unterschiedliche Stressfaktoren aktiviert beziehungsweise inaktiviert werden, wurden in den folgenden Experimenten HeLa B - und NB4 - Zellen (isoliert aus dem Knochenmark von APL Patienten) sowohl mit ATO als auch mit Sorbitol gestresst und die Aktivierung unterschiedlicher Kinasen mittels Proteinmikroarrayanalysen quantifiziert. Um zu überprüfen, wann einer der Stresse zur Apoptose führt wurde auch die Aktivierung von Caspase 3 quantifiziert. Diese wird in HeLa B Zellen eindeutig bei 0,25 molarem Sorbitolstress nach 60 min aktiviert, und diese Aktivierung bleibt bis zum letzten Messpunkt nach 720 min erhalten (Abb. 3.14.1 a)). In NB4 Zellen tritt die Aktivierung der Caspase 3 unter Sorbitolstress (0,25 M) erst nach 240 min auf, bleibt aber ebenfalls bis 720 min erhalten (Abb. 3.14.1 b)). Nach einer Stressinduktion mit 1 M Sorbitol wird die Caspase 3 weder in HeLa B - noch in NB4 – Zellen verstärkt aktiviert. Allerdings sind die Messungen in NB4-Zellen nach 45 min bei 1 M Sorbitol fast alle im gelben Bereich. Das bedeutet diese Messungen wurden mit Proben durchgeführt deren Proteinmenge niedriger war als die der Proben bei den Messungen die blau dargestellt sind. Das beeinflusst schließlich die Genauigkeit der Messungen und könnte auf ein starkes Absterben der Zellen nach 1 M Sorbitolstress schließen lassen.

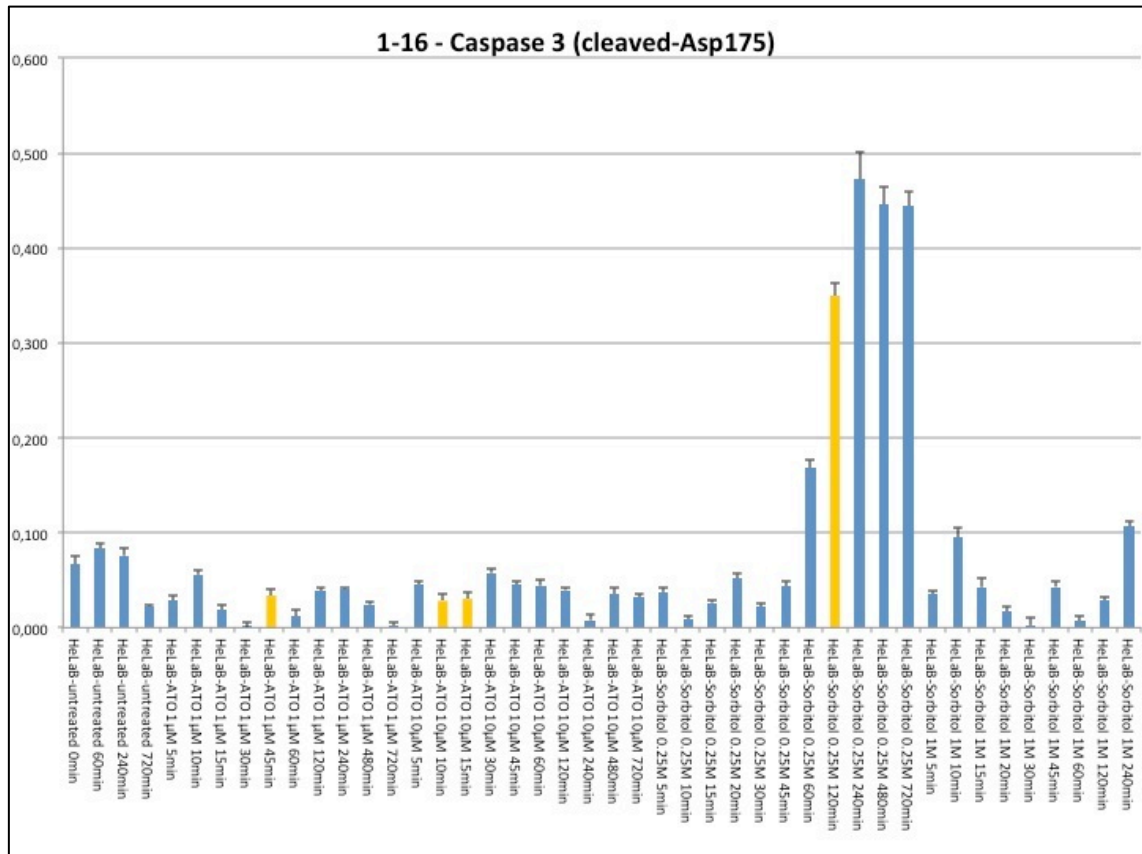


Abbildung 3.14.1 a): Quantifizierung der aktivierten Caspase 3 in HeLa B Zellen nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

Die y-Achse repräsentiert die aktivierte Caspase 3. Auf der x-Achse sind die Zeitreihen der unbehandelten und der mit ATO oder Sorbitol gestressten HeLa B Zellen aufgetragen. Zu berücksichtigen ist, dass die Zelllysate die gelb markiert sind weniger als 2 mg/ml Protein enthielten. Alle anderen (blau gekennzeichnet) wurden mit der finalen Proteinkonzentration von 2 mg/ml im Proteinmikroarray-Versuch analysiert.

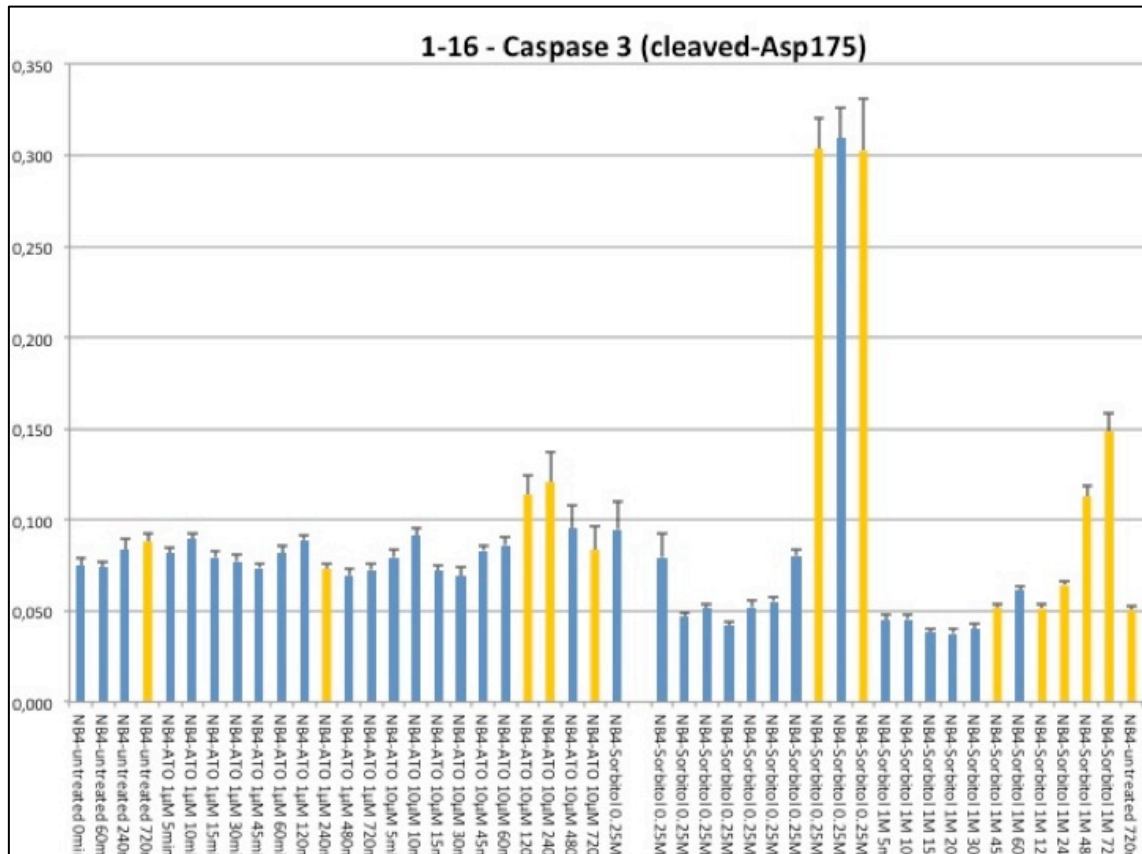


Abbildung 3.14.1 b): Quantifizierung der aktivierten Caspase 3 in NB4 Zellen nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

Die y-Achse repräsentiert die aktivierte Caspase 3. Auf der x-Achse sind die Zeitreihen der unbehandelten und der mit ATO oder Sorbitol gestressten NB4 Zellen aufgetragen. Die gelb markierten Proben enthielten weniger als 2 mg/ml Protein. Alle anderen hatten eine finale Proteinkonzentration von genau 2 mg/ml.

Die MAP2-Kinase MKK7, die zunächst von einer MAP3-Kinase (MLK1/2/3) aktiviert wird, phosphoryliert SAPK/JNK. Aktivierte SAPKs/JNKs phosphorylieren und aktivieren schließlich c-Jun. Die Abbildung 3.14.2 a) zeigt eine erhöhte Aktivierung von MKK7 in ATO (10 µM) gestressten Zellen nach 240 min. Bei 1 µM ATO kann eine leichte Aktivierung von MKK7 nach 5, 15 und 60 min nachgewiesen werden. Dies ist auch der Fall, wenn die Zellen mit 1 M Sorbitol gestresste werden (nach 15, 20 und 60 min). 0,25 M Sorbitol führt nicht zu einer verstärkten Phosphorylierung von MKK7.

In NB4 Zellen führt weder Sorbitol noch ATO zu einer signifikanten Akkumulation aktivierter MKK7 (Abb. 3.14.2 b).

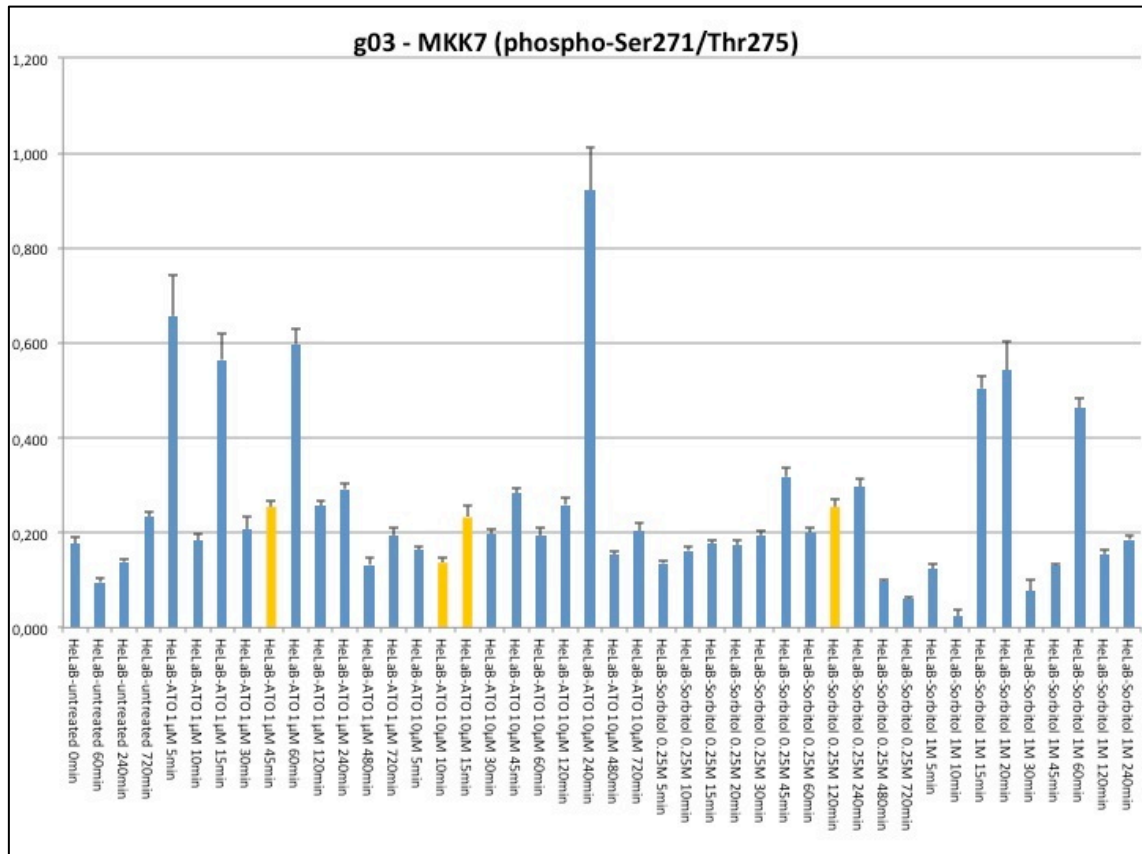


Abbildung 3.14.2 a): Quantifizierung phosphorylierter MKK7 in HeLa B Zellen nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

Die y-Achse repräsentiert phosphorylierte MKK7. Auf der x-Achse sind die Zeitreihen der unbehandelten und der mit ATO oder Sorbitol gestressten HeLa B Zellen aufgetragen. Die gelb markierten Proben enthielten weniger als 2 mg/ml Protein. Alle anderen hatten eine finale Proteinkonzentration von genau 2 mg/ml.

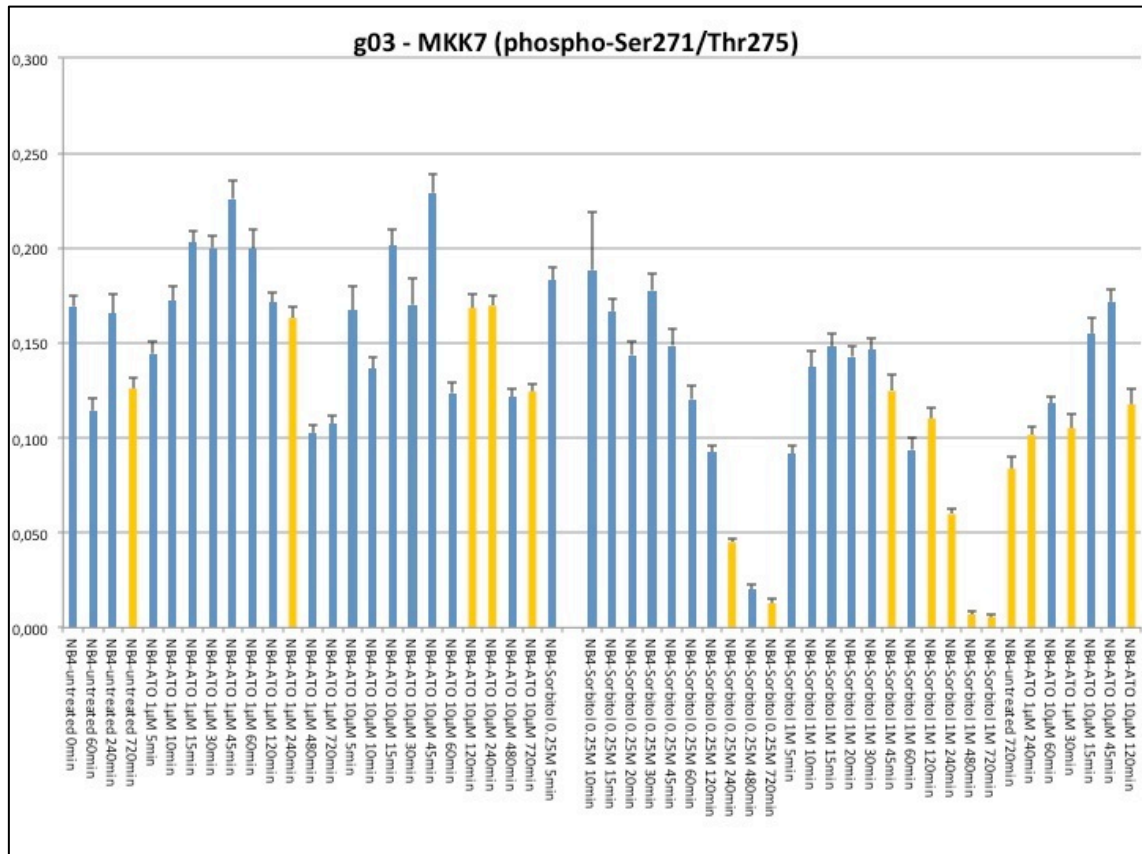


Abbildung 3.14.2 b): Quantifizierung phosphorylierter MKK7 in NB4 Zellen nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

Die y-Achse repräsentiert phosphorylierte MKK7. Auf der x-Achse sind die Zeitreihen der unbehandelten und der mit ATO oder Sorbitol gestressten NB4 Zellen aufgetragen. Die gelb markierten Proben enthielten weniger als 2 mg/ml Protein. Alle anderen hatten eine finale Proteinkonzentration von genau 2 mg/ml.

Eine Stressinduktion mit 0,25 M Sorbitol führt in HeLa B Zellen nach 5 min zu einem Anstieg der aktivierten SAP/JN-Kinasen, der bis zu 120 min aufrechtgehalten wird. 1 M Sorbitol führt zu einer geringen Aktivierung der Kinasen (nach 5 min, 45 min, 120 min und 240 min). ATO hat im Vergleich zu den unbehandelten Zellen keinen Einfluss auf die Aktivierung von SAPK/JNK (Abb. 3.14.3 a).

In NB4 Zellen können phosphorylierte SAPKs/JNKs ebenfalls nach Sorbitolstress verstärkt nachgewiesen werden, sowohl mit 0,25 als auch mit 1 M Sorbitol. In beiden Fällen sind nach 5 min bis 240 min viele phosphorylierte SAPKs/JNKs nachweisbar (Abb. 3.14.3 b).

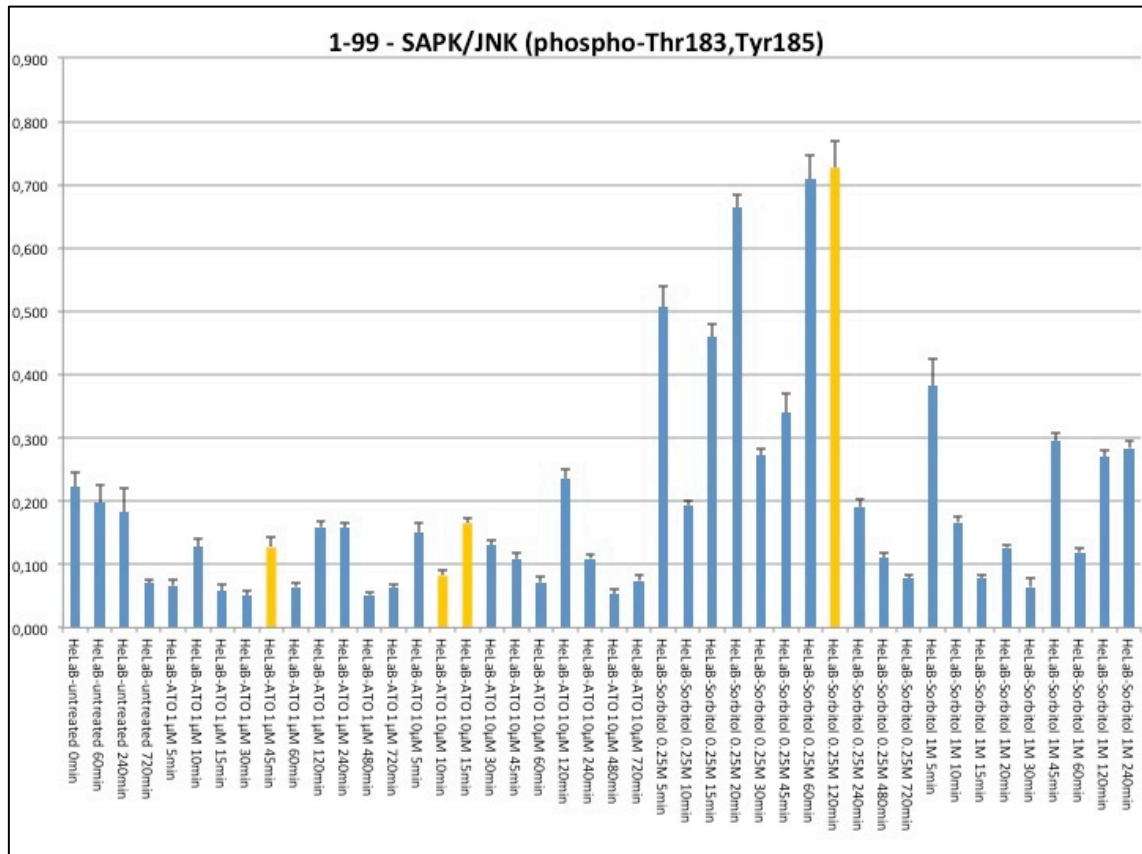


Abbildung 3.14.3 a): Quantifizierung phosphorylierter SAPK/JNK in HeLa B Zellen nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

Die y-Achse repräsentiert phosphorylierte SAPK /JNK. Auf der x-Achse sind die Zeitreihen der unbehandelten und der mit ATO oder Sorbitol gestressten HeLa B Zellen aufgetragen. Die gelb markierten Proben enthielten weniger als 2 mg/ml Protein. Alle anderen hatten eine finale Proteinkonzentration von genau 2 mg/ml.

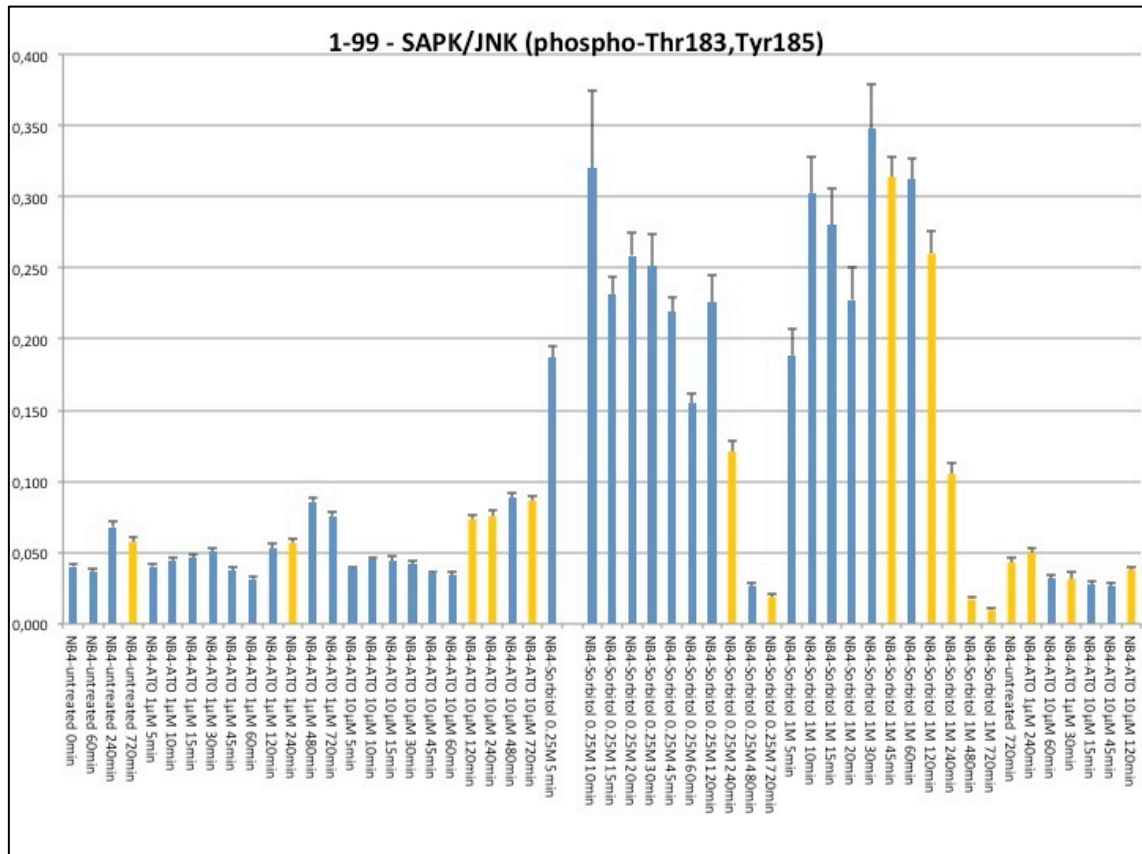


Abbildung 3.14.3 b): Quantifizierung phosphorylierter SAPK/JNK in NB4 Zellen nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

Die y-Achse repräsentiert phosphorylierte SAPK /JNK. Auf der x-Achse sind die Zeitreihen der unbehandelten und der mit ATO oder Sorbitol gestressten NB4 Zellen aufgetragen. Die gelb markierten Proben enthielten weniger als 2 mg/ml Protein. Alle anderen hatten eine finale Proteinkonzentration von genau 2 mg/ml.

Da c-Jun in der Phosphorylierungskette unterhalb der SAPKs/JNKs steht und von ihnen an zwei Serinen phosphoryliert wird, wurde die Phosphorylierung von c-Jun quantifiziert. Anhand dieser Daten können Rückschlüsse auf die Aktivität der SAPKs/JNKs getroffen werden. Ähnlich wie in Abbildung 3.14.3 a) führt der osmotische Stress durch 0,25 M Sorbitol in HeLa B Zellen nach 20 min, sowie nach 60 und 120 min zu einer Akkumulation von phosphoryliertem c-Jun. Die Konzentration von 1 M Sorbitol führt nach 5 min ebenfalls zu einem geringen Anstieg und nach 45 min sowie 120 min zu einer stärkeren Akkumulation von phosphoryliertem c-Jun in den HeLa B Zellen (Abb.: 3.14.4 a). Die Phosphorylierung der SAP/JN-Kinasen ist nach 1 M Sorbitol etwas schwächer (Abb.: 3.14.3 a)).

In NB4 Zellen führt eine Konzentration von 10 µM ATO nach 240 min zu einem Anstieg von phosphoryliertem c-Jun. Dieses Ergebnis korreliert nicht mit der Phosphorylierung der SAPKs / JNKs. Die Daten mit 0,25 M Sorbitol zeigen aber

ähnlich wie die Quantifizierung der Phosphorylierung der SAPKs /JNKs in NB4 Zellen einen Anstieg von phosphoryliertem c-Jun nach 5 und 10 min, der dann wieder abflacht. Eine Konzentration von 1 M Sorbitol führt zu einer Akkumulation von phosphoryliertem c-Jun im Zeitraum von 15 bis 120 min (Abb.: 3.14.4 b).

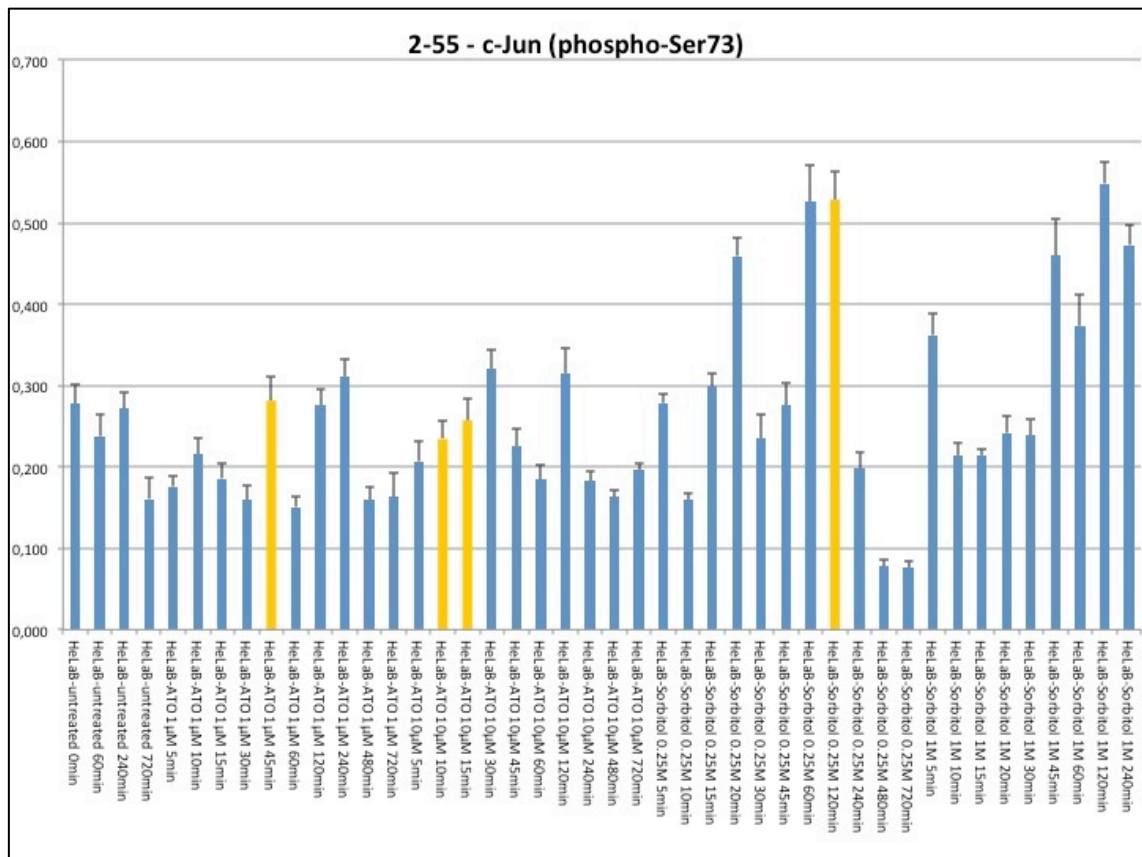


Abbildung 3.14.4 a): Quantifizierung von phosphoryliertem c-Jun in HeLa B Zellen nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

Die y-Achse repräsentiert phosphoryliertes c-Jun. Auf der x-Achse sind die Zeitreihen der unbehandelten und der mit ATO oder Sorbitol gestressten HeLa B Zellen aufgetragen. Die gelb markierten Proben enthielten weniger als 2 mg/ml Protein. Alle anderen hatten eine finale Proteinkonzentration von genau 2 mg/ml.

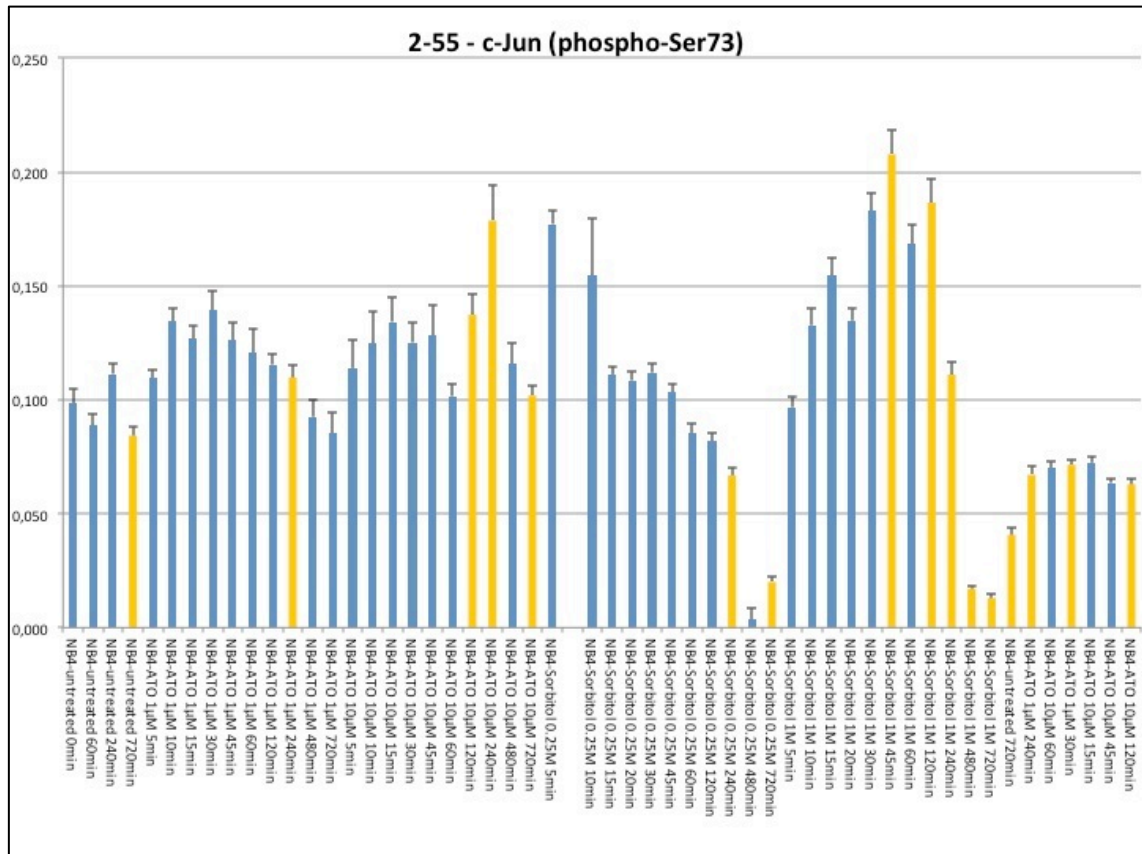


Abbildung 3.14.4 b): Quantifizierung von phosphoryliertem c-Jun in NB4 Zellen nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

Die y-Achse repräsentiert phosphoryliertes c-Jun. Auf der x-Achse sind die Zeitreihen der unbehandelten und der mit ATO oder Sorbitol gestressten NB4 Zellen aufgetragen. Die gelb markierten Proben enthielten weniger als 2 mg/ml Protein. Alle anderen hatten eine finale Proteinkonzentration von genau 2 mg/ml.

p53 ist ein 53 kDa großes Protein, das durch Phosphorylierung aktiviert wird und als Tumorsuppressor fungiert. Es reguliert als Transkriptionsfaktor u.a. nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus und der Induktion der Apoptose beteiligt sind.

In Abbildung 3.14.5 a) sieht man das Ergebnis der Quantifizierung von phosphoryliertem p53 in HeLa B Zellen. In diesen ist bei 1 M Sorbitolstress nach 45 min verstärkt phosphoryliertes p53 nachweisbar (Abb. 3.14.5 a).

In NB4 Zellen wird insgesamt weniger aktiviertes p53 nachgewiesen und dort zeigen die Mikroarraydaten einen leichten Anstieg von phosphoryliertem p53 nach ATO-Stress, jedoch nicht nach Sorbitolstress (Abb. 3.14.5 b).

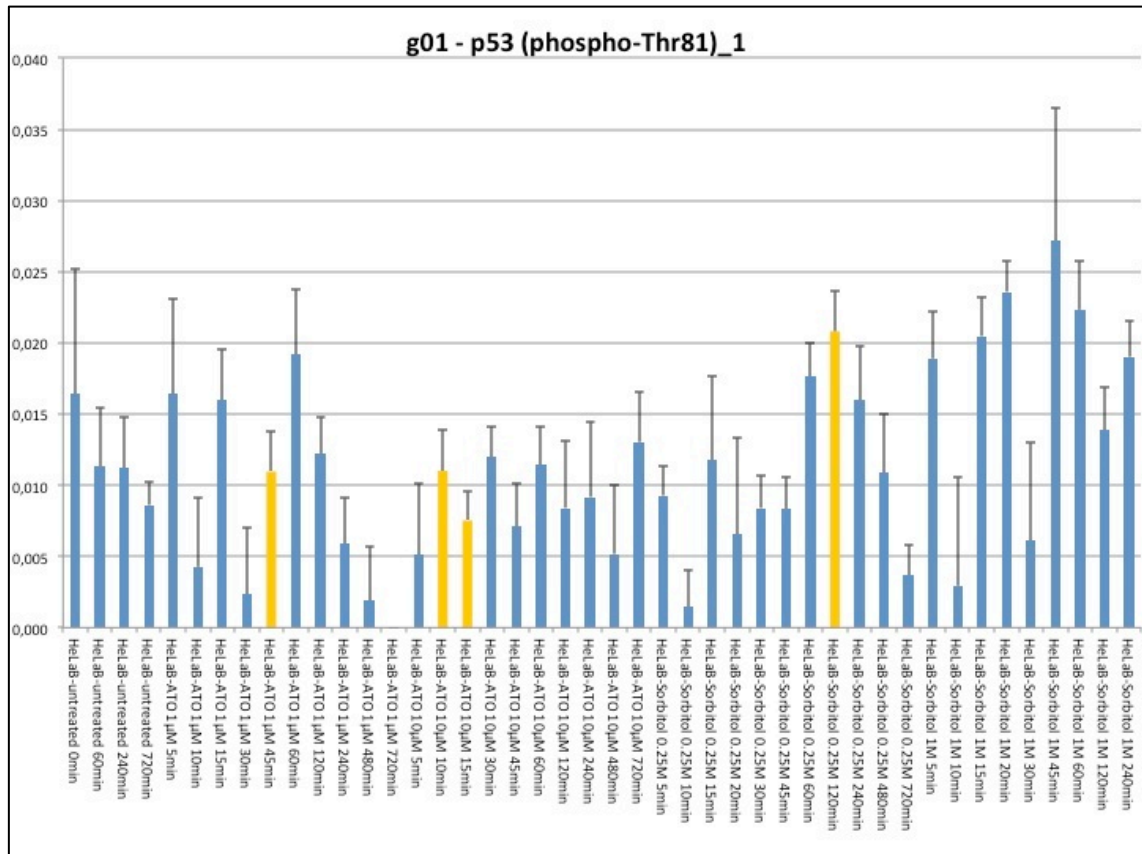


Abbildung 3.14.5 a): Quantifizierung von p53 in HeLa B Zellen nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

Die y-Achse repräsentiert phosphoryliertes p53. Auf der x-Achse sind die Zeitreihen der unbehandelten und der mit ATO oder Sorbitol gestressten HeLa B Zellen aufgetragen. Die gelb markierten Proben enthielten weniger als 2 mg/ml Protein. Alle anderen hatten eine finale Proteinkonzentration von genau 2 mg/ml.

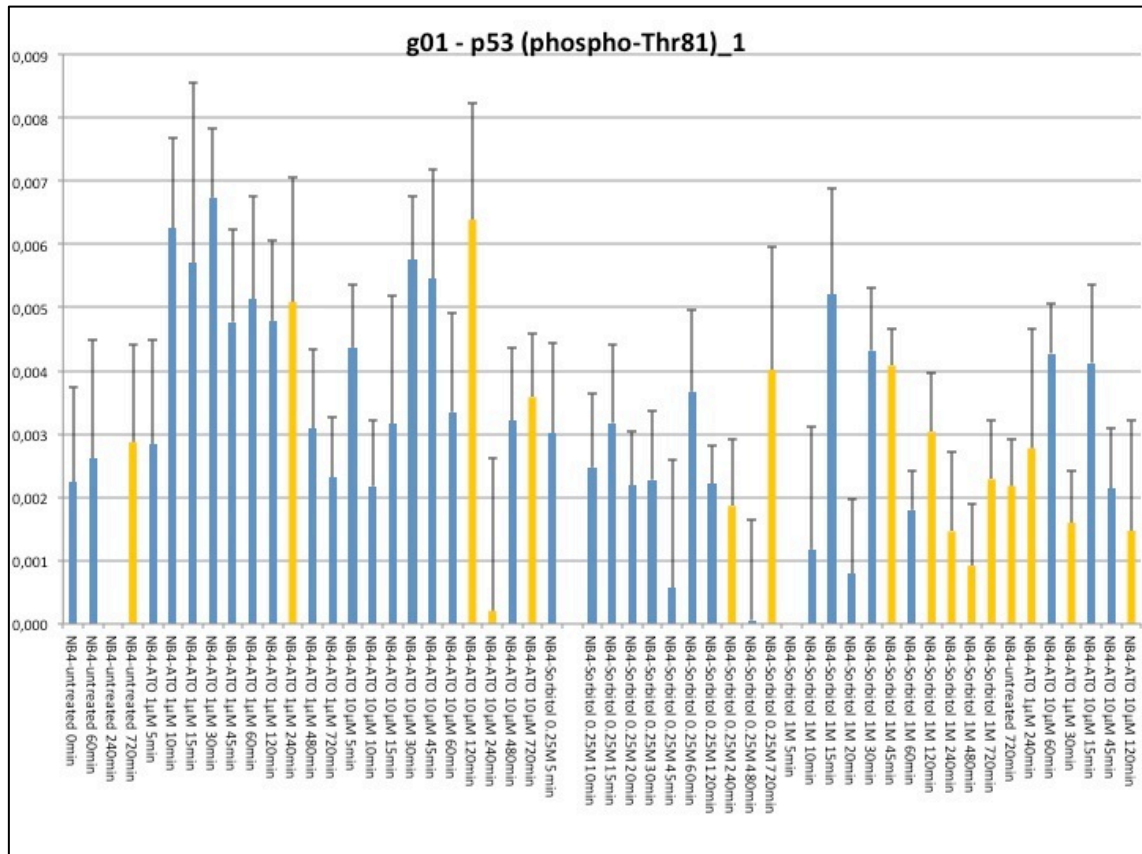


Abbildung 3.14.5 b): Quantifizierung von p53 in NB4 Zellen nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

Die y-Achse repräsentiert phosphoryliertes p53. Auf der x-Achse sind die Zeitreihen der unbehandelten und der mit ATO oder Sorbitol gestressten NB4 Zellen aufgetragen. Die gelb markierten Proben enthielten weniger als 2 mg/ml Protein. Alle anderen hatten eine finale Proteinkonzentration von genau 2 mg/ml.

In HeLa B Zellen führt eine Stressinduktion mit Sorbitol bereits nach 5 min (bei 0,25 M und 1 M gleichermaßen) zu einem Anstieg der MEK1/2-Aktivität, die jedoch transient ist (Abb. 3.14.6 a). In NB4 Zellen führt 1 M Sorbitol erst nach 60 min zu einem signifikanten Anstieg von MEK1/2, der bei längerer Stressinduktion wieder abnimmt (Abb. 3.14.6 b).

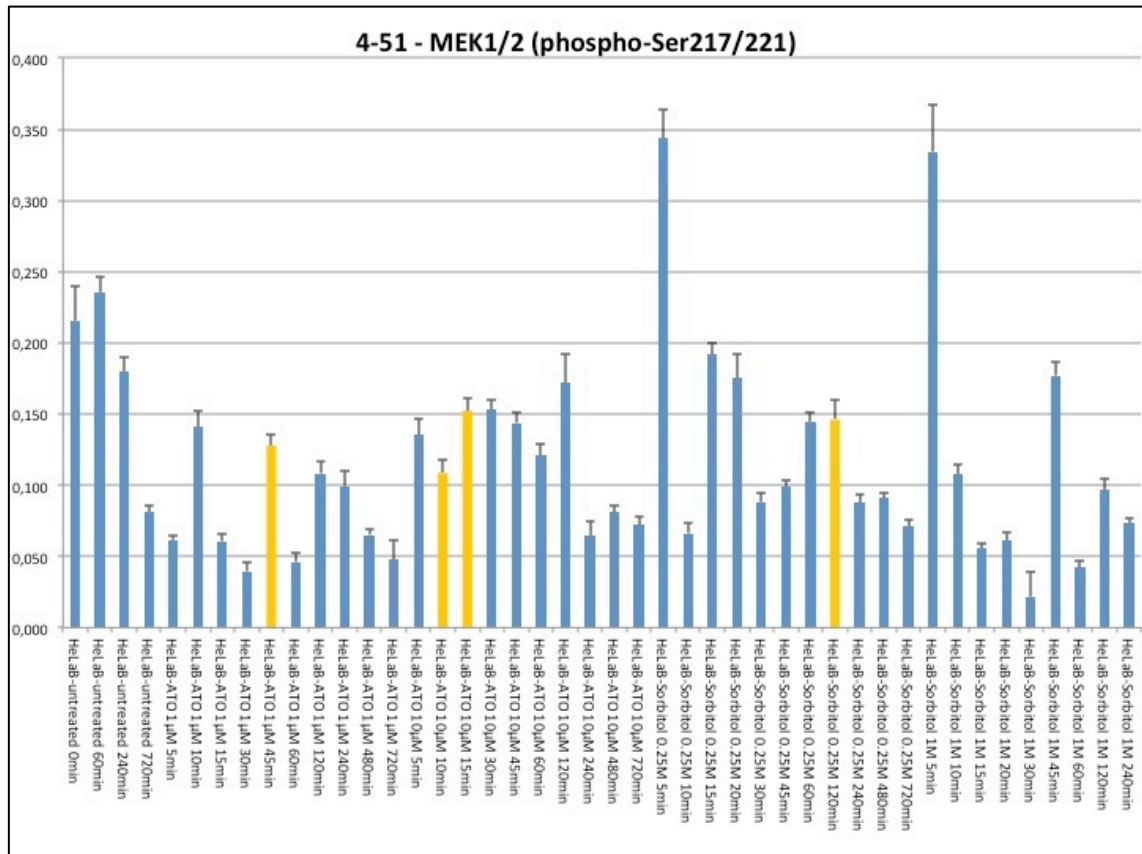


Abbildung 3.14.6 a): Quantifizierung der phosphorylierten MEK1/2 in HeLa B Zellen nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

Die y-Achse repräsentiert phosphorylierte MEK1/2. Auf der x-Achse sind die Zeitreihen der unbehandelten und der mit ATO oder Sorbitol gestressten HeLa B Zellen aufgetragen. Die gelb markierten Proben enthielten weniger als 2 mg/ml Protein. Alle anderen hatten eine finale Proteinkonzentration von genau 2 mg/ml.

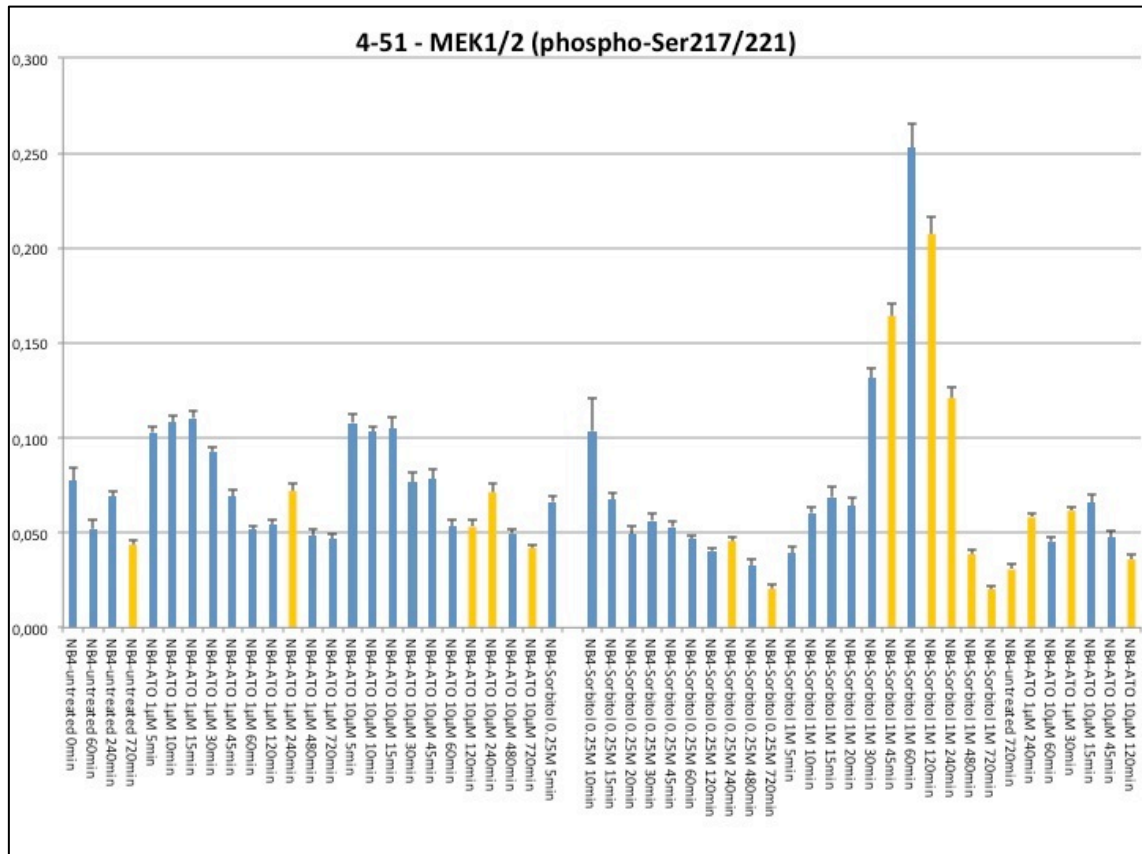


Abbildung 3.14.6 b): Quantifizierung der phosphorylierten MEK1/2 in NB4 Zellen nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

Die y-Achse repräsentiert phosphorylierte MEK1/2. Auf der x-Achse sind die Zeitreihen der unbehandelten und der mit ATO oder Sorbitol gestressten NB4 Zellen aufgetragen. Die gelb markierten Proben enthielten weniger als 2 mg/ml Protein. Alle anderen hatten eine finale Proteinkonzentration von genau 2 mg/ml.

Eine Stressinduktion der HeLaB- oder NB4-Zellen mit ATO führt nicht zur Aktivierung der beiden Kinasen ERK1 und ERK2. Werden die Zellen jedoch mit Sorbitol (0,25 M und 1 M) gestresst, so werden Erk 1/2 bereits nach 5 min aktiviert, die Aktivierung sinkt aber nach 10 min wieder auf das Ausgangsniveau ab (Abb. 3.14.7 a). In NB4 Zellen führt erst die Konzentration von 1 M Sorbitol nach 60 min zu einer signifikanten Erhöhung der Kinaseaktivität von Erk 1/2 (Abb. 3.14.7 b). Dieses Ergebnis korreliert mit dem Ergebnis in Abb. 3.14.6.

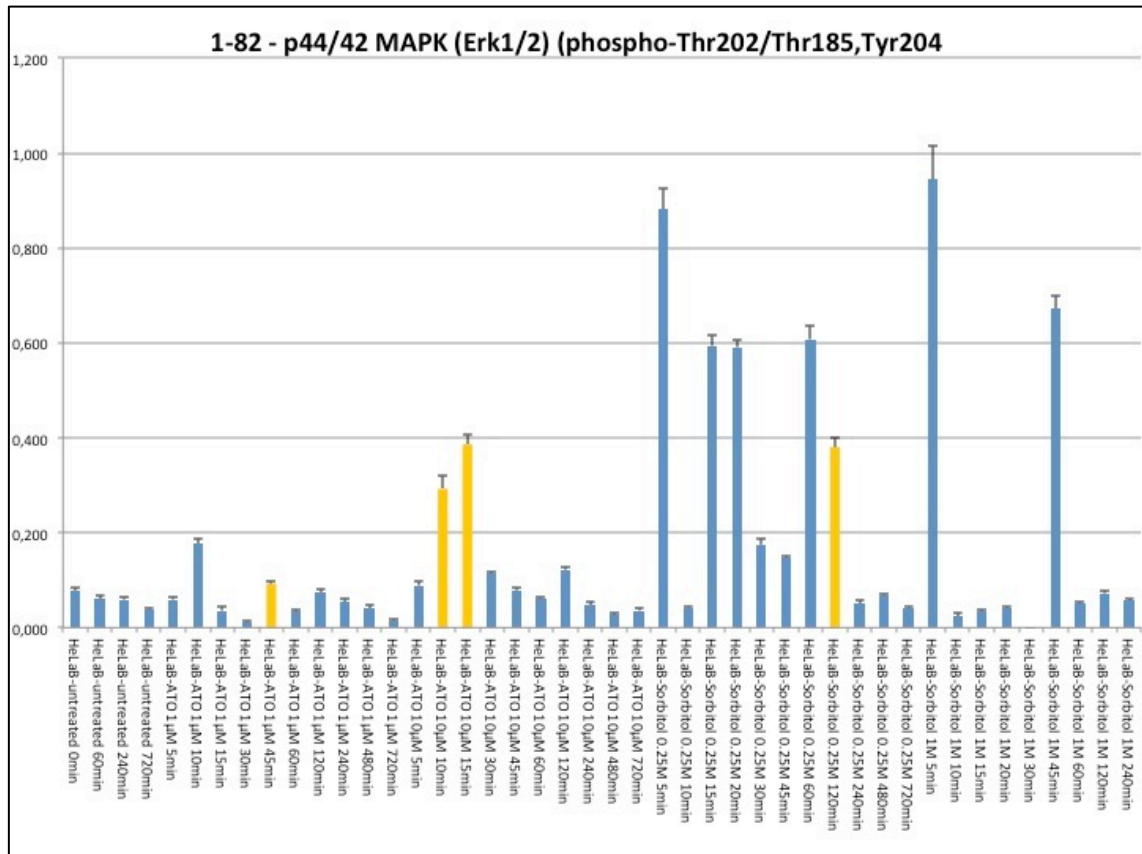


Abbildung 3.14.7 a): Quantifizierung phosphorylierter p44/42 MAPK (ERK1/2) in HeLa B Zellen nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

Die y-Achse repräsentiert phosphorylierte p44/42 MAPK (ERK1/2). Auf der x-Achse sind die Zeitreihen der unbehandelten und der mit ATO oder Sorbitol gestressten HeLa B Zellen aufgetragen. Die gelb markierten Proben enthielten weniger als 2 mg/ml Protein. Alle anderen hatten eine finale Proteinkonzentration von genau 2 mg/ml.

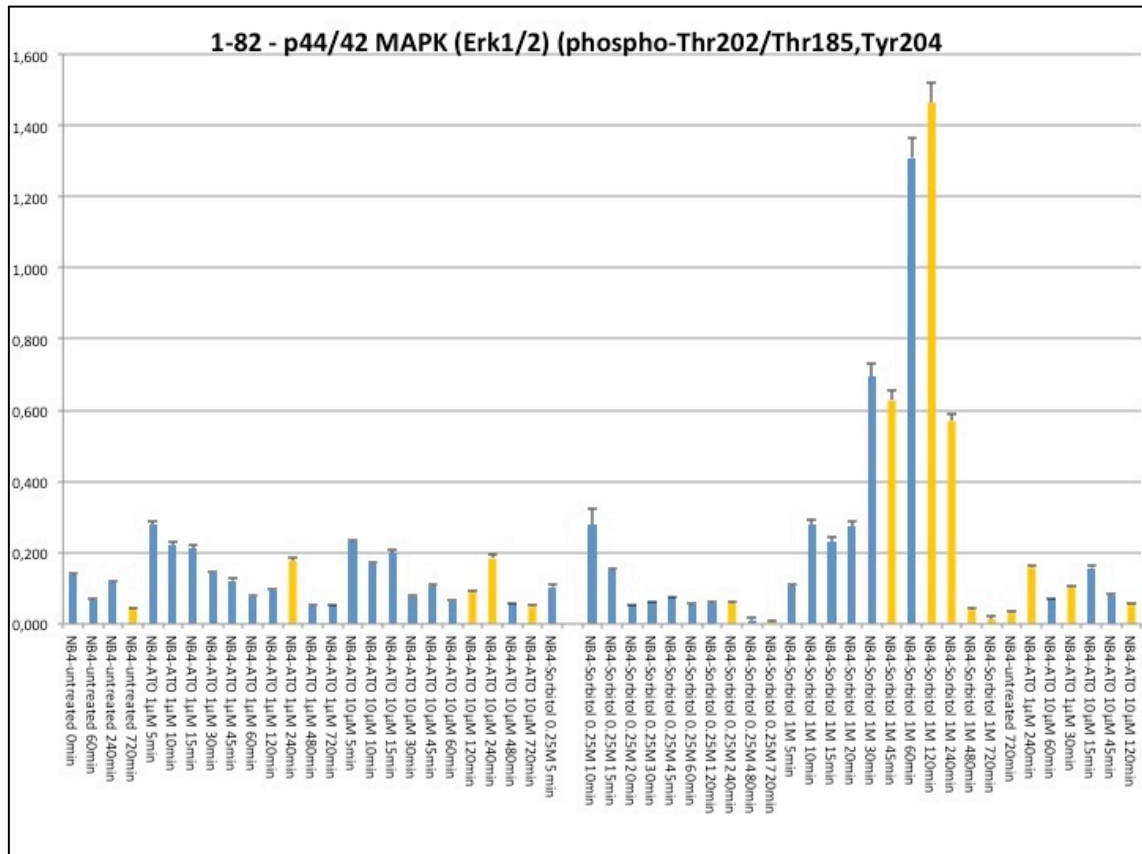


Abbildung 3.14.7 b): Quantifizierung phosphorylierter p44/42 MAPK (ERK1/2) in NB4 Zellen nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

Die y-Achse repräsentiert phosphorylierte p44/42 MAPK (ERK1/2). Auf der x-Achse sind die Zeitreihen der unbehandelten und der mit ATO oder Sorbitol gestressten NB4 Zellen aufgetragen. Die gelb markierten Proben enthielten weniger als 2 mg/ml Protein. Alle anderen hatten eine finale Proteinkonzentration von genau 2 mg/ml.

Eine Aktivierung von RSK2 ist nach ATO-Stressinduktion weder in HeLa B- noch in NB4-Zellen erkennbar. 0,25 M sowie 1 M Sorbitol führen in HeLa B-Zellen zu einer leichten Aktivierung von RSK2 nach 5 min (Abb.: 3.14.8 a). In NB4 Zellen führt 0,25 M Sorbitol nach 10 min und 1 M nach 120 min zu einer wiederum leichten Aktivierung von RSK2 (Abb.: 3.14.8 b).

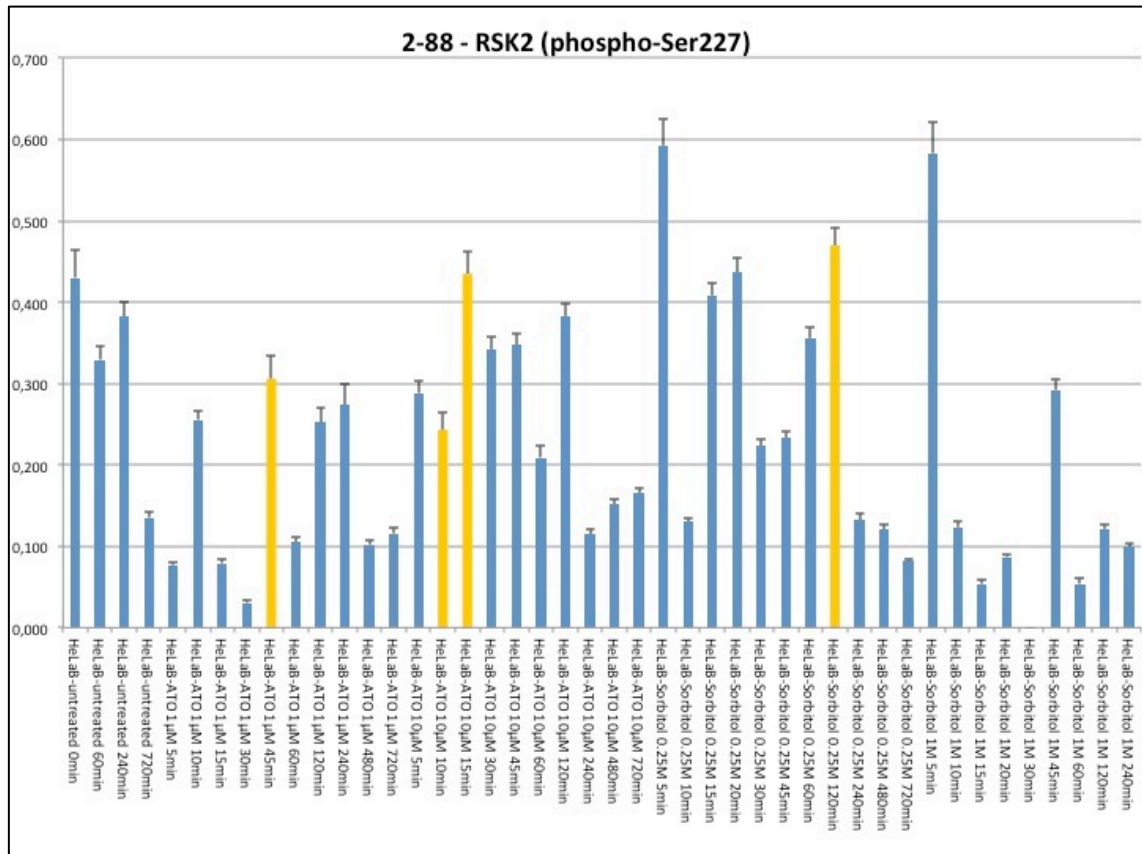


Abbildung 3.14.8 a): Quantifizierung von phosphoryliertem RSK2 in HeLa B Zellen nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

Die y-Achse repräsentiert phosphoryliertes RSK2. Auf der x-Achse sind die Zeitreihen der unbehandelten und der mit ATO oder Sorbitol gestressten HeLa B Zellen aufgetragen. Die gelb markierten Proben enthielten weniger als 2 mg/ml Protein. Alle anderen hatten eine finale Proteinkonzentration von genau 2 mg/ml.

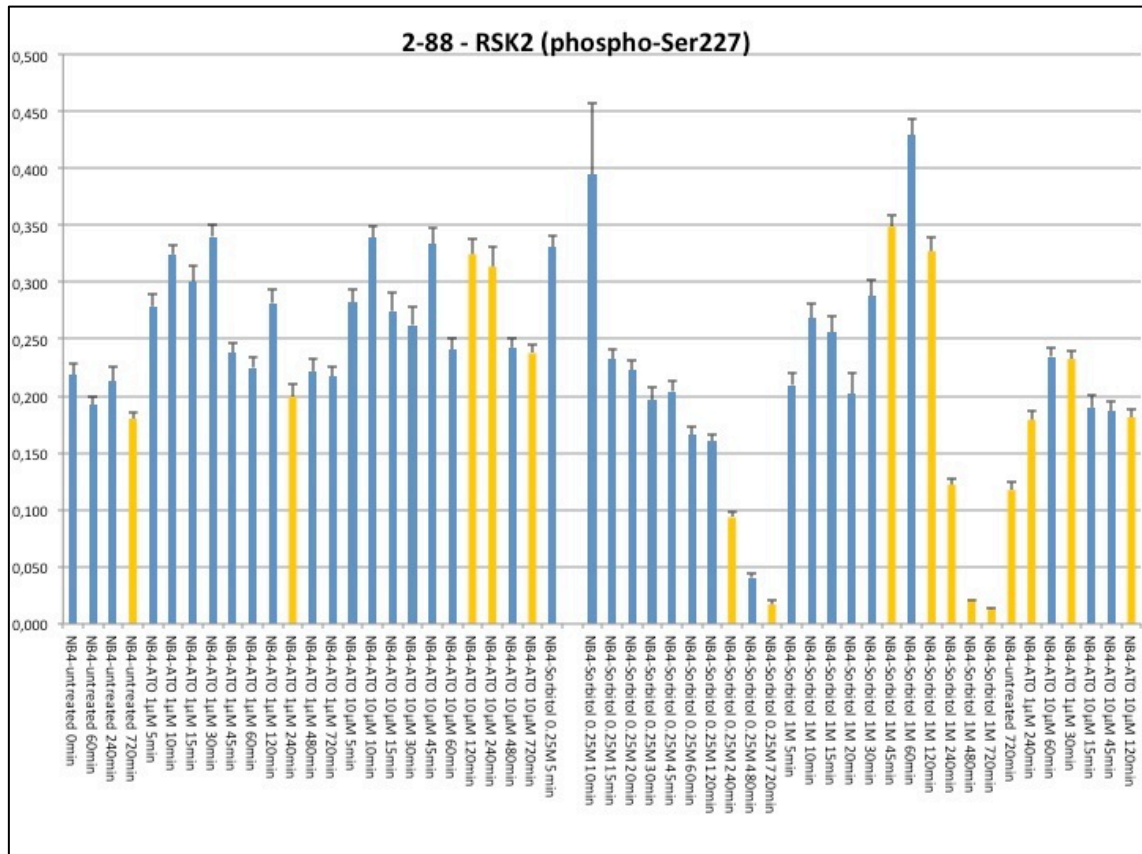


Abbildung 3.14.8 b): Quantifizierung von phosphoryliertem RSK2 in NB4 Zellen nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

Die y-Achse repräsentiert phosphoryliertes RSK2. Auf der x-Achse sind die Zeitreihen der unbehandelten und der mit ATO oder Sorbitol gestressten HeLa B Zellen aufgetragen. Die gelb markierten Proben enthielten weniger als 2 mg/ml Protein. Alle anderen hatten eine finale Proteinkonzentration von genau 2 mg/ml.

Die Abbildung 3.14.9 a) zeigt in unbehandelten, aber auch in ATO gestressten HeLa B Zellen eine gleichbleibende Aktivität von p38 MAPK (p38-mitogenaktivierte Proteinkinase). Nach Stressinduktion mit 1M Sorbitol ist nach 5 min eine leichte Akkumulation der phosphorylierten p38 MAPK zu beobachten.

In NB4 Zellen führt Sorbitol bereits in geringer Konzentration (0,25 M) und nach kürzester Zeit (5 min) zu einer Akkumulation der aktivierten Kinase, die jedoch im weiteren Verlauf wieder abnimmt und nach 240 min das Ausgangsniveau erreicht. Die Stressinduktion mit 1 M Sorbitol führt ebenfalls nach 5 min zu einem ähnlichen, aber langsamer abfallenden Aktivierung von p38. ATO hat keinen Einfluss auf die Aktivierung von p38 MAPK (Abb. 3.14.9 b).

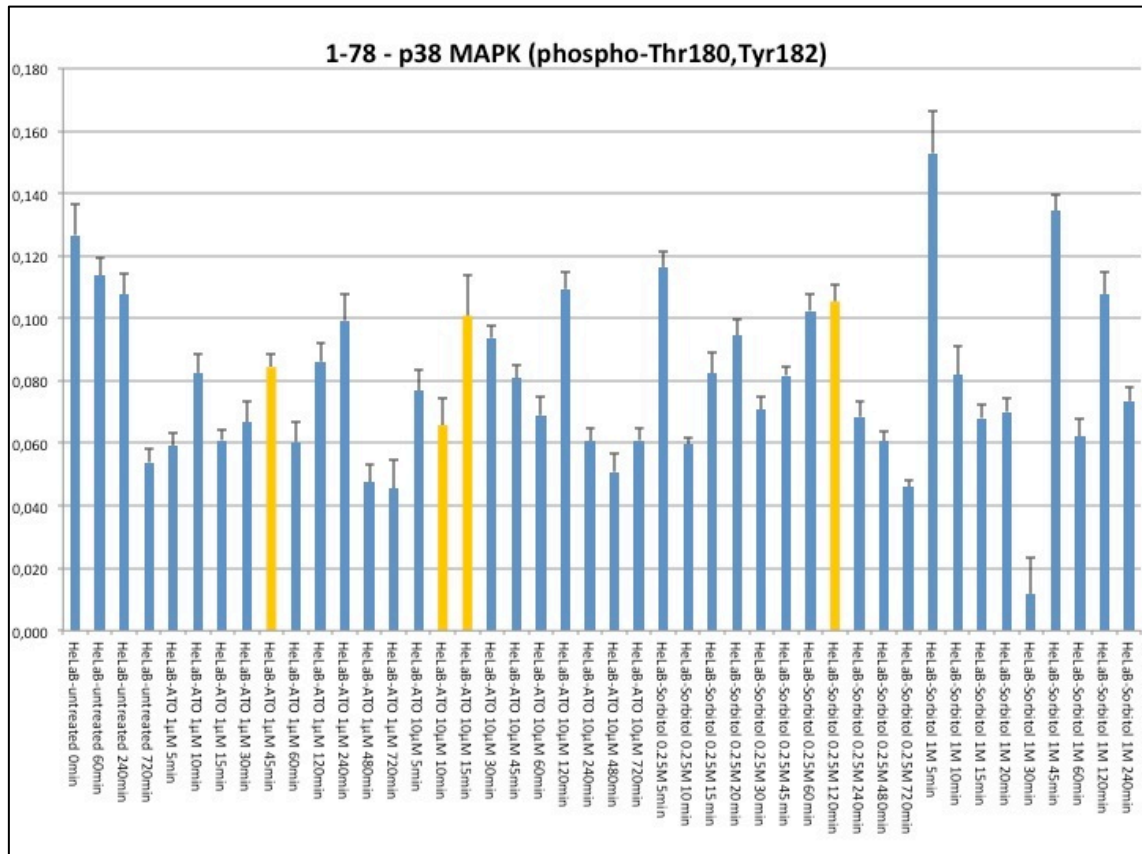


Abbildung 3.14.9 a): Quantifizierung phosphorylierter p38 MAPK in HeLa B Zellen nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

Die y-Achse repräsentiert phosphorylierte p38 MAPK. Auf der x-Achse sind die Zeitreihen der unbehandelten und der mit ATO oder Sorbitol gestressten HeLa B Zellen aufgetragen. Die gelb markierten Proben enthielten weniger als 2 mg/ml Protein. Alle anderen hatten eine finale Proteinkonzentration von genau 2 mg/ml.

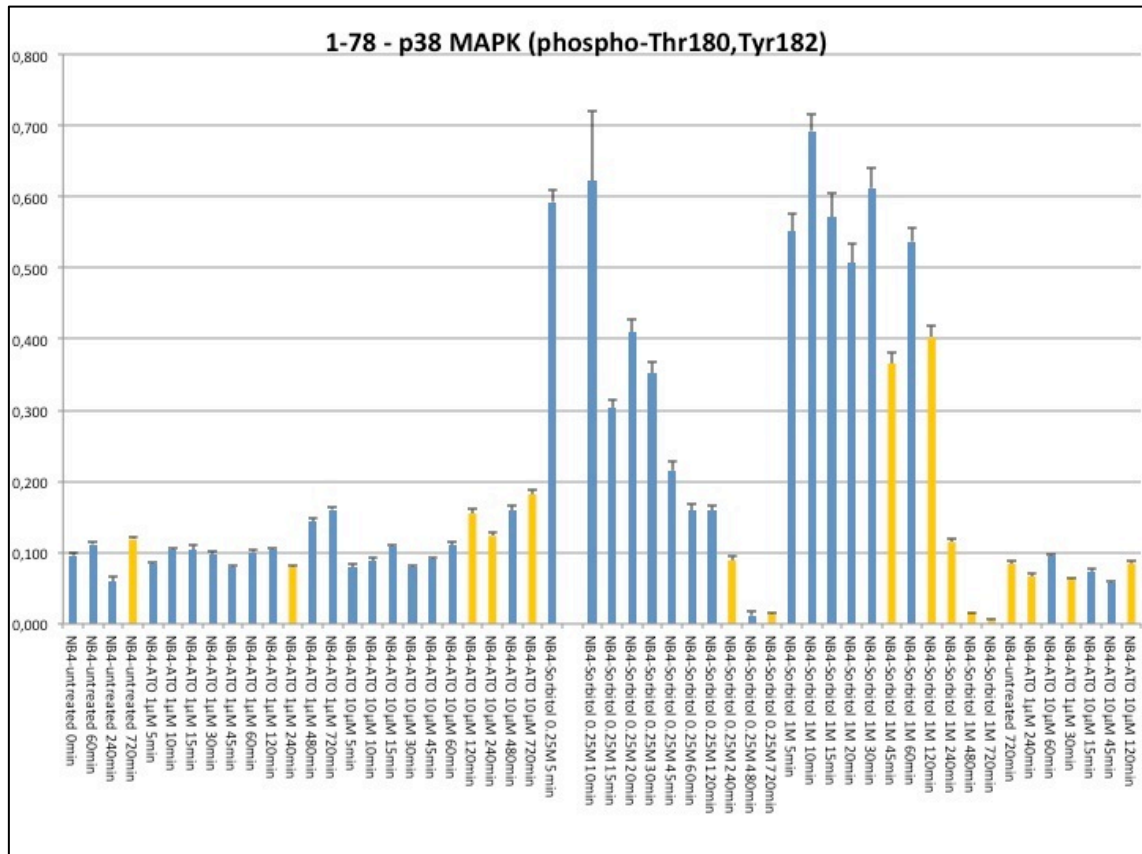


Abbildung 3.14.9 b): Quantifizierung phosphorylierter p38 MAPK in NB4 Zellen nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

Die y-Achse repräsentiert phosphorylierte p38 MAPK. Auf der x-Achse sind die Zeitreihen der unbehandelten und der mit ATO oder Sorbitol gestressten NB4 Zellen aufgetragen. Die gelb markierten Proben enthielten weniger als 2 mg/ml Protein. Alle anderen hatten eine finale Proteinkonzentration von genau 2 mg/ml.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand zunächst darin eine SUMO-abhängige Ubiquitinligase (SUMO-Targeted Ubiquitin Ligases (STUbl)) zu finden, die PML für den Abbau über das 26S-Proteasom kennzeichnet. Die Ubiquitinligase RNF4 bietet sich als Kandidat dafür an, da sie unter anderem in PML-Kernkörpern lokalisiert ist und dort hauptsächlich mit PML III über ihr RING-Motiv interagiert (Häkli *et al.*, 2004). Außerdem bindet RNF4, genau wie die Heterodimere Hex3/Slx8 (*Saccharomyces cerevisiae*) und Rfp/Slx8 (*Schizosaccharomyces pombe*) nichtkovalent über SIMs an SUMO-Konjugate (Perry *et al.*, 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass RNF4 die Defekte der *rfp1rfp2*-, *slx8*-, und *rfp1rfp2slx8*-Mutationen in *Schizosaccharomyces pombe* (Xie *et al.*, 2007; Prudden *et al.*, 2007) sowie die *hex3*- und *slx8*- Mutationen in *Saccharomyces cerevisiae* komplementiert und der Akkumulation hochmolekularer SUMO-Konjugaten entgegen wirkt (Uzunova *et al.*, 2007).

Da die Stressinduktion mit ATO in humanen Fibroblasten (HS27 Zellen) (Abb.: 3.1), in HeLa B Zellen (Abb.: 3.12) sowie in der stabilen SUMO2-Zelllinie (Abb.: 3.3) zu einer Akkumulation von Ubiquitinkonjugaten führte und RNF4 durch seine SIMs in der Lage ist SUMO-Konjugate zu erkennen und an diese zu binden, sollte die stabil exprimierende SUMO2-Zelllinie dazu dienen die SUMO-abhängige Ubiquitinierung unter anderem von PML durch RNF4 nachzuweisen. Außerdem konnten bereits vorangegangene Studien zeigen, dass PML in humanen Zellen SUMO-abhängig abgebaut wird. Eine Behandlung der Zellen mit ATO führt vorzugsweise zur SUMO2/3-Modifizierung von PML (Saitoh *et al.*, 2000; Uzunova *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 1998; Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2001). Zusätzlich zu den stabilen SUMO-Zelllinien (SUMO1-, SUMO2-, SUMO3- und deren Kontrollzelllinie *Empty*-Zelllinie; Weisshaar *et al.*, 2008) wurden im Rahmen dieser Arbeit die stabilen SUMO2/K11R- und SUMO3/K11R-Zelllinien hergestellt (Abb.: 3.2), die ähnlich wie die SUMO1-Zelllinie nicht mehr in der Lage sind SUMO-Ketten am Substrat auszubilden. Mit Hilfe dieser Zelllinien sollte die subnukleäre Lokalisation von RNF4 aufgeklärt werden. Darüber hinaus sollte gezeigt werden, ob RNF4 multiSUMOylierte oder polySUMOylierte Substrate wie PML bindet und abbaut.

Zur weiteren Charakterisierung von RNF4 wurden unterschiedliche SIM-Mutanten hergestellt. Diese sollten den Mechanismus der Substraterkennung von RNF4 aufklären, insbesondere ob mehr als nur ein SIM dafür notwendig ist. Weil die ATO-Stressinduktion zu Unterschieden im STUbL-Signalweg führt, wurden im Rahmen dieser Arbeit die verschiedenen Zelllinien weiteren Stressfaktoren, wie Sorbitol und H_2O_2 , ausgesetzt. Dabei galt es herauszufinden, ob diese ebenfalls zu Veränderungen im SUMOylierungssystem führen und ob sie einen Einfluss auf endogenes PML oder die Morphologie von PML-Kernkörpern haben. Bekannt ist bereits, dass osmotischer Stress zu einer CK2 abhängigen Phosphorylierung von PML und schließlich zu dessen Abbau führt (Scaglioni *et al.*, 2006). In dieser Arbeit offenbarten sich allerdings deutliche Unterschiede zwischen der Stressinduktion mit ATO und Sorbitol. Um die möglichen Ursachen dieser Unterschiede zu identifizieren, wurde die Aktivität mehrerer zellulärer Signalkaskaden mit Hilfe von Proteinmikroarrays in Zusammenarbeit mit Zeptosens quantitativ untersucht.

4.1 Einfluss von Arsentrioxid auf Proteinubiquitinierung

Um zu klären, ob und wann ATO zu einer Akkumulation von Ubiquitinkonjugaten führt, wurde eine Zeitreihe der Stressinduktion mit ATO in primären HS27 Zellen durchgeführt (Abb.: 3.1). Nach 3 h nimmt die Akkumulation von Ubiquitinkonjugaten zu. Dies zeigt, eine Stressinduktion durch ATO in primären Fibroblasten führt zu einer allgemeinen Aktivierung von Ubiquitinierungsprozessen und voraussichtlich auch zum weiteren Abbau über das 26S-Proteasom. Um den Proteinabbau nachweisen zu können, muss man aber zusätzlich das Proteasom mit Hilfe von beispielsweise MG132 inhibieren, da die Ubiquitinierung von Proteinen nicht zwangsläufig zu deren Abbau führt (Windheim *et al.*, 2008 Haglund *et al.*, 2003; Ulrich *et al.*, 2005; Acconcia *et al.*, 2009; Thompson und Hinz, 2009). Daher wurde in den folgenden Experimenten der Einfluss von Stressfaktoren wie ATO oder Sorbitol mit gleichzeitiger Proteasominhibition untersucht.

4.2 Charakterisierung stabiler SUMO-Zelllinien

Um ein geeignetes System für die Analyse von SUMO-abhängigen Prozessen in humanen Zellen zu etablieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit stabile SUMO-Zelllinien hergestellt. Zusätzlich zu den bereits etablierten stabilen SUMO-Zelllinien (SUMO1-, SUMO2-, SUMO3- und *Empty*-Zelllinien) wurden SUMOK11R-Zelllinien (SUMO2K11R- und SUMO3K11R-Zelllinien) hergestellt, die ähnlich wie die SUMO1-Zelllinie aufgrund eines fehlenden Lysins¹¹ nicht in der Lage sind SUMO-Ketten am Substrat auszubilden. Mit Hilfe dieser Zelllinien kann unter anderem gezeigt werden, ob eine MultiSUMOylierung oder PolySUMOylierung von SUMO2 bzw. SUMO3 zum Abbau von beispielsweise PML über den STUbL-Signalweg mit RNF4 führt (siehe Abb.: 3.4 a) und b)). Das in Abbildung 3.2 zusammengefasste Experiment zeigt die positiv getesteten Klone die die entsprechende SUMOK11R-Isoformen nach Induktion mit Doxycyclin stabil exprimieren. In diesen Lysaten sind sowohl freies SUMO, als auch hochmolekulare SUMO-Konjugate nachweisbar.

4.3 Für den Abbau von transfiziertem PML ist eine SUMO2-Überexpression notwendig aber nicht ausreichend

In unbehandelten SUMO2-Zellen ist FLAG-PML zusätzlich zur Bande bei 70 kDa als eine weitere Bande bei ca. 100 kDa und als eine sehr schwache Doppelbande zwischen 130 und 170 kDa nachweisbar (Abb.: 3.3 A). Die Stressinduktion durch ATO führte im Gegensatz zu den anderen Stressfaktoren (H₂O₂ oder Sorbitol) in der stabilen SUMO2-Zelllinie zu einer verstärkten Modifizierung von überexprimiertem PML zwischen 130 und 170 kDa, vermutlich durch SUMO2 (Doppelbande zwischen 130 und 170 kDa). Nach der Westernblotanalyse mit FLAG-PML hatte die Inhibition des Proteasoms keinen Effekt auf überexprimiertes PML nach ATO- oder Sorbitol- Stress. Lediglich die Behandlung der Zellen mit 0,3 M H₂O₂ führte nach 3 h zu einer schwachen Stabilisierung der Doppelbande zwischen 130 und 170 kDa, die durch MG132 verstärkt werden konnte (Abb.: 3.3 A). Die Abbildung 3.3 B zeigt dagegen eine Akkumulation von Ubiquitinkonjugaten nach ATO-Stress und gleichzeitiger Proteasominhibition. Dabei fällt auf, dass auch hier die Doppelbande zwischen

130 und 170 kDa stabilisiert werden konnte. Überexprimierte PML-Konjugate zwischen 130 und 170 kDa sind also vermutlich nicht nur SUMO2-modifiziert, sondern auch ubiquitiniert. Dies ist ein Hinweis darauf, dass nach ATO-Stressinduktion in der stabilen SUMO2-Zelllinie überexprimiertes FLAG-PML verstärkt mit SUMO2 modifiziert wird. Die SUMO2-Modifikation führt dann zur Ubiquitinierung der SUMO-Konjugaten und aufgrund des Effektes der Proteasominhibition mit MG132 schließlich zu deren Abbau über das 26S-Proteasom (Weisshaar et al., 2008; Uzunova et al., 2007).

Mit Hilfe der stabilen SUMO1- und SUMO2K11R-Zelllinien sollte ebenfalls die Wirkung von ATO auf die Modifikation von transfiziertem PML untersucht werden (Abb.: 3.4 a) und 3.4 b)). Die Westernblotanalysen gegen FLAG-PML in den Abbildungen 3.4 a) und 3.4 b) zeigten ausschließlich in der stabilen SUMO2-Zelllinie eine Akkumulation von überexprimiertem PML über 72 kDa. Sowohl in der *Empty*-Kontrollzelllinie als auch in der SUMO1- und in der SUMO2K11R-Zelllinie war FLAG-PML oberhalb der charakteristischen Bande bei 72 kDa kaum nachweisbar. PML wird demnach vermutlich verstärkt mit SUMO2 posttranslational modifiziert. Zudem zeigte das Experiment 3.4 a) ähnlich wie die Abbildung 3.3 eine noch stärkere Modifikation von FLAG-PML nach ATO-Stressinduktion, vor allem zwischen 130 und 170 kDa, die unabhängig von der Inhibition des Proteasoms durch MG132 ist. Demnach führt die Modifikation von PML mit SUMO2 noch nicht zu dessen Abbau.

Aus diesem Grund wurden weitere Zellexperimente durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob die humane Ubiquitinligase RNF4 einen Effekt auf die Stabilität von PML unter ATO-Stress in der stabilen SUMO2-Zelllinie hat.

4.4 RNF4 und UbcH5b sind gemeinsam am Abbau von überexprimiertem PML beteiligt

Aufgrund der Tatsache, dass die ATO-Stressinduktion in der SUMO2-Zelllinie eine verstärkte Modifikation von transfiziertem PML zwischen 130 und 170 kDa hervorruft, bei der es sich vermutlich um SUMO2/3 modifiziertes PML handelt (Abb.: 3.3), sollte schließlich gezeigt werden dass die humane Ubiquitinligase RNF4 den Abbau von überexprimiertem PML initiiert. Demnach wurden Experimente durchgeführt, in denen die SUMO2-Zelllinie sowohl mit FLAG-PML

als auch mit Myc-RNF4 kotransfiziert wurde. Anschließend wurden die Zellen mit ATO gestresst und das Proteasom mit MG132 inhibiert (Daten nicht gezeigt). Eine Veränderung oder gar ein Abbau von überexprimiertem PML konnte nicht nachgewiesen werden.

Schließlich wurde ein Experiment durchgeführt, in dem die stabile SUMO2-Zelllinie zusätzlich zu FLAG-PML und Myc-RNF4 mit dem ubiquitinkonjugierenden Enzym Ubch5b kotransfiziert wurde. Mit dem Ergebnis, dass Ubch5b gemeinsam mit RNF4 in der Lage ist überexprimiertes PML vollständig abzubauen. Das bedeutet unter Bedingungen einer SUMO2- und PML-Überexpression ist RNF4 limitierend. Durch die zusätzliche RNF4-Überexpression wird dann Ubch5b limitierend. Erst die Koexpression von Ubch5b und RNF4 führen schließlich zum vollständigen Abbau von wiederum überexprimiertem PML in der SUMO2-Zelllinie, der nicht durch die Inhibition des Proteasoms verhindert werden kann. Eine Überexpression von RNF4 bewirkt ohne Ubch5b nur einen leichten Abbau von FLAG-PML vor allem um 130 kDa. Die Stressinduktion durch ATO hatte in diesem überexprimierenden System kaum Auswirkungen auf den Abbau von PML. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass endogenes PML sowie PML-Kernkörper durch eine ATO-Stressinduktion und RNF4-Überexpression abgebaut werden (Abb.: 3.6; 3.10; 3.3.11) (Weisshaar *et al.*, 2008; Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2008; Tatham *et al.*, 2008; Maroui *et al.*, 2012). Also folgten Immunfluoreszenzversuche, die den Einfluss von ATO und RNF4 auf die Morphologie von PML-Kernkörpern verdeutlichen sollten.

4.5 RNF4 führt gemeinsam mit ATO zum Zerfall von PML-Kernkörpern

Da RNF4 den Abbau von überexprimiertem PML in der SUMO2-Zelllinie vermittelt, sollte nun untersucht werden ob dieser Abbau von PML Auswirkungen auf die Morphologie von PML-Kernkörpern hat (Abb.: 3.6). Das Ergebnis war eindeutig. Nach der Überexpression von SUMO2 sowie PML und RNF4 blieben PML-Kernkörper weiterhin nachweisbar. Ein vollständiger Zerfall von PML-Kernkörpern *in vivo* konnte erst nach zusätzlicher Stressinduktion durch ATO gezeigt werden. Dieser Effekt wurde nicht erzielt wenn zusätzlich zum ATO-Stress das Proteasom inhibiert wurde (Abb.: 3.6). Demnach führen

ATO und RNF4 gemeinsam zum Zerfall von PML-Kernkörpern. Da die Inhibition des Proteasoms diesen Effekt verhindert, beruht der Zerfall der PML-Kernkörper auf dem Abbau von FLAG-PML zwischen 130 und 170 kDa durch das 26S-Proteasom (Doppelbande zwischen 130 und 170 kDa; Abb.: 3.3; 3.4; 3.5). ATO führt demnach zunächst zur verstärkten SUMO2/3-Modifikation von FLAG-PML zwischen 130 und 170 kDa. PolySUMOyliertes FLAG-PML wird dann von RNF4 erkannt, ubiquitiniert und schließlich über das 26S-Proteasom abgebaut (Weisshaar et al., 2008; Tatham et al., 2008; Lallemand-Breitenbach et al., 2008).

In Abbildung 3.5 war RNF4 ohne Ubch5b nicht in der Lage überexprimiertes PML vollständig abzubauen. Nach der alleinigen Transfektion von RNF4 konnte jedoch ein leichter Rückgang von überexprimiertem PML vor allem um 130 kDa beobachtet werden. Ein ähnliches Bandenmuster ist in den ATO gestressten Zellen und gleichzeitiger RNF4-Überexpression erkennbar. Diese Beobachtung verifiziert die Vermutung, dass FLAG-PML zwischen 130 und 170 kDa SUMO2 modifiziertes PML repräsentiert, das von RNF4 erkannt und ubiquitiniert wird.

4.6 RNF4 benötigt seine zwei essentiellen SIMs (SIM2 und SIM4) um endogenes PML abzubauen

Zur weiteren Charakterisierung von RNF4 wurde der Einfluss der Überexpression von RNF4-SIM-Mutanten auf die Morphologie von PML-Kernkörpern in HeLa B Zellen untersucht. Diese sollten den Mechanismus der Substraterkennung von RNF4 klären, insbesondere welche seiner vier potentiellen SIMs notwendig sind um ein Substrat wie PML zu binden und abzubauen. Demnach wurden vier unterschiedliche SIM-Einzelmutanten (SIM1-, SIM2-, SIM3-, SIM4-Mutanten) und eine SIM-Doppelmutante (SIM 2/3-Mutante) von RNF4 in HeLa B Zellen überexprimiert. Wurden der RNF4-WT oder die RNF4-SIM1- bzw. die -SIM3-Mutante überexprimiert, so waren kaum noch PML-Kernkörper nachweisbar. Mutiert man aber SIM2, SIM2/3 oder SIM4, so ließen sich noch viele endogene PML-Kernkörper nachweisen. Demnach sind SIM2 und SIM4 essentiell für die Interaktion von RNF4 mit PML. Die SIM2-, SIM2/3 und SIM4-Mutanten sind nicht mehr in der Lage PML-Kernkörper zu spalten oder abzubauen (Abb.: 3.7). Im Gegensatz zum vorherigen Experiment

wurde hier der Zerfall endogener PML-Kernkörper in HeLa B Zellen untersucht. Daher war es möglich auch ohne zusätzliche Stressinduktion mit ATO den Zerfall der PML-Kernkörper zu beobachten.

Dieses Experiment zeigte, dass SIM2 und SIM4 die beiden essentiellen SIMs in RNF4 sind. Es gibt aber bereits *in vitro* Interaktionsstudien die belegen, dass die beiden SIMs, SIM2 und SIM3 essentiell für die Interaktion von RNF4 mit SUMO sind. Diese beiden SIMs in RNF4 sind notwendig für die Bindung einer SUMO-Kette mit zwei SUMOs (*DI-SUMO*). SIM4 erkennt dagegen längere Ketten von mindestens vier SUMOs (Keusekotten *et al.*, noch nicht veröffentlicht). In der lebenden Zelle ist der Mechanismus von RNF4 vielleicht vielseitiger, weswegen sich die Daten eventuell unterscheiden. Eine Stressinduktion mit beispielsweise ATO führt zu einer Akkumulation von SUMO2-modifiziertem PML. Danach kann PML mit langen und kurzen SUMO-Ketten modifiziert sein und deswegen bindet RNF4 vielleicht einmal über seine beiden SIMs, SIM2 und SIM3, und ein anderes Mal über SIM2 und SIM4 ans SUMOylierte Substrat. Darüber hinaus ist bekannt, dass eine RNF4-RING-Dimerisierung für dessen Funktion notwendig ist (Liew *et al.*, 2010; Plechanovova *et al.*, 2011). Es kann sein, dass die Homodimerisierung von RNF4 ebenfalls Auswirkungen auf die Interaktion seiner SIMs mit unterschiedlich polySUMO-Ketten hat.

4.7 ATO induziert im Gegensatz zu Sorbitol den Abbau von endogenem PML und schließlich den Zerfall von PML-Kernkörpern

Da ATO zur SUMO2-Modifikation von PML führt (Abb.: 3.3 und 3.4) und gemeinsam mit RNF4 am Abbau von endogenen PML-Kernkörpern beteiligt ist (Abb.: 3.6), sollte schließlich untersucht werden, ob andere Stressfaktoren wie osmotischer Stress durch Sorbitol einen ähnlichen Effekt auf die Morphologie von PML-Kernkörpern hat. In der SUMO2-Zelllinie führt ATO zur Stabilisierung der Doppelbande von FLAG-PML zwischen 130 und 170 kDa, die nach Sorbitolstress nicht erkennbar ist (Abb.: 3.3). Außerdem ist nach osmotischem Stress, unabhängig von der Inhibition des Proteasoms, keine Stabilisierung von Ubiquitinkonjugaten zwischen 130 und 170 kDa nachweisbar (Abb.: 3.3). Das bedeutet, PML wird zwischen 130 und 170 kDa, anders als beim ATO-Stress,

nach der Stressinduktion mit Sorbitol vermutlich nicht SUMO2-modifiziert und demnach auch nicht ubiquitiniert und abgebaut.

In unbehandelten HS27 Zellen sind nach der Quantifizierung von PML-Kernkörpern im Durchschnitt 14 PML-Kernkörper detektierbar. Zellen, die mit 1 M Sorbitol gestresst wurden, beinhalten rund 20 und ATO gestresste Zellen etwa 12 PML-Kernkörper (Abb.: 3.8.2). Außerdem sind die PML-Kernkörper in den osmotisch gestressten Zellen größer und kolokalisieren hauptsächlich mit SUMO1. In den ATO gestressten Zellen sind die PML-Kernkörper klein und kolokalisieren hauptsächlich mit SUMO2 (Abb.: 3.8.1). Auch wenn Kolokalisationsstudien nichts über die Modifikation von PML mit SUMO1 oder SUMO2 aussagen, so scheint der osmotische Stress durch Sorbitol im Gegensatz zu ATO weder zum Abbau von überexprimiertem PML noch von endogenen PML-Kernkörpern über den STUbL-Signalweg zu führen (Abb.: 3.3). Bekannt ist, dass der osmotische Stress die konstitutiv aktive Casein-Kinase 2 hochreguliert und zur Phosphorylierung und schließlich zur SUMO1-Modifizierung von Daxx führt (Chang *et al.*, 2011). Es ist also möglich, dass PML nach osmotischem Stress bevorzugt mit SUMO1 modifiziert und deswegen nicht über den STUbL-Signalweg mit RNF4 abgebaut wird. SUMO1 führt zwar zur Assoziation von RNF4 mit PML-Kernkörpern, aber wahrscheinlich nicht zu deren Abbau (Häkli *et al.*, 2004; Tatham *et al.*, 2008; Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2008; Percherancier *et al.*, 2009; Maroui *et al.*, 2012; Matera *et al.*, 2010).

ATO und Sorbitol haben unterschiedliche oder sogar gegensätzliche Auswirkungen auf die Morphologie von PML-Kernkörpern (Abb.: 3.8). Aus diesem Grund wurde der Einfluss beider Stressfaktoren, ATO und Sorbitol, auf die Stabilität und Modifikation von endogenem PML in HS27- und HeLa B-Zellen analysiert. Die Analyse der Zellysate beider Zelllinien nach ATO-Stressinduktion zeigte eindeutig einen Rückgang der Banden bei 130 kDa und zwischen 130 und 170 kDa, die wiederum durch die Inhibition des Proteasoms stabilisiert werden konnten (Abb.: 3.9). Demnach wird auch endogenes PML ATO-abhängig abgebaut (Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2008; Tatham *et al.*, 2008; Matera *et al.*, 2010).

Eine Stressinduktion mit Sorbitol hat dagegen eine Stabilisierung der Bande bei 130 kDa zufolge. Zwischen 130 und 170 kDa sind keine Banden erkennbar,

dafür akkumulieren PML-Konjugate im hochmolekularen Bereich weit über 170 kDa. Diese Zellen zeigen keinen Effekt auf eine zusätzliche Behandlung mit MG132. Demnach führt der osmotische Stress durch Sorbitol nicht zum Abbau von endogenem PML über das 26S-Proteasom. Da sich das Bandenmuster von endogenem PML nach Sorbitolstress von dem der unbehandelten und ATO gestressten Zelllysaten unterscheidet, scheint PML nach osmotischem Stress anders modifiziert zu werden (Abb.: 3.8.1; 3.12; 3.13.1; 3.13.2). Es wird vermutlich weniger SUMO2/3 modifiziert, sondern eher SUMO1 modifiziert. Durch die Akkumulation der hochmolekularen PML-Konjugaten könnte PML auch gemischte SUMO-Ketten tragen (Matic *et al.*, 2008).

Da RNF4 am Abbau von sowohl überexprimiertem PML (Abb.: 3.5) als auch endogenem PML, sowie am Zerfall von PML-Kernkörpern (Abb.: 3.6; 3.7) beteiligt ist, sollte der Einfluss von RNF4 auf PML in ATO gestressten Zellen, nun mit dem in Sorbitol gestressten Zellen verglichen werden.

4.8 Einfluss von RNF4 auf endogenes PML unter verschiedenen Stressbedingungen

Nachdem in Abbildung 3.5, 3.6 und 3.7 bereits gezeigt werden konnte, dass RNF4 mit Hilfe seiner beiden essentiellen SIMs (SIM2 und SIM4) in der Lage ist PML abzubauen und PML-Kernkörper zu spalten, sollte nun der Einfluss von überexprimiertem RNF4 auf endogenes PML-Protein nach Sorbitolstress mit ATO verglichen werden (Abb.: 3.10). Erkennbar ist, dass die Überexpression von RNF4 bereits ohne Stressinduktion mit ATO zu einem Abbau von endogenem PML führte (alle Banden werden schwächer) (Weisshaar *et al.*, 2008; Tatham *et al.*, 2008; Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2008). Dieser Effekt korreliert mit dem Ergebnis nach der Koexpression von RNF4 und UbcH5b. Dort führte die Überexpression von RNF4 zu einer leichten Abnahme von FLAG-PML um 130 kDa, auch ohne Mitwirkung von ATO (Abb.: 3.5).

Eine Stressinduktion mit ATO führte wie erwartet zum Verschwinden der Banden bei 130 und zwischen 130 und 170 kDa, die durch MG132 wieder stabilisiert werden konnten. Die Überexpression von RNF4 hatte in diesen Zellen keinen zusätzlichen Effekt auf endogenes PML. Das bedeutet ATO führt zwar gemeinsam mit RNF4 zum Zerfall von PML-Kernkörpern (Abb.: 3.6), nicht

aber zum vollständigen Abbau von endogenem PML-Protein. Da nicht nur SUMOyliertes PML, sondern auch RNF4 durch den Einfluss von ATO in PML-Kernkörper rekrutiert wird (Geoffroy *et al.*, 2010), kann es sein, dass RNF4 nach Stressinduktion mit ATO hauptsächlich mit polySUMOyliertem PML interagiert und außerhalb der PML-Kernkörper nicht nachweisbar ist. Ein Großteil des PML-Proteins ist nämlich nicht in PML-Kernkörpern, sondern diffus im Zellkern verteilt (Weidtkamp-Peters *et al.*, 2008).

Der Sorbitolstress führte unabhängig von der RNF4-Überexpression zur Akkumulation endogener PML-Konjugaten zwischen 95 und 170 kDa, sowie hochmolekularer Konjugaten über 170 kDa. Demnach führt der osmotische Stress durch Sorbitol unabhängig von der Inhibition des Proteasoms, sowie der Überexpression von RNF4 im Gegensatz zu ATO zur Akkumulation von endogenem PML. Außerdem lässt die Westernblotanalyse mit HA-RNF4 vermuten, dass Sorbitol zum Abbau von überexprimiertem RNF4 führt, der nicht durch MG132 verhindert werden kann. Das bedeutet, selbst wenn PML nach osmotischem Stress SUMO2/3 modifiziert wird, so führt RNF4 aufgrund seines Abbaus nicht zu dessen Ubiquitinierung und folglich auch nicht zu dessen Abbau.

Analog zu den HS27 Zellen, die mit RNF4 transient transfiziert wurden (Abb.: 3.10), wurden schließlich auch HeLa B Zellen mit RNF4 transfiziert. Verglichen mit den untransfizierten HeLa B Zellen in Abbildung 3.9 ändert eine RNF4-Überexpression jedoch nicht das charakteristische Bandenmuster von endogenem PML in unbehandelten sowie in ATO oder Sorbitol gestressten HeLa B Zellen, mit und ohne Proteasominhibition durch MG132. Nach ATO-Stress verschwanden die Banden bei 130 und zwischen 130 und 170 kDa, die wiederum durch MG132 stabilisiert werden konnten (Abb.: 3.11). Folglich hat RNF4 hier keinen zusätzlichen Effekt auf den Abbau von endogenem PML. Dennoch führten RNF4 und ATO gemeinsam zum Abbau von PML-Kernkörpern (Abb.: 3.6). Allerdings wurden in Abbildung 3.6 SUMO2 überexprimierende Zellen mit FLAG-PML kotransfiziert. In diesem System scheint endogenes RNF4 limitierend zu sein und deshalb musste dort zusätzlich zum ATO-Stress RNF4 überexprimiert werden. Bei der Analyse von endogenem PML scheint endogenes RNF4 nicht limitierend für dessen Abbau nach ATO-Stress zu sein.

Der Sorbitolstress führte zur Akkumulation von PML-Konjugaten bei 130 kDa und im hochmolekularen Bereich weit über 170 kDa. Die Inhibition des Proteasoms durch MG132 hatte in den Sorbitol gestressten Zellen auf endogenes PML keinen Effekt. Allerdings zeigte das Experiment in Abbildung 3.11 genau wie das Experiment in Abbildung 3.10 einen Abbau von überexprimiertem RNF4 nach Behandlung der Zellen mit Sorbitol, der nicht durch MG132 verhindert werden konnte. Daher können die hochmolekularen PML-Agglomerate, egal ob sie SUMO2- oder SUMO1-modifiziert sind oder sogar gemischte Ketten tragen, nicht über den STUbL-Signalweg durch RNF4 abgebaut werden, weil diese selbst abgebaut wird. Um zeigen zu können, dass Sorbitolstress verglichen mit ATO vielleicht zu einer Akkumulation von SUMO1- und weniger von SUMO2-Konjugaten führt, wurden im folgenden Experiment neben endogenem PML auch SUMO1 und SUMO2 in den gestressten HeLa B Zelllysaten analysiert.

4.9 Analyse der Modifikation von endogenem PML nach verschiedenen Stressbedingungen

In den Experimenten 3.12 und 3.13.2 wurden HeLa B Zellen, ähnlich wie in den vorangegangenen Experimenten, mit ATO oder Sorbitol gestresst. Neben endogenem PML wurde endogenes SUMO2, SUMO1 und Ubiquitin analysiert. Die Westernblotanalyse von endogenem PML zeigte ein Verschwinden der Bande bei 130 kDa nach ATO-Stress und deren Stabilisierung durch 0,25 M sowie 1 M Sorbitol (Abb.: 3.12). Auffällig ist vor allem die Akkumulation von SUMO2-Konjugaten nach ATO-Stress (Abb.: 3.12 und 3.13.2). Dies korreliert mit den Erkenntnissen aus Abbildung 3.4 a). Dort konnte nur in der stabilen SUMO2-Zelllinie modifiziertes FLAG-PML vor allem nach der Behandlung der Zellen mit ATO nachgewiesen werden. Darüber hinaus waren in den ATO gestressten Zelllysaten mehr Ubiquitinkonjugate als in den Sorbitol gestressten Zellen nachweisbar (Abb.: 3.12 und 3.13.2). Dies und die Tatsache, dass der Effekt von ATO durch MG132 beeinflusst wird (Abb.: 3.11, 3.10, 3.9) bestärkt die Annahme, dass ATO zum proteasomalen Abbau von endogenem PML führt (Weisshaar *et al.*, 2008; Tatham *et al.*, 2008; Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2008). In Sorbitol gestressten Zellen konnten dagegen SUMO1-Konjugate

angereichert werden (Abb.: 3.12 und 3.13.2). Diese Erkenntnisse bestärken schließlich die Vermutung aus Abbildung 3.8.1, nach denen ATO nicht nur zur vollständigen Kollokalisierung von SUMO2 und PML-Kernkörpern, sondern auch zu dessen Modifikation mit SUMO2 führt (Maroui *et al.*, 2012). Sorbitol könnte dagegen aufgrund der Stabilisierung von SUMO1-Konjugaten (Abb.: 3.12 und 3.13.1) und der Akkumulation von SUMO1 in PML-Kernkörpern (Abb.: 3.8.1) die SUMO1-Modifikation von endogenem PML initiieren. Die Modifikation von PML mit SUMO1 oder mit gemischten SUMO-Ketten könnte schließlich zur Stabilisierung von sowohl PML als auch PML-Kernkörpern führen (Matic *et al.*, 2008; Palvomo *et al.*, 2001).

Um die posttranslationale Modifikation von endogenem PML mit SUMO1 oder SUMO2 nach den unterschiedlichen Stressinduktionen zu verifizieren, wurde eine Immunpräzipitation (IP) von endogenem PML durchgeführt. Das in Abbildung 3.13.1 zusammengefasste Ergebnis zeigt auch nach der IP ein Verschwinden von endogenem PML bei 130 kDa durch Stressinduktion mit ATO. Diese Bande konnte durch MG132 wieder stabilisiert werden. Eine Stabilisierung von SUMO2 und Ubiquitin modifizierten PML-Konjugaten konnte mit Hilfe von MG132 sowohl in ungestressten Zellen, als auch verstärkt in ATO gestressten Zellen nachgewiesen werden. Somit führt ATO zunächst zur SUMO2-Modifikation von endogenem PML bei 130 kDa. SUMO2 modifiziertes PML wird dann von einem STUbL wie RNF4 erkannt, ubiquitiniert und schließlich proteasomal abgebaut.

Die Stressinduktion mit Sorbitol zeigt, wie auch schon die vorangegangenen Experimente mit ungereinigten Zelllysaten (Abb.: 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13.2), vor allem eine Stabilisierung von endogenem PML bei 130 kDa. Nach der Stressinduktion mit 1 M Sorbitol werden die hochmolekularen Konjugate über 170 kDa anders als nach 0,25 M Sorbitolstress durch die Inhibition des Proteasoms stabilisiert. Diese hochmolekulare PML-Akkumulation repräsentiert demnach vermutlich unter anderem SUMO2/3 modifiziertes PML. Die im Vergleich zu den ATO gestressten Zellen geringe, und vor allem von der Inhibition des Proteasoms unabhängige Ubiquitinierung von PML, ist eine mögliche Erklärung für die Stabilisierung von PML bei 130 kDa sein.

Darüber hinaus ist in den osmotisch gestressten Zellen eine leichte Anreicherung von SUMO1 modifiziertem PML zu erkennen (siehe auch Abb.:

3.12 und 3.13.2). Demnach wird PML nach osmotischem Stress unter anderem mit SUMO1 modifiziert. Es ist möglich, dass die stabilisierte PML-Bande bei 130 kDa nach Sorbitolstress SUMO1 modifiziertes PML repräsentiert, da diese unabhängig von der Inhibition des Proteasoms nach Sorbitolstress stabilisiert werden konnte. Oder es handelt sich bei der Modifikation von PML nach Sorbitolstress um gemischte SUMO-Ketten (Matic *et al.*, 2008). Darüber hinaus akkumulieren nach der PML-IP in den mit 1 M Sorbitol gestressten Zellen, unabhängig von der Inhibition des Proteasoms SUMO2-Konjugate, die in den Kontrollzelllysaten (Abb.: 3.13.2) oder in den mit 0,25 M Sorbitol gestressten Zellen nach der IP nicht nachgewiesen werden können (Abb.: 3.13.1). Diese massive Akkumulation von SUMO2-Konjugaten nach Sorbitolstress war demnach nicht zu erwarten. Trotz dieser starken Akkumulation von SUMO2 modifiziertem PML nach 1 M Sorbitolstress, ist in diesen Präzipitaten kein Abbau von endogenem PML erkennbar. Das bedeutet, selbst wenn PML nach Sorbitolstress verstärkt SUMO2 modifiziert werden würde, würde dies nicht zu dessen proteasomalen Abbau über das 26S-Proteasom führen. Die SUMO2-Ketten könnten final mit SUMO1 modifiziert sein, was vielleicht den Abbau von PML über den STUb1-Signalweg durch RNF4 verhindert. Da die PML-IP aber unter nativen Bedingungen durchgeführt wurde, könnten die SUMO2-Konjugate zum Teil auch andere SUMOylierte Proteine enthalten, die nicht kovalent an PML binden.

4.10 Auswirkung unterschiedlicher Stressfaktoren auf die Signaltransduktion in HeLa B- und NB4-Zellen

ATO und Sorbitol haben unterschiedliche Auswirkungen auf das SUMOylierungsmuster von PML. ATO begünstigt die Modifizierung von PML vor allem durch SUMO2/3 und führt schließlich mit Hilfe der humanen Ubiquitinligase RNF4 zum Abbau von PML und PML-Kernkörpern (Weisshaar *et al.*, 2008; Tatham *et al.*, 2008; Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2008). Sorbitol dagegen führt primär zu einer Vergrößerung der PML-Kernkörper und zur Stabilisierung von endogenem PML bei 130 kDa, vermutlich durch SUMO1 oder gemischte Ketten von SUMO2/3 und SUMO1 (Matic *et al.*, 2008). Außerdem ist

der Effekt von Sorbitol im Gegensatz zum Effekt von ATO unabhängig von der Inhibition des Proteasoms. Sorbitol führt darüber hinaus zum Abbau von RNF4 (Abb.: 3.10 und 3.11). Dadurch ist die Stabilisierung von PML nicht nur durch den fehlenden Einfluss von MG132, oder das sich vom ATO-Stress unterscheidende SUMOylierungsmuster, sondern auch durch den Abbau von RNF4 begründet.

Weiterhin ist bekannt, dass der Abbau von PML, aber auch die Anzahl und Größe der PML-Kernkörper durch Phosphorylierung kontrolliert wird. PML besitzt mehr als 30 Phosphorylierungsstellen und kann zum Beispiel in seiner N-terminalen Prolin-reichen Region, rund um die RBCC-Domäne, am Serin 403 direkt neben der Ubiquitinierungsstelle K401 (Häkli *et al.*, 2005; Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2008), neben seinem NLS und neben seinem C-terminalen SIM phosphoryliert werden (Xiwen Cheng und Hung-Ying Kao, 2012; Schmitz und Grishina; 2012). Es konnte bereits gezeigt werden, dass osmotischer Stress zu einer CK2 abhängigen Phosphorylierung von PML und schließlich zu dessen Abbau führt (Scaglioni *et al.*, 2006). Darüber hinaus gibt es Studien die belegen, dass eine Stressinduktion mit ATO unter anderem zur Aktivierung von ERK und schließlich zur Phosphorylierung von Thr 28, Ser 36, Ser 38 und Ser 40 im PML-Protein führt. Anschließend wird das phosphorylierte PML-Protein verstärkt SUMOyliert. Dieser Prozess induziert schließlich Apoptose (Hayakawa und Privalki, 2004). Die Phosphorylierung von PML beeinflusst darüber hinaus die Interaktion von PML mit anderen Proteinen, sowie seine SUMOylierung und Ubiquitinierung (Wei *et al.*, 2003; Scaglioni *et al.*, 2003; Tagata *et al.*, 2008).

Deshalb wurde untersucht, welche der Phosphorylierung von PML vorgeschalteten Signalkaskaden durch ATO oder Sorbitol aktiviert werden. Dafür wurden HS27- sowie NB4-Zellen über einen längeren Zeitraum mit ATO oder Sorbitol behandelt und mittels Proteinmikroarray analysiert.

4.10.1 Quantifizierung der aktivierten Caspase 3 in HeLa B- und NB4-Zellen nach ATO- oder Sorbitol-Stressinduktion

Da Kinasen durch unterschiedliche Stressfaktoren, darunter auch der osmotische Stress durch Sorbitol, aktiviert werden und an vielen Prozessen wie zum Beispiel der Apoptose, der Zelldifferenzierung und der Zellteilung beteiligt

sind, wurde zunächst die Effektorcaspase 3 quantifiziert. Die Quantifizierung der Caspase sollte zeigen, ob und wann eine der Stressfaktoren Apoptose auslöst. In HeLa B Zellen konnte die aktivierte Caspase 3 ab einer Stunde nach Auslösung des osmotischen Stresses mit 0,25 M Sorbitol durchgängig nachgewiesen werden (Abb.: 3.14.1 a)). In NB4 Zellen erfolgte diese Aktivierung deutlich später nach 240 min (Abb.: 3.14.2 b)). Die Stressinduktion mit 1 M Sorbitol führte weder in HeLa B- noch in NB4-Zellen zu einer verstärkten Aktivierung der Effektorcaspase 3. In den NB4 Zellen waren die Messungen bei 1 M Sorbitol nach 45 min jedoch ungenau (fast alle Messungen sind im gelben Bereich, das bedeutet, dass die gemessenen Proben im Gegensatz zu den anderen Proben (blau) weniger als 2 mg/ml Protein enthielten). Die Proteinkonzentration beeinflusst schließlich die Genauigkeit der Messungen und könnte auf ein Absterben der Zellen durch 1 M Sorbitolstress nach 45 min schließen lassen. Trotzdem scheint der osmotische Stress von 1 M oder 0,25 M Sorbitol nach 30 min noch nicht zur Apoptose geführt zu haben. Demnach sind die Ergebnisse der endogenen PML-IP in Abbildung 3.13.1 nach Sorbitolstress unabhängig von Apoptose-Ereignissen.

4.10.2 osmotischer Stress führt im Gegensatz zu ATO zur Aktivierung der SAPK/JNK-Signalkaskade

Die Quantifizierung in Abbildung 3.14.2 a) zeigt, dass die MAP2-Kinase MKK7 nach Stressinduktion der HeLa B Zellen mit 10 μ M ATO verstärkt phosphoryliert und aktiviert wurde. Eine vergleichsweise leichte Aktivierung von MKK7 war nach Behandlung der Zellen mit 1 μ M ATO sowie mit 1 M Sorbitol erkennbar. Die Stressinduktion mit 0,25 M Sorbitol hatte keine Auswirkungen auf MKK7. In den NB4 Zellen führte weder Sorbitol noch ATO zu einer signifikanten Anhäufung phosphorylierter MKK7 (Abb.: 3.14.2 b)).

Nach der Analyse der Quantifizierung von SAP/JN-Kinasen führte ATO weder in HeLa B- noch in NB4-Zellen zu einer Aktivierung derer. Werden HeLa B Zellen aber mit 0,25 M Sorbitol behandelt, so ist bereits nach 5 min ein Anstieg der aktivierten SAP/JN-Kinasen messbar gewesen, und wurde bis zu 120 min aufrechtgehalten. 1 M Sorbitol führte zu einer geringen Aktivierung der SAPKs/JNKs (Abb.: 3.14.3 a). In NB4 Zellen führten sowohl 0,25 M als auch 1

M Sorbitol nach bereits 5 min zu einer starken Akkumulation phosphorylierter SAPs/JNKs (Abb.: 3.14.3 b).

Die Ergebnisse der Quantifizierung phosphorylierter SAP/JN-Kinasen korrelieren leider nicht mit denen der MKK7-Phosphorylierung. Da aber nicht nur MKK7, sondern auch MKK4 in der Lage ist SAPKs/JNKs zu phosphorylieren ist es möglich, dass diese durch Sorbitolstress verstärkt aktiviert wird. Leider wurde MKK4 nicht analysiert.

c-Jun steht in der Phosphorylierungskaskade unterhalb der SAP/JN-Kinasen und kann von ihnen an zwei Serinen phosphoryliert werden. Deshalb sollten die Proteinmikroarraydaten von c-Jun denen der SAPKs/JNKs ähnlich sein. Demnach führte die Stressinduktion der HeLa B Zellen mit 0,25 M Sorbitol ähnlich, wie in Abbildung 3.14.3 a) gezeigt, nach 20 min, sowie nach 60 und 120 min zur Akkumulation von phosphoryliertem c-Jun. Phosphoryliertes c-Jun konnte aber auch nach 1 M Sorbitolstress verstärkt nachgewiesen werden (Abb.: 3.14.4 a).

In NB4 Zellen führte die Konzentration von 10 μ M ATO nach 240 min zu einem Anstieg von phosphoryliertem c-Jun. Dies korreliert nicht mit den Daten der SAPK/JNK-Phosphorylierung. Allerdings wurde diese Messung mit einer Probe durchgeführt, deren Proteinkonzentration leider zu gering war und deshalb vermutlich auch ungenau gemessen wurde (gelber Balken). In NB4 Zellen führten sowohl 0,25 M, als auch 1 M Sorbitol zu einem Anstieg von phosphoryliertem c-Jun (Abb.: 3.14.4 b).

Wenn man schließlich die Quantifizierungen miteinander vergleicht, so ist erkennbar, dass der osmotische Stress durch Sorbitol zunächst zur Aktivierung der SAP/JN-Kinasen und dann wie erwartet zur Phosphorylierung von c-Jun geführt hat (Abb.: 4.1). MKK7 wurde nach Sorbitolstress nicht verstärkt phosphoryliert. Demnach scheint eine andere MAP3-Kinase wie zum Beispiel MKK4 den SAP/JN-Kinasen vorgeschaltet zu sein.

	HeLa B Zellen		NB4 Zellen	
MKK7	1 μ M ATO \rightarrow	P-MKK7	1 μ M ATO \rightarrow	-
	10 μ M ATO \rightarrow	P-MKK7	10 μ M ATO \rightarrow	-
	0,25 M Sorbitol \rightarrow	-	0,25 M Sorbitol \rightarrow	-
	1 M Sorbitol \rightarrow	P-MKK7	1 M Sorbitol \rightarrow	-
SAPK/JNK	1 μ M ATO \rightarrow	-	1 μ M ATO \rightarrow	-
	10 μ M ATO \rightarrow	-	10 μ M ATO \rightarrow	-
	0,25 M Sorbitol \rightarrow	P-SAPK/JNK	0,25 M Sorbitol \rightarrow	P-SAPK/JNK
	1 M Sorbitol \rightarrow	P-SAPK/JNK	1 M Sorbitol \rightarrow	P-SAPK/JNK
c-Jun	1 μ M ATO \rightarrow	-	1 μ M ATO \rightarrow	-
	10 μ M ATO \rightarrow	-	10 μ M ATO \rightarrow	P-c-Jun
	0,25 M Sorbitol \rightarrow	P-c-Jun	0,25 M Sorbitol \rightarrow	P-c-Jun
	1 M Sorbitol \rightarrow	P-c-Jun	1 M Sorbitol \rightarrow	P-c-Jun

Abbildung 4.1: Übersicht über die Phosphorylierung von MKK7, SAPK/JNK und cJun in den beiden Zelllinien HeLa B und NB4 nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

HeLa B- sowie NB4-Zellen wurden entweder mit ATO oder Sorbitol gestresst. Danach wurde mit Hilfe des Proteinmikroarrayverfahrens eine Quantifizierung der Phosphorylierung von MKK7, SAPK/JNK und c-Jun durchgeführt. P-c-Jun ist grau markiert, weil diese Messung mit einer zu gering konzentrierten Probe durchgeführt wurde und deshalb ungenau sein kann. **P-** \rightarrow starke Phosphorylierung; **P-** \rightarrow schwache Phosphorylierung

JNK führt aber nicht nur zur Phosphorylierung und Aktivierung von c-Jun. Es kontrolliert auch direkt oder indirekt die Aktivierung von p53 und hat dadurch Einfluss auf Apoptose (Fuchs *et al.*, 1998; Fan *et al.*, 2001; Schroeter *et al.*, 2003). Dadurch korreliert die Aktivierung von p53 unter Stressbedingungen oft mit der Aktivierung von JNK (Adler *et al.*, 1997; Manujendra *et al.*, 2012). Nach der Analyse der Proteinmikroarray-Daten führte die Stressinduktion mit 1 M Sorbitol in HeLa B Zellen nach 45 min zu einer leichten Aktivierung von p53. In NB4 Zellen führte dagegen 1 μ M ATO zu einer leichten Akkumulation von phosphoryliertem p53. Nach der Stressinduktion mit Sorbitol konnte in NB4 Zellen vergleichsweise wenig aktiviertes p53 nachgewiesen werden. Das in

Abbildung 4.2 zusammengefasste Aktivierungsmuster zeigt die Diskrepanz zwischen der Aktivierung von SAPK/JNK und p53. Demnach führten weder ATO noch Sorbitol zur Phosphorylierung von p53 über die SAPK/JNK-Signalkaskade.

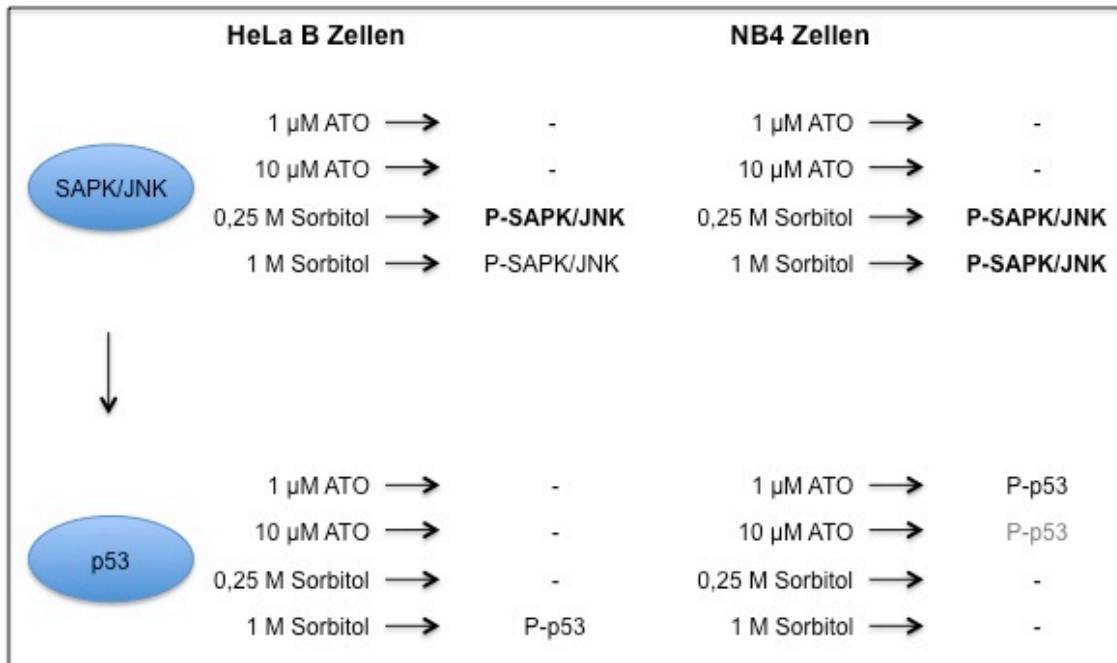


Abbildung 4.2: Übersicht über die Phosphorylierung von SAPK/JNK und p53 in den beiden Zelllinien HeLa B und NB4 nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

HeLa B- sowie NB4-Zellen wurden entweder mit ATO oder Sorbitol gestresst. Danach wurde mit Hilfe des Proteinmikroarrayverfahrens eine Quantifizierung der Phosphorylierung der Kinasen durchgeführt. **P-** \rightarrow starke Phosphorylierung; **P-** \rightarrow schwache Phosphorylierung. P-*RSK2* ist grau markiert, weil 10 μ M ATO nur zu einer sehr schwachen Aktivierung von p53 führt.

4.10.3 osmotischer Stress führt im Gegensatz zu ATO zur Aktivierung der ERK-Signalkaskade

Sowohl in HeLa B Zellen als auch in NB4 Zellen hatte die Stressinduktion mit ATO keine Auswirkungen auf die Phosphorylierung von MEK1/2. Wurden die Zellen jedoch mit Sorbitol gestresst, so war nach Stressinduktion mit 0,25 M sowie mit 1 M eine transiente Akkumulation phosphorylierter MEK1/2 nach 5 min erkennbar. In NB4 Zellen führte 1 M Sorbitol nach 60 min zur Phosphorylierung von MEK1/2. Osmotischer Stress durch 0,25 M Sorbitol hatte keinen Effekt auf die Phosphorylierung von MEK1/2.

Die beiden Kinasen ERK1 und ERK2 werden durch MEK1/2 phosphoryliert und aktiviert. Demnach sollte die Aktivierung von ERK1/2 der Aktivierung von MEK1/2 nach ATO- oder Sorbitol-Stress entsprechen.

Die Stressinduktion durch ATO führte weder in HeLa B- noch in NB4-Zellen zur Aktivierung von ERK1/2. Wurden HeLa B Zellen jedoch mit 0,25 oder 1 M Sorbitol gestresst, so konnte bereits nach 5 min eine Akkumulation phosphorylierter Kinasen nachgewiesen werden. Diese sank nach kurzer Zeit wieder auf das Ausgangsniveau ab. In NB4 Zellen konnte phosphoryliertes ERK erst durch die Stressinduktion mit 1 M Sorbitol nach 60 min nachgewiesen werden. Der Vergleich der Quantifizierung von ERK1/2 mit MEK1/2 zeigt ein fast identisches Aktivierungsmuster.

RSK2 steht in der Phosphorylierungskaskade unter den Kinasen MEK1/2 und ERK1/2. Nach der Analyse der Daten zeigte RSK2 ein ähnliches Aktivierungsmuster wie die beiden vorgeschalteten Kinasen. ATO-Stress führte weder in HeLa B- noch in NB4-Zellen zu einer Aktivierung von RSK2. Wurden HeLa B Zellen aber mit 0,25 oder 1 M Sorbitol gestresst, so konnte eine Akkumulation von phosphoryliertem RSK2 nach 5 min nachgewiesen werden. Dies korreliert mit der Aktivierung von MEK1/2 und ERK1/2. In NB4-Zellen führten 0,25 M Sorbitol nach 10 min zur schwachen und 1 M Sorbitol nach 120 min zur etwas stärkeren Aktivierung von RSK2.

Wenn man nun die Aktivierung der Kinasen im ERK-Signalweg vergleicht, dann wird deutlich, dass das Aktivierungsmuster auf den drei Ebenen (MEK1/2, ERK1/2, RSK2) ähnlich ist (Abb.: 4.3). Der osmotische Stress durch Sorbitol aktiviert die ERK1/2-Signalkaskade.

	HeLa B Zellen		NB4 Zellen	
MKK1/2	1 μ M ATO \rightarrow	-	1 μ M ATO \rightarrow	-
	10 μ M ATO \rightarrow	-	10 μ M ATO \rightarrow	-
	0,25 M Sorbitol \rightarrow	P-MKK1/2	0,25 M Sorbitol \rightarrow	-
	1 M Sorbitol \rightarrow	P-MKK1/2	1 M Sorbitol \rightarrow	P-MKK1/2
ERK1/2	1 μ M ATO \rightarrow	-	1 μ M ATO \rightarrow	-
	10 μ M ATO \rightarrow	-	10 μ M ATO \rightarrow	-
	0,25 M Sorbitol \rightarrow	P-ERK1/2	0,25 M Sorbitol \rightarrow	-
	1 M Sorbitol \rightarrow	P-ERK1/2	1 M Sorbitol \rightarrow	P-ERK1/2
RSK2	1 μ M ATO \rightarrow	-	1 μ M ATO \rightarrow	-
	10 μ M ATO \rightarrow	-	10 μ M ATO \rightarrow	-
	0,25 M Sorbitol \rightarrow	P-RSK2	0,25 M Sorbitol \rightarrow	P-RSK2
	1 M Sorbitol \rightarrow	P-RSK2	1 M Sorbitol \rightarrow	P-RSK2

Abbildung 4.3: Übersicht über die Phosphorylierung von MKK1/2, ERK1/2 und RSK2 in den beiden Zelllinien HeLa B und NB4 nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

HeLa B- sowie NB4-Zellen wurden entweder mit ATO oder Sorbitol gestresst. Danach wurde mit Hilfe des Proteinmikroarrayverfahrens eine Quantifizierung der Phosphorylierung der drei Kinasen im ERK-Signalweg durchgeführt. P- \rightarrow starke Phosphorylierung; P- \rightarrow schwache Phosphorylierung. P-RSK2 ist grau markiert, weil 0,25 M Sorbitol nur zu einer sehr schwachen Aktivierung von RSK2 geführt hat.

4.10.4 RSK2 ist ein Substrat von ERK und weniger von der p38 MAP-Kinase

Es gibt kaum ein Substrat von ERK, das nicht auch von p38 phosphoryliert werden kann. Aus diesem Grund wurde die Aktivierung der p38 Map-Kinase quantifiziert. In ATO gestressten HeLa B und NB4-Zellen konnte keine signifikante Aktivierung von p38 nachgewiesen werden. Eine Stressinduktion mit 1 M Sorbitol führte in HeLa B-Zellen nach 5 min zu einer leichten Akkumulation von phosphoryliertem p38. Dies korreliert mit der Aktivierung von RSK2. Allerdings führte 0,25 M Sorbitol nur zur Phosphorylierung von RSK2,

nicht aber von p38. In NB4 Zellen führte Sorbitol sowohl in geringer Konzentration (0,25M), als auch in erhöhter Konzentration (1 M) nach bereits nach 5 min zu einem Anstieg der Phosphorylierung von p38. RSK2 wurde in NB4 Zellen erst später phosphoryliert. Demnach scheint RSK2 unter osmotischem Stress weniger von p38 als viel mehr durch ERK phosphoryliert zu werden (vgl. Abb.: 4.3 und 4.4).

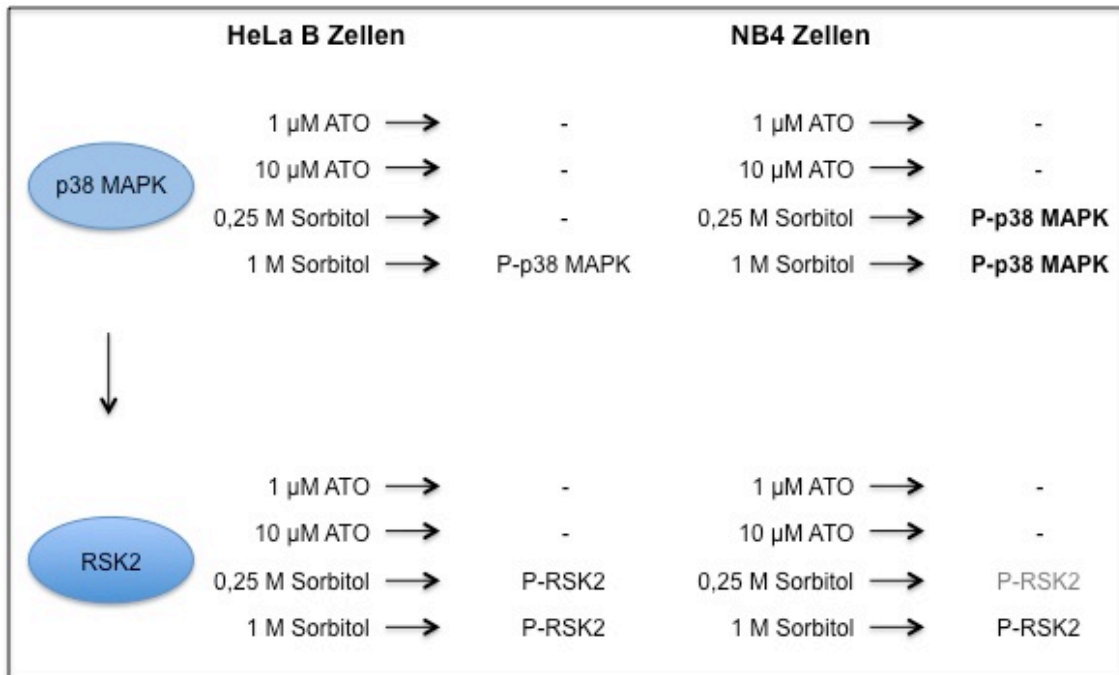


Abbildung 4.4: Übersicht über die Phosphorylierung von p38 MAPK und RSK2 in den beiden Zelllinien HeLa B und NB4 nach Stressinduktion mit ATO oder Sorbitol

HeLa B- sowie NB4-Zellen wurden entweder mit ATO oder Sorbitol gestresst. Danach wurde mit Hilfe des Proteinmicroarrayverfahrens eine Quantifizierung der Phosphorylierung der Kinasen durchgeführt. P- → starke Phosphorylierung; P- → schwache Phosphorylierung. P-RSK2 ist grau markiert, weil 0,25 M Sorbitol nur zu einer sehr schwachen Aktivierung von RSK2 geführt hat.

Durch die Analysen der Signaltransduktionswege nach Behandlung der Zellen mit ATO oder Sorbitol ist erkennbar, dass Sorbitol im Gegensatz zu ATO einen stärkeren Einfluss auf die Aktivierung des SAPK/JNK- sowie des ERK-Signalwegs hat. Eine Stressinduktion sowohl der HeLa B- als auch der NB4-Zellen mit Sorbitol führt zur Aktivierung von SAPK/JNK vermutlich über MKK4 und schließlich zur Phosphorylierung von c-Jun. Zudem führt Sorbitol zur Aktivierung von ERK1/2 über MKK1/2 und final zur Phosphorylierung von RSK2. Da fast alle Substrate von ERK auch von p38 phosphoryliert werden können, wurde zusätzlich die Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase untersucht. Diese wird wahrscheinlich auch zur Aktivierung von RSK beitragen.

Da sich aber die beiden Aktivierungsmuster von ERK1/2 und RSK2 ähnlicher sind, wird RSK2 vermutlich hauptsächlich durch ERK1/2 phosphoryliert.

4.10.5 Zusammenfassung der Aktivierung beider Signalkaskaden durch Sorbitol

Die folgende Abbildung 4.5 soll verdeutlichen welche Kinasen durch Sorbitol phosphoryliert und aktiviert werden. Eine Stressinduktion sowohl der HS27- als auch der NB4 Zellen mit Sorbitol führte, im Gegensatz zu ATO, zur Aktivierung der SAPK/JNK- sowie der ERK-Signalkaskade.

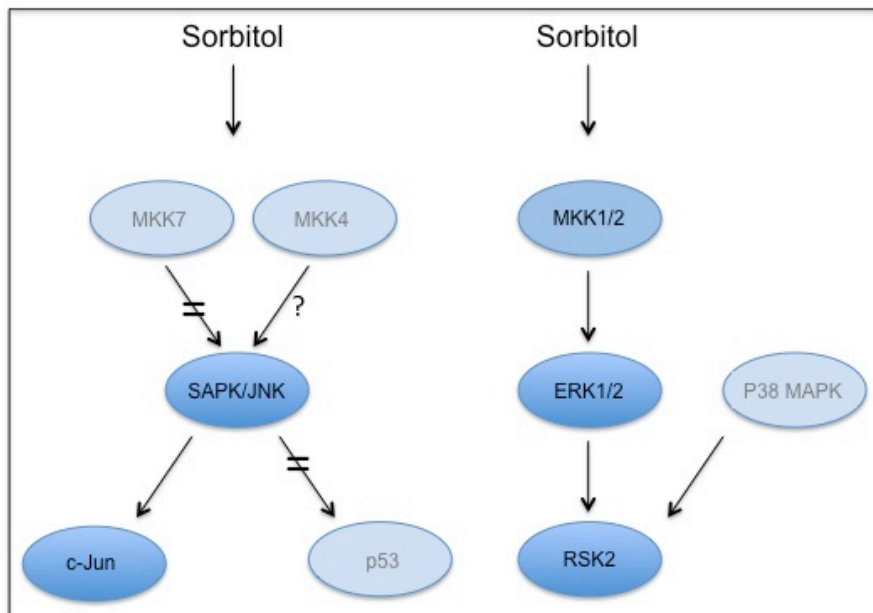


Abbildung 4.5: Übersicht über die Aktivierung der JNK- und ERK-Signalkaskade in HeLa B- und NB4-Zellen nach Sorbitolstress

Sorbitol führt über die Aktivierung von SAPK/JNK zur Phosphorylierung von c-Jun. Außerdem führt Sorbitol zur Aktivierung der ERK-Signalkaskade über MKK1/2 und endet bei der Phosphorylierung von RSK2.

Obwohl osmotischer Stress laut Literatur zu einer CK2 abhängigen Phosphorylierung von PML und schließlich zu dessen Abbau führt (Scaglioni *et al.*, 2006), belegen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien eine Stabilisierung von PML und PML-Kernkörpern nach osmotischem Stress (Abb.: 3.8.1; 3.9; 3.10; 3.11; 3.12, 3.13). Ein Abbau von PML konnte nicht beobachtet werden. Der osmotische Stress durch Sorbitol führt demnach wahrscheinlich über die SAPK/JNK- sowie ERK-Signalkaskade zur Phosphorylierung von PML, die dessen Abbau über den STUbL-Signalweg verhindert. Diese Phosphorylierung führt vermutlich weniger zur SUMO2-Modifikation, als eher

zur SUMO1-Modifikation von PML (Abb.: 3.8.1; 3.12; 3.13). Es ist aber auch möglich, dass PML nach osmotischem Stress mit gemischten SUMO-Ketten modifiziert wird (Matic *et al.*, 2008). Jedenfalls führt die Phosphorylierung von PML voraussichtlich zu weiteren Modifikationen von PML, die das Protein stabilisieren und nicht für den Abbau über das 26S-Proteasom kennzeichnen (Abb.: 4.6). Im Kampf gegen Krebs werden bereits gezielt Kinaseinhibitoren eingesetzt, darunter auch CK2-Inhibitoren, um unter anderem den Abbau von PML zu verhindern (Wolyniec *et al.*, 2013). Darüber hinaus wird diskutiert, ob man diese Inhibitoren mit Medikamenten kombiniert, die DNA-Schäden hervorrufen, da diese nachweislich PML aktivieren. Demzufolge könnte man in der Krebstherapie, möglicherweise auch Sorbitol mit Kinaseinhibitoren kombinieren.

Weiterhin gibt es die Möglichkeit, dass RNF4 durch Sorbitolstress phosphoryliert und abgebaut wird (Abb.: 3.10 und 3.12). Demnach würde, durch beispielsweise CK2 phosphoryliertes PML, zumindest nicht über den in dieser Arbeit beschriebenen STUbL-Signalweg abgebaut werden.

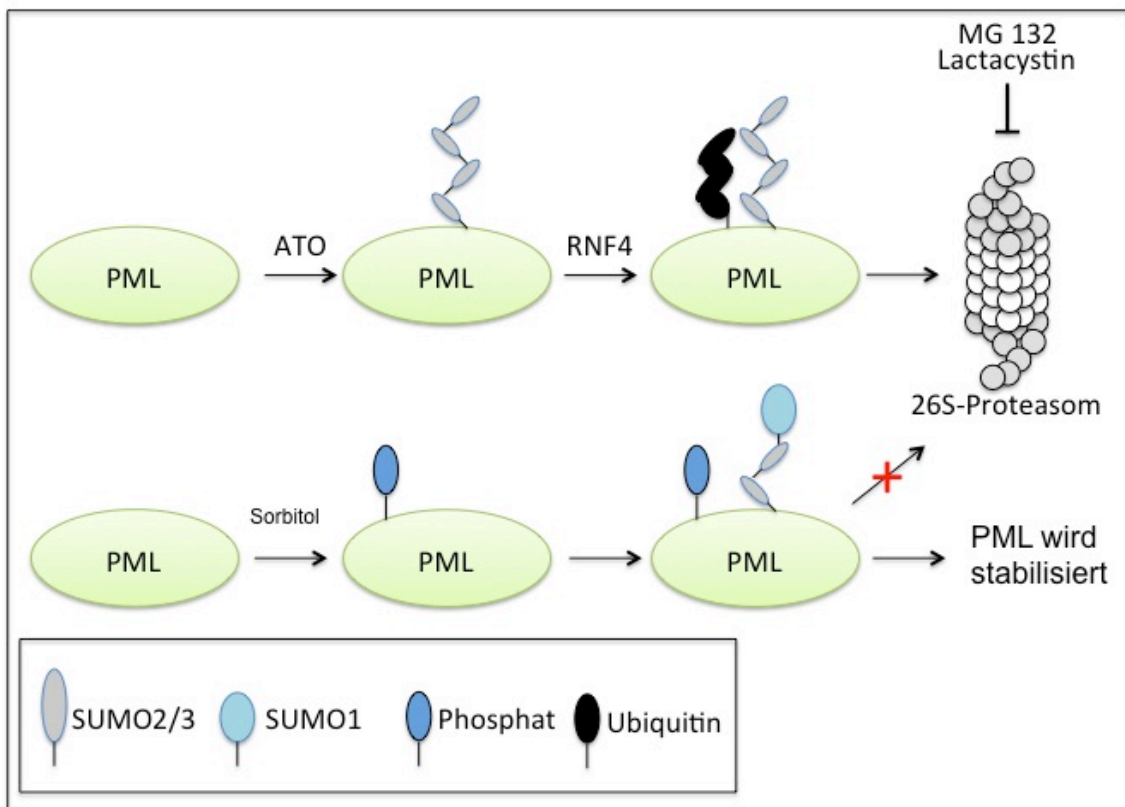


Abbildung 4.6: Model über die Wirkungsweise von ATO und Sorbitol

ATO führt zum Abbau von PML und PML-Kernkörpern über den STUbL-Signalweg
Sorbitol führt über ERK und SAPK/JNK zur Phosphorylierung und Stabilisierung von PML und PML-Kernkörpern

Acconcia, F., Sigismund, S., and Polo, S. (2009). Ubiquitin in trafficking: the network at work. *Exp Cell Res* 315, 1610-1618.

Ades, L., Sanz, M.A., Chevret, S., Montesinos, P., Chevallier, P., Raffoux, E., Vellenga, E., Guerci, A., Pigneux, A., Huguet, F., et al. (2008). Treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL): a comparison of French-Belgian-Swiss and PETHEMA results. *Blood* 111, 1078-1084.

Adler, V., Pincus, M.R., Minamoto, T., Fuchs, S.Y., Bluth, M.J., Brandt-Rauf, P.W., Friedman, F.K., Robinson, R.C., Chen, J.M., Wang, X.W., et al. (1997). Conformation-dependent phosphorylation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1686-1691.

Agostini, C., and Gurrieri, C. (2006). Chemokine/cytokine cocktail in idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 3, 357-363.

Alcalay, M., Zangrilli, D., Pandolfi, P.P., Longo, L., Mencarelli, A., Giacomucci, A., Rocchi, M., Biondi, A., Rambaldi, A., Lo Coco, F., et al. (1991). Translocation breakpoint of acute promyelocytic leukemia lies within the retinoic acid receptor alpha locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1977-1981.

Bailey, D., and O'Hare, P. (2002). Herpes simplex virus 1 ICP0 co-localizes with a SUMO-specific protease. *J Gen Virol* 83, 2951-2964.

Bancalari, A., Otero, C., Bello, P., Soto, G., Pandolfi, E., and Leon, L. (1991). [Myocardial damage following neonatal severe asphyxia]. *Rev Chil Pediatr* 62, 232-237.

Beaumont, M., Sanz, M., Carli, P.M., Maloisel, F., Thomas, X., Detourmignies, L., Guerci, A., Gratecos, N., Rayon, C., San Miguel, J., et al. (2003). Therapy-related acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol* 21, 2123-2137.

Bergink, S., and Jentsch, S. (2009). Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature* 458, 461-467.

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

Biondi, A., Rambaldi, A., Alcalay, M., Pandolfi, P.P., Lo Coco, F., Diverio, D., Rossi, V., Mencarelli, A., Longo, L., Zangrilli, D., et al. (1991). RAR-alpha gene rearrangements as a genetic marker for diagnosis and monitoring in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 77, 1418-1422.

Bischof, O., Kirsh, O., Pearson, M., Itahana, K., Pelicci, P.G., and Dejean, A. (2002). Deconstructing PML-induced premature senescence. *EMBO J* 21, 3358-3369.

Bischof, O., Nacerddine, K., and Dejean, A. (2005). Human papillomavirus oncoprotein E7 targets the promyelocytic leukemia protein and circumvents cellular

senescence via the Rb and p53 tumor suppressor pathways. *Mol Cell Biol* 25, 1013-1024.

Boddy, A.V., English, M., Pearson, A.D., Idle, J.R., and Skinner, R. (1996). Ifosfamide nephrotoxicity: limited influence of metabolism and mode of administration during repeated therapy in paediatrics. *Eur J Cancer* 32A, 1179-1184.

Boddy, A.V., Yule, S.M., Wyllie, R., Price, L., Pearson, A.D., and Idle, J.R. (1996). Intrasubject variation in children of ifosfamide pharmacokinetics and metabolism during repeated administration. *Cancer Chemother Pharmacol* 38, 147-154.

Boddy, M.N., Howe, K., Etkin, L.D., Solomon, E., and Freemont, P.S. (1996). PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene* 13, 971-982.

Boichuk, S., Hu, L., Makielski, K., Pandolfi, P.P., and Gjoerup, O.V. (2011). Functional connection between Rad51 and PML in homology-directed repair. *PLoS One* 6, e25814.

Borden, K.L. (2002). Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol* 22, 5259-5269.

Borden, K.L., Campbell Dwyer, E.J., and Salvato, M.S. (1998). An arenavirus RING (zinc-binding) protein binds the oncoprotein promyelocyte leukemia protein (PML) and relocates PML nuclear bodies to the cytoplasm. *J Virol* 72, 758-766.

Borden, K.L., Campbelldwyer, E.J., Carlile, G.W., Djavani, M., and Salvato, M.S. (1998). Two RING finger proteins, the oncoprotein PML and the arenavirus Z protein, colocalize with the nuclear fraction of the ribosomal P proteins. *J Virol* 72, 3819-3826.

Borden, K.L., Lally, J.M., Martin, S.R., O'Reilly, N.J., Solomon, E., and Freemont, P.S. (1996). In vivo and in vitro characterization of the B1 and B2 zinc-binding domains from the acute promyelocytic leukemia protooncoprotein PML. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1601-1606.

Borrow, J., and Solomon, E. (1992). Molecular analysis of the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukaemia. *Baillieres Clin Haematol* 5, 833-856.

Callis, J., and Vierstra, R.D. (2000). Protein degradation in signaling. *Curr Opin Plant Biol* 3, 381-386.

Carvalho, T., Seeler, J.S., Ohman, K., Jordan, P., Pettersson, U., Akusjarvi, G., Carmo-Fonseca, M., and Dejean, A. (1995). Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. *J Cell Biol* 131, 45-56.

Chang, K.S., Fan, Y.H., Andreeff, M., Liu, J., and Mu, Z.M. (1995). The PML gene encodes a phosphoprotein associated with the nuclear matrix. *Blood* 85, 3646-3653.

- Chelbi-Alix, M.K., and de The, H. (1999). Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene* 18, 935-941.
- Chen, C., and Matesic, L.E. (2007). The Nedd4-like family of E3 ubiquitin ligases and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 26, 587-604.
- Chen, C., Sun, X., Guo, P., Dong, X.Y., Sethi, P., Zhou, W., Zhou, Z., Petros, J., Frierson, H.F., Jr., Vessella, R.L., et al. (2007). Ubiquitin E3 ligase WWP1 as an oncogenic factor in human prostate cancer. *Oncogene* 26, 2386-2394.
- Chen, C., Zhou, Z., Guo, P., and Dong, J.T. (2007). Proteasomal degradation of the KLF5 transcription factor through a ubiquitin-independent pathway. *FEBS Lett* 581, 1124-1130.
- Chen, G.Q., Zhu, J., Shi, X.G., Ni, J.H., Zhong, H.J., Si, G.Y., Jin, X.L., Tang, W., Li, X.S., Xong, S.M., et al. (1996). In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As₂O₃ induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. *Blood* 88, 1052-1061.
- Chen, J., Halappanavar, S., Th' ng, J.P., and Li, Q. (2007). Ubiquitin-dependent distribution of the transcriptional coactivator p300 in cytoplasmic inclusion bodies. *Epigenetics* 2, 92-99.
- Chen, R.H., Lee, Y.R., and Yuan, W.C. (2012). The role of PML ubiquitination in human malignancies. *J Biomed Sci* 19, 81.
- Chen, X., Barton, L.F., Chi, Y., Clurman, B.E., and Roberts, J.M. (2007). Ubiquitin-independent degradation of cell-cycle inhibitors by the REGgamma proteasome. *Mol Cell* 26, 843-852.
- Chen, Y. (2007). The enzymes in ubiquitin-like post-translational modifications. *Biosci Trends* 1, 16-25.
- Cheng, J., Bawa, T., Lee, P., Gong, L., and Yeh, E.T. (2006). Role of desumoylation in the development of prostate cancer. *Neoplasia* 8, 667-676.
- Cheng, K., Grisendi, S., Clohessy, J.G., Majid, S., Bernardi, R., Sportoletti, P., and Pandolfi, P.P. (2007). The leukemia-associated cytoplasmic nucleophosmin mutant is an oncogene with paradoxical functions: Arf inactivation and induction of cellular senescence. *Oncogene* 26, 7391-7400.
- Cheng, X., and Kao, H.Y. (2012). Post-translational modifications of PML: consequences and implications. *Front Oncol* 2, 210.
- Chiu, M.W., Shih, H.M., Yang, T.H., and Yang, Y.L. (2007). The type 2 dengue virus envelope protein interacts with small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) conjugating enzyme 9 (Ubc9). *J Biomed Sci* 14, 429-444.

Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H., and Hershko, A. (1982). "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem* 257, 2537-2542.

Ciechanover, A., Heller, H., Katz-Etzion, R., and Hershko, A. (1981). Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 761-765.

Ciechanover, A., and Schwartz, A.L. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2727-2730.

Condemine, W., Takahashi, Y., Zhu, J., Puvion-Dutilleul, F., Guegan, S., Janin, A., and de The, H. (2006). Characterization of endogenous human promyelocytic leukemia isoforms. *Cancer Res* 66, 6192-6198.

Curtin, D., Ferris, H.A., Hakli, M., Gibson, M., Janne, O.A., Palvimo, J.J., and Shupnik, M.A. (2004). Small nuclear RING finger protein stimulates the rat luteinizing hormone-beta promoter by interacting with Sp1 and steroidogenic factor-1 and protects from androgen suppression. *Mol Endocrinol* 18, 1263-1276.

Daniel, M.T., Koken, M., Romagne, O., Barbey, S., Bazarbachi, A., Stadler, M., Guillemain, M.C., Degos, L., Chomienne, C., and de The, H. (1993). PML protein expression in hematopoietic and acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 82, 1858-1867.

Dasso, M. (2008). Emerging roles of the SUMO pathway in mitosis. *Cell Div* 3, 5.

de Stanchina, E., Querido, E., Narita, M., Davuluri, R.V., Pandolfi, P.P., Ferbeyre, G., and Lowe, S.W. (2004). PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol Cell* 13, 523-535.

de The, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., and Dejean, A. (1991). The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66, 675-684.

Desterro, J.M., Rodriguez, M.S., and Hay, R.T. (1998). SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. *Mol Cell* 2, 233-239.

Desterro, J.M., Thomson, J., and Hay, R.T. (1997). Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS Lett* 417, 297-300.

Doucas, V., Tini, M., Egan, D.A., and Evans, R.M. (1999). Modulation of CREB binding protein function by the promyelocytic (PML) oncoprotein suggests a role for nuclear bodies in hormone signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2627-2632.

Dundr, M., and Misteli, T. (2001). Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J* 356, 297-310.

- Duprez, E., Saurin, A.J., Desterro, J.M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M.N., Solomon, E., de The, H., Hay, R.T., and Freemont, P.S. (1999). SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J Cell Sci* 112 (Pt 3), 381-393.
- Dyck, J.A., Maul, G.G., Miller, W.H., Jr., Chen, J.D., Kakizuka, A., and Evans, R.M. (1994). A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* 76, 333-343.
- El McHichi, B., Regad, T., Maroui, M.A., Rodriguez, M.S., Aminev, A., Gerbaud, S., Escriou, N., Dianoux, L., and Chelbi-Alix, M.K. (2010). SUMOylation promotes PML degradation during encephalomyocarditis virus infection. *J Virol* 84, 11634-11645.
- El McHichi, B., Regad, T., Maroui, M.A., Rodriguez, M.S., Aminev, A., Gerbaud, S., Escriou, N., Dianoux, L., and Chelbi-Alix, M.K. (2010). SUMOylation promotes PML degradation during encephalomyocarditis virus infection. *J Virol* 84, 11634-11645.
- Engelhardt, O.G., Boutell, C., Orr, A., Ullrich, E., Haller, O., and Everett, R.D. (2003). The homeodomain-interacting kinase PKM (HIPK-2) modifies ND10 through both its kinase domain and a SUMO-1 interaction motif and alters the posttranslational modification of PML. *Exp Cell Res* 283, 36-50.
- Eskiw, C.H., Dellaire, G., and Bazett-Jones, D.P. (2004). Chromatin contributes to structural integrity of promyelocytic leukemia bodies through a SUMO-1-independent mechanism. *J Biol Chem* 279, 9577-9585.
- Eskiw, C.H., Dellaire, G., Mymryk, J.S., and Bazett-Jones, D.P. (2003). Size, position and dynamic behavior of PML nuclear bodies following cell stress as a paradigm for supramolecular trafficking and assembly. *J Cell Sci* 116, 4455-4466.
- Everett, R.D., and Chelbi-Alix, M.K. (2007). PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* 89, 819-830.
- Everett, R.D., Rechter, S., Papior, P., Tavalai, N., Stamminger, T., and Orr, A. (2006). PML contributes to a cellular mechanism of repression of herpes simplex virus type 1 infection that is inactivated by ICP0. *J Virol* 80, 7995-8005.
- Fabunmi, R.P., Wigley, W.C., Thomas, P.J., and DeMartino, G.N. (2001). Interferon gamma regulates accumulation of the proteasome activator PA28 and immunoproteasomes at nuclear PML bodies. *J Cell Sci* 114, 29-36.
- Fagioli, M., Alcalay, M., Pandolfi, P.P., Venturini, L., Mencarelli, A., Simeone, A., Acampora, D., Grignani, F., and Pelicci, P.G. (1992). Alternative splicing of PML transcripts predicts coexpression of several carboxy-terminally different protein isoforms. *Oncogene* 7, 1083-1091.

- Fan, Y., Zhao, M., and Huang, C. (2001). [Preliminary study of effect of antisense hsc70 effect on the stability of mutant p53 protein]. *Zhonghua zhong liu za zhi* [Chinese journal of oncology] 23, 376-378.
- Fogal, V., Gostissa, M., Sandy, P., Zacchi, P., Sternsdorf, T., Jensen, K., Pandolfi, P.P., Will, H., Schneider, C., and Del Sal, G. (2000). Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO J* 19, 6185-6195.
- Freemont, P.S. (2000). RING for destruction? *Curr Biol* 10, R84-87.
- Fuchs, S.Y., Adler, V., Buschmann, T., Yin, Z., Wu, X., Jones, S.N., and Ronai, Z. (1998). JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev* 12, 2658-2663.
- Galanty, Y., Belotserkovskaya, R., Coates, J., and Jackson, S.P. (2012). RNF4, a SUMO-targeted ubiquitin E3 ligase, promotes DNA double-strand break repair. *Genes Dev* 26, 1179-1195.
- Geoffroy, M.C., and Hay, R.T. (2009). An additional role for SUMO in ubiquitin-mediated proteolysis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 564-568.
- Geoffroy, M.C., Jaffray, E.G., Walker, K.J., and Hay, R.T. (2010). Arsenic-induced SUMO-dependent recruitment of RNF4 into PML nuclear bodies. *Mol Biol Cell* 21, 4227-4239.
- Gill, G. (2005). Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev* 15, 536-541.
- Gill, G. (2005). SUMO changes Sox for developmental diversity. *Mol Cell* 20, 495-496.
- Gresko, E., Ritterhoff, S., Sevilla-Perez, J., Roscic, A., Frobis, K., Kotevic, I., Vichalkovski, A., Hess, D., Hemmings, B.A., and Schmitz, M.L. (2009). PML tumor suppressor is regulated by HIPK2-mediated phosphorylation in response to DNA damage. *Oncogene* 28, 698-708.
- Guldner, H.H., Szostecki, C., Grotzinger, T., and Will, H. (1992). IFN enhance expression of Sp100, an autoantigen in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 149, 4067-4073.
- Guo, A., Salomoni, P., Luo, J., Shih, A., Zhong, S., Gu, W., and Pandolfi, P.P. (2000). The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 2, 730-736.
- Haas, A.L., and Bright, P.M. (1988). The resolution and characterization of putative ubiquitin carrier protein isozymes from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* 263, 13258-13267.

- Haas, A.L., Bright, P.M., and Jackson, V.E. (1988). Functional diversity among putative E2 isozymes in the mechanism of ubiquitin-histone ligation. *J Biol Chem* 263, 13268-13275.
- Haglund, K., Di Fiore, P.P., and Dikic, I. (2003). Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci* 28, 598-603.
- Hakli, M., Karvonen, U., Janne, O.A., and Palvimo, J.J. (2001). The RING finger protein SNURF is a bifunctional protein possessing DNA binding activity. *J Biol Chem* 276, 23653-23660.
- Hakli, M., Karvonen, U., Janne, O.A., and Palvimo, J.J. (2005). SUMO-1 promotes association of SNURF (RNF4) with PML nuclear bodies. *Exp Cell Res* 304, 224-233.
- Hakli, M., Karvonen, U., Janne, O.A., and Palvimo, J.J. (2005). SUMO-1 promotes association of SNURF (RNF4) with PML nuclear bodies. *Exp Cell Res* 304, 224-233.
- Hakli, M., Lorick, K.L., Weissman, A.M., Janne, O.A., and Palvimo, J.J. (2004). Transcriptional coregulator SNURF (RNF4) possesses ubiquitin E3 ligase activity. *FEBS Lett* 560, 56-62.
- Hang, J., and Dasso, M. (2002). Association of the human SUMO-1 protease SENP2 with the nuclear pore. *J Biol Chem* 277, 19961-19966.
- Hannich, J.T., Lewis, A., Kroetz, M.B., Li, S.J., Heide, H., Emili, A., and Hochstrasser, M. (2005). Defining the SUMO-modified proteome by multiple approaches in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280, 4102-4110.
- Hasan, S.K., Ottone, T., Schlenk, R.F., Xiao, Y., Wiemels, J.L., Mitra, M.E., Bernasconi, P., Di Raimondo, F., Stanghellini, M.T., Marco, P., et al. (2010). Analysis of t(15;17) chromosomal breakpoint sequences in therapy-related versus de novo acute promyelocytic leukemia: association of DNA breaks with specific DNA motifs at PML and RARA loci. *Genes Chromosomes Cancer* 49, 726-732.
- Hay, R.T. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18, 1-12.
- Hayakawa, F., and Privalsky, M.L. (2004). Phosphorylation of PML by mitogen-activated protein kinases plays a key role in arsenic trioxide-mediated apoptosis. *Cancer Cell* 5, 389-401.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1982). Mechanisms of intracellular protein breakdown. *Annu Rev Biochem* 51, 335-364.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.
- Hershko, A., Ciechanover, A., and Rose, I.A. (1981). Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown. *J Biol Chem* 256, 1525-1528.

Hershko, A., Eytan, E., Ciechanover, A., and Haas, A.L. (1982). Immunochemical analysis of the turnover of ubiquitin-protein conjugates in intact cells. Relationship to the breakdown of abnormal proteins. *J Biol Chem* 257, 13964-13970.

Heun, P. (2007). SUMO organization of the nucleus. *Curr Opin Cell Biol* 19, 350-355.

Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-141.

Huang, Y., Qiu, J., Chen, G., and Dong, S. (2008). Coiled-coil domain of PML is essential for the aberrant dynamics of PML-RAR α , resulting in sequestration and decreased mobility of SMRT. *Biochem Biophys Res Commun* 365, 258-265.

Huett, A., Heath, R.J., Begun, J., Sassi, S.O., Baxt, L.A., Vyas, J.M., Goldberg, M.B., and Xavier, R.J. (2012). The LRR and RING domain protein LRSAM1 is an E3 ligase crucial for ubiquitin-dependent autophagy of intracellular *Salmonella Typhimurium*. *Cell Host Microbe* 12, 778-790.

Hunter, T., and Sun, H. (2008). Crosstalk between the SUMO and ubiquitin pathways. *Ernst Schering Found Symp Proc*, 1-16.

Ishov, A.M., and Maul, G.G. (1996). The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *J Cell Biol* 134, 815-826.

Ishov, A.M., Sotnikov, A.G., Negorev, D., Vladimirova, O.V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E.T., Strauss, J.F., 3rd, and Maul, G.G. (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol* 147, 221-234.

Itahana, Y., Yeh, E.T., and Zhang, Y. (2006). Nucleocytoplasmic shuttling modulates activity and ubiquitination-dependent turnover of SUMO-specific protease 2. *Mol Cell Biol* 26, 4675-4689.

Jacquiau, H.R., van Waardenburg, R.C., Reid, R.J., Woo, M.H., Guo, H., Johnson, E.S., and Bjornsti, M.A. (2005). Defects in SUMO (small ubiquitin-related modifier) conjugation and deconjugation alter cell sensitivity to DNA topoisomerase I-induced DNA damage. *J Biol Chem* 280, 23566-23575.

Jensen, K., Shiels, C., and Freemont, P.S. (2001). PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20, 7223-7233.

Joazeiro, C.A., and Weissman, A.M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102, 549-552.

Jul-Larsen, A., Visted, T., Karlsen, B.O., Rinaldo, C.H., Bjerkgvig, R., Lonning, P.E., and Boe, S.O. (2004). PML-nuclear bodies accumulate DNA in response to polyomavirus BK and simian virus 40 replication. *Exp Cell Res* 298, 58-73.

- Kakizuka, A., Miller, W.H., Jr., Umesono, K., Warrell, R.P., Jr., Frankel, S.R., Murty, V.V., Dmitrovsky, E., and Evans, R.M. (1991). Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 66, 663-674.
- Kirsh, O., Seeler, J.S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F., et al. (2002). The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *EMBO J* 21, 2682-2691.
- Klein, U.R., Haindl, M., Nigg, E.A., and Muller, S. (2009). RanBP2 and SENP3 function in a mitotic SUMO2/3 conjugation-deconjugation cycle on Borealin. *Mol Biol Cell* 20, 410-418.
- Koken, M.H., Linares-Cruz, G., Quignon, F., Viron, A., Chelbi-Alix, M.K., Sobczak-Thepot, J., Juhlin, L., Degos, L., Calvo, F., and de The, H. (1995). The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. *Oncogene* 10, 1315-1324.
- Kosoy, A., Calonge, T.M., Outwin, E.A., and O'Connell, M.J. (2007). Fission yeast Rnf4 homologs are required for DNA repair. *J Biol Chem* 282, 20388-20394.
- Kraft, E., Stone, S.L., Ma, L., Su, N., Gao, Y., Lau, O.S., Deng, X.W., and Callis, J. (2005). Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of Arabidopsis. *Plant Physiol* 139, 1597-1611.
- Kumar, A., Ito, A., Hirohama, M., Yoshida, M., and Zhang, K.Y. (2013). Identification of quinazolinyl-oxo biaryl urea as a new class of SUMO activating enzyme 1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*.
- Kuo, M.L., den Besten, W., Thomas, M.C., and Sherr, C.J. (2008). Arf-induced turnover of the nucleolar nucleophosmin-associated SUMO-2/3 protease Senp3. *Cell Cycle* 7, 3378-3387.
- Kurepa, J., Walker, J.M., Smalle, J., Gosink, M.M., Davis, S.J., Durham, T.L., Sung, D.Y., and Vierstra, R.D. (2003). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in Arabidopsis. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *J Biol Chem* 278, 6862-6872.
- Kyratsous, C.A., Walters, M.S., Panagiotidis, C.A., and Silverstein, S.J. (2009). Complementation of a herpes simplex virus ICP0 null mutant by varicella-zoster virus ORF61p. *J Virol* 83, 10637-10643.
- Lafarga, M., Fernandez, R., Mayo, I., Berciano, M.T., and Castano, J.G. (2002). Proteasome dynamics during cell cycle in rat Schwann cells. *Glia* 38, 313-328.
- Lallemand-Breitenbach, V., Jeanne, M., Benhenda, S., Nasr, R., Lei, M., Peres, L., Zhou, J., Zhu, J., Raught, B., and de The, H. (2008). Arsenic degrades PML or PML-

RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol* 10, 547-555.

Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., Puvion, F., Koken, M., Honore, N., Doubeikovsky, A., Duprez, E., Pandolfi, P.P., Puvion, E., Freemont, P., et al. (2001). Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J Exp Med* 193, 1361-1371.

Lamond, A.I., and Earnshaw, W.C. (1998). Structure and function in the nucleus. *Science* 280, 547-553.

Lavau, C., Marchio, A., Fagioli, M., Jansen, J., Falini, B., Lebon, P., Grosveld, F., Pandolfi, P.P., Pelicci, P.G., and Dejean, A. (1995). The acute promyelocytic leukaemia-associated PML gene is induced by interferon. *Oncogene* 11, 871-876.

Lee, M.H., Lee, S.W., Lee, E.J., Choi, S.J., Chung, S.S., Lee, J.I., Cho, J.M., Seol, J.H., Baek, S.H., Kim, K.I., et al. (2006). SUMO-specific protease SUSP4 positively regulates p53 by promoting Mdm2 self-ubiquitination. *Nat Cell Biol* 8, 1424-1431.

Li, T., Santockyte, R., Shen, R.F., Tekle, E., Wang, G., Yang, D.C., and Chock, P.B. (2006). Expression of SUMO-2/3 induced senescence through p53- and pRB-mediated pathways. *J Biol Chem* 281, 36221-36227.

Liew, C.W., Sun, H., Hunter, T., and Day, C.L. (2010). RING domain dimerization is essential for RNF4 function. *Biochem J* 431, 23-29.

Lin, D.Y., Huang, Y.S., Jeng, J.C., Kuo, H.Y., Chang, C.C., Chao, T.T., Ho, C.C., Chen, Y.C., Lin, T.P., Fang, H.I., et al. (2006). Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Mol Cell* 24, 341-354.

Lorick, K.L., Jensen, J.P., Fang, S., Ong, A.M., Hatakeyama, S., and Weissman, A.M. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11364-11369.

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

Maroui, M.A., Kheddache-Atmane, S., El Asmi, F., Dianoux, L., Aubry, M., and Chelbi-Alix, M.K. (2012). Requirement of PML SUMO interacting motif for RNF4- or arsenic trioxide-induced degradation of nuclear PML isoforms. *PLoS One* 7, e44949.

Maroui, M.A., Pampin, M., and Chelbi-Alix, M.K. (2011). Promyelocytic leukemia isoform IV confers resistance to encephalomyocarditis virus via the sequestration of 3D polymerase in nuclear bodies. *J Virol* 85, 13164-13173.

- Matera, A.G. (1999). Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol* 9, 302-309.
- Matic, I., Macek, B., Hilger, M., Walther, T.C., and Mann, M. (2008). Phosphorylation of SUMO-1 occurs in vivo and is conserved through evolution. *J Proteome Res* 7, 4050-4057.
- Matic, I., Schimmel, J., Hendriks, I.A., van Santen, M.A., van de Rijke, F., van Dam, H., Gnad, F., Mann, M., and Vertegaal, A.C. (2010). Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif. *Mol Cell* 39, 641-652.
- Matunis, M.J. (2006). Isolation and fractionation of rat liver nuclear envelopes and nuclear pore complexes. *Methods* 39, 277-283.
- Matunis, M.J., Zhang, X.D., and Ellis, N.A. (2006). SUMO: the glue that binds. *Dev Cell* 11, 596-597.
- Melchior, F., Schergaut, M., and Pichler, A. (2003). SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends Biochem Sci* 28, 612-618.
- Melnick, A., Fruchtman, S., Zelent, A., Liu, M., Huang, Q., Boczkowska, B., Calasanz, M., Fernandez, A., Licht, J.D., and Najfeld, V. (1999). Identification of novel chromosomal rearrangements in acute myelogenous leukemia involving loci on chromosome 2p23, 15q22 and 17q21. *Leukemia* 13, 1534-1538.
- Melnick, A., and Licht, J.D. (1999). Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93, 3167-3215.
- Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M., and Caput, D. (2000). Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J Biol Chem* 275, 36316-36323.
- Miteva, M., Keusekotten, K., Hofmann, K., Praefcke, G.J., and Dohmen, R.J. (2010). Sumoylation as a signal for polyubiquitylation and proteasomal degradation. *Subcell Biochem* 54, 195-214.
- Miyazaki, Y., Yamasaki, M., Mishima, H., Mansho, K., Tachibana, H., and Yamada, K. (2001). Oxidative stress by visible light irradiation suppresses immunoglobulin production in mouse spleen lymphocytes. *Biosci Biotechnol Biochem* 65, 593-598.
- Moriuchi, H., Moriuchi, M., Smith, H.A., Straus, S.E., and Cohen, J.I. (1992). Varicella-zoster virus open reading frame 61 protein is functionally homologous to herpes simplex virus type 1 ICP0. *J Virol* 66, 7303-7308.
- Morrison, N., Goddard, J.P., Ledbetter, D.H., Boyd, E., Bourn, D., and Connor, J.M. (1991). Chromosomal assignment of a large tRNA gene cluster (tRNA(Leu), tRNA(Gln), tRNA(Lys), tRNA(Arg), tRNA(Gly)) to 17p13.1. *Hum Genet* 87, 226-230.

- Mukhopadhyay, D., and Riezman, H. (2007). Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315, 201-205.
- Muller, S., Matunis, M.J., and Dejean, A. (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J* 17, 61-70.
- Muller, S., Miller, W.H., Jr., and Dejean, A. (1998). Trivalent antimonials induce degradation of the PML-RAR oncoprotein and reorganization of the promyelocytic leukemia nuclear bodies in acute promyelocytic leukemia NB4 cells. *Blood* 92, 4308-4316.
- Nacerddine, K., Lehembre, F., Bhaumik, M., Artus, J., Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C., Pandolfi, P.P., and Dejean, A. (2005). The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell* 9, 769-779.
- Nasr, R., Guillemain, M.C., Ferhi, O., Soilihi, H., Peres, L., Berthier, C., Rousselot, P., Robledo-Sarmiento, M., Lallemand-Breitenbach, V., Gourmel, B., et al. (2008). Eradication of acute promyelocytic leukemia-initiating cells through PML-RARA degradation. *Nat Med* 14, 1333-1342.
- Ni, J., Chen, G., Zhu, J., Zhong, H., Tang, W., Li, X., Xiong, S., Shen, Z., Chen, S., Wang, Z., et al. (1997). [Effects of arsenic trioxide on the subcellular localization of PML/PML-RARalpha protein in leukemic cells]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 18, 32-34.
- Nisole, S., Maroui, M.A., Mascle, X.H., Aubry, M., and Chelbi-Alix, M.K. (2013). Differential Roles of PML Isoforms. *Front Oncol* 3, 125.
- Nisole, S., Stoye, J.P., and Saib, A. (2005). TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* 3, 799-808.
- Noso, S., Fujisawa, T., Kawabata, Y., Asano, K., Hiromine, Y., Fukai, A., Ogihara, T., and Ikegami, H. (2007). Association of small ubiquitin-like modifier 4 (SUMO4) variant, located in IDDM5 locus, with type 2 diabetes in the Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 2358-2362.
- Palvimo, J.J. (2007). PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription. *Biochem Soc Trans* 35, 1405-1408.
- Pampin, M., Simonin, Y., Blondel, B., Percherancier, Y., and Chelbi-Alix, M.K. (2006). Cross talk between PML and p53 during poliovirus infection: implications for antiviral defense. *J Virol* 80, 8582-8592.
- Pandolfo, I., Longo, M., Girone, G., Gaeta, M., Blandino, A., and Salvi, L. (1990). [Trans-sphenoidal spread of rhinopharyngeal neoplasms. Correlations between computerized tomography and magnetic resonance]. *Radiol Med* 80, 645-648.

- Papouli, E., Chen, S., Davies, A.A., Huttner, D., Krejci, L., Sung, P., and Ulrich, H.D. (2005). Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. *Mol Cell* 19, 123-133.
- Pelzer, C., Kassner, I., Matentzoglou, K., Singh, R.K., Wollscheid, H.P., Scheffner, M., Schmidtke, G., and Groettrup, M. (2007). UBE1L2, a novel E1 enzyme specific for ubiquitin. *J Biol Chem* 282, 23010-23014.
- Peng, H., Begg, G.E., Schultz, D.C., Friedman, J.R., Jensen, D.E., Speicher, D.W., and Rauscher, F.J., 3rd (2000). Reconstitution of the KRAB-KAP-1 repressor complex: a model system for defining the molecular anatomy of RING-B box-coiled-coil domain-mediated protein-protein interactions. *J Mol Biol* 295, 1139-1162.
- Perry, J.J., Tainer, J.A., and Boddy, M.N. (2008). A SIM-ultaneous role for SUMO and ubiquitin. *Trends Biochem Sci* 33, 201-208.
- Pfander, B., Moldovan, G.L., Sacher, M., Hoege, C., and Jentsch, S. (2005). SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* 436, 428-433.
- Pickart, C.M., and Rose, I.A. (1985). Functional heterogeneity of ubiquitin carrier proteins. *J Biol Chem* 260, 1573-1581.
- Pickart, C.M., and Rose, I.A. (1985). Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase acts on ubiquitin carboxyl-terminal amides. *J Biol Chem* 260, 7903-7910.
- Plechanovova, A., Jaffray, E.G., McMahon, S.A., Johnson, K.A., Navratilova, I., Naismith, J.H., and Hay, R.T. (2011). Mechanism of ubiquitylation by dimeric RING ligase RNF4. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1052-1059.
- Poulsen, S.L., Hansen, R.K., Wagner, S.A., van Cuijk, L., van Belle, G.J., Streicher, W., Wikstrom, M., Choudhary, C., Houtsmuller, A.B., Marteijn, J.A., et al. (2013). RNF111/Arkadia is a SUMO-targeted ubiquitin ligase that facilitates the DNA damage response. *J Cell Biol* 201, 797-807.
- Praefcke, G.J., Hofmann, K., and Dohmen, R.J. (2012). SUMO playing tag with ubiquitin. *Trends Biochem Sci* 37, 23-31.
- Prudden, J., Pebernard, S., Raffa, G., Slavin, D.A., Perry, J.J., Tainer, J.A., McGowan, C.H., and Boddy, M.N. (2007). SUMO-targeted ubiquitin ligases in genome stability. *EMBO J* 26, 4089-4101.
- Puvion-Dutilleul, F., Legrand, V., Mehtali, M., Chelbi-Alix, M.K., de The, H., and Puvion, E. (1999). Deletion of the fiber gene induces the storage of hexon and penton base proteins in PML/Sp100-containing inclusions during adenovirus infection. *Biol Cell* 91, 617-628.
- Rabellino, A., and Scaglioni, P.P. (2013). PML Degradation: Multiple Ways to Eliminate PML. *Front Oncol* 3, 60.

- Reichelt, M., Wang, L., Sommer, M., Perrino, J., Nour, A.M., Sen, N., Baiker, A., Zerboni, L., and Arvin, A.M. (2011). Entrapment of viral capsids in nuclear PML cages is an intrinsic antiviral host defense against varicella-zoster virus. *PLoS Pathog* 7, e1001266.
- Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., et al. (2001). The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J* 20, 2140-2151.
- Rodriguez, M.S., Dargemont, C., and Hay, R.T. (2001). SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* 276, 12654-12659.
- Rowley, J.D., Golomb, H.M., and Dougherty, C. (1977). 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet* 1, 549-550.
- Scaglioni, P.P., and Pandolfi, P.P. (2003). Medicine: taking apart a cancer protein. *Nature* 426, 512-513.
- Scaglioni, P.P., Yung, T.M., Cai, L.F., Erdjument-Bromage, H., Kaufman, A.J., Singh, B., Teruya-Feldstein, J., Tempst, P., and Pandolfi, P.P. (2006). A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. *Cell* 126, 269-283.
- Schmitz, M.L., and Grishina, I. (2012). Regulation of the tumor suppressor PML by sequential post-translational modifications. *Front Oncol* 2, 204.
- Schroeter, H., Boyd, C.S., Ahmed, R., Spencer, J.P., Duncan, R.F., Rice-Evans, C., and Cadenas, E. (2003). c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated modulation of brain mitochondria function: new target proteins for JNK signalling in mitochondrion-dependent apoptosis. *Biochem J* 372, 359-369.
- Shen, L.N., Geoffroy, M.C., Jaffray, E.G., and Hay, R.T. (2009). Characterization of SENP7, a SUMO-2/3-specific isopeptidase. *Biochem J* 421, 223-230.
- Shen, T.H., Lin, H.K., Scaglioni, P.P., Yung, T.M., and Pandolfi, P.P. (2006). The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol Cell* 24, 331-339.
- Song, J., Durrin, L.K., Wilkinson, T.A., Krontiris, T.G., and Chen, Y. (2004). Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14373-14378.
- Song, J., Zhang, Z., Hu, W., and Chen, Y. (2005). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) recognition of a SUMO binding motif: a reversal of the bound orientation. *J Biol Chem* 280, 40122-40129.
- Stadler, M., Chelbi-Alix, M.K., Koken, M.H., Venturini, L., Lee, C., Saib, A., Quignon, F., Pelicano, L., Guillemain, M.C., Schindler, C., et al. (1995). Transcriptional induction

of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene* 11, 2565-2573.

Sternsdorf, T., Grotzinger, T., Jensen, K., and Will, H. (1997). Nuclear dots: actors on many stages. *Immunobiology* 198, 307-331.

Sternsdorf, T., Jensen, K., and Will, H. (1997). Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *J Cell Biol* 139, 1621-1634.

Sternsdorf, T., Jensen, K., Zuchner, D., and Will, H. (1997). Cellular localization, expression, and structure of the nuclear dot protein 52. *J Cell Biol* 138, 435-448.

Stoffler, D., Fahrenkrog, B., and Aebi, U. (1999). The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 11, 391-401.

Su, H.L., and Li, S.S. (2002). Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins. *Gene* 296, 65-73.

Sun, Q., Chen, K., and Zhang, S. (2008). Crosstalk triggered safety standby pacing associated with an improperly seated ventricular lead. *Europace* 10, 75-76.

Tagata, Y., Yoshida, H., Nguyen, L.A., Kato, H., Ichikawa, H., Tashiro, F., and Kitabayashi, I. (2008). Phosphorylation of PML is essential for activation of C/EBP epsilon and PU.1 to accelerate granulocytic differentiation. *Leukemia* 22, 273-280.

Tang, Q., Bell, P., Tegtmeyer, P., and Maul, G.G. (2000). Replication but not transcription of simian virus 40 DNA is dependent on nuclear domain 10. *J Virol* 74, 9694-9700.

Tatham, M.H., Geoffroy, M.C., Shen, L., Plechanovova, A., Hattersley, N., Jaffray, E.G., Palvimo, J.J., and Hay, R.T. (2008). RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat Cell Biol* 10, 538-546.

Tatham, M.H., and Hay, R.T. (2009). FRET-based in vitro assays for the analysis of SUMO protease activities. *Methods Mol Biol* 497, 253-268.

Tatham, M.H., Jaffray, E., Vaughan, O.A., Desterro, J.M., Botting, C.H., Naismith, J.H., and Hay, R.T. (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* 276, 35368-35374.

Tatham, M.H., Kim, S., Jaffray, E., Song, J., Chen, Y., and Hay, R.T. (2005). Unique binding interactions among Ubc9, SUMO and RanBP2 reveal a mechanism for SUMO paralog selection. *Nat Struct Mol Biol* 12, 67-74.

Tatham, M.H., Kim, S., Jaffray, E., Song, J., Chen, Y., and Hay, R.T. (2005). Unique binding interactions among Ubc9, SUMO and RanBP2 reveal a mechanism for SUMO paralog selection. *Nat Struct Mol Biol* 12, 67-74.

- Tavalai, N., Adler, M., Scherer, M., Riedl, Y., and Stamminger, T. (2011). Evidence for a dual antiviral role of the major nuclear domain 10 component Sp100 during the immediate-early and late phases of the human cytomegalovirus replication cycle. *J Virol* 85, 9447-9458.
- Tavalai, N., Kraiger, M., Kaiser, N., and Stamminger, T. (2008). Insertion of an EYFP-pp71 (UL82) coding sequence into the human cytomegalovirus genome results in a recombinant virus with enhanced viral growth. *J Virol* 82, 10543-10555.
- Tavalai, N., and Stamminger, T. (2011). Intrinsic cellular defense mechanisms targeting human cytomegalovirus. *Virus Res* 157, 128-133.
- Tempe, D., Piechaczyk, M., and Bossis, G. (2008). SUMO under stress. *Biochem Soc Trans* 36, 874-878.
- Terris, B., Baldin, V., Dubois, S., Degott, C., Flejou, J.F., Henin, D., and Dejean, A. (1995). PML nuclear bodies are general targets for inflammation and cell proliferation. *Cancer Res* 55, 1590-1597.
- Thompson, L.H., and Hinz, J.M. (2009). Cellular and molecular consequences of defective Fanconi anemia proteins in replication-coupled DNA repair: mechanistic insights. *Mutat Res* 668, 54-72.
- Ulrich, H.D. (2005). Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: a plea of no contest. *Trends Cell Biol* 15, 525-532.
- Ulrich, H.D. (2005). SUMO modification: wrestling with protein conformation. *Curr Biol* 15, R257-259.
- Ulrich, H.D., Vogel, S., and Davies, A.A. (2005). SUMO keeps a check on recombination during DNA replication. *Cell Cycle* 4, 1699-1702.
- Uzunova, K., Gottsche, K., Miteva, M., Weisshaar, S.R., Glanemann, C., Schnellhardt, M., Niessen, M., Scheel, H., Hofmann, K., Johnson, E.S., et al. (2007). Ubiquitin-dependent proteolytic control of SUMO conjugates. *J Biol Chem* 282, 34167-34175.
- van Wijk, S.J., and Timmers, H.T. (2010). The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *FASEB J* 24, 981-993.
- Wang, C.Y., Podolsky, R., and She, J.X. (2006). Genetic and functional evidence supporting SUMO4 as a type 1 diabetes susceptibility gene. *Ann N Y Acad Sci* 1079, 257-267.
- Wei, X., Yu, Z.K., Ramalingam, A., Grossman, S.R., Yu, J.H., Bloch, D.B., and Maki, C.G. (2003). Physical and functional interactions between PML and MDM2. *J Biol Chem* 278, 29288-29297.

- Weidtkamp-Peters, S., Lenser, T., Negorev, D., Gerstner, N., Hofmann, T.G., Schwanitz, G., Hoischen, C., Maul, G., Dittrich, P., and Hemmerich, P. (2008). Dynamics of component exchange at PML nuclear bodies. *J Cell Sci* 121, 2731-2743.
- Weisshaar, S.R., Keusekotten, K., Krause, A., Horst, C., Springer, H.M., Gottsche, K., Dohmen, R.J., and Praefcke, G.J. (2008). Arsenic trioxide stimulates SUMO-2/3 modification leading to RNF4-dependent proteolytic targeting of PML. *FEBS Lett* 582, 3174-3178.
- Windheim, M., Peggie, M., and Cohen, P. (2008). Two different classes of E2 ubiquitin-conjugating enzymes are required for the mono-ubiquitination of proteins and elongation by polyubiquitin chains with a specific topology. *Biochem J* 409, 723-729.
- Xie, J., Zhu, J., Yang, H., Weng, S., Chen, C., Chen, H., Xie, Q., Li, M., and He, J. (2007). RING finger proteins of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) function as ubiquitin ligase enzymes. *Virus Res* 123, 170-177.
- Xie, Y., Kerscher, O., Kroetz, M.B., McConchie, H.F., Sung, P., and Hochstrasser, M. (2007). The yeast Hex3.Slx8 heterodimer is a ubiquitin ligase stimulated by substrate sumoylation. *J Biol Chem* 282, 34176-34184.
- Yehuda-Gafni, O., Cividalli, G., Abrahamov, A., Weintrob, M., Neriah, S.B., Cohen, R., and Abeliovich, D. (2002). Fluorescence in situ hybridization analysis of the cryptic t(12;21) (p13;q22) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 132, 61-64.
- Yin, Y., Seifert, A., Chua, J.S., Maure, J.F., Golebiowski, F., and Hay, R.T. (2012). SUMO-targeted ubiquitin E3 ligase RNF4 is required for the response of human cells to DNA damage. *Genes Dev* 26, 1196-1208.
- Yoshida, H., Ichikawa, H., Tagata, Y., Katsumoto, T., Ohnishi, K., Akao, Y., Naoe, T., Pandolfi, P.P., and Kitabayashi, I. (2007). PML-retinoic acid receptor alpha inhibits PML IV enhancement of PU.1-induced C/EBPepsilon expression in myeloid differentiation. *Mol Cell Biol* 27, 5819-5834.
- Yun, C., Wang, Y., Mukhopadhyay, D., Backlund, P., Kolli, N., Yergey, A., Wilkinson, K.D., and Dasso, M. (2008). Nucleolar protein B23/nucleophosmin regulates the vertebrate SUMO pathway through SENP3 and SENP5 proteases. *J Cell Biol* 183, 589-595.
- Zhang, D.Y., and Borden, W.T. (2002). Do deviations from bond enthalpy additivity define the thermodynamic stabilities of diradicals? *J Org Chem* 67, 3989-3995.
- Zhong, S., Salomoni, P., and Pandolfi, P.P. (2000). The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol* 2, E85-90.

Zhu, J., Koken, M.H., Quignon, F., Chelbi-Alix, M.K., Degos, L., Wang, Z.Y., Chen, Z., and de The, H. (1997). Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3978-3983.

Posttranslational modifications such as sumoylation, ubiquitination or phosphorylation regulate multiple functions of the promyelocytic leukemia protein (PML) also the morphology of PML nuclear bodies. In this study, the influence of different stress factors as arsenic trioxide (ATO) and sorbitol on endogenous and overexpressed PML has been analysed to investigate the STUbL (sumo-targeted ubiquitin ligase) - signalling pathway of RNF4 (*RING finger protein 4*).

Sumoylation of PML is a key regulator of PML stability in response to extracellular or intracellular stimuli. This study shows PML degradation via poly-sumoylation induced by ATO, a therapeutic agent for treatment of acute promyelocytic leukemia (APL). Sumoylated PML is targeted for ubiquitination by the E3 ligase RNF4 prior to the proteasome-mediated degradation. Furthermore, I was able to demonstrate that RNF4 interacts with PML as substrate *in vivo* using its two essential SIMs, SIM2 and SIM4.

In contrast to ATO sorbitol treatment leads to increased PML-nuclear bodies (PML-NBs) in number and size and to a stabilization of PML, which is not affected by the inhibition of the 26S proteasome. Due to the discrepancy between the effects of ATO and sorbitol on PML and PML-NBs, the activity of cellular signalling cascades has been analysed upon those stress factors.

After quantitative analysis of kinases, there is evidence that osmotic stress leads to the activation of the SAPK/JNK (*Stress-activated Protein Kinase/Jun N-terminal Kinase*) - and ERK (*Extracellular-signal Regulated Kinase*) - signalling pathways.

In conclusion, ATO leads to the proteolytic degradation of PML due to its sumo-dependant ubiquitination mediated by RNF4. So I assume, that in contrast to ATO, after osmotic stress PML is stabilized through its own phosphorylation via the SAPK/JNK- and the ERK-signalling cascade.

Posttranslationale Modifikationen des Proteins der Promyelozytenleukämie (PML), zum Beispiel durch Phosphorylierung, Ubiquitinierung oder SUMOylierung, beeinflussen allgemein sowohl die Funktion von PML als auch die Morphologie von PML-Kernkörpern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss unterschiedlicher Stressfaktoren auf endogenes sowie überexprimiertes PML analysiert. Somit konnte gezeigt werden, dass PML über den STUbL (*SUMO-targeted ubiquitin ligase*) - Signalweg durch die humane Ubiquitinligase RNF4 (*RING finger protein 4*) abgebaut wird.

Arsentrioxid (ATO), das in der Therapie der akuten Promyelozytenleukämie (APL) Verwendung findet, führt zur PolySUMOylierung von PML. PolySUMOyliertes PML wird schließlich von der SUMO-abhängigen Ubiquitinligase RNF4 erkannt und proteasomal abgebaut. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass RNF4 *in vivo* über seine beiden essentiellen SIMs, SIM2 und SIM4, mit PML als Substrat interagiert.

Eine Stressinduktion mit Sorbitol führte im Gegensatz zu ATO zur Stabilisierung von PML. Dieser Effekt war unabhängig von der Inhibition des Proteasoms. Darüber hinaus beeinflusst osmotischer Stress die Anzahl und Größe der PML-Kernkörper. Es konnten, verglichen mit ATO, mehr und vor allem größere PML-Kernkörper nachgewiesen werden. Da ATO und Sorbitol unterschiedliche oder sogar gegensätzliche Auswirkungen auf die Morphologie von PML-Kernkörpern hatten, wurde die Aktivität mehrerer zellulärer Signalkaskaden in ATO sowie Sorbitol behandelten Zellen mit Hilfe von Proteinmikroarrays untersucht. Die Analyse zeigt einen Vergleich zwischen dem Effekt von Sorbitol und ATO. Der osmotische Stress führte, im Gegensatz zu ATO, zur Aktivierung der SAPK/JNK (*Stress-activated Protein Kinase/Jun N-terminal Kinase*) - sowie ERK (*Extracellular-signal Regulated Kinase*) – Signalkaskade.

Demnach führt ATO zum proteasomalen Abbau von PML durch die SUMO-abhängige Ubiquitinligase RNF4. Osmotischer Stress dagegen stabilisiert PML, vermutlich durch dessen Phosphorylierung über die SAPK/JNK- bzw. ERK-Signalkaskade.

Als erstes möchte ich meiner Mutter für ihre aufopferungsvolle Unterstützung danken. Ohne Sie wäre die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Du bist die beste Mama der Welt. Danke für alles; Ich hab Dich lieb. Diese Arbeit ist auch für Dich!

Lieber Christoph, Dir danke ich weil Du immer zu mir stehst. Egal was um uns herum geschieht, wir halten immer zusammen.

Felix und Flora, Euch danke ich von Herzen, dass ihr in den letzten drei Wochen so liebe und gut gelaunte Kinder wart. Ich liebe Euch, Ihr seid mein größtes Glück.

Nun möchte ich natürlich auch meinem Chef Dr. Gerrit Praefcke für seine Unterstützung danken. Lieber Gerrit, du hast mir in den letzten Jahren viel beigebracht und ich glaube Du bist einer der Gründe, warum ich überhaupt eine Promotion begonnen habe. Dafür, und für deine Freundschaft, bin ich Dir sehr dankbar.

Prof. Dr. Jürgen Dohmen danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens dieser Arbeit und für die nette Zusammenarbeit in den letzten Jahren.

Prof. Dr. Günter Schwarz danke ich für die Bereitschaft, den Vorsitz meiner Verteidigung zu übernehmen und für die netten Unterhaltungen bei diversen ZMMK-Meetings.

Dr. Veronika Bade danke ich, weil wir nicht nur beruflich, sondern auch privat gut harmonisiert haben. Im Labor hatte sie immer ein offenes Ohr und mindestens eine helfende Hand. Über unsere gemeinsame Freizeit außerhalb des Instituts könnte ich mittlerweile ein Buch schreiben. Vielleicht tu ich das nach Abgabe dieser Arbeit;-)

Katrin Meyer-Teschendorf danke ich nicht nur für die Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit, sondern auch für ihre starken Nerven mit mir. Auf Dich ist immer Verlass. Danke, dass Du mich heute am Tag vor der Abgabe nicht alleine gelassen hast.

Anke, Dir danke ich auch für die vergangenen zwei Wochen. Auch wenn ich zwischendurch etwas unter Strom stand, so hatten wir doch eine nette Zeit im Labor.

Dr. Christoph Biversi, Dir danke ich für Dein unermüdliches Interesse an meiner Forschung. Ich kenne niemanden in meinem Freundeskreis, der sich länger als 5 Minuten mit mir über meine Arbeit unterhalten wollte. Danke für Deine Freundschaft.

Ich versichere, dass die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Dr.Gerrit Praefcke, Institut für Genetik, Zülpicher Str. 47, 50674 Köln, betreut worden.