

**Untersuchungen zum regulatorischen
Wechselspiel zwischen SUMOylierung und
anderen Proteinmodifikationen am Beispiel der
STAT-Proteine und MAPKAP Kinase 2**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biologin Susan Schwede, geb. Zimnik

geboren am 29.04.1980 in Blankenburg

2011

Die vorliegende Dissertation wurde in der Medizinischen Hochschule Hannover im Zentrum für Biochemie unter der Leitung von Dr. Rainer Niedenthal in der Zeit von Oktober 2007 bis August 2010 durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. rer. nat. M. Gaestel
Abteilung für Physiologische Chemie
Zentrum Biochemie
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. W. Müller
Abteilung für Physiologische Chemie
Zentrum Biochemie
Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 25.11.2010

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Betreuer, Herrn Dr. Rainer Niedenthal, bedanken. Dafür, dass er es mir ermöglicht hat, Arbeiten zu diesem faszinierenden Thema in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen sowie für die Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Matthias Gaestel für die Übernahme des Referats und Herrn Prof. Walter Müller für das Übernehmen des Korreferats.

Eine große Hilfe waren die Kooperationen mit Dr. Oliver Dittrich-Breiholz und Prof. Andreas Pich, wofür ich mich ebenfalls bedanken möchte.

Bedanken möchte ich mich aber auch vor allem bei Herrn Malte Klaus für die mentale Unterstützung im Laboralltag und bei Oliver Scholz für die kleinen Pausen zwischendurch.

Jessica Schwermann danke ich für die stetige Beantwortung gestellter Fragen und ihrer Bereitschaft umgehend Probleme zu lösen.

Herrn Roger Ritter danke ich für die kleinen, aber stets hilfreichen Tipps zwischendurch.

Bedanken möchte ich mich auch bei Britta Oelve für das Verständnis der besonderen Umstände sowie ihrer bedingungslosen Freundschaft während dieser Zeit. Jochen Hoffmann und Wolfgang Drabner und ihren Frauen danke ich für ihre Rücksicht und Geduld während dieser Zeit.

Inbesondere danken möchte ich meiner Familie für die ständige Unterstützung sowie den uneingeschränkten und unerschöpflichen Glauben in meine Person und für die liebevolle Anteilnahme.

Abschließend danke ich Jörn Schwede und seiner Tochter Nora. Jörn für das Miterleben der Freuden, der Rückschläge und der Begeisterung sowie für die Liebe, mit der er im rechten Moment Licht in dunkle Stunden gebracht hat. Nora danke ich für die Erinnerung daran, das Leben auch mal unbeschwert zu sehen.

Zusammenfassung

Die physiologische Aktivität von STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) wird durch verschiedene posttranslationale Modifikationen beeinflusst. So ist die Phosphorylierung an Tyrosin (Tyr, Y) 701 Voraussetzung zur STAT1-Dimerisierung, die SUMOylierung an Lysin (Lys, K) 703 führt zu einer Unterdrückung transkriptioneller Aktivität. Proteinmodifikationen können jedoch auch durch die Interaktion anderer Modifikationen reguliert werden. So konnte bereits mit dem *Ubc9 fusion-directed SUMOylation* (UFDS)-System die Inhibierung der STAT1Y701-Phosphorylierung durch die SUMOylierung des nahe gelegenen K703 gezeigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst ein *in vivo* induzierbares SUMOylierungssystem, das *Ubc9/substrate dimerization-dependent SUMOylation* (USDDS)-System, entwickelt. Dieses System nutzt die Möglichkeit der chemischen Induktion der Dimerisierung zweier Proteindomänen (FRB und FKBP), die an das SUMO-konjugierende Enzym Ubc9 bzw. an das SUMOylierungssubstratprotein fusioniert werden. Durch USDDS wurden für STAT1-FKBP und p53-FKBP die SUMOylierung an den spezifischen SUMOylierungsstellen gezeigt sowie MYF6 und HES1 als neue SUMOylierungssubstrate identifiziert. Des Weiteren konnte die Unterdrückung der STAT1K703-SUMOylierung durch die Interferon- β -induzierte STAT1Y701-Phosphorylierung im USDDS-System nachgewiesen werden, wodurch pY701 und SUMOK703 in STAT1 als zwei sich gegenseitig ausschließende Proteinmodifikationen eines Moleküls beschrieben werden konnten. Der Einsatz massenspektrometrischer Analytik ermöglichte die Identifizierung des STAT3K709 sowie STAT4K667, K669, K673 und K691 als SUMOylierungsstellen. Durch Mutationsanalyse konnte eine weitere SUMOylierungsstelle identifiziert werden: STAT5aK696. Alle ermittelten SUMOylierungsstellen liegen ähnlich wie bei STAT1 in relativer Nähe zu der konservierten Y-Phosphorylierungsstelle. Eine zu STAT1 analoge gegenseitige Beeinflussung der SUMOylierung und der Phosphorylierung ist für STAT5aK696 und STAT5aY694 sehr wahrscheinlich, muss jedoch noch weiter abgeklärt werden. Der Einfluss der STAT5aK696-SUMOylierung auf die transkriptionelle Regulation wurde in einem Microarray untersucht. Einen Unterschied in der Genexpression zwischen STAT5a- und STAT5aK696R-komplementierten Zellen konnte für 32 Gene gezeigt werden. Untersuchungen zum Wechselspiel zwischen SUMOylierung und Phosphorylierung wurden auch für die MAPKAP Kinase MK2 *in vivo* durchgeführt, für die kürzlich eine durch aktivierte MEKK1 induzierte SUMOylierung gezeigt werden konnten. Dabei wurden Hinweise erhalten, dass die Phosphorylierung an MK2S258 sowohl an der Regulation der T208- und T320-Phosphorylierung als auch an der SUMOylierung beteiligt sein könnte. Eine direkte phosphorylierungsabhängige SUMOylierung von T208, S258 oder T320 konnte jedoch nicht gezeigt werden. MK2K339, K359 und K360 konnten durch Massenspektroskopie als

SUMOylierungsstellen identifiziert und durch Mutation bestätigt werden. Die unmittelbare Nähe der MK2-SUMOylierungsstelle K339 zum Kernexportsignal (NES) und die Tatsache, dass K359/360 Teil des Kernlokalisierungssignales (NLS) und der p38 α -Bindedomäne sind, könnte auf eine Beteiligung der SUMOylierung an der MK2-Lokalisation sowie an der Regulation der Interaktion von p38 α /MK2 hindeuten. Eine weitere Funktion der MK2-SUMOylierung könnte in der Proteinstabilisierung liegen, da zum einen in komplementierten MEF-Zellen die Proteinexpression des MK2K339/359/360Rs gegenüber des MK2s geringer ist und zum anderen die transkriptionelle Aktivität bezüglich der untersuchten *Immediate early genes* (IEGs) Fos, Jun, Egr-1 und Ttp durch die Mutation der SUMOylierungsstellen verkürzt zu sein scheint.

Schlagwörter: SUMO (*Small ubiquitin-related modifier*), STAT1 (*Signal transducer and activator of transcription 1*), MAPKAP Kinase 2 (*Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2*)

Abstract

The physiological activity of STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) is influenced by several post translational modifications. Phosphorylation of Tyrosin (Tyr, Y) 701 is required for STAT1 dimerization and SUMOylation at Lysin (Lys, K) 703 represses transcriptional activity. In addition it has been shown that SUMOylation at K703 leads to inhibition of Y701 phosphorylation. In this thesis an *in vivo* inducible SUMOylation system the *Ubc9/substrate dimerization-dependent SUMOylation* (USDDS)-system has been developed. This system uses the possibility of a chemical induced dimerization of two protein domains (FRB and FKBP), which are fused to the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 the or the SUMOylation substrate protein respectively. Using USDDS it was possible to demonstrate the SUMOylation at the already known specific SUMOylation sites of STAT1-FKBP and p53-FKBP as well as to identify MYF6 and HES1 as new SUMOylation substrates. Moreover it was possible to demonstrate by using USDDS that Interferon- β -induced STAT1Y701 phosphorylation leads to repression of STAT1 SUMOylation and therefore that pY701 and SUMOK703 are two mutually exclusive protein modifications in STAT1. Mass spectroscopy analyses revealed STAT3K709 as well as STAT4K667, K669, K673 and K691 as SUMOylation sites. Another SUMOylation site in STAT5a, K696 was identified by mutation analysis. All these identified SUMOylation sites are relatively close located to a conserved Y phosphorylation site like in STAT1. It is therefore likely that SUMOylation of STAT5aK696 and phosphorylation of STAT5aY694 affect themselves similarly as has been shown for K703 and Y701 of STAT1. However this effect could not be verified definitely for STAT5aK696 and Y694 during this thesis. The influence of the STAT5aK696 SUMOylation has been analyzed via microarray. A difference in gene expression levels between STAT5 and STAT5aK696R complemented cells could be observed in 32 genes. Analyses of the interplay between SUMOylation and phosphorylation have also been performed for the MAPKAP kinase MK2 *in vivo* because the stimulation dependent SUMOylation of MK2 has been reported before. These analyses revealed that the MK2 phosphorylation site S258 might be involved in regulating the phosphorylation of T208 and T320 as well as the SUMOylation of MK2. A directly phosphorylation dependent SUMOylation of T208, S258 and T320 could not be shown. MK2K339, K359 and K360 have been identified as SUMOylation sites of MK2 by mass spectroscopy. Mutation of these SUMOylation sites did not reveal any variation in the T208, S258 or T320 phosphorylation of MK2. Because of the close proximity of the MK2 SUMOylation site K339 to the nuclear export signal (NES) and the fact that K359/360 are part of the nuclear localisation signal (NLS) and the p38 α binding domain the SUMOylation of MK2 might be involved in regulating MK2 localization and p38 α interaction. Additionally the MK2 SUMOylation might be involved in protein stability due to the fact that the protein expression of MK2K339/359/360R compared to MK2 is much lower in complemented MEF-cells. Furthermore, the transcriptional activity of the immediate early genes (IEGs) Fos, Jun, Egr-1 and Ttp seems to be reduced due to mutation of the MK2 SUMOylation sites.

Keywords: SUMO (*Small ubiquitin-related modifier*), STAT1 (*Signal transducer and activator of transcription 1*), MAPKAP kinase 2 (*Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2*)

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	2
Abstract	4
Inhaltsverzeichnis	6
1 Einleitung	8
1.1 Posttranslationale Proteinmodifikationen	8
1.2 SUMOylierung	9
1.3 Phosphorylierung	12
1.4 Jak/STAT-Signalweg	14
1.5 MAP Kinase-Kaskade	18
1.6 MK2	19
1.7 Projektbeschreibung	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Laborgeräte	23
2.2 Material	24
2.2.1 Chemikalien.....	24
2.2.2 Antikörper	25
2.2.3 Enzyme	26
2.2.4 Kits	26
2.2.5 Standards	26
2.2.6 Plasmide.....	26
2.2.7 Oligonukleotid-Primer	27
2.3 Methoden	28
2.3.1 Molekularbiologische Methoden.....	28
2.3.2 Zellbiologische Methoden	34
2.3.3 Biochemische Methoden.....	38
3 Ergebnisse	41
3.1 Entwicklung des Ubc9/substrate dimerization-dependent SUMOylation (USDDS)-Systems	41
3.1.1 Induktion substratspezifischer SUMOylierung durch AP21967-abhängige Ubc9-Bindung	42
3.1.2 <i>Ubc9/substrate dimerization-dependent SUMOylation</i> (USDDS) erfolgt an substratspezifischer SUMOylierungsstelle	43
3.1.3 Überprüfung der Funktionalität des <i>Ubc9/substrate dimerization-dependent SUMOylation</i> (USDDS)-Systems und Identifizierung neuer SUMOylierungssubstrate	44
3.2 Untersuchungen zur SUMOylierung und zur Tyrosin-Phosphorylierung der STAT- Proteine	46
3.2.1 Phosphorylierung an STAT1Y701 schließt K703-SUMOylierung an STAT1 aus..	46
3.2.2 pY701 und K703-SUMOylierung an STAT1 schließen sich gegenseitig aus	47
3.2.3 Existieren sich ausschließende Tyrosin-Phosphorylierungen und SUMOylierungen auch bei den anderen Mitgliedern der STAT-Proteinfamilie.....	48
3.2.4 Immortalisierung von STAT5 ^{-/-} -Zellen	60
3.2.5 Komplementation von MEF STAT5 ^{-/-} -Zellen	61

3.3 Untersuchungen zur SUMOylierung und Phosphorylierung der MAPKAP Kinase 2	67
3.3.1 Induktion der MK2-SUMOylierung und -Phosphorylierung an T208, S258 und T320 durch die Koexpression von MEKK1ca	68
3.3.2 Beeinflussung der T208-, S258- und T320-Phosphorylierungen und der MK2-SUMOylierung	69
3.3.4 Identifizierung der MK2-SUMOylierungsstellen	71
3.3.5 Charakterisierung der SUMOylierungsmutante MK2K339/359/360R	76
4 Diskussion	82
4.1 Entwicklung des Ubc9/substrate dimerization-dependent SUMOylation (USDDS)-Systems	82
4.2 Untersuchungen zum Wechselspiel der SUMOylierung und Tyrosin-Phosphorylierung der STAT-Proteine	83
4.3 Untersuchungen zur SUMOylierung und Phosphorylierung der MAPKAP Kinase 2	88
Abkürzungsverzeichnis	93
Anhang	95
Literaturverzeichnis	99
Lebenslauf Susan Schwede	106

1 Einleitung

1.1 Posttranslationale Proteinmodifikationen

Eine unverzichtbare Eigenschaft von Zellen ist die Fähigkeit sensibel, schnell und reversibel auf inter- und extrazelluläre Einflüsse zu reagieren. Eine zentrale Rolle nimmt hierbei die posttranslationale Proteinmodifikation (PTM) ein. Mit Hilfe unterschiedlichster Modifikationen kann die Proteinaktivität, die subzelluläre Lokalisation, die Stabilität oder auch die Interaktion mit anderen Proteinen reguliert werden [1]. Zu diesen Modifikationen gehören unter anderen die gut charakterisierten Vorgänge der Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung oder Glykosylierung. Weiterhin besteht die Möglichkeit Proteinfunktionen durch die kovalente Bindung anderer Proteine, wie Ubiquitin (Ub) oder Ubiquitin-ähnliche Proteine, zu kontrollieren [2]. Die Erkennung von posttranslationalen Modifikationen erfolgt durch spezifische Erkennungs-/Bindungsdomänen der zu rekrutierenden Proteine, wie beispielsweise Ubiquitin-Bindungsdomänen (UBDs) oder Phospho-Bindungsdomänen [3]. Einzelne Proteine können verschiedene Modifikationen aufweisen oder sogar gleichzeitig auf unterschiedlichste Weise modifiziert werden. So weisen Histone beispielsweise eine enorme Modifikationsvielfalt auf. Innerhalb der 100AS des N- oder C-terminalen Endes von Histon H2A, H2B, H3 und H4 sind Lys-Acetylierung, Mono-, Di- oder Trimethylierung, Biotinylierung, Ubiquitinierung, Neddylierung, SUMOylierung und Ser/Thr/Tyr-Phosphorylierung zu finden [4, 5]. Das N-terminale Ende von Histon H3 kann sogar an K4 methyliert und an fünf weiteren Lysinen (K9, K14, K18, K23 und K27) acetyliert werden [6].

In Abhängigkeit des Ortes und der Anzahl der gleichen Modifikation können auch unterschiedliche Funktionen vermittelt werden. Das bekannteste Beispiel ist Ubiquitin, welches als Proprotein synthetisiert wird und durch C-terminale Hydrolasen reift. Die freie Carboxylgruppe des dabei freigelegten Glycin-Glycin Motivs wird für die Knüpfung einer Isopeptidbindung mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysins des Zielproteins benötigt. Mono-Ubiquitinierung löst bei der Verknüpfung mit dem Histon H2B die Methylierung von Histon H3 aus [7]. Die Poly-Ubiquitinierung hingegen, bei der das erste Ubiquitin an ein Substratprotein angehängt und anschließend an das Lys48 dieses Ubiquitins mit der C-terminalen Carboxylgruppe eines weiteren Ubiquitins verknüpft wird, markiert das Zielprotein für den Abbau durch Proteasomen [8]. Die Poly-Ubiquitinierung kann auch Lys63 verknüpft sein und ist dann unter anderem an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B oder an der DNA-Reparatur beteiligt [9, 10].

Eine weitere sehr komplexe Form der Modifizierung erfolgt durch Ubiquitin-ähnliche Modifizierer (*Ubiquitin-like modifiers*' (UBLs)). Bekannte UBLs sind SUMO (small *ubiquitin-related modifier*), Rub1 (NEDD8), ISG15, Apg8 oder Apg12 [2]. Sie werden analog zu Ubiquitin an ein Substrat konjugiert und dienen verschiedensten regulatorischen Vorgängen.

1.2 SUMOylierung

Das SUMO-Protein (*Small ubiquitin-related modifier*) gehört zu der Gruppe der Ubiquitin-*like modifiers* (UBLs). Da SUMO unabhängig in verschiedenen Forschungsgruppen identifiziert wurde, ist es auch als Sentrin, PIC1, GMP, UBL1 und SMT3 bekannt [11].

Analog zu Ubiquitin kann SUMO kovalent an Zielproteine (Substrat) gebunden werden. Bei diesem Vorgang der SUMOylierung wird eine Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin des gereiften SUMO-Protein und der ϵ -Aminogruppe eines Lysins (Lys, K) des Substrates ausgebildet [1]. In Säugern werden vier verschiedene SUMO-Isoformen beschrieben. SUMO1, SUMO2, SUMO3 und SUMO4. SUMO1-SUMO3 werden ubiquitär exprimiert, wohingegen SUMO4 vermutlich hauptsächlich in den Nieren, Lymphknoten und im Gehirn exprimiert wird [12]. Ubiquitin und SUMO-1 stimmen in ihrer Aminosäuresequenz zwar nur zu 18% überein, zeigen jedoch sehr ähnliche drei-dimensionale Strukturen (Abbildung 1). Sie haben kaum unterschiedliche Molekülmassen (Ub 9kDa und SUMO 11kDa) und weisen eine $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ -Faltung sowie ein C-terminales Glycin-Glycin-Motiv auf. Abweichungen zeigen sich im N-terminalen Bereich, welcher bei SUMO-1 aus einer langen, flexiblen Verlängerung besteht [1].

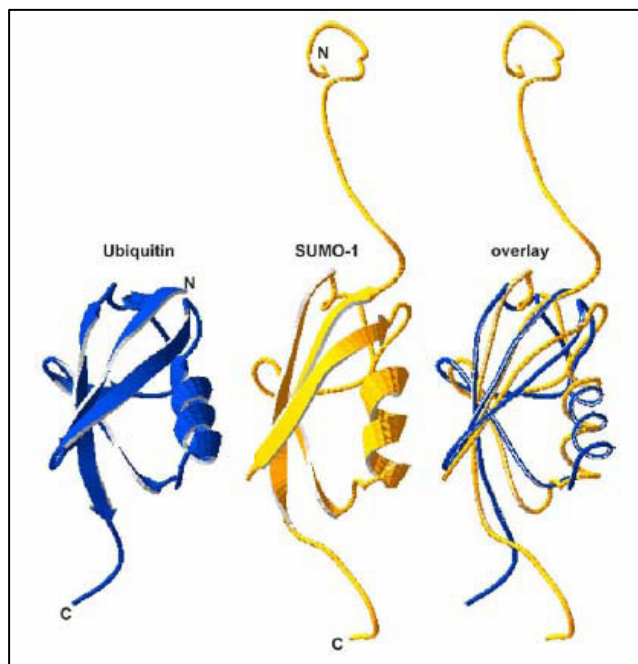


Abbildung 1: Strukturvergleich von Ubiquitin und humanem SUMO1. Charakteristisch sind für beide Proteine die $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ -Faltung und das Doppel-Glycin-Motiv am C-Terminus. SUMO-1 unterscheidet sich deutlich am N-Terminus durch eine lange und flexible Verlängerung. Die Strukturbestimmung von Ubiquitin erfolgte über Röntgenstrahlenkristallographie, SUMO mittels NMR. Abbildung übernommen von Dohmen et al. 2004 [1]

Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zwischen SUMO1 und SUMO2/SUMO3 beträgt ~50%. SUMO2 und SUMO3 stimmen zu ~95% in ihrer Aminosäuresequenz überein und werden daher häufig gemeinsam als SUMO2/3 betrachtet. Obwohl alle SUMO-Isoformen von gleichen Enzymen aktiviert und konjugiert werden, scheinen sich die

Funktionen von SUMO1 und SUMO2/3 teilweise zu unterscheiden. SUMO2/3 liegt überwiegend unkonjugiert in der Zelle vor, wohingegen die Mehrheit des SUMO1 an andere Proteine gebunden ist. Unterschiede zwischen den verschiedenen Isoformen bestehen auch in der Auswahl der Zielproteine (Substrate). So ist RanGAP1 das Hauptsubstrat von SUMO1, wird aber kaum von SUMO2/3 modifiziert [11].

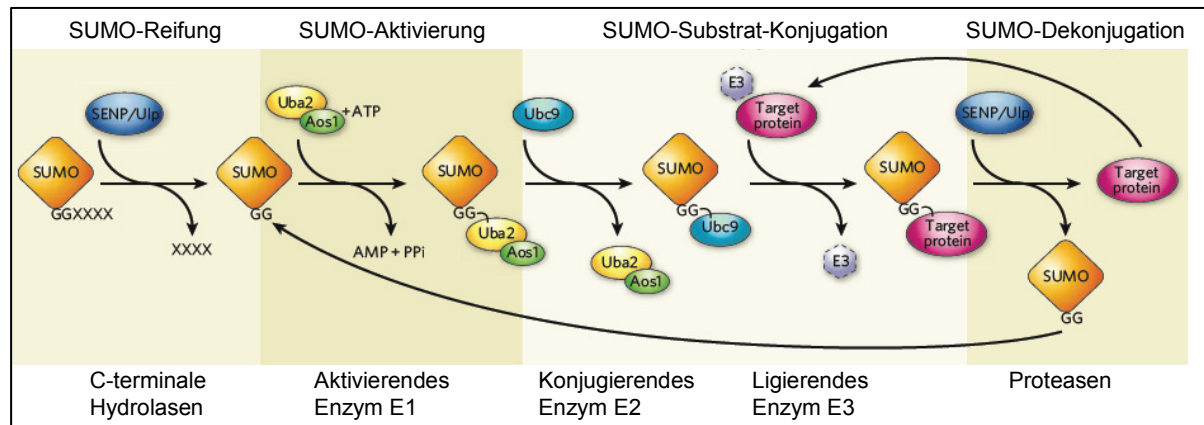


Abbildung 2: SUMO-Konjugation eines Zielproteins. Das SUMO-Proprotein wird durch C-terminale Hydrolasen gespalten, so dass ein Doppel-Glycin-Motiv frei zugänglich wird. Bei der ATP-abhängigen Aktivierung wird SUMO auf das E1-aktivierende Enzym (Aos1/Uba2-Heterodimer), unter Ausbildung eines Thioesters, übertragen. Anschließend erfolgt die Übertragung von SUMO auf das konjugierende E2 Enzym Ubc9. Bei der Konjugation wird mit Hilfe des E3 ligierenden Enzyms das Zielprotein (Substrat) und SUMO in unmittelbare Nähe gebracht und eine Isopeptidbindung ausgebildet. Dieser Vorgang ist reversibel. Durch Proteasen kann die Dekonjugation (Trennung von SUMO und Substrat) katalysiert werden. Abbildung verändert nach Meulmeester [13]

Abbildung 2 zeigt schematisch den Vorgang der SUMO-Konjugation an ein Zielprotein (Substrat). Da SUMO als Vorläuferprotein synthetisiert wird, müssen Hydrolasen vor der Konjugation das C-terminale Glycin-Glycin Motiv (GG) durch Abspaltung einiger C-terminalen AS (xxxx) zugänglich machen. Das wird im Säuger durch sechs verschiedene sentrienspezifische Proteasen katalysiert (SEN1-3 und SEN5-7) [14, 15]. In der Hefe werden die entsprechenden Proteasen mit C-terminaler Hydrolaseaktivität als Ulp1/Ulp2 (*ubiquitin like specific protease*) bezeichnet [16, 17]. Die SUMO-Aktivierung erfolgt unter ATP-Verbrauch durch E1-aktivierende Enzyme. E1 besteht aus einem Aos1-Uba2-Heterodimer [18]. Als aktive Stelle (*active site*) in der UBA2-Untereinheit dient eine Cysteinseitenkette (-SH). Sie wird für die Ausbildung des SUMO-E1-Thioesters benötigt. Anschließend wird aktiviertes SUMO auf das E2-konjugierende Enzym Ubc9 übertragen [2]. Im letzten Schritt (SUMO-Substrat-Konjugation), der manchmal durch eine E3 Ligase vermittelt wird, kommt es zur Ausbildung der Isopeptidbindung zwischen SUMO (C-terminales Glycin) und dem Zielprotein. Bei einer Vielzahl der SUMO-Substrate erfolgt diese Bindung an ein Lysin (K), welches innerhalb der Konsensussequenz $\Psi KxE/D$ liegt. Ψ ist hierbei eine Aminosäure mit hydrophober Seitenkette, vorzugsweise Leucin (L), Isoleucin (I) oder Valin (V). X bezeichnet jede beliebige Aminosäure, gefolgt von einer Glutaminsäure (E) oder Asparaginsäure (D) [1, 19]. Im Jahr 2006 wurden zwei verschiedene Varianten dieser

SUMO-Konsensussequenz identifiziert. Zum einen das phosphorylierungsabhängige SUMOylierungsmotiv (PDSM, *phosphorylation-dependent SUMOylation motif*), welches beispielsweise in HSF1, SNIP1 und MEF2 gefunden wurde [20]. Dieses Motiv besteht aus der konventionellen Konsensussequenz, gefolgt von einem phosphoryliertem Serin (S) und einem Prolin (P): $\Psi KxExxpSP$. Die zusätzliche negative Ladung der Phosphatgruppe scheint hierbei die Substrat-Ubc9-Interaktion zu erhöhen. Dieser Mechanismus breitet sich vermutlich auch auf andere Phosphorylierungsstellen aus und liefert so eine Möglichkeit der Regulation von SUMOylierungen. Weitere Sequenzanalysen haben die wichtige Rolle negativ geladener Reste C-terminal des Akzeptor-Lysins bei vielen SUMOylierungssubstraten belegt, wodurch sich die zweite Variante der konventionellen SUMOylierungs-Konsensussequenz definiert: das negativ geladene aminosäureabhängige SUMOylierungsmotiv (NDSM, *negatively charged amino-acid-dependent SUMOylation motif*) [21]. Bisher sind drei verschiedene Gruppen von SUMO-E3-Ligasen beschrieben worden. Die erste Gruppe von Ligasen ist die PIAS (*protein inhibitor of activated STAT (signal transducer and activator of transcription)*)-Proteinfamilie. Sie besitzen, analog zu Ubiquitin-E3-Ligasen, eine RING-Finger-ähnliche Struktur und binden direkt an Ubc9 und an das Substrat. Zur zweiten Gruppe gehört ein 358kDa großes Protein, das RanBP2/Nup358. In RanBP2 ist eine Domäne von 30kDa für die katalytische Aktivität verantwortlich. Sie besitzt weder ein RING-Finger-Motiv noch zeigt sie andere Homologien zu Ubiquitin-E3-Ligasen. Bei der Konjugation erfolgt die Bindung nur an Ubc9 und nicht an das Substrat. Pc2 ein Polycomb Protein wurde ebenfalls als E3-Ligase beschrieben. Bekannt ist bereits, dass dieses Protein keine Verwandtschaft mit PIAS oder RanBP2 aufweist [19]. Es zeigt beispielsweise E3-Aktivität für den Korepressor CtBP und besitzt zwei funktionelle Domänen. Eine Domäne im C-terminalen Bereich mit Adapterfunktion, die Ubc9 und das Substrat in räumliche Nähe bringt und eine zweite, N-terminale Domäne mit E3-Aktivität [22]. Die SUMOylierung ist ein dynamischer und reversibler Prozess. Die SUMO-Dekonjugation, also die SUMO-Abspaltung vom Substrat, wird auch durch Ulp/SENPs katalysiert, die zusätzlich zu der C-terminalen Hydrolaseaktivität, die für die Reifung von neu synthetisiertem SUMO-Protein benötigt wird, eine Funktion als Isopeptidase besitzen. SENPs zeigen unterschiedliche Vorlieben bezüglich ihrer Aktivität bei der Reifung, der Isopeptidspaltung und bei der Wahl der verschiedenen SUMO-Proteine. Zum Beispiel dekonjugieren SENP3 und SENP5 vorzugsweise SUMO2/3 vom Substrat [23, 24]. Des Weiteren unterscheiden sie sich in ihrer Lokalisierung. Ulp1 und SENP2 sind im Kernporenkomplex angereichert [17, 25, 26], SENP5 im Zellkern, obwohl auch kleine Bruchstücke im Zytoplasma gefunden wurden [23, 24]. SENP1 und SENP6 befinden sich scheinbar sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern [27-30].

Die Modifizierung von Zielproteinen durch SUMO ist in verschiedenste zelluläre Prozesse involviert. Dazu gehören Signaltransduktion, Regulation der Transkription, DNA-Reparatur, Chromosomensegregation, Steuerung des Zellzyklus sowie der subzellulären Lokalisation. Seit der Entdeckung von SUMO 1996 wurde eine Vielzahl an Substraten identifiziert. Häufig sind für diese Proteine die genauen Funktionen der SUMOylierung noch unklar [1]. Die Funktionen der SUMOylierung variieren unter anderem durch die Auswirkungen auf Protein-Protein-Interaktionen oder auf die Interaktion zwischen Protein und DNA. Erfolgt beispielsweise durch die SUMOylierung eine Änderung der Interaktion zwischen DNA und Protein, kann dadurch die transkriptionelle Aktivität reguliert werden. So erhöht sich die DNA-Bindungsaktivität nach der Konjugation des Hitzeschockfaktors HSF1 und HSF2 mit SUMO, wohingegen die Konjugation der Transkriptionsfaktoren Sp3, c-Jun oder c-Myb eine Verringerung der transkriptionellen Aktivität zur Folge hat [18].

Wird die Modifikation eines Zielproteins durch Ubiquitin und SUMO am gleichen Lysin katalysiert, können diese Proteine als Gegenspieler wirken, wodurch die Protein-Stabilität reguliert werden kann. Ein gut untersuchtes Beispiel ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B. Er liegt im Zytosol in inaktiver Form an I κ B α gebunden vor. Nach einer Stimulation durch TNF (Tumornekrosefaktor) wird I κ B α phosphoryliert, polyubiquitiniert und vom Proteasom abgebaut. Von dem Inhibitor befreit kann NF- κ B im Zellkern seine Zielgene aktivieren. Wird I κ B α nicht ubiquitiniert, sondern SUMOyliert, kann nach TNF-Stimulation keine Polyubiquitinierung und kein Abbau stattfinden. Die Funktion von NF- κ B wird inhibiert [2].

1.3 Phosphorylierung

Die Ser (S)-, Thr (T)- und Tyr (Y)-Phosphorylierung zählt zu den am besten untersuchten PTMs. Sie spielt eine entscheidende Rolle bei Signaltransduktionswegen und kontrolliert viele wichtige biologische Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung und DNA-Reparatur [31-34]. Phosphorylierungen erfolgen durch Proteinkinasen, die eine der größten Genfamilien in Eukaryoten bilden und ~ 2% des proteinkodierenden Genoms ausmachen [31, 32, 35]. Mehr als 510 Proteinkinasen sind im menschlichen Organismus bekannt [35, 36], und Schätzungen zufolge können über 1/3 aller menschlichen Proteine phosphoryliert werden [31, 33]. Proteinkinasen können in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden: Ser/Thr-Kinasen, die ca. 80% aller Kinasen darstellen und Tyr-Kinasen [31, 35]. Eukaryotische Kinasen sind strukturell sehr ähnlich und weisen die gleiche Faltung der katalytischen Domäne auf. Diese ist ca. 250 Aminosäuren lang, besteht aus einer kurzen N-terminalen Schleife mit β -Faltblättern und einer größeren C-terminalen Schleife mit α -Helices. ATP bindet in einer Spalte zwischen diesen Schleifen und das Substrat entsprechend längs dieser Spalte. Innerhalb der katalytischen Domäne befinden sich konservierte Seitenketten, die die Übertragung der Phosphatgruppe des ATPs auf die Ser-, Thr- oder Tyr-Reste des Substrates katalysieren [31, 32]. Um sicherzustellen, dass jede Kinase das richtige

Zielprotein an der passenden Stelle phosphoryliert, arbeiten viele spezifische Faktoren zusammen. Der Hauptfaktor ist das Vermitteln der spezifischen Bindungsstellen zwischen den Seitenketten der aktiven Stelle der Kinase und den Substrat-Seitenketten, die die Phosphorylierungsstellen umgeben.

Intrazelluläre Prozesse können von Tyr-Kinasen durch das Rekrutieren von Proteinen mit einer SH2-Domäne aktiviert werden. Die SH2-Domäne bindet an das phospho-Tyrosin-Motiv aus 5-8 Aminosäureseitenketten in Abhängigkeit der Passgenauigkeit der Ligandenphosphorylierung und den angrenzenden Aminosäuren [37]. Aktivierte Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) wie der *epidermal growth factor receptor receptor* (EGFR) werden an mehreren Tyr phosphoryliert. Jede phosphorylierte Stelle bindet jedoch an SH2-Domänen eines oder mehrerer ausgewählter zytoplasmatischer Signalproteine, welche anschließend spezifisch intrazelluläre Signalwege aktivieren [38-40]. Tyr-Phosphorylierung kann auch die intramolekulare Regulation SH2-Domäne-tragender Proteine unterstützen. Als Modellbeispiel gilt die Tyrosinkinase der Src-Familie, welche die größte nicht-Rezeptortyrosinkinasefamilie bildet. Sie wird durch die Tyr-Phosphorylierung innerhalb ihres C-terminalen Endes inaktiviert. So entsteht eine Bindungsstelle für die Src-SH2-Domäne, was zu einer autoinhibierenden Konformation führt. Die Kinasedomäne ist in diesem inaktiven Zustand unzugänglich und die SH2- und SH3 (*Src-homology-3*)–Domänen sind durch die Bindung interner Liganden maskiert [41].

Tabelle 1: Phosphoserin/Phosphothreonin-Bindungsdomänen.

Domain/protein	Consensus-binding motif	Functions
14-3-3	R-S-X-pS-X-P	Survival, cell cycle, cytoskeleton, metabolism, signalling
TPR repeat	pS-Q	Nonsense-mediated decay
FHA	pT-X-X-D	Cell cycle, DNA repair, transport
MH2	pS-X-pS	TGFβ signalling
WW	pS-P	Cis-trans prolyl isomerization
WD40	L-P-pT-P	Cell cycle, ubiquitylation
BRCT	pS-X-X-Y	DNA-damage response, cell cycle
Polo box	S-pS-P	Cell cycle
FF	pS-Y/F/W-pS	Transcription, splicing
NT-Cgt1	(Y-S-P-T-pS-P-S) ₃	RNA 5'-capping
SRI	(Y-pS-P-T-pS-P-S) ₂	Histone methylation
β-arrestin	pS/pT...pS/pT...pS/pT	GPCR downregulation and signalling
Arm repeat	pS-pS-L-pS-A-L-pS	β-catenin signalling

Zusammengestellt sind Domänen-Familien, das entsprechende pSer/pThr Konsensus-Bindungsmotiv welches von den einzelnen Mitgliedern erkannt wird sowie zelluläre Prozesse, die durch diese Interaktion reguliert werden. BRCT, *breastcancer-susceptibility protein-1 C-terminal*; FHA, *forkhead-associated*; MH2, *MAD-homology-2*; NT-Cgt1, Nukleotidyltransferase–Domäne der Cgt1-Untereinheit; pS, phosphoSerin; pT, phosphoThreonin; SRI, *Set2 Rpb1 interacting*; TGFβ, *transforming growth factor-β*; X, eine beliebige Aminosäure. Tabelle nach Seet et al. 2006 [34]

Ser/Thr-Phosphorylierungen sind weiter verbreitet als die Tyr-Phosphorylierung. Dem entsprechend ist die Menge der selektiv an pSer/pThr-Stellen bindenden Domänen größer [42]. Tabelle 1 zeigt nur einen Teil der Fülle an pSer/pThr Konsensus-Bindungsmotiven und die Vielfalt der durch diese Interaktionen regulierten Prozesse.

1.4 Jak/STAT-Signalweg

Der Jak (*Janus activated kinase*)/STAT (*signal transducer and activator of transcription*)-Signalweg wurde bei der Untersuchung der Signalweiterleitung durch Zytokine entdeckt [43]. Zytokine nehmen eine wichtige Rolle bei Wachstums-, Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen sowie bei der Kontrolle des Immunsystems ein. Die Bindung von Zytokinen (Ligand) an ihren Rezeptor führt zu dessen Homo- oder Heterodimerisierung und löst die Aktivierung einer intrazellulären Signaltransduktionskaskade, den Jak/STAT-Signalweg, aus. Die Rezeptoren werden anhand von Strukturmerkmalen in verschiedene Familien eingeteilt: die Interferon (IFN)-Familie (IFN- α/β , IFN- γ ; Interleukin (IL)-10, IL-19, IL-20, IL-22), die gp-130-Familie (IL-6, IL-11, OSM, LIF, CT-1, GCSF, IL-12, IL-23, Leptin, CTNF, NNT-1/BSF-3), die gC-Familie (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21) und die Familie der Wachstumshormone (Epo, GH, PRL, Tpo) [44]. Des Weiteren können STATs durch Rezeptortyrosinkinasen wie EGF-R (*epidermal growth factor receptor*), CSF-1R (*colony stimulating factor-1 receptor*) und PDGF-R (*platelet derived growth factor receptor*) oder auch durch einige Mitglieder der G-Protein gekoppelten Rezeptoren aktiviert werden [44, 45].

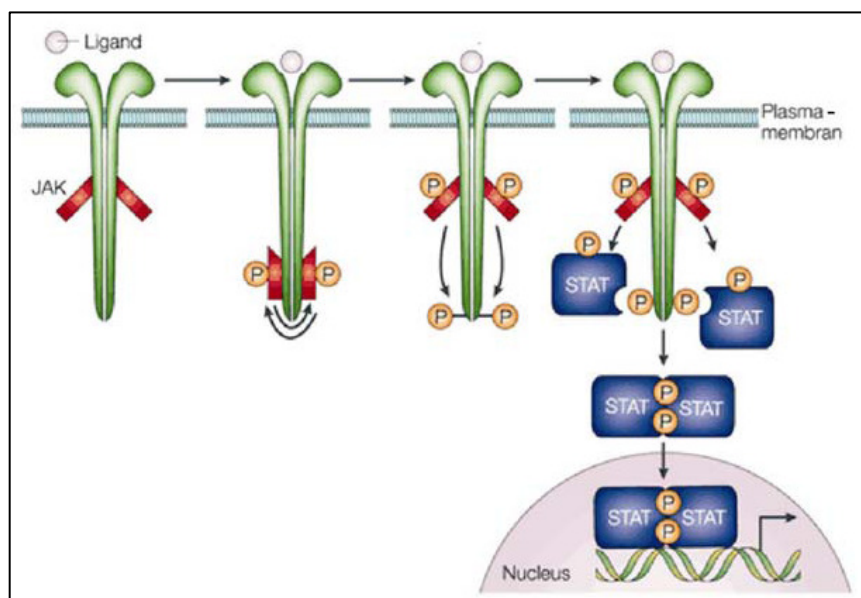


Abbildung 3: Jak/STAT-Signalweg. Die Bindung eines Liganden induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors (grün) und führt durch Trans-Phosphorylierung zu einer Aktivierung der kovalent gebundenen Janus-Kinasen (rot). Die aktivierten Kinasen phosphorylieren den Rezeptor. Über ihre SH2-Domäne binden die STAT-Proteine (blau) an die phosphorylierten Tyrosine der Rezeptoren und werden ebenfalls Tyrosinphosphoryliert, dimerisieren und binden im Kern an die Promoterregion ihrer Zielgene [46].

Abbildung 3 zeigt schematisch den Jak/STAT-Signalweg. Er beginnt mit der Zytokinbindung an den entsprechenden Rezeptor. Diese Bindung führt zu einer Konformationsänderung im zytosolischen Teil, wodurch die rezeptorgebundenen Proteine der Jak-Familie in räumliche Nähe gebracht werden und durch Trans-Phosphorylierung aktiviert werden [47]. In aktivierter Form vermitteln die Jaks die Phosphorylierung der spezifischen Rezeptor-Tyrosinseitenketten, welche anschließend als Bindungsstelle für STAT-Proteine dienen. Nach der Rekrutierung der STATs an den Rezeptor werden diese durch die Jaks ebenfalls an einer Tyrosinseitenkette phosphoryliert. Diese Aktivierung führt zur Dissoziation des Rezeptors, der STAT-Dimerisierung, der Wanderung in den Zellkern, der DNA-Bindung und der damit verbundenen Änderung der Genexpression. In Säugern sind vier Mitglieder der Jak-Familie bekannt: Jak1-3 und Tyk2 (Tyrosinkinase2). Jak1, Jak2 und Tyk2 werden ubiquitär exprimiert, wohingegen Jak3 nur in Muskelzellen oder in Zellen des lymphatischen Systems vorkommt [45]. Die einzelnen Jaks werden an verschiedene Rezeptoren gebunden und können mit unterschiedlicher Präferenz die Mitglieder der STAT-Familie aktivieren. Es wurden bisher sieben verschiedene STAT-Proteine im Säuger beschrieben. STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6 zeigen große Ähnlichkeit in Struktur und Funktion. Die STAT-Proteine bestehen aus ca. 750-850 Aminosäuren. Die Proteinstruktur lässt sich in sechs konservierte Bereiche einteilen: die N-terminale Domäne (NH₂), die *coiled-coiled domain* (CCD), die DNA-bindende Domäne (DBD), die Verbindungsdomäne (*linker*), die SH2/Tyrosin-Aktivierungsdomäne und die C-terminale transkriptionelle Aktivierungsdomäne (TAD) (Abbildung 4). Die N-terminale Domäne ist an der Di- und Tetramerisation sowie an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt [48]. Die DBD befindet sich im mittleren Bereich des Proteins (ungefähr bei AS 320-480) und reguliert die Spezifität der DNA-Bindung [49, 50]. Des Weiteren ist die DBD, vermutlich durch das Aufrechterhalten der passenden Konformation bei der Importinbindung, in den Kerntransport involviert [51]. Die Verbindungsdomäne ist für die transkriptionelle Aktivierung, beispielsweise von STAT1, wichtig [52] und spielt eine Rolle für Protein-Protein-Interaktion zwischen STAT3 und GRIM-19, wodurch die STAT3-Aktivität negativ reguliert wird [53]. Zwischen AS 600 und 700 befinden sich bei den Mitgliedern der STAT-Familie die SH2-Domäne und das hochkonservierte Tyr-Aktivierungsmotiv ungefähr bei AS 700. Die SH2-Domäne gewährleistet die Erkennung und die Bindung spezifischer pTyr-Motive und ist damit maßgeblich an drei wesentlichen Vorgängen der Signalweiterleitung beteiligt: (1) das Rekrutieren an den Zytokin-Rezeptor durch das Erkennen spezifischer pTyr-Motive, (2) die Anlagerung an die aktivierten Jaks und (3) der STAT Homo- oder Heterodimerisierung [54]. Alle STAT-Proteine können durch diese SH2-pTyr-Interaktion Heterodimere bilden und mit Ausnahme von STAT2 auch homodimerisieren [49, 55]. Entsprechend der Fähigkeit einzigartige transkriptionelle Antworten auszulösen, ist die TAD im C-terminalen Bereich

unter den STATs wenig konserviert und trägt zu der STAT-Spezifität bei. Die ersten Hinweise darauf, dass der C-Terminus für die transkriptionelle Aktivierung codiert, erhielt man aus Vergleichsanalysen von Gesamtlängenprotein von STAT1 und der alternativen Splicevariante STAT1 β , der C-terminal 38 Aminosäuren fehlen [56]. Außer für STAT2 sind auch für die anderen STAT-Proteine gut charakterisierte C-terminal verkürzte Isoformen beschrieben [44]. Sie sind in der Regel transkriptionell nicht aktiv und scheinen als dominant-negative Regulatoren zu wirken. Obwohl über die genauen Mechanismen der C-terminalen Regulation der Transkription der STAT-Proteine wenig bekannt ist, gibt es einige wichtige Erkenntnisse. Zusätzlich zu der Tyr-Phosphorylierungsstelle besitzen STAT1, STAT3, STAT4, STAT5a und STAT5b eine Ser (S)-Phosphorylierungsstelle im C-terminalen Bereich, welche in STAT2 und STAT6 fehlt [55]. Die transkriptionelle Aktivität einiger STATs kann durch diese Ser-Phosphorylierung beeinflusst werden [57]. Sie scheint die Transkription einiger, aber nicht aller Zielgene zu erhöhen und die Bindung zu anderen transkriptionellen Regulatoren wie MCM5, BRCA1 zu verändern [58, 59].

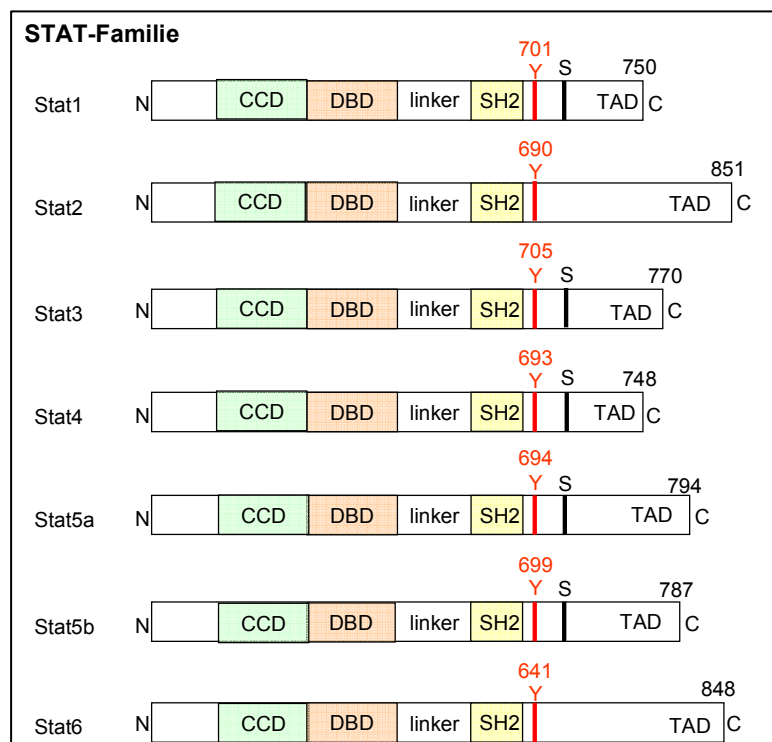


Abbildung 4: Schematische Domänenstruktur der STAT-Proteine. STAT-Proteine haben eine Länge zwischen 750 und 850 Aminosäuren und weisen konservierte Bereiche auf. CCD (*coiled-coiled domain*), DBD (DNA-bindende Domäne), *linker* (Verbindungsdomäne), SH2 (SH2-Aktivierungsdomäne), TAD (C-terminale transkriptionelle Aktivierungsdomäne). Y-Phosphorylierungsstellen sind rot gekennzeichnet, die Ser-Phosphorylierungsstellen mit einem schwarzen „S“. Abbildung modifiziert nach Lim et al. [60]

Der Jak/STAT-Signalweg ist für eine Vielzahl an transkriptionellen Antworten, die die Abwehr, die Differenzierung, die Proliferation und die Onkogenese betreffen, wichtig. Daher müssen für die Steuerung dieses Signalweges verschiedenste regulierende Mechanismen existieren, die den Signalweg in positiver oder negativer Form beeinflussen können.

Während erste Studien sich auf die Untersuchung der Rolle der Tyrosinkinase in der STAT-Aktivierung konzentrierten, wurden in späteren Studien auch andere positive Regulatoren identifiziert. Hierzu gehören die Serinkinasen und interagierende Proteine. Ser-Phosphorylierung konnte zuerst für STAT1 und STAT3 an S727 innerhalb eines Pro Met Ser Pro (PMSP)-Motivs gezeigt werden [61, 62]. Da das PMSP-Motiv auch im C-Terminus von STAT4 und STAT5 konserviert ist, wurde angenommen, dass Pro-gerichtete Serinkinasen für die Modifikation verantwortlich seien. Reporterstudien haben gezeigt, dass die Ser-Phosphorylierung die transkriptionelle Aktivität von STAT1 und STAT3 erhöht [57, 61]. Physiologische Analysen mit STAT1 und STAT1S727A rekonstituierten STAT1^{-/-}-Zellen ergaben, dass die Ser-Phosphorylierung nur die Expression einiger, aber nicht aller Zielgene erhöht [63]. Die Steigerung der transkriptionellen Aktivität durch Ser-Phosphorylierung konnte auch für STAT4 bewiesen werden [64]. Obwohl STAT5 an Ser phosphoryliert werden kann, konnte ein Anstieg der transkriptionellen Aktivität nicht überzeugend gezeigt werden [65]. Dafür scheint jedoch die Proteinstabilität erhöht zu sein [66]. Die STAT-Aktivierung ist ein temporäres Ereignis. Daher muss auch das Abschalten oder die Unterbrechung des Signalweges durch verschiedene Mechanismen geregelt sein. Diese Herabregulation kann zu verschiedenen Zeitpunkten stattfinden: an den Rezeptoren, den Jaks oder an den STATs selbst. Ein häufig genutzter Mechanismus um den Rezeptor nach dem Weiterleiten eines Signals zu inaktivieren, ist die Endozytose. So wurde in der intrazellulären Domäne der gp-130-Familie ein konserviertes Motiv aus 10 Aminosäuren gefunden, welches die Endozytose reguliert [67]. Des Weiteren ist der Abbau in Abhängigkeit von Ubiquitin-Proteasom in die Herabregulation involviert. Studien haben gezeigt, dass Proteasominhibitoren die Tyr-Phosphorylierung von STAT4, STAT5 und STAT6 signifikant stabilisieren, auf STAT1, STAT2 und STAT3 aber nur geringen Einfluss haben. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Proteasominhibitoren die Jak-Aktivität verlängern [68, 69] und in STAT5 wurde eine C-terminale Domäne gefunden, die den Abbau fördert [70]. Eine weitere zentrale Rolle nehmen die Phosphatasen bei der Herabregulierung ein. So wurden zwei verwandte SH2-enthaltene Phosphatasen, SHP1 und SHP2, identifiziert, die die Jak-Aktivität herabsetzen. Der Verlust der Fähigkeit des gp-130-Rezeptors SHP2 zu rekrutieren, verlängert die Signalweiterleitung von STAT3 signifikant [71]. Weitere Studien zeigten, dass die Phosphatase CD45 den Jak/STAT-Signalweg negativ reguliert, wenn dieser durch IL-3, IL-4, EPO oder IFN- stimuliert wurde [72]. Zwei weitere Proteinfamilien sind maßgeblich an der Herabregulation dieses Signalweges beteiligt: SOCS (*suppressor of cytokine signaling*) und PIAS (*protein inhibitor of activated STAT*). SOCS werden ligandeninduziert exprimiert und inhibieren STATs entweder durch die Interaktion mit den Jaks oder dem phosphorylierten Rezeptor oder durch das Konkurrieren um die Rezeptorbindung [60]. PIAS-Proteine werden stetig exprimiert und interagieren direkt mit den phosphorylierten STATs. Die einzelnen PIAS-Proteine zeigen eine

gewisse Spezifität gegenüber STATs: PIAS1 und PIASy für STAT1, PIAS3 für STAT3 und STAT5 und PIASx für STAT4. Es konnte gezeigt werden, dass PIAS1 und PIAS3 nach der Bindung die transkriptionelle Aktivität durch das Blocken der DNA-Bindung des aktivierten STAT1 oder STAT3 schwächen [73, 74].

1.5 MAP Kinase-Kaskade

Die Signaltransduktion über mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) gehört zu den zentralen Signalwegen, die verschiedene Zellfunktionen wie z.B. Proliferation, Differenzierung und Apoptose reguliert. MAP Kinasen dienen der Vermittlung extrazellulärer Signale, die über Rezeptoren in das Innere der Zelle geleitet werden, bis hin zu den gewünschten intrazellulären Zielen wie Zytoskelett, *downstream* Kinasen oder Transkriptionsfaktoren, was die Wichtigkeit der Regulation der subzellulären Lokalisierung der MAP Kinasen für die Signalkaskade erkennen lässt [75]. Wachstumsfaktoren, Stress und Entzündungen gehören zu einer Vielzahl der extrazellulären Stimuli, welche eine sequenzielle Phosphorylierung und Aktivierung eines Dreikomponenten-Moduls auslösen können [76]. Dieses Modul ist in Abbildung 5 dargestellt. Es besteht aus drei Proteinkinasen, der MAP Kinase (MAPK), der MAP Kinase Kinase (MAPKK, MEK) und der MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK, MAP3K).

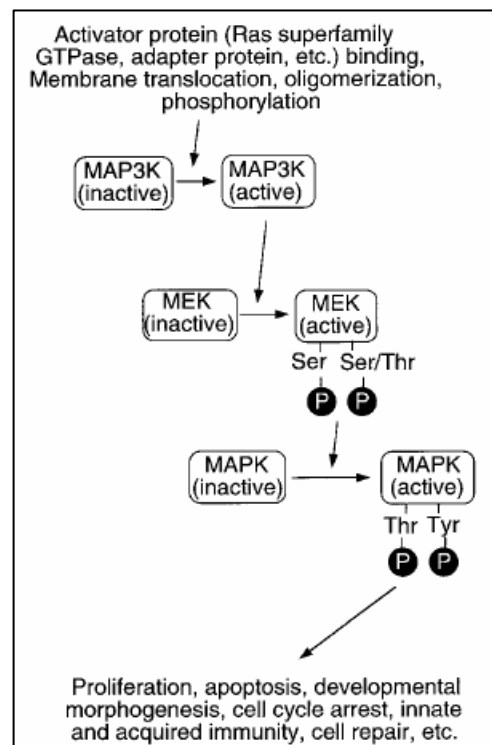


Abbildung 5: Dreikomponenten-Modul der MAPK-Aktivierung. Der MAP Kinase-Signalweg besteht aus drei Kinasen, die durch sequentielles Phosphorylieren aktiviert werden und Signale von der Zelloberfläche innerhalb der Zelle bis zum Zielprotein weiterleiten. Gekennzeichnet sind die jeweiligen Phosphorylierungsstellen (Aminosäuren Ser, Thr, Tyr) der Kinasen durch „P“. MAPK - *Mitogen-activated protein kinase*, MEK - *Mitogen-activated protein kinase-kinase*, MAP3K - *Mitogen-activated protein kinase-kinase-kinase*. Abbildung übernommen von Kondoh et al. 2005 [75].

MAPKKK Kinasen (MAPKKKK) oder kleine GTP-bindende Moleküle der Ras- oder Rho-Familie katalysieren die Aktivierung der MAPKKK [77]. Diese Ser/Thr-Kinasen phosphorylieren anschließend die nächste Komponente, die MAPKK, welche ihrerseits die MAPK aktivieren. Diese Aktivierung erfolgt sehr spezifisch, da sie die Phosphorylierung eines Threonin- und eines Tyrosinrestes, getrennt durch eine einzelne Aminosäure (Thr-X-Tyr-Motiv), voraussetzt [76].

Im Säuger werden die existierenden MAPKK als MKK oder MEK (MAPK/ERK Kinase) bezeichnet. Die MAPK-Familie besteht aus drei gut charakterisierten Unterfamilien: (1) die ERK1 und ERK2 (*extracellular signal-regulated kinase*), (2) JNK1, JNK2 und JNK3 (c-jun NH2-terminale Kinase) und (3) die vier Proteinkinasen p38 α , β , γ und δ). Eine weitere Gruppe bildet die ERK5 MAPK [78]. Außerdem gibt es einige Proteinkinasen, deren Funktionen bisher noch nicht weiter charakterisiert wurden. Hierzu zählen z.B. ERK7 oder ERK8 [79].

1.6 MK2

Die *Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2* (MAPKAP Kinase 2) oder auch MK2 genannt, ist ein Substrat der MAP Kinase p38. Die p38-Signalkaskade wird als Antwort auf physikalischen Stress (z.B. osmotischer Schock, UV-Licht oder Hitze), Zytokine (Interferon, Interleukin-1), Tumornekrosefaktoren (TNF- α) oder Wachstumsfaktoren (Transformierender Wachstumsfaktor- β (TGF- β)) ausgelöst [79]. Es sind eine Vielzahl an MKKKs wie beispielsweise MEKK1-4, TAK (*transforming growth factor beta-activated kinase 1*) oder ASK1 (*Apoptosis Signal-Regulating Kinase1*) bekannt, die die p38-spezifischen MKKs MKK3 und MKK6 aktivieren können [80]. MKK6 kann alle p38 Isoformen aktivieren (α , β , γ , δ), wohingegen MKK3 bevorzugt p38 α und p38 β phosphoryliert [81]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass p38 α und p38 δ auch durch die JNK-spezifische Kinase MKK4 aktiviert werden können [80]. Die p38-Zielproteine sind sehr vielfältig. Dazu zählen Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren, Regulatoren des Zellzyklus oder Proteine des Zytoskeletts. Zu den Proteinkinasen gehören die MAPKAP Kinasen MK2, MK3 und MK5 sowie MNK1/2 (*MAPK kinase interacting kinases 1 and 2*) und MSK1/2 (*mitogen- and stress-activated kinase-1 and 2*) [82-85]. MK2 und MK3 sind ausschließlich Zielproteine von p38, wohingegen MSKs und MNKs zusätzlich auch durch ERK phosphoryliert werden können [84, 86, 87]. MK5 wird von den atypischen MAP Kinasen ERK3 und ERK4 aktiviert [88-90]. MK2 und MK3 stimmen in ihrer Primärstruktur zu 75% sowie in ihrer katalytischen Domäne zu 78% überein. Obwohl MK2 und MK3 auch strukturelle Gemeinsamkeiten im Vergleich zu MK5 aufweisen, beträgt diese für MK2 und MK5 in ihren Aminosäuresequenzen nur 42%. MK2 und MK3 sind sich folglich strukturell näher als MK5 und werden in dem folgenden Teil genauer beschrieben. MK2 wurde zuerst 1992 aufgereinigt, als Hitzeschock Proteinkinase (HSP; *small heat-shock*

protein) charakterisiert [91] und zwei Jahre später als erstes p38-Substrat beschrieben [82, 92]. MK3 wurde 1996 als zweites Familienmitglied als Proteinkinase identifiziert, die spezifisch durch p38 aktiviert wird [93]. Der strukturelle Aufbau von MK2 und MK3 ist bei Wirbeltieren sehr ähnlich. Beide Proteinkinasen besitzen im N-Terminus eine prolinreiche Domäne, für die *in vitro* die Interaktion mit c-abl-SH3 (Src-homology-3)-Domänen [94] und die Notwendigkeit für die Zellbewegung in MEF (*mouse embryonic fibroblasts*)-Zellen [95] gezeigt werden konnte. Weitere Gemeinsamkeiten innerhalb der Struktur sind die katalytische Kinasedomäne und C-terminal die autoinhibitorische Region sowie Sequenzen für das Kernexportsignal (NES) und das Kernlokalisierungssignal (NLS). MK2 und MK3 werden durch Phosphorylierung an drei bzw. zwei regulatorischen Phosphorylierungsstellen aktiviert [83, 96, 97]. Eine konservierte Phosphorylierungsstelle befindet sich innerhalb der Aktivierungsschleife (Maus MK2Thr208; Mensch MK2Thr222) und eine weitere Hauptphosphorylierungsstelle (Maus MK2Thr320; Mensch MK2Thr334) in einer Scharnierregion zwischen der katalytischen und der C-terminalen autoinhibitorischen Region. Für MK2 wurde zusätzlich eine Phosphorylierungsstelle innerhalb der katalytischen Domäne beschrieben (Maus MK2Ser258; Mensch MK2Ser272). Stress- und zytokinabhängige MK2/MK3-Aktivierung wird ausschließlich durch die MAP Kinase-Isoformen p38 α und p38 β vermittelt [98]. Die p38 α -Bindungsstelle befindet sich im C-terminalen Teil der MKs und überschneidet sich mit dem NLS [100]. Abbildung 6 zeigt die Aktivierung und die Translokation von MK2. MK2 und p38 α liegen als inaktiver Komplex im Zellkern vor, was darauf hindeutet, dass dieser Komplex ein funktionelles NLS besitzt [101]. Nach der Aktivierung durch eine *upstream* Kinase, wie z.B. MKK6, phosphoryliert p38 α MK2 an den regulatorischen Stellen. Besonders die Phosphorylierung von Thr334 führt zu einer Schwächung der Interaktion zwischen der C-terminalen Helix und dem katalytischem Kern und anschließend zu der Freilegung des NES [102, 103]. Das aktivierte NES überwiegt gegenüber dem NLS und führt zur Translokation von MK2 aus dem Zellkern in das Zytoplasma. Nach der Dephosphorylierung des MK2s ist das NLS stärker als das NES und sorgt für den Rücktransport des inaktiven MK2s in den Zellkern, wo es mit p38 α erneut einen Komplex bilden kann und das NES maskiert vorliegt [99].

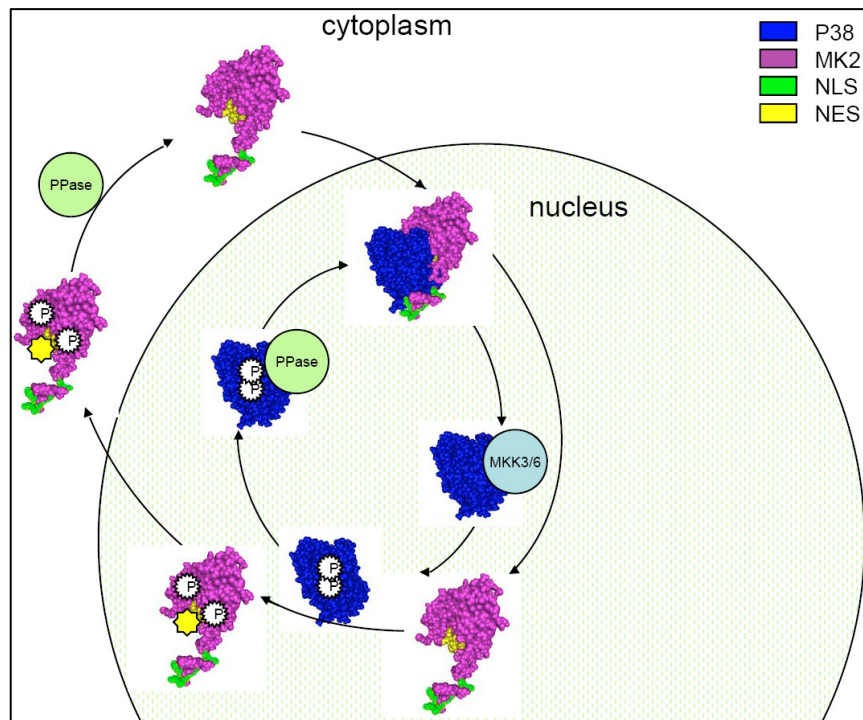


Abbildung 6: Modell der Aktivierung und der Translokation von MK2. MK2 und p38 α bilden im Zellkern einen stabilen Komplex, der durch aktivierte MKK3/6 gelöst wird. Die MK2-Phosphorylierung erfolgt durch die vorübergehende Interaktion mit aktiviertem p38 α . Die Phosphorylierung von T334 führt zu einer Konformationsänderung in der Scharnierregion, was wiederum zur Freilegung und Aktivierung des NES führt, welches dann stärker als das NLS ist und MK2 aus dem Zellkern in das Zytoplasma wandern lässt. Sobald MK2 dephosphoryliert wird, bewirkt das NLS die Translokation in den Zellkern, wo das inaktive MK2 erneut einen Komplex mit p38 α bildet. NES = Kernexportsignal; NLS = Kernlokalisationssignal; P = Phosphorylierung [99]

MK2 interagiert zwar nicht nur mit p38 α , trotzdem haben beide Proteine eine stabilisierende Wirkung aufeinander. Es konnte zum einen gezeigt werden, dass bei mangelnder MK2-Expression auch die Expression von p38 α deutlich reduziert wird und es zum anderen eine Verringerung des MK2-Expressionslevels bei fehlender p38 α -Expression in MEF-Zellen gibt [95, 104]. Das optimale Phosphorylierungstellenmotiv für die MKs wurde mit Φ -X-R-X-L/N-pS/pT-I/V/F/L-X beschrieben, wobei Φ eine Aminosäure mit hydrophoben Seitenketten beschreibt [98, 105, 106]. Die ersten Substratproteine, die für die MKs identifiziert wurden, waren die Hitzeschockproteine (HSP; *heat-shock protein*) HSP27 und HSP25 (in Mensch und in Maus), die durch MK2 an drei oder zwei Serinseitenketten phosphoryliert werden [91]. Erfolgt dieser Vorgang stressabhängig, ist er beteiligt an der Änderung der HSP25/27 Oligomerisierungs- und Chaperoneigenschaften [107] wie auch an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts [108]. Des Weiteren ist MK2 an der Regulation von Kontrollpunkten innerhalb des Zellzyklus beteiligt. 2001 wurde beschrieben, dass p38 für die Phosphorylierung von Cdc25B und die anschließende Bindung an 14-3-3-Proteine nach UV-Bestrahlung nötig ist, um den Verbleib in der G2/M-Phase für die DNA-Reparatur der beschädigten Zelle einzuleiten [109]. Vier Jahre später wurde *in vitro* die direkte Phosphorylierung von Cdc25B und Cdc25C durch MK2 nach UV-Bestrahlung gezeigt sowie den Verlust des G2/M-Kontrollpunktes in Zellen mit MK2-*knockdown* [106]. Eine weitere Rolle nehmen MK2 und

MK3 in der posttranskriptionellen Regulation bei Entzündungsprozessen ein. Nach einer Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation führt die Abwesenheit beider Kinasen zu einer fast vollständigen Hemmung der Produktion des Tumornekrosefaktor- α (TNF) sowie einer damit verbundenen erhöhten Resistenz gegen septischen Schock und Kollagen-induzierter Arthritis [110-112]. Diese Vorgänge werden durch die Beteiligung mRNA-bindender MK2/3-Substrate reguliert, die die Stabilität und die Translatierbarkeit der AUUUA-Elemente-tragenden Zytokin-mRNAs entscheiden [113].

Für MK2 und MK3 wurden bisher viele Substrate beschrieben, die in die Regulation des Zytoskeletts, die Zellzyklusregulation, die transkriptionelle und posttranskriptionelle Genregulation sowie die Apoptose involviert sind, häufig ist jedoch die physiologische Relevanz dieser Substratphosphorylierung noch nicht bekannt.

1.7 Projektbeschreibung

Ausgangspunkt dieser Arbeit war der Nachweis, dass die STAT1-SUMOylierung an Lysin 703 die STAT1-Phosphorylierung an Tyrosin 701 verhindert und somit eine Aktivierung von STAT1 unterdrückt. Dieses Ergebnis wurde durch die Verwendung des *Ubc9 fusion-directed SUMOylation* (UFDS)-Systems erreicht. Die direkte Fusion des SUMO-konjugierenden Enzyms Ubc9 an ein Substratprotein verstärkt hierbei deutlich die SUMOylierung, so dass Analysen an ursprünglich sehr schwach modifizierten Substraten *in vivo* ermöglicht werden. Dieser Vorteil lässt jedoch weiterführende Untersuchungen wie zum Beispiel kinetische SUMOylierungsstudien oder Untersuchungen, bei denen eine andere Proteinmodifikation der SUMOylierung vorgeschaltet ist, wegen der dauerhaften Substrat-Ubc9-Fusion nicht zu. Deshalb ist die Entwicklung eines induzierbaren SUMOylierungssystems unerlässlich und erstes Ziel dieser Arbeit. Mit diesem System sollte einerseits die Auswirkung der STAT1Y701-Phosphorylierung auf die K703-SUMOylierung untersucht und andererseits die Wechselwirkung der Phosphorylierung und die SUMOylierung anderer STAT-Proteine charakterisiert werden. Da für die MAPKAP Kinase MK2 kürzlich eine stimulationsabhängige SUMOylierung gezeigt werden konnte, sollten entsprechende Untersuchungen zum Wechselspiel der SUMOylierung und Phosphorylierung sowie Analysen zur Identifizierung der MK2-SUMOylierungsstelle und der möglichen funktionellen Bedeutung durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Laborgeräte

<u>Gerät</u>	<u>Modell, Herstellerfirma</u>
Agarosegel-Elektrophorese	EPS 301, Amersham Pharmacia
Drehrad	MHH-Eigenbau
Flow cytometer	FACS Calibur, Becton Dickinson
Geldokumentationssystem	Digit-Store duo, INTAS
Inkubationswippe	WT 16, Biometra
Inkubator	Innova 4230, New Brunswick 3029, Forma Scientific 3111/ HO, Forma Scientific
Kühlzentrifuge	RC5C, DU PONT 5402, Eppendorf 5804 R, Eppendorf
Licht-/ Fluoreszenzmikroskop	Leica MCS NT, Leica Diavert, Leitz Scientific CK2, Olympus
Microarray Scanner	G2505C, Agilent
Mikrowellenofen	FM421, Moulinex
PCR-Gerät	Personal Cycler, Biometra
pH-Meter	pH211, HANNA
Pipetten	Eppendorf
Photometer	Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech
Real-time PCR	ABI7500 FAST, Applied Biosystems
SDS-Gel System (Elektrophorese)	Mini-PROTEAN Cell, Bio-Rad
Spannungsgerät	EPS 300, Amersham Pharmacia
Sterilwerkbank	VBM-600
Temperierbarer Drehinkubator	Mini hybridisation oven, Appligene
Thermoblock	TB1, Biometra
Tischzentrifuge	5415 D, Eppendorf
Überkopfmischer	MHH-Eigenbau
Vortex-Gerät	Vortex-Genie2, Scientific Industries
Western Blot Dokumentation	LAS 3000, Fuji
Western Blotkammer	Sigma-Aldrich

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien

<u>Chemikalie</u>	<u>Herstellerfirma</u>
100x L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH
100x NEAA (<i>Non-essential amino acids</i>)	PAA Laboratories GmbH
100x Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH
1x Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH
Acrylamid	Roth
Agar-Agar	Gibco BRL
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth
Ampicillin	Roth
Anisomycin	Sigma
AP21967	ARIAD Pharmaceuticals
APS	Roth
ATP	Fermentas
Bacto Pepton	Gibco BRL
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck
D-MEM	PAA Laboratories GmbH
DMSO (Dimethyl Sulfoxid)	Sigma
dNTP	Fermentas
EDTA	Merck
Essigsäure	Roth
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Roth
FCS Gold	PAA
Glucose	Merck
Glutathion-Sepharose-4B	GE Healthcare
Glycerol	Merck
Glycin	ICN Biochemical
Hefeextrakt	Gibco BRL
HEPES	Roth
Hexadimethrine Bromide (Polybrene)	Sigma
Hygromycin B	Clontech
Interferon	ImmunoTools
Isopropanol	Merck
Kanamycin	AppliChem
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
L-Histidinol-dihydrochlorid	Sigma
Methanol	J.T. Baker
MgCl ₂	Merck
MgSO ₄	Merck

Na ₂ HPO ₄	Merck
NaCl	Merck
NaOH	Riedel de Haen
N-Z-Case Plus (Casein, enzymatisch hydrolysiert)	Sigma
PEG (Polyethylene Glycol)	Sigma
Pepton aus Casein	Roth
Polyethylenimine (PEI)	Sigma
PVDF-Membran	Roth
Salzsäure, 37,5%	Merck
SDS	Roth
SOB	Roth
Strep-Tactin	IBA
TEMED	Roth
Tris	ICN Biomedicals
Triton X-100	Serva
Tween20	Merck
β-Mercaptoethanol	Merck

2.2.2 Antikörper

Für den Immunochemischen Proteinachweis wurden für den Gebrauch die primären Antikörper 1: 2000 in TBS-T und die sekundären Antikörper 1:4000 in TBS-T / Milch (5%) verdünnt eingesetzt.

<u>Antikörperbezeichnung</u>	<u>Herstellerfirma</u>
FKBP12	Affinity BioReagents
GAPDH (6C5)	Chemion
GFP (B-2)	Santa Cruz
GST (B14)	Santa Cruz
MAPKAPK2 (MK2)	Cell Signaling
p38α (A1F7)	Santa Cruz
p53 (1C12)	Cell Signaling
pHsp25 (S86)	Invitrogen
pp38 Thr180/Tyr182(3D7)	Cell Signaling
pS258MK2	Dr. C. James Hastie University Dundee
pT222MK2	Cell Signaling
pT334MK2	Cell Signaling
pY701-STAT1	Cell Signaling
STAT1	Cell Signaling
STAT3	Cell Signaling
STAT5 (3H7)	Cell Signaling
SUMO1	Cell Signaling
SUMO2/3 (18H8)	Cell Signaling
Ubc9 (H-81)	Santa Cruz
rabbit-anti-sheep-HRP	Santa Cruz
goat-anti-rabbit-HRP	Dianova
rabbit-anti-mouse-HRP	Dianova

2.2.3 Enzyme

<u>Enzymname</u>	<u>Herstellerfirma</u>
BamHI	Fermentas
BglII	Fermentas
BioScript RNase H Low reverse transcriptase	Bioline
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
DpnI	Fermentas
EcoRI	Fermentas
EcoRV	Fermentas
EheI	Fermentas
HindIII	Fermentas
Pfu DNA Polymerase	Stratagene
Pfu Ultra II DNA-Polymerase	Stratagene
RNase-Inhibitor	Roche
Sall	Fermentas
T4-DNA-Ligase	Fermentas
Taq-Polymerase	Fermentas
XbaI	Fermentas
XhoI	Fermentas

2.2.4 Kits

Gateway LR Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen
Gateway BP Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen
QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	MilliPore
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel
Quick Amp Labeling kit, two color"	Agilent Technologies

2.2.5 Standards

Lambda Marker	Eigenherstellung: Lambda DNA mit <i>HindIII</i> und <i>EcoRI</i> vollständig gespalten und mit 6 x Agarosegel Ladungspuffer versetzt.
Magic Mark XP Western Blot Standard	Invitrogen

2.2.6 Plasmide

pC4EN-F1E	ARIAD Pharmaceuticals
pC4-RHE	ARIAD Pharmaceuticals
pCL-Eco	Imgenex
pcDNA3	Invitrogen
pDest27	Invitrogen
pDONR201	Invitrogen
pEGFP-C1	Clontech

pEXPR-IBA105	IBA
	Der in dieser Arbeit eingesetzte Vektor pEXPR-IBA105 wurde für die Verwendung modifiziert. Er wurde Ehel/Stul geschnitten und die Fragmente im Agarosegel getrennt. Nach der Elution der beiden größten Banden aus dem Gel wurden diese ligiert. Der so entstandene Vektor besitzt nur noch eine Ehel-Schnittstelle bei 990bp und keine Stul-Schnittstelle.
pIRES2-EGFP	Clontech
pMSCV hygro	Clontech
pREP8	Invitrogen
pCU, pNU	Destinationvektoren, hergestellt mit dem Gateway Rekombinations-System

pCU: Die Rekombinationskassette wurde zwischen den CMV-Promotor und dem ORF des Ubc9 kloniert. Über die att1 und att2 Stellen dieses Vektors können ORFs ohne Stopp-Codon in 5'-Richtung des Ubc9 ORFs und im Leseraster des Ubc9 ORF eingefügt werden.

pNU: Besitzt hinter dem CMV-Promotor ein Ubc9 mit eigenem ATG, aber ohne Stopp-Codon. In 3'-Richtung von Ubc9 folgt die Gateway Rekombinationskassette. Durch eine Rekombination über die att1 und att2 Stellen dieser Kassette mit den att1 und att2 Stellen der Entry-Klone werden die ORFs im gleichen Leseraster an die Ubc9 codierende Sequenz fusioniert.

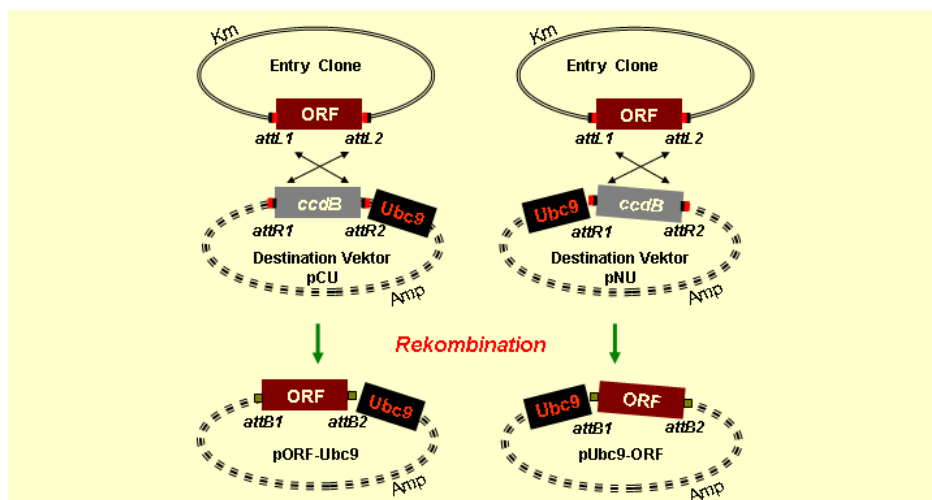


Abbildung 7: Klonierung der Ubc9-Fusionsprotein-Expressionsvektoren mit dem Gateway Rekombinations-System. Entry-Klone mit den zu untersuchenden ORFs werden mit dem pCU oder pNU Destinationvektor rekombiniert. Hierbei wird das Gegenselektionsgen ccdB durch Rekombination gegen einen ORF ausgetauscht. Die Ubc9-ORF oder ORF-Ubc9 tragenden Expressionsklone sind durch Ampicillin selektierbar.

Alle weiteren Konstrukte, die für diese Arbeit kloniert wurden, sind im Anhang Tabelle 5 zusammengestellt.

2.2.7 Oligonukleotid-Primer

Die Oligonukleotide wurden von MWG synthetisiert.

2.3 Methoden

2.3.1 Molekularbiologische Methoden

Puffer und Lösungen

EB-Puffer (Qiagen)	10mM Tris HCl, pH 8,5
TAE-Puffer	0,11% (v/v) Essigsäure 40mM Tris, pH 8,0 1mM EDTA
6x Agarosegel Ladungspuffer	30% Glycerol 0,025% Bromphenolblau 1x TAE-Puffer
LB Medium	1% Bacto Pepton 1% NaCl 0,5% Hefeextrakt Festes Medium enthielt zusätzlich 15g Agar-Agar. Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren, je nach Selektion, zugegeben: 100µg/ml Ampicillin, 50µg/ml Kanamycin
SOB-Medium	Fertigmischung der Firma Roth; es werden 26g/l Medium eingesetzt Zusammensetzung: Trypton 20 g/l Hefeextrakt 5 g/l MgCl ₂ 0,95 g/l NaCl 0,5 g/l KCl 0,186 g/l
SOC-Medium	SOB 20mM Glucose

***E. coli* Stämme**

DH5α

Genotyp: *deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17*(*r_k⁻m_k⁺*), *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*,
 Δ (*lacZYA-argFv169*), ϕ 80 δ *lacZ* Δ M15, F⁻, λ ⁻

XL1-Blue (Stratagene)

Genotyp: *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *hsdR17* *supE44* *relA1* *lac* [F'*proAB lacI^qZ* Δ M15
Tn10 (Tet^r)]

Herstellung kompetenter *E. coli*

10ml Bakterienvorkultur werden 1:100 mit LB-Medium verdünnt und bis zu einer Zelldichte von $OD_{600nm} < 0,4$ bei 37°C inkubiert. Das Pellet wird mit 500ml Puffer1 (50mM $CaCl_2$, 10mM Tris HCl pH8,0) gewaschen und 15min bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 20min bei 5000rpm wurde das Zellpellet in 7ml Puffer2 (50mM $CaCl_2$, 15% Glycerin) aufgenommen, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

Kompetente *E. colis* wurden für die Transformation zur DNA-Verfilfältigung (Mini- und Maxi-Präp) eingesetzt.

Herstellung ultrakompetenter *E. coli*

Eine frisch ausgestrichene Einzelkolonie des Stammes XL1-blue (aus dem QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene) wurde in einer 25ml SOB-Medium Flüssigkultur angesetzt und 8h bei 37°C geschüttelt. Mit 2,5ml dieser Vorkultur wurden 250ml SOC-Medium angeimpft und bei 18°C erfolgte das Wachstum bis zu einer OD_{600nm} von 0,55. Alle weiteren Schritte wurden mit vorgekühlten Materialien durchgeführt und eiskalte sterile Lösungen verwendet. Die Kultur wurde für 10min auf Eis inkubiert und anschließend durch Zentrifugation für 10min bei 4500rpm und 4°C sedimentiert. Nach dem vollständigen Entfernen des Mediums wurden die Zellen vorsichtig in 80ml Transformationspuffer (10mM PIPES (pH 6,7), 250mM KCl, 55mM $MnCl_2$ und 15mM $CaCl_2$) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 20ml Transformationspuffer resuspendiert und nach Zugabe von 1,5ml DMSO 10min auf Eis inkubiert. 100µl Aliquots dieser Suspension wurden und bei -70°C aufbewahrt.

Ultrakompetente *E. colis* wurden für die Transformation nach einer Ligation oder Mutagenese eingesetzt.

Transformation durch Hitzeschock

Werden Bakterien mit Plasmid-DNA in einer Suspension gemischt, lagert sich die DNA an die Polysaccharide auf der Zelloberfläche an. Die DNA-Aufnahme in die Zelle wird durch einen kurzen Hitzeschock (42°C, 90sec) und anschließender Temperaturabsenkung (4°C) induziert.

Für Transformationen durch Hitzeschock wurden 40µl kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes DH5α oder XL1-blue und ca.100ng DNA verwendet. Die Kultivierung erfolgte auf LB-Platten (mit entsprechendem Antibiotikum) über Nacht (ÜN) bei 37°C. Wurde für die Selektion Ampicillin verwendet, wurden die transformierten *E. coli*-Zellen direkt ausplattiert. Bei einer Selektion auf Kanamycin, erfolgte vor dem Ausplattieren eine Inkubation der transformierten Zellen für 30min in 800µl LB-Medium ohne Antibiotikum.

Für die Transformation ultrakompetenter Zellen, wurde die DNA zusammen mit den *E. colis* vor dem Hitzeschock 1h bei 4°C inkubiert. Vor dem Ausplattieren auf Selektionsmedium

erfolgte eine Inkubation der transformierten Zellen für 1h in 800µl SOC-Medium ohne Antibiotikum.

Präparation von Plasmid-DNA

Alle Plasmidpräparationen wurden mit dem Plasmid Mini- bzw. Maxi-Kit der Firma Qiagen nach Protokoll durchgeführt.

Bei dieser Methode erfolgt eine SDS gekoppelte, alkalische Lyse der Bakterienzellen. Die Trennung von Plasmid- und chromosomaler DNA wird durch ein schnelles Absenken des pH-Wertes erreicht. Chromosomale DNA haftet an den Zellwandbruchstücken und Proteinen in der unlöslichen Fraktion, Plasmid-DNA ist löslich, da sie schneller renaturiert. Bei geringer Salzkonzentration und niedrigem pH-Wert bindet die Plasmid-DNA an eine equilibrierte Anionenaustauschersäule. Anschließend werden Verunreinigungen durch Waschen bei mittlerer Salzkonzentration entfernt und bei hoher Salzkonzentration die Plasmid-DNA eluiert.

Die DNA wird bei der Maxipräparation mit Isopropanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in EB Puffer (Qiagen) aufgenommen.

Die präparierten Plasmide sind Ausgangsmaterial für Mutagenese, Transfektionen, Transformationen, Rekombinationen, Restriktionsspaltungen und Sequenzierungen.

DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration wurde am Nanodrop ND-1000 Spektralphotometer, gegen EB-Puffer (Qiagen) als Referenz, gemessen.

Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind natürliche Enzyme, die DNA an spezifischen Stellen spalten. Sie binden an spezifische Erkennungssequenzen auf einem DNA-Doppelstrang. Die Erkennungssequenzen sind 4-8 Basenpaare lang und zeigen palindromische Muster. Das Spalten der DNA erfolgt durch Hydrolysieren des Zucker-Phosphat-Rückgrates an definierten Phosphodiester-Bindungen. Die gespaltene DNA weist entweder glatte Enden (Blunt Ends) oder kohäsive Enden (Sticky Ends) auf, bei denen sowohl das 5`- als auch das 3`-Ende überhängen kann.

Für die Restriktionsspaltungen wurden 1U Enzym pro 1µg DNA und Spaltstelle eingesetzt. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte für 1h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur. Die Restriktionsspaltungen wurden zur Klonierung und für die Analyse von DNA verwendet.

Agarose-Gelelektrophorese

Die Trennung Nukleinsäuren (DNA) verschiedener Größe erfolgt mittels der Agarosegelelektrophorese. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA ist eine Auftrennung im Agarosegel durch Anlegen einer Spannung möglich. Die

Geschwindigkeit mit der sich die DNA-Moleküle fortbewegen ist u. a. abhängig von der Molekülgröße, der Agarosekonzentration, der angelegten Spannung und der Art des Laufpuffers. Die Nukleinsäuren können durch die Färbung mit Ethidiumbromid (EtBr) sichtbar gemacht werden. EtBr ist ein interkallierender Farbstoff, der nach dem Einbau in die DNA unter ultraviolettem (UV)-Licht fluoresziert.

Zur Analyse wurden 1% Agarosegele mit EtBr (50µg/100ml) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von ca. 100V. Nach anschließender Dokumentation unter UV-Licht konnten entsprechende DNA-Banden für eine Gelextraktion ausgeschnitten werden. Agarosegele wurden zur Überprüfung von DNA-Isolierung, zur DNA-Aufreinigung und zur Auftrennung verschieden großer DNA-Fragmente nach der Restriktionsspaltung eingesetzt.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zum Aufreinigen von DNA aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraktion Kit der Firma Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

Durch das chaotrope Salz NaClO₄ werden bei 50°C die Wasserstoffbrücken im Gel geschwächt und die Gelmatrix zerstört. Die DNA geht in Lösung und kann an eine Silicagel-beschichtete Membran gebunden werden. Verunreinigungen werden durch Waschen entfernt und die aufgereinigte DNA mit EB Puffer (Qiagen) eluiert.

Ligation von DNA-Fragmenten

Das Enzym T4-DNA-Ligase ist ursprünglich an der Replikation des Phagen T4 beteiligt. In der Molekularbiologie wird es eingesetzt, um DNA-Fragmente wieder zu verknüpfen, die durch Restriktionsspaltung entstanden sind. Die T4-DNA-Ligase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Veresterung von einer 5'-Phosphatgruppe mit einer 3'-OH-Gruppe. Für einen 10µl Ansatz wurden Insert-DNA und Vektor-DNA im Verhältnis 3:1 (mol) eingesetzt. Weiterhin wurden von der Firma Fermentas 1µl 10xReaktionspuffer, 1µl T4-Ligase (1U) und 1µl 50% PEG4000 (Endkonz. 5%) zum Ansatz hinzu gegeben. Die Inkubation erfolgte 2h bei RT (~25°C). 2µl des Ligationsprodukt wurde anschließend zur Transformation in *E.coli* eingesetzt.

Gerichtete *in vitro* Mutagenese

Die zielgerichtete Punktmutation der Plasmid-DNA wurde unter Verwendung des QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kits der Firma Stratagene in einer PCR durchgeführt.

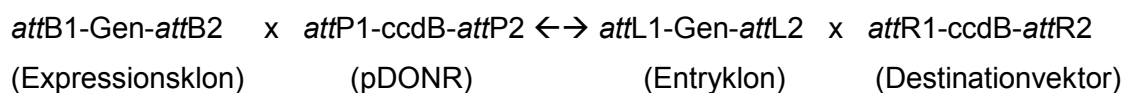
In der PCR-Reaktion dient die Plasmid-DNA, welche mutagenisiert werden soll, als Matritze. Durch zwei komplementäre Primer wird das gesamte Plasmid amplifiziert. In einer anschließenden Spaltungsreaktion werden die Matritzen, durch die methylierungssensitive Restriktionsendonuclease DpnI, verdaut. Die Primer enthalten den Nucleotidaustausch sowie

wenn möglich eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle, mit dessen Hilfe die Mutanten identifiziert werden können.

Der PCR-Ansatz enthielt 2,5µl 10xReaktionspuffer (Stratagene), 25ng Plasmid-DNA, je 125ng Primer1 (sense) und Primer2 (antisense), 5mM dNTP (MBI Fermentas) und 1,75U Pfu Ultra II DNA-Polymerase (Stratagene). Die Ansätze wurden mit dH₂O auf 25µl Endvolumen aufgefüllt. Die PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen: 30s 95°C (Denaturierung), gefolgt von 30 Zyklen aus je 30s 95°C (Denaturierung), 60s 65°C (Annealing), 180s 72°C (Extension). Nach dem DpnI-Verdau wurden 2µl der Ansätze für die Transformation von ultrakompetenten XL1-Blue eingesetzt.

Klonierung durch Rekombination

Bei dieser Art der Klonierung wurde die Gateway Technologie der Firma Invitrogen verwendet. Hierbei werden die Vorteile der spezifischen Rekombinationseigenschaften des Lambdabakteriophagen genutzt, wodurch die Möglichkeit eines schnellen und hoch effizienten DNA-Sequenzaustausches in verschiedene Vektoren erreicht wird. Die schematische Reaktion lautet wie folgt:



BP-Reaktion: *In vitro* Rekombination zwischen dem Expressionsklon des zu rekombinierenden Gens (enthält *attB*) und dem pDONR-Vektor (enthält *attP*). Als positives Produkt entsteht ein Entryklon mit dem gewünschtem Gen (enthält *attL*).

LR-Reaktion: *In vitro* Rekombination zwischen dem Entryklon des zu rekombinierenden Gens (enthält *attL*) und einem Destination-Vektor (enthält *attR*). Als positives Produkt entsteht ein Expressionsklon mit dem gewünschtem Gen (enthält *attB*).

Für diese Rekombination wurden in einem Gesamtvolumen von 2µl jeweils 40ng Expressions- oder Entryklon und 60ng Vektor sowie 0,5µl Clonase-Mix eingesetzt. Nach der Inkubation von 1h bei 25°C erfolgten die Zugabe von 0,5µl ProteinaseK und eine weitere Inkubation von 10min bei 37°C. Anschließend wurde der Reaktionsansatz zur Transformation in ultrakompetenten XL1-Blue eingesetzt. Die Selektion der positiven Klone erfolgte auf LB-Agarplatten mit Ampicillin.

DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierung erfolgten durch die FA GATC (<http://www.gatc-biotech.com>). Zur Analyse wurden 30µl DNA mit einer Konzentration von 30-100ng/µl in einem 1,5ml Safe lock Reagiergefäß verschickt. Entsprechende Primer wurden in der GATC Library ausgewählt oder in einem 1,5ml Safe lock Reagiergefäß mit 10pmol/µl (30µl) übersandt.

Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient dazu, bestimmte DNA-Abschnitte *in vitro* zu amplifizieren. Die zu vervielfältigende doppelsträngige DNA (Template) wird hierfür zunächst durch Hitze denaturiert. Mit zwei kurzen, zur DNA komplementären, einzelsträngigen DNA-Fragmenten (Primer) wird diese hybridisiert (Annealing). Anschließend erfolgt die Strangsynthese (Extension), bei der der DNA-Abschnitt zwischen den Primern mit Hilfe einer hitzebeständigen Polymerase (*Taq*- oder *Pfu*-Polymerase) neu synthetisiert wird. Durch Wiederholen dieser drei Schritte wird der Ausgangsabschnitt im Idealfall 2^x -fach vervielfältigt, wobei x für die Anzahl der Zyklen steht. Abschließend werden bei einer längeren Extensionszeit eventuell unvollendete Strangsynthesen fertig gestellt.

Die Reaktionsbedingungen wurden, wenn nicht anders angegeben, wie folgt gewählt: 90s 96°C (Denaturierung), gefolgt von 40 Zyklen aus je 30s 96°C (Denaturierung), 30s 50°C (Annealing), 180s 72°C (Extension) gefolgt von einer abschließenden Extensionszeit von 10min bei 72°C.

Real-time-PCR

Die reverse Transkription von 1µg der Gesamt-mRNA erfolgte unter der Verwendung von 50U BioScript RNase H Low reverse transcriptase (Bioline), 1U Oligo-dT7-Primer (Roche), 16U RNase-Inhibitor und 10mM dNTPs (Roche) in 20µl Reaktionsvolumen bei einer Inkubation von 1h bei 42°C. Abschließend wurden die Enzyme 10min bei 70°C inaktiviert. 0,8µl der synthetisierten cDNA wurden in 10µl Reaktionsvolumen in der real-time PCR in dem ABI7500 FAST real-time PCR system (Applied Biosystems) eingesetzt. Eine spezifische Amplifikation wurde durch den *Taqman Gene Expression Assay* (Applied Biosystems) gemäß den Herstellerempfehlungen sichergestellt. Folgende Assays wurden eingesetzt: Mm00446968_m1 (Houskeeper Hprt1), Mm00656724_m1 (Zielgen Egr1), Mm00457144_m1 (Zielgen Ttp), Mm00487425_m1 (Zielgen Fos) und Mm00495062_s1.

Als Maß für die Quantifizierung der DNA-Startmenge wurden die Ct-Werte (*cycle-threshold*) herangezogen. Sie entsprechen der Anzahl der PCR-Zyklen, die für das Erreichen eines konstant definierten Fluoreszenzniveaus notwendig sind. An diesem Punkt befindet sich in allen Ansätzen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Das Mittel der Ct-Werte wurde durch die 7500 FAST System Software v.1.3.0 mit der Einstellung „auto CT“ berechnet. Zur Normalisierung der Ct-Werte des untersuchten Gens (Fos, Jun, Egr-1 oder Ttp) wurden die Ct-Werte des Houskeepers Hprt-1 abgezogen, dies entspricht dem Δ Ct-Wert. Für einen übersichtlichen Vergleich im Diagramm wird die x-fache Änderung der Genexpression dargestellt. Hierzu wird der Δ Ct-Wert der Kontrolle gleich „null“ gesetzt und die Δ Ct-Werte der restlichen Messungen angeglichen. Die so erhaltenen Werte werden abschließend ins Quadrat gesetzt, da sich im Falle einer 100%igen Effizienz der PCR mit jedem Zyklus sich die DNA-Produktmenge verdoppelt.

Microarray

Für diese Studie wurde ein *Mouse Genome Oligo Microarray* (G4122F, ID 014868, Agilent Technologies) benutzt, mit dem 45018 Oligonukleotide des gesamten Maus-Transkriptoms untersucht werden können und wurden in Kooperation mit der Microarray Facility der Medizinischen Hochschule Hannover, unter der Leitung von Dr. Oliver Dittrich-Breiholz, durchgeführt. Die Synthese der Cy3- oder Cy5-markierten cRNAs wurde nach dem *Quick Amp Labeling kit, two color* (Agilent Technologies) gemäß den Herstellerempfehlungen durchgeführt. Die Fragmentierung, die Hybridisierung sowie alle Waschschriffe erfolgten nach dem *Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol V5.7* (<http://www.agilent.com>). Die Microarray-Slides wurde auf dem Agilent Micro Array Scanner G2505C (5 µm Pixelaufösung, Bit-Tiefe 20) gescannt. Die Datenextraktion erfolgte mit der *Feature Extraction Software V10.7.3.1* unter der Verwendung der Datei Standardextraktionsprotokolls: GE2_107_Sep09.xml.

2.3.2 Zellbiologische Methoden

2.3.2.1 Puffer und Lösungen

PBS	140mM NaCl 10mM Na ₂ HPO ₄ 7mM KCl 1,8mM KH ₂ PO ₄
PLC-Puffer	1% (v/v) Triton X-100 10% (v/v) Glycerol 150mM NaCl 50mM HEPES 1,5mM MgCl ₂ 1mM EGTA
DMEM Komplett	DMEM mit 10% FCS 1x L-Glutamin 1x Penicillin (100U/ml)/Streptomycin (100µg/ml)

Zelllinien

HEK293T	(<i>human, embryonic, kidney</i>) mit SV40 large T Antigen und adenoviralen Genen transformierte Nieren-Epithelzelllinie Kultivierungsmedium: DMEM Komplett
EcoPack2-293	basiert auf der HEK293-Zelllinie, die einen hohen Titer an rekombinantem MCMV-Virus 24-72h nach transienter Transfektion

produzieren kann. Der Virus infiziert effizient viele verschiedene Maus- und Ratten-Zellen.

Kultivierungsmedium: DMEM Komplett

MEF (*mouse embryonic fibroblasts*) embryonale Fibroblasten aus der Maus

Kultivierungsmedium: DMEM Komplett mit 5% NEAA

MEF MK2/MK3^{-/-} MEF-Zellen mit MK2- und MK3-*knockout* [111]

MEF STAT5^{-/-} MEF-Zellen mit STAT5a- und STAT5b-*knockout* [114]

Kultivierung von Zellkulturen

Die Zellen wurden in entsprechendem Kultivierungsmedium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Passagieren der HEK293T-Zellen erfolgte 1:3 im Abstand von drei Tagen ohne Trypsin. MEF-Zellen wurden 1:10-1:20 unter der Verwendung von Trypsin passagiert.

Transiente Transfektion von Gewebekulturzellen

Das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Die DNA-Moleküle können nicht durch die Zellmembran diffundieren, sondern gelangen als Komplex mit anderen Reagenzien in das Zytoplasma.

Alle Transfektionen wurden mit Polyethylenimin (PEI) durchgeführt. Das Reagenz und die DNA interagieren und bilden kleine (30-100nm), stabile Komplexe. Diese Komplexe lagern sich auf der Zelloberfläche an und werden durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Die DNA gelangt in den Zellkern und kann transkribiert werden. Für die Zelltransfektion wurden HEK293-Zellen in entsprechenden Kultivierungsgefäßen (z.B. 12 well-Platte) 24h vor der Transfektion ausgesät. Der Transfektionsansatz pro well (A=3,9cm²) einer 12 well-Platte enthielt 750ng Plasmid-DNA und 3,1µl PEI in einem Gesamtvolumen von 50µl DMEM. Nach dem Vortexen (10s) und einer Inkubation von 10min bei RT erfolgten ein Mediumwechsel (450µl DMEM komplett) und die Zugabe des Transfektionsansatzes auf die Zellen. Die Transfektionsdauer betrug 24h. Anschließend wurden die Zellen mikroskopisch überprüft und lysiert.

Bei Transfektionen in anderen Gefäßen (z.B. einer 6 well-Platte) wurden die DNA-Menge und die Volumina des Transfektionreagenzes und des Mediums entsprechend der Kultivierungsfläche angeglichen.

Ubc9-fusion directed SUMOylation-System (UFDS)

Zur gezielten SUMOylierung von Proteinen (Substrat) wurde das *Ubc9-fusion directed SUMOylation-system* (UFDS) eingesetzt. Das Substratprotein wird direkt an das konjugierende Enzym Ubc9 (E2) fusioniert. Durch die räumliche Nähe der beiden Komponenten kann, auch in Abwesenheit von substratspezifischen SUMO-Ligasen (E3), das Substrat SUMOyliert werden. Die notwendige Bewegungsfreiheit für die Interaktion wird durch einen *Spacer* aus fünf Aminosäuren (Glu-Phe-Gly₃), zwischen den beiden Proteinen, gewährleistet (Abbildung 8).

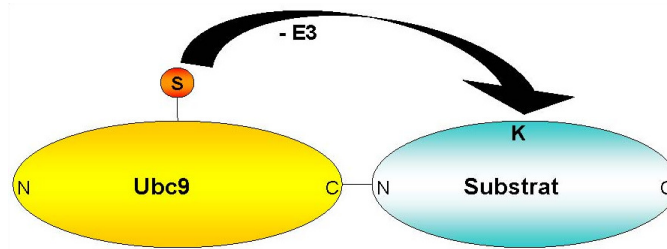


Abbildung 8: Ubc9 fusion-directed SUMOylation-System (UFDS). Das Substratprotein liegt als Fusionsprotein mit dem konjugierenden Enzym (E2) Ubc9 vor. Durch die räumliche Nähe wird das Substrat auch in Abwesenheit der SUMO-Ligase (E3) konjugiert. N und C kennzeichnen das jeweilige terminale Ende des Proteins, K die SUMOylierungsstelle. Das S bezeichnet das an Ubc9 konjugierte SUMO. Abbildung verändert nach [115]

Zellyse

Die Proteinauftrennung über eine SDS-PAGE erfordert die Lyse und der zuvor transfizierten Zellen. Die Lyse der Lipid-Doppelschicht erfolgt durch das Detergens Triton X-100, welches im Wasser dazu neigt Micellen zu bilden. Die hydrophoben Enden des Detergens binden an die hydrophoben Regionen der Membranproteine und verdrängen dadurch die Lipidmoleküle. Durch das polare Detergensende entsteht ein Membranprotein-Detergens-Komplex, der in Lösung geht. Analog werden auch Lipid-Detergens-Micellen gebildet.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, in PLC-Puffer (60µl pro well einer 12 well-Platte) aufgenommen und 30min in Eis auf der Inkubationswippe inkubiert. Anschließend wurden die Proben 20min mit 13000rpm bei 4°C zentrifugiert, der Überstand in 2x SDS-Gelladungspuffer (60µl pro well einer 12 well-Platte) aufgenommen und für 10min bei 95°C aufgeköcht. Die Proben wurden direkt auf ein SDS-Gel geladen oder bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt.

Proteinaufreinigung

Proteine mit einem GST-Tag wurden über Glutathione Sepharose4B-Beads (GE Healthcare) aufgereinigt, Proteine die einen Strep-Tag enthielten über Strep-Tactin-Beads (IBA). Die Proteinaufreinigung erfolgte im Batch-Verfahren mit entsprechenden Beads.

Zellen einer 10cm Schale wurden in 500µl PLC-Puffer mit Proteaseinhibitoren (Roche) lysiert. 450µl Extrakt wurden ÜN bei 4°C im Überkopfmischer mit 25µl mit PLC gewaschener Beads inkubiert. Zur Beseitigung nicht gebundener Proteine wurden die Beads 3x mit PLC gewaschen, in 25µl 2xGelladungspuffer aufgenommen und für 10min bei 95°C aufgeköcht. Die Zentrifugation der Beads erfolgte 3min bei 4°C und 2000rpm.

Immortalisierung

Die Immortalisierung erfolgte durch die Transfektion von primären MEF STAT5^{-/-}-Zellen in einer 6cm-Schale. 600µl DMEM, 5µg pSV40 LT, 1µg pREP8 und 12µl TurboFect der Firma Fermentas wurden gemischt und nach 25min Inkubation bei RT tropfenweise auf die Zellen gegeben. 8h später erfolgte ein Mediumwechsel mit Kultivierungsmedium und 48h nach der Transfektion die Zugabe von 4mM Histidinol.

Stabile Zellkulturen durch viralen Gentransfer in MEF-Zellen

Retrovirale Produktion

EcoPack2-293-Zellen einer 10cm-Schale wurden mit 5µg des entsprechenden retroviralen Expressionsvektor pMSCV und 5µg pCL-Eco transfiziert. 8h nach der Transfektion erfolgten ein Mediumwechsel und die weitere Inkubation bei 32°C zur Virusproduktion. Virusenthaltendes Medium wurde jeweils nach 24h und 32h von den Zellen abgenommen und vereinigt (Pool1) sowie nach 48h und 56h (Pool2). Das Medium wurde 10min bei 1000rpm zentrifugiert und durch 0,45µm filtriert. 2ml jeden Pools wurden direkt für die Infektion eingesetzt, das restliche Medium bei -80°C gelagert.

Infektion und Gentransfer der MEF-Zellen

Für die Infektion wurde jeweils 2ml virusenthaltendes Medium mit 8µg Polybrene versetzt. MEF-Zellen einer 6-well Platte wurden 2x für 18-22h bei 37°C infiziert (Pool1, Pool2). Zwischen den beiden Infektionen lag eine Erholungsphase von 8h in Kultivierungsmedium. 24h nach der letzten Infektion erfolgte die Selektion mit HygromycinB (200µg/ml).

Der retrovirale Gentransfer wurde für die Komplementation von STAT5^{-/-}- und MK2/3^{-/-}-Zellen mit folgenden Konstrukten verwendet:

1. jeweils pMSCV (Leervektor, Kontrolle, Mockzellen)
2. STAT5a-IRES-EGFP
3. STAT5aK696R-IRES-EGFP
4. MK2-IRES-EGFP
5. MK2K339/359/360R-IRES-EGFP

RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte gemäß Herstellerprotokoll mit dem NucleoSpin RNA II-Kit der Firma Macherey und Nagel.

Zellen einer 6cm-Zellkulturschale wurden mit PBS gewaschen und für die Isolation in 350µl RA1-Puffer mit 2% DTT (500mM) mechanisch gelöst. Die Elution der RNA erfolgte in 40µl RNase-freiem Wasser.

Die RNA wurde direkt für die reverse Transkription eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

2.3.3 Biochemische Methoden

2.3.3.1 Puffer und Lösungen

2x Laemmli-Puffer	4% SDS 20% Glycerol 160mM Tris/ HCl (pH 6,8) → vor Gebrauch 5% β -Mercaptoethanol und 8% Bromphenolblau-Lösung hinzugeben
10x SDS-Laufpuffer	1% (w/v) SDS 2M Glycin 250mM Tris/HCl (pH 8,8)
SemiDry-Puffer	20% (v/v) Methanol 0,037% (w/v) SDS 48mM Tris 39mM Glycin
Stripping-Puffer	2% (w/v) SDS 0,7% (v/v) β -Mercaptoethanol 62mM Tris/ HCl, pH 6,8
TBS-T	150mM NaCl 20mM Tris-HCl, pH 7,6 0,1% (v/v) Tween20
Coomassie-Färbelösung	1g Coomassie R 1g Coomassie G 50% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-PAGE können Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Je nach Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins wurden verschiedenprozentige Trenngele eingesetzt. Die Zusammensetzung für 30ml eines 7,5% Trenngels ist wie folgt: 7,5ml 30% Acrylamidlösung, 11,2ml 1M Tris (pH 8,8), 150 μ l 20% SDS, 11,2ml H₂O, 200 μ l 10% APS und 50 μ l TEMED. Für andersprozentige Gele wird die Menge an Acrylamid entsprechend variiert und mit H₂O auf ein Volumen von 30ml aufgefüllt. Die verwendeten Sammelgele waren 5% (Zusammensetzung: 1,7ml 30% Acrylamidlösung, 1,25ml 1M Tris (pH 6,8), 50 μ L 20% SDS, 7,3ml H₂O, 50 μ l 10% APS, 15 μ l TEMED). Pro Gelladungstasche wurden 15 μ l Probe bzw. Marker geladen. Die Elektrophorese erfolgte in einer Apparatur der

Firma Bio-Rad in 1x SDS-Laufpuffer mit 12V/cm. Anschließend wurden die Gele für einen Western Blot verwendet oder die Proteine mit Coomassie gefärbt.

Western Blot (WB)

Durch Western Blot-Technik werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine in einem elektrischen Feld vom Gel auf eine Membran übertragen (Blotten). Die transferierten Proteine können anschließend mit immunochemischen Techniken analysiert werden.

Der Transfer der Proteine erfolgte durch SemiDry-Blotting auf eine PVDF-Membran (Roth) in einer Western Blotkammer (Sigma-Aldrich). Die Membran wurde vor der Verwendung zur Aktivierung kurz in 96% Methanol geschwenkt und anschließend mit SemiDry-Blot-Puffer gewaschen. Der elektrophoretische Transfer erfolgte in SemiDry-Blot-Puffer durch Anlegen eines Stromes von $0,8\text{mA/cm}^2$ Gel für 1,5h.

Immunochemischer Nachweis von Proteinen

Nach dem Blotten wurde die PVDF-Membran für 30min bei Raumtemperatur (RT) in TBS-T / 5% (w/v) Milchpulver abgesättigt und der primäre Antikörper in 2ml TBS-T auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte ÜN im Drehrad bei 4°C. Vor der Zugabe des sekundären Antikörpers wurde der Blot 3x 5min bei RT mit TBS-T gewaschen. Der sekundäre, mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper wurde in 2ml TBS-T/5% (w/v) Milchpulver verdünnt. Nach 1h Inkubation bei RT im Drehrad wurde der Blot 3x mit TBS-T gewaschen. Die Entwicklung erfolgte mit dem Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (MilliPore). Der Blot wurde mit je 500 μl Lösung A und Lösung B überschichtet und die entstehende Fluoreszenz mit Hilfe des Fuji LAS3000-Systems detektiert.

Für die Analyse mit weiteren primären Antikörpern, wurde die Membran 30min bei 50°C mit Stripping-Puffer inkubiert, wodurch die bereits gebundenen Antikörper von der Membran entfernt wurden. Anschließend wurde die Membran 3x mit TBS-T gewaschen und wie oben beschrieben, erneut geblockt und der Immunochemische Nachweis durchgeführt.

Coomassie Färbung von Polyacrylamidgelen

Um Proteine in einem Polyacrylamid-Gel sichtbar zu machen, wurden dieses 1min in einer Coomassie-Färbelösung in der Microwelle kurz erhitzt und anschließend 15min auf einer Wippe bei RT geschwenkt. Das Entfärben erfolgte durch mehrmaliges Aufkochen und Schwenken des Geles in dH_2O .

Massenspektrometrische (MS)-Analyse

Die MS-Analyse wird zur Bestimmung der Masse von Proteinen und Peptiden eingesetzt. Hierbei erfolgt die Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Ein Massenspektrometer besteht prinzipiell aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor. In der Ionen-Quelle werden aus einer Substanzprobe freie Ionen emittiert, die dann im Analysator hinsichtlich ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses (m/z) aufgetrennt

werden. Im Detektor wird das Ionensignal aufgezeichnet und in ein Massenspektrum umgerechnet.

In dieser Arbeit wurden die zwei verschiedenen Ionisationsmethoden MALDI-(*Matrix assisted laser desorption ionisation*) und ESI-(*Elektrospray Ionisierung*) MS in einer Kooperation mit der Core Facility massenspektrometrische (MS-) Proteinanalytik der Medizinischen Hochschule Hannover, unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas Pich, eingesetzt.

Probenvorbereitung für die MS-Analyse

Die gereinigten Proteinextrakte wurden vor der Trennung im SDS-Gel mit Acrylamid behandelt, um die Cysteinreste zu alkylieren. Hierzu wurden 30µl Probe in Laemmli-Puffer aufgekocht und anschließend sofort mit 1µl 40% Acrylamid (Serva) versetzt. Nach 20 min Inkubation bei RT wurden die Proteine im SDS-Gel getrennt und durch Coomassie gefärbt. Die Proteine wurde im Gel mit der Endoproteinase Trypsin verdaut und anschließend die entstandenen Peptide aus dem Gel extrahiert.

a) MALDI-TOF/TOF-MS (*Matrix-Assisted-Laser-Desorption / Ionization – Time-Of-Flight Mass-Spectrometry*)-Analyse

Die Durchführung der Analyse erfolgte mit einem Ultraflex I Maldi TOF/TOF (Bruker Daltonik, Bremen). Die Peptide wurden in 5% Acetonitril und 0,2% Trifluoressigsäure gelöst. 1µl Probe (Peptidmischung) wurde mit 1µl Matrixlösung (1mg/ml α -Cyanohydroxyzimtsäure in 50% Acetonitril und 0,2% Trifluoressigsäure) auf einem *Ancortaget* (Bruker Daltonik, Bremen) gemischt und getrocknet. Für die MS-Messungen wurden die Ionen mit 25kV beschleunigt und in einer Reflektormessung die Peptidmassen bestimmt. Eine Messung ergibt sich aus 1000 aufsummierten Einzelspektren. Die externe Kalibration erfolgte durch die Verwendung eines Peptidstandards (Peptidecalibrationstandard I; Bruker Daltonik, Bremen).

b) LC-ESI-MS (LC = Flüssigkeitschromatografie reversed Phase, ESI = Elektrospray-Ionisierung)

Für die Analyse wurden die Peptide in 2% Acetonitril und 0,2% Ameisensäure gelöst und in einer reversed phase Chromatografie in einem nano-LC-System (Dionex) mit einer C18 Pepmap-Säule (Dionex) getrennt. Der Auslass der LC war direkt mit der Elektrospray Ionenquelle des LTQ Orbitrap-Velos (Thermo Fisher Scientific) Massenspektrometers verbunden. Die Durchführung der Messung erfolgte mit einer Top10-Methode und mittels *High capacity dissociation* (HCD)- Fragmentierung. Die Massenauflösung wurde auf 60.000 eingestellt, so dass Massengenauigkeiten von ca. 1 ppm erreicht wurden. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Datenbankanalyse und dem MASCOT-Suchalgorithmus (Matrix Science UK) sowie den Softwarepaketen *Proteome Discoverer* (Thermo Fisher Scientific) und *Biotoools* (Bruker Daltonik).

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung des *Ubc9/substrate dimerization-dependent SUMOylation (USDDS)-Systems*

Die Identifikation und die Analyse von Protein-SUMOylierungen wird sehr oft dadurch erschwert, dass ein spezifisches SUMOylierungssubstrat in der Zelle gering exprimiert ist und nur ein geringer Teil des Proteins SUMOyliert in der Zelle vorliegt. Des Weiteren werden viele SUMOylierungen nur durch eine spezifische Ligase oder nach einer spezifischen Stimulation induziert. Um die niedrigen Level an SUMOylierung *in vivo* zu erhöhen, wurde das *Ubc9 fusion-directed SUMOylation* (UFDS)-System entwickelt (Abbildung 8) [115]. Durch die Fusion des konjugierenden Enzyms (Ubc9) an das Substratprotein ist es möglich, gezielt ligaseunabhängig eine stärkere SUMOylierung eines Substrates an seinen spezifischen SUMOylierungsstellen herbeizuführen. Weiterführende Untersuchungen wie zum Beispiel kinetische SUMOylierungsstudien oder die Untersuchung von Substrat-SUMOylierung nach vorheriger Substratmodifikation sind wegen der dauerhaften Substrat-Ubc9-Fusion mit UFDS nicht durchführbar.

Um diese Einschränkung zu überwinden, sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit ein System entwickelt werden, mit dem gezielt *in vivo* SUMOylierung induziert werden kann: das *Ubc9/substrate dimerization-dependent SUMOylation* (USDDS)-System (Abbildung 9). In diesem System wird die Ausbildung eines stabilen rapamycininduzierten Heterodimers zwischen FKBP12 (12kDa-FK506-binding protein) und der FRB (FKBP12-rapamycin-binding)-Domäne des FRAP (FKBP-rapamycin-associated protein) genutzt [116]. Für den Einsatz des USDDS-Systems wurden die FRB- oder die FKBP-Domäne an Ubc9 und die entsprechend andere Domäne an das zu untersuchende Substratprotein fusioniert (Abbildung 9A). Die beiden Domänen heterodimerisieren, induziert durch das synthetische Rapamycinderivat AP21967 [117], wodurch das mit SUMO beladene Ubc9-Fusionsprotein und das Substrat-Fusionsprotein in räumliche Nähe zueinander gebracht werden und die Übertragung des SUMOs auf das Substrat erfolgen kann (Abbildung 9B). Erste Studien durch USDDS wurden mit den bekannten SUMOylierungssubstraten STAT1 und p53 durchgeführt (Abbildung 9C), da die spezifische SUMOylierung dieser Proteine durch UFDS bereits in der Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte.

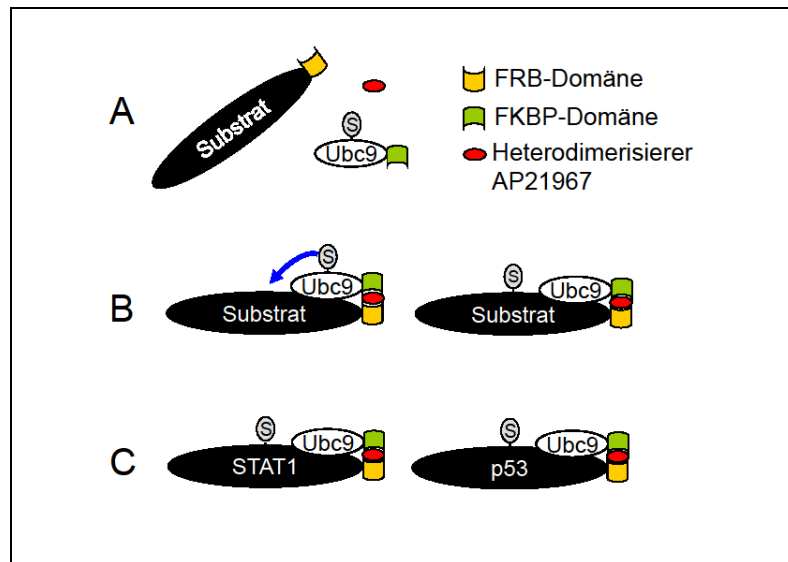


Abbildung 9: Schematische Darstellung des USDDS-Systems. (A) Eine Heterodimerisierungsdomäne (z.B. FRB) wird an das Substrat und die entsprechend andere Domäne (z.B. FKBP) an Ubc9 fusioniert. (B) Nach Koexpression der beiden Fusionsproteine in HEK293-Zellen und Inkubation mit dem membrangängigen Heterodimerisierer AP21967 erfolgt die Heterodimerisierung der beiden Fusionsproteine. Das Substrat und das mit SUMO beladene Ubc9 befinden sich in unmittelbarer Nähe zueinander, wodurch die SUMO-Übertragung auf das Substrat erfolgen kann. (C) Das System wurde mit den bekannten SUMOylierungs substraten STAT1 und p53 getestet. Abbildung verändert nach [118]

3.1.1 Induktion substratspezifischer SUMOylierung durch AP21967-abhängige Ubc9-Bindung

Die Heterodimerisierungsdomänen FRB und FKBP wurden jeweils C-terminal an das Substrat (STAT1-FRB, STAT1-FKBP, p53-FRB und p53-FKBP) und an Ubc9 (Ubc9-FRB und Ubc9-FKBP) fusioniert und die verschiedenen Kombinationen der Domänen *in vivo* getestet. Abbildung 10 zeigt die Western Blot-Analyse der Proteinextrakte nach der Kotransfektion der Expressionsplasmide des Substrat-FRB, EGFP-SUMO1 mit dem Ubc9-FKBP-Expressionsplasmid und entsprechender Induktion der SUMOylierung in HEK293-Zellen.

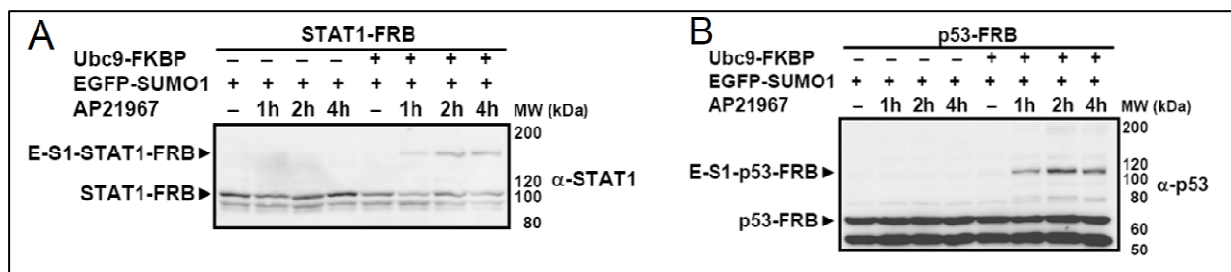


Abbildung 10: AP21967 induziert *in vivo* STAT1- und p53-SUMOylierung. Expressionsplasmide für (A) STAT1-FRB und EGFP-SUMO1 oder (B) p53-FRB und EGFP-SUMO1 wurden allein (-) oder zusammen mit Ubc9-FKBP (+) in HEK293-Zellen kotransfiziert. 24h nach der Transfektion erfolgte die Inkubation der Zellen mit AP21967 (1 μ M) für die angegebene Dauer. Die Fusionsproteine in den Zellextrakten wurden im Western Blot mittels (A) STAT1-Antikörper (α -STAT1) und (B) p53-Antikörper (α -p53) nachgewiesen. E-S1-STAT1-FRB = STAT1-FRB-Fusionsprotein konjugiert mit EGFP-SUMO1; E-S1-p53-FRB = p53-FRB-Fusionsprotein konjugiert mit EGFP-SUMO1. [118]

Für die SUMOylierung des Substrates ist die Koexpression von Ubc9 und EGFP-SUMO1 allein nicht hinreichend, sondern es muss eine mindestens einstündige Inkubation mit dem Heterodimerisierer AP21967 erfolgen. Die Menge an SUMOyliertem Substrat kann durch eine AP21967-Inkubation von 2h erhöht werden, erreicht dann aber ihren Höhepunkt.

Die Substrat-FKBP Expressionsplasmide wurden mit Ubc9-FRB in gleicher Weise getestet und lieferten gleiche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 *Ubc9/substrate dimerization-dependent SUMOylation (USDDS) erfolgt an substratspezifischer SUMOylierungsstelle*

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die SUMOylierung unter Verwendung des USDDS an der bekannten SUMOylierungsstelle bestimmter Substratproteine stattfindet. Hierzu wurden die entsprechenden SUMOylierungsstellen der Substrate von Lysin (Lys, K) nach Arginin (Arg, R) mutiert (STAT1-K703R-FRB und p53-K386R-FRB) und die USDDS im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Der Aminosäureaustausch erfolgt bei SUMOylierungsuntersuchungen von Lys nach Arg, da beide Aminosäuren die gleiche Charakteristik des positiv geladenen Restes aufweisen. Die Mutation sollte daher mit Ausnahme der Nicht-SUMOylierbarkeit keine Auswirkungen auf das Protein haben. In HEK293-Zellen konnte keine SUMOylierung der Mutanten STAT1-K703R-FRB oder p53-K386R-FRB (Abbildung 11A und 11B) festgestellt werden. Offenbar führt die induzierte Heterodimerisierung von Ubc9 und dem Substratprotein zu einer bevorzugten SUMOylierung an der spezifischen SUMOylierungsstelle.

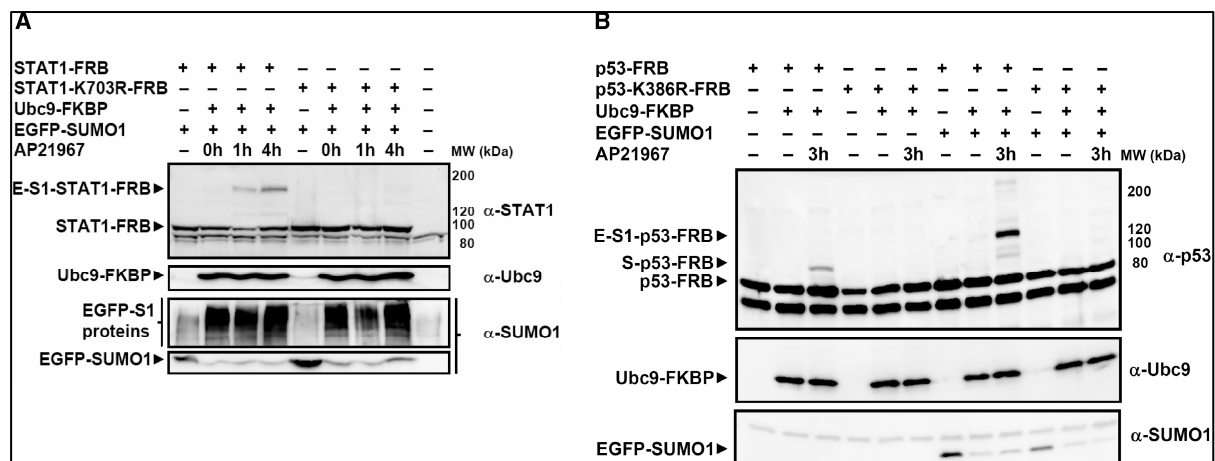


Abbildung 11: USDDS erfolgt an substratspezifischer SUMOylierungsstelle. Expressionsplasmide für EGFP-SUMO1 und (A) STAT1-FRB oder STAT1-K703R-FRB, (B) p53-FRB oder p53-K386R-FRB wurden allein (-) oder zusammen mit Ubc9-FKBP (+) in HEK293-Zellen kotransfiziert. 24h nach der Transfektion erfolgte die Inkubation der Zellen mit AP21967 (1 μ M) für die angegebene Dauer. Die Fusionsproteine in den Zellextrakten wurden im Western Blot mittels (A) STAT1-Antikörper (α -STAT1) und (B) p53-Antikörper (α -p53) nachgewiesen. Nach dem Strippen wurde Ubc9-FKBP mit einem Ubc9-Antikörper (α -Ubc9) und EGFP-SUMO1 mit einem SUMO1-Antikörper (α -SUMO1) nachgewiesen. E-S1-STAT1-FRB = STAT1-FRB-Fusionsprotein konjugiert mit EGFP-SUMO1; E-S1-p53-FRB = p53-FRB-Fusionsprotein konjugiert mit EGFP-SUMO1. [118]

3.1.3 Überprüfung der Funktionalität des *Ubc9/substrate dimerization-dependent SUMOylation* (USDDS)-Systems und Identifizierung neuer SUMOylierungssubstrate

Die generelle Funktionalität des USDDS-Systems wurde mit möglichen SUMOylierungsprodukten, die im *Ubc9 fusion-directed SUMOylation* (UFDS)-System untersucht worden waren [115], überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Vergleich der Protein-SUMOylierung im USDDS- und UFDS-System.

Substratprotein	SUMOylierung im USDDS-System	SUMOylierung im UFDS-System
STAT1	+	+
p53	+	+
CRSP9	+	+
FOS	+	+
CSNK2B	+	+
EDF1	+/-	+
TCF21	+	+/-
ATF3	+/-	+/-
VDRIP	-	-
STK16	-	-
CKS2	-	-
RFXANK	-	-
CDK4	-	+/-
MAPK13	-	+/-
CDKN3	-	+/-
CDKN2D	-	+/-
MYF6	+	-
HES1	+	-

Die SUMOylierung der untersuchten Proteine im USDDS-System wurde mit der SUMOylierung der gleichen Proteine im UFDS-System [119] verglichen. Die FKBP-Domäne war hierbei an den C-Terminus der Fusionsproteine kloniert. (+) SUMOylation; (+/-) schwache SUMOylierung; (-) keine SUMOylierung nachweisbar. [118]

HEK293-Zellen wurden mit den entsprechenden Expressionsplasmiden der Substratprotein-FKBP-Fusionsproteine und Ubc9-FKBP allein (-) oder mit EGFP-SUMO1 (+) kotransfiziert. Die Induktion der SUMOylierung (USDDS) mit dem Heterodimerisierer AP21967 erfolgte vor der Zelllyse für 4h. Die SUMOylierung konnte in der Western Blot-Analyse für CRSP9, FOS, CSNK2B, TCF21 durch USDDS verifiziert werden (Abbildung 12A-D) und MYF6 sowie HES1 konnten als neue SUMOylierungssubstrate identifiziert werden (Abbildung 12E-F). Die Proteine VDRIP, STK16, CKS2, RFXANK zeigten weder UFDS noch USDDS. CDK4,

MAPK13, CDKN3 und CDKN2D zeigten schwache SUMOylierung im UFDS-System, die jedoch mittels USDDS nicht bestätigt werden konnte.

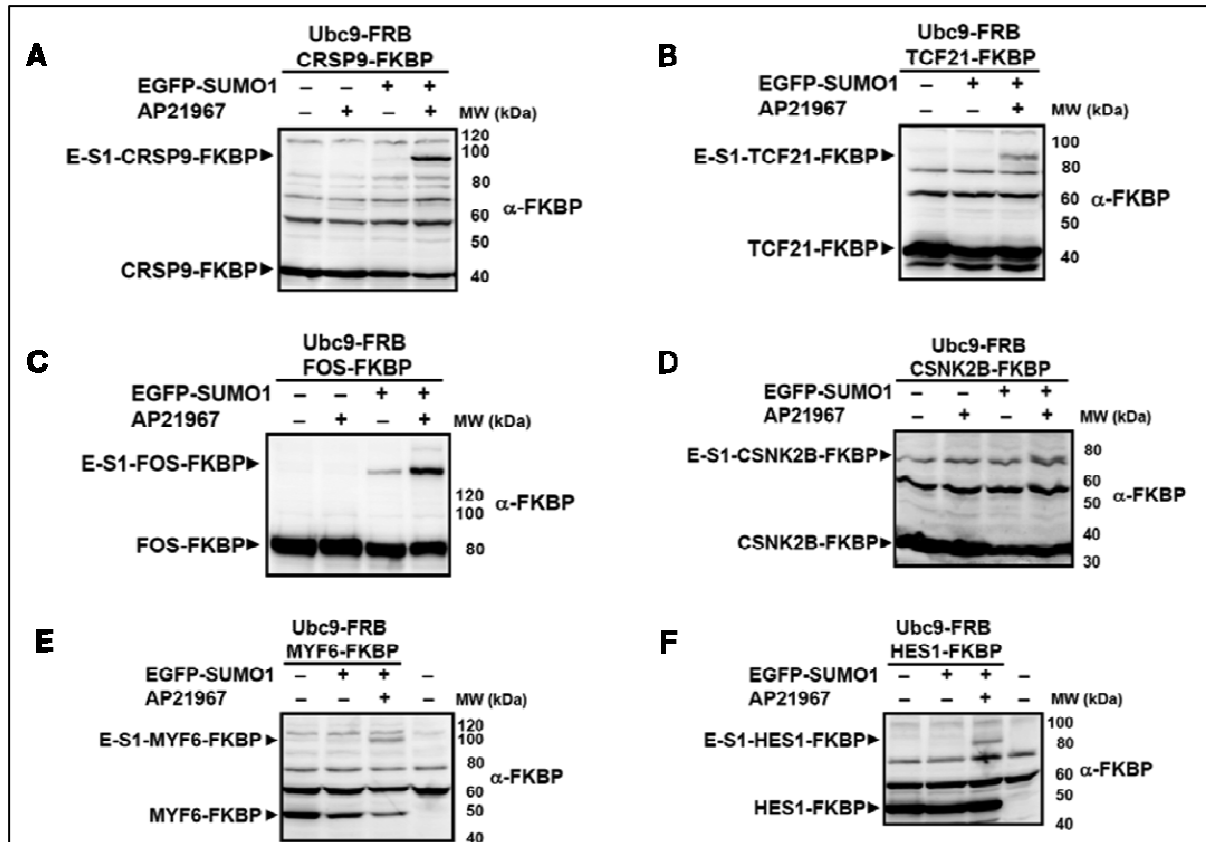


Abbildung 12: AP21967-induzierte SUMOylierung verschiedener Substrate im USDDS-System. Ubc9-FRB und Substrat-FKBP wurden allein (-) oder mit EGFP-SUMO1 koexprimiert. 24h nach der Transfektion erfolgte die Inkubation der Zellen wie angegeben für 4 Stunden mit AP21967 (1 μ M). Die Fusionsproteine in den Zellextrakten wurden im Western Blot mit einem FKBP-Antikörper (α -FKBP) nachgewiesen. (A-D) Verifikation der SUMOylierung mittels UFDS-System identifizierter SUMOylierungsprodukte. (E-F) Identifizierung neuer SUMOylierungsprodukte. E-S1-Substrat-FKBP = Substrat-FKBP-Fusionsprotein konjugiert mit EGFP-SUMO1 [118]

3.2 Untersuchungen zur SUMOylierung und zur Tyrosin-Phosphorylierung der STAT-Proteine

3.2.1 Phosphorylierung an STAT1Y701 schließt K703-SUMOylierung an STAT1 aus

Interferonstimulation von STAT1-transfizierten COS7-Zellen führt nicht nur zu einer Erhöhung der STAT1-Phosphorylierung [120], sondern auch zu einer vermehrten STAT1-SUMOylierung [121, 122]. Daher könnte man annehmen, dass die STAT1Y701-Phosphorylierung direkt die SUMOylierbarkeit von STAT1 an K703 erhöhe. Mittels *Ubc9 fusion-directed SUMOylation* (UFDS) konnte in der Arbeitsgruppe bisher die Inhibierung der STAT1Y701-Phosphorylierung durch STAT1K703-SUMOylierung [115] gezeigt werden. Auf Grund der kontinuierlichen SUMOylierung von STAT1 im UFDS-System war es bislang nicht möglich, den entgegengesetzten Fall, den Einfluss der Phosphorylierung auf die SUMOylierung, zu untersuchen. Durch die Etablierung der induzierbaren SUMOylierung des USDDS-Systems kann nun auch diese Wechselwirkung *in vivo* analysiert werden. HEK293-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden STAT1-FRB bzw. -FKBP, Ubc9-FKBP bzw. -FRB und EGFP-SUMO1 kotransfiziert. Vor der Induktion der SUMOylierung (USDDS) mit dem Heterodimerisierer AP21967 wurden die Zellen für 1h mit Interferon- β (1000U/ml) stimuliert, um die Phosphorylierung an STAT1Y701 vor der SUMOylierung herbeizuführen. Abbildung 13 zeigt die Y701-Phosphorylierung (α -pY701STAT1) von STAT1-FRB und endogenem STAT1.

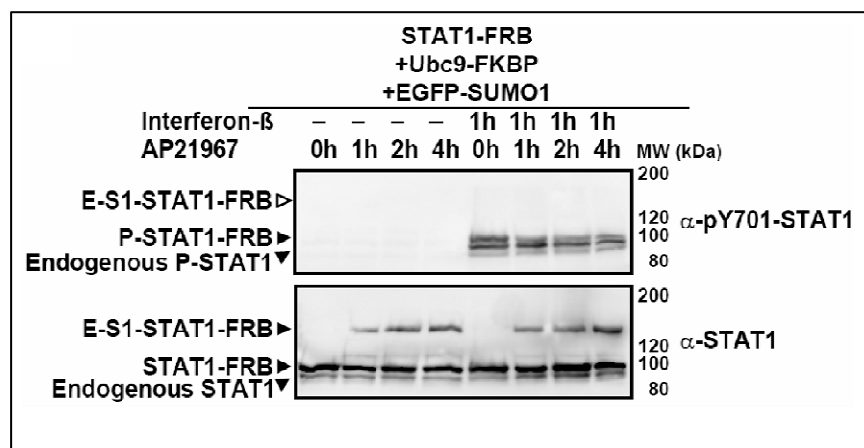


Abbildung 13: STAT1Y701-Phosphorylierung schließt SUMOylierung an STAT1K703 aus. Für USDDS wurden Expressionsplasmide für STAT1-FRB mit Ubc9-FKBP und EGFP-SUMO1 in HEK293-Zellen kotransfiziert. Nach 24h wurden die Transfektanten für 1h mit Interferon- β stimuliert (1h) oder unbehandelt (-) weiterinkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit AP21967 (1 μ M) für die angegebene Dauer. Die Proteine der Transfektanten wurden im Western Blot mittels phospho (p)Y701STAT1-Antikörper (α -pY701STAT1) auf das phosphorylierte und nach dem Strippen auf das gesamte nicht phosphorylierte STAT1-Fusionsprotein mit einem STAT1-Antikörper (α -STAT1) untersucht. E-S1-STAT1-FRB = STAT1-FRB-Fusionsprotein konjugiert mit koexprimiertem EGFP-SUMO1; P-STAT1-FRB = STAT1-FRB phosphoryliert an Y701; der weiß gefüllte Pfeil gibt die Position an, an dem phosphoryliertes E-S1-STAT1-FRB von dem (p)Y701STAT1-Antikörper (α -pY701STAT1) angezeigt werden sollte.[118]

SUMOyliertes STAT1-FRB mit gleichzeitiger Y701-Phosphorylierung ist zu keinem Zeitpunkt sichtbar. Die Entwicklung mit einem STAT1-spezifischem Antikörper zeigt deutlich die SUMOylierung nach 1h, 2h und 4h Inkubation mit AP21967. Folglich schließt die STAT1-Phosphorylierung an Y701 die K703-SUMOylierung aus.

3.2.2 pY701 und K703-SUMOylierung an STAT1 schließen sich gegenseitig aus

Die Ergebnisse durch UFDS [115] und USDDS legen die Vermutung nahe, dass die Y701-Phosphorylierung und K703-SUMOylierung von STAT1 zwei sich gegenseitig ausschließende (exklusive) Modifikationen sind. Um das dynamische Wechselspiel zwischen der Y701-Phosphorylierung und der K703-SUMOylierung von STAT1 *in vivo* weiter zu charakterisieren, wurde STAT1-FRB bzw. -FKBP im USDDS-System untersucht. Die entsprechenden Expressionsplasmide wurden in HEK293-Zellen kotransfiziert und die Transfektanten erst, zur Induktion der Phosphorylierung, mit Interferon- β stimuliert und anschließend, zur Induktion der SUMOylierung, mit AP21967 bzw. umgekehrt.

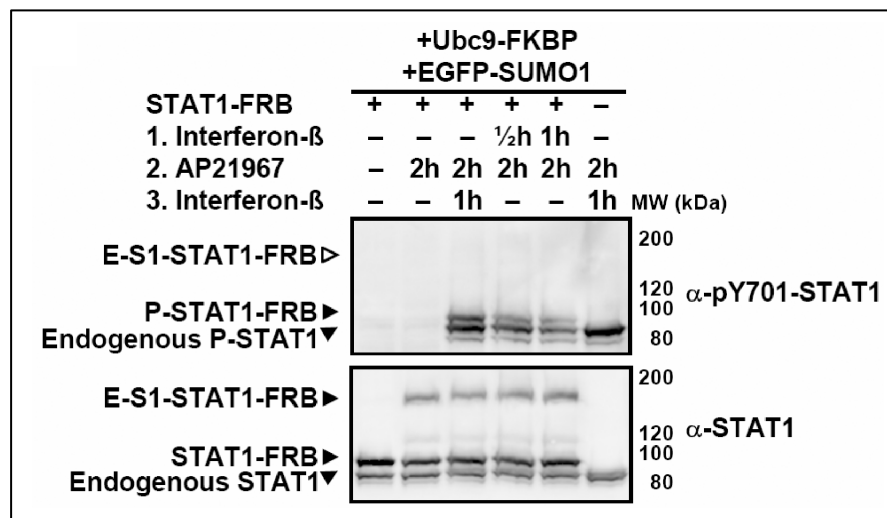


Abbildung 14: Gegenseitiger Ausschluss von Y701-Phosphorylierung und K703-SUMOylierung an STAT1. Für USDDS wurden die Expressionsplasmide für STAT1-FRB mit Ubc9-FKBP und EGFP-SUMO1 in HEK293-Zellen kotransfiziert. Nach 24h wurden die Transfektanten mit Interferon- β stimuliert (1/2h oder 1h) oder unbehandelt (-) weiterinkubiert und anschließend für 2h mit AP21967 (1 μ M) behandelt. Wie angegeben wurden einige Transfektanten zuerst für 2h mit AP21967 (1 μ M) behandelt und dann mit Interferon- β stimuliert (1h) oder unbehandelt (-) weiterinkubiert. Die Proteine der Transfektanten wurden im Western Blot mittels phospho (p)Y701STAT1-Antikörper (α -pY701STAT1) auf phosphoryliertes und nach dem Strippen auf das gesamte STAT1-Fusionsprotein mit einem STAT1-Antikörper (α -STAT1) untersucht. E-S1-STAT1-FRB = STAT1-FRB-Fusionsprotein konjugiert mit EGFP-SUMO1; P-STAT1-FRB = STAT1-FRB phosphoryliert an Y701; der weiß gefüllte Pfeil gibt die Position an, an dem phosphoryliertes E-S1-STAT1-FRB von dem (p)Y701STAT1-Antikörper (α -pY701STAT1) angezeigt werden sollte.[118]

Die Western Blot-Analysen von STAT1-FKBP (Daten nicht gezeigt) und STAT1-FRB (Abbildung 14) zeigten, dass unter keinen Stimulationsbedingungen eine Doppelmodifikation durch SUMOylierung und Y701-Phosphorylierung von STAT1 erkennbar ist, obwohl

Einzelphosphorylierung und –SUMOylierung in jedem Stimulationsszenario deutlich sichtbar sind. Demnach ist STAT1 an Y701 phosphorylierbar oder an K703 SUMOylierbar. STAT1 kann aber nicht zur gleichen Zeit beide Modifikationen aufweisen.

3.2.3 Existieren sich ausschließende Tyrosin-Phosphorylierungen und SUMOylierungen auch bei den anderen Mitgliedern der STAT-Proteinfamilie

Die Mitglieder der STAT-Proteinfamilie (STAT1-6) besitzen ungefähr bei AS 700 eine konservierte Y-Phosphorylierungsstelle, die für die Y-phosphorylierungsabhängige Dimerisierung eine essentielle Rolle spielt. Da sich in STAT1 diese Phosphorylierungsstelle (Y701) in unmittelbarer Nähe zu der untersuchten SUMOylierungsstelle (K703) befindet, stellen sich drei Fragen:

1. Befinden sich in STAT2-STAT6 auch mögliche SUMOylierungsstellen (K) in unmittelbarer Nähe dieser Y-Phosphorylierungsstelle?
2. Sind diese tatsächlich die spezifischen SUMOylierungsstellen für das Protein?
3. Wie beeinflussen sich Y-Phosphorylierung und SUMOylierung in diesen STAT-Proteinen?

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der STAT-Proteine im Bereich der Y-Phosphorylierungsstelle (Abbildung 15) erkennt man, dass ähnlich wie bei STAT1 STAT2, STAT3 und STAT5 ein Lysin (K) C-terminal und STAT4 N-terminal zur Y-Phosphorylierungsstelle aufweisen. Das nächste K in STAT6 liegt C-terminal der Y-Phosphorylierungsstelle 6 Aminosäuren entfernt.

Protein	Homologe AS-Sequenz (von N- nach C-terminal)
STAT1	(691-720) YSRPKEAPEP MELDGPKG TG YIK TELISVS EVHPSRLQTT
STAT2	(670-709) RDEAFGCYYQ EKVNLQERRK Y L K HRLIVVS NRQVDELQQP
STAT3	(685-724) KYCRPESQEH PEADPGSAAP Y L K TKFICVT PTTCSNTIDL
STAT4	(673-712) KHYSQPCEV SRPTERGD KG Y VPSVFIPIS TIRSDSTEPH
STAT5a	(668-713) PKDEVFSKYYP TPVLAKAVDG Y V K PQIKQVV PEFVNASADA
STAT5b	(663-718) YSKYYTPVPC ESATAKAVDG Y V K PQIKQVV PEFVNASADA
STAT6	(621-660) KDEAFRSHYK PEQMGKDGRG Y VPAT I KMTV ERDQPLPTPE

Abbildung 15: Homologe Aminosäuresequenz der STAT-Proteine. STAT-Proteine zeigen homologe Sequenzen zu der Phosphorylierungsstelle Y701 und der K703-SUMOylierungsstelle von STAT1. Bekannte Phosphorylierungsstellen (Y) sind rot markiert. Die bekannte STAT1-SUMOylierungsstelle K703 wird in blau angezeigt, das der Tyrosin-Phosphorylierungsstelle am nächsten gelegene Lysin ist grün markiert. Die eingeklammerten Zahlen geben die Aminosäurepositionen an.

3.2.3.1 Analyse möglicher SUMOylierungsstellen in STAT3-STAT5

Zur Untersuchung, ob es sich bei den zur Y-Phosphorylierungsstelle benachbarten Lysinen (K) tatsächlich um die substratspezifischen SUMOylierungsstellen handelt, wurden STAT3, STAT4 und STAT5a zunächst im UFDS-System auf SUMOylierbarkeit hin getestet. Das Klonieren der entsprechenden Ubc9-Fusionsproteine erfolgte mit dem Gateway System. Die hierfür notwendigen Entryklone wurden uns von Bernhard Korn (DKFZ) zur Verfügung gestellt. Nach erfolgreicher Identifizierung der Proteine STAT3, STAT4 und STAT5a als SUMOylierungssubstrate wurden entsprechende Konstrukte, bei denen die möglichen SUMOylierungsstellen in den jeweiligen STAT-Proteinen von Lysin (K) nach Arginin (R) mutiert wurden, hergestellt. Die Abbildungen 16 und 17 zeigen *in vivo* die SUMOylierung der STAT-Proteine im UFDS-System.

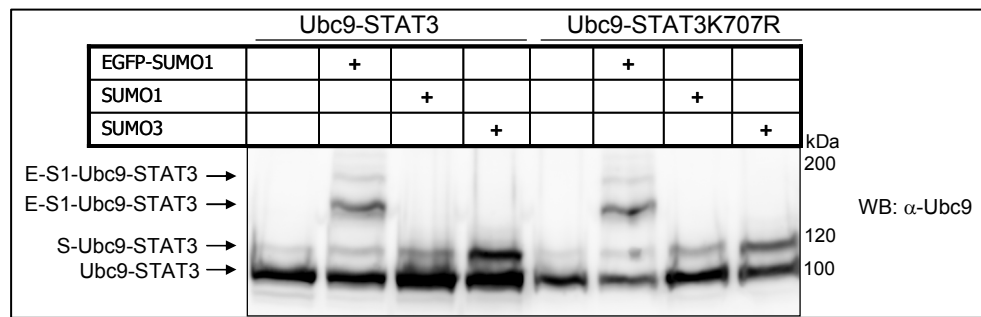


Abbildung 16: SUMOylierung von Ubc9-STAT3 *in vivo*. Für UFDS wurden Expressionsplasmide für Ubc9-STAT3 oder Ubc9-STAT3K707R allein oder mit verschiedenen SUMO-Expressionsplasmiden (+) in HEK293-Zellen kotransfiziert. Die Proteine der Transfektanten wurden im Western Blot mit einem Ubc9-Antikörper (α -Ubc9) nachgewiesen. E-S1-Ubc9-STAT3 = Ubc9-STAT3-Fusionsprotein konjugiert mit EGFP-SUMO1; S-Ubc9-STAT3 = Ubc9-STAT3-Fusionsprotein konjugiert mit endogenem oder koexprimiertem SUMO-Protein.

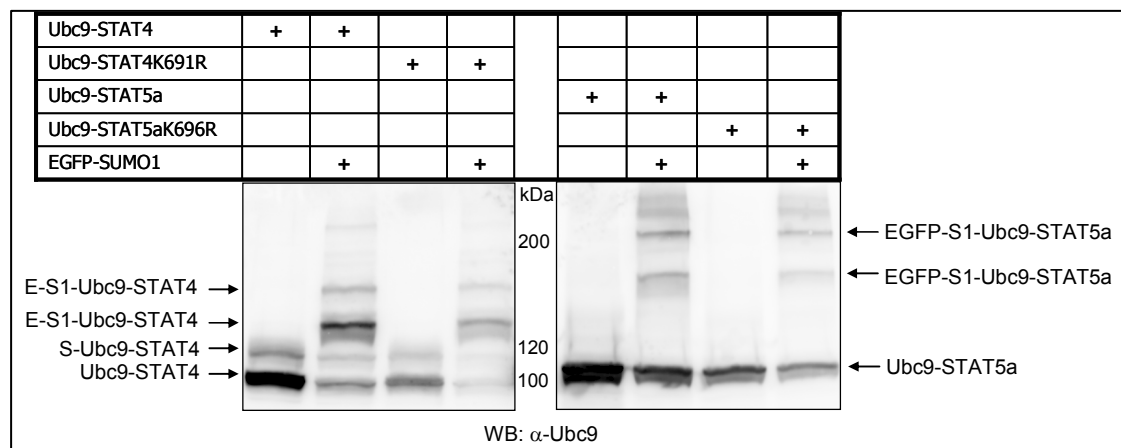


Abbildung 17: SUMOylierung von Ubc9-STAT4 und Ubc9-STAT5a *in vivo*. Für UFDS wurden die verschiedenen Expressionsplasmide der Ubc9-Fusionsproteine allein oder mit EGFP-SUMO1 (+) in HEK293-Zellen kotransfiziert. Im Western Blot erfolgte der Proteinnachweis der Transfektanten mit einem Ubc9-Antikörper (α -Ubc9). E-S1-Ubc9-STAT = Ubc9-STAT-Fusionsprotein konjugiert mit EGFP-SUMO1; S-Ubc9-STAT4 = Ubc9-STAT4-Fusionsprotein konjugiert mit endogenem SUMO.

Die SUMOylierung konnte für STAT3, STAT4 und STAT5a als Ubc9-Fusionsprotein durch koexprimiertes SUMO nachgewiesen werden. Ubc9-STAT3 und Ubc9-STAT4 wurden zusätzlich durch endogenes SUMO modifiziert. Für Ubc9-STAT3K307R, -STAT4K691R und -STAT5aK696R konnten in Bezug auf die SUMOylierung keine nennenswerten Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden.

Da die Identifizierung der SUMOylierungsstellen durch UFDS keine eindeutigen Ergebnisse lieferte, wurde eine Analyse mit dem USDDS-System durchgeführt. Zunächst wurde getestet ob STAT3, -4 und -5a im USDDS-System SUMOylierbar sind, anschließend erfolgte die Analyse der möglichen SUMOylierungsstellen. Die stimulationsabhängige SUMOylierung verschiedener Proteine, u. a. auch für STAT1, konnte durch die Kotransfektion der konstitutiv aktiven (*constitutiv activ; ca*) MAP3K MEKK1 in früheren Arbeiten gezeigt werden [119], so dass die Erhöhung der SUMOylierung der STAT-Proteine durch deren Koexpression im USDDS-System überprüft wurde. Entsprechende STAT-FKBP-Expressionsplasmide wurden hergestellt und durch die Kotransfektion von Ubc9-FRB- und SUMO-Expressionsplasmiden in HEK293-Zellen mit entsprechender Induktion durch AP21967 untersucht. In Abbildung 18A ist deutlich die SUMOylierung von STAT5a-FKBP mit EGFP-SUMO1 nach 4h AP21967-Inkubation zu erkennen, die durch die Koexpression von MEKK1ca noch verstärkt werden konnte. STAT5aK696R-FKBP zeigt nach 4h AP21967-Inkubation eine sehr starke Reduktion von SUMOyliertem Fusionsprotein (E-S1-STAT5a-FKBP). Die schwache SUMOylierung der Mutante sowie die schwächere Doppelbande über der Haupt-SUMOylierung bei ungefähr 200kDa, welche bei dem WT und der Mutante gleiche Intensitäten zeigen, könnte möglicherweise ein Hinweis auf weitere SUMOylierungsstellen in STAT5a-FKBP sein. Nach diesem Ergebnis wurde die SUMOylierung von STAT5a-FKBP durch Kotransfektion von SUMO3 im USDDS-System getestet. Die WB-Analyse ergab ein ähnliches Bild wie bei der Kotransfektion von EGFP-SUMO1. Abbildung 18B zeigt für STAT5a-FKBP eine verstärkte SUMOylierung durch Kotransfektion von MEKK1ca. Die SUMOylierung ist als Doppelbande sichtbar, wobei die untere Bande für STAT5aK696R-FKBP verschwindet.

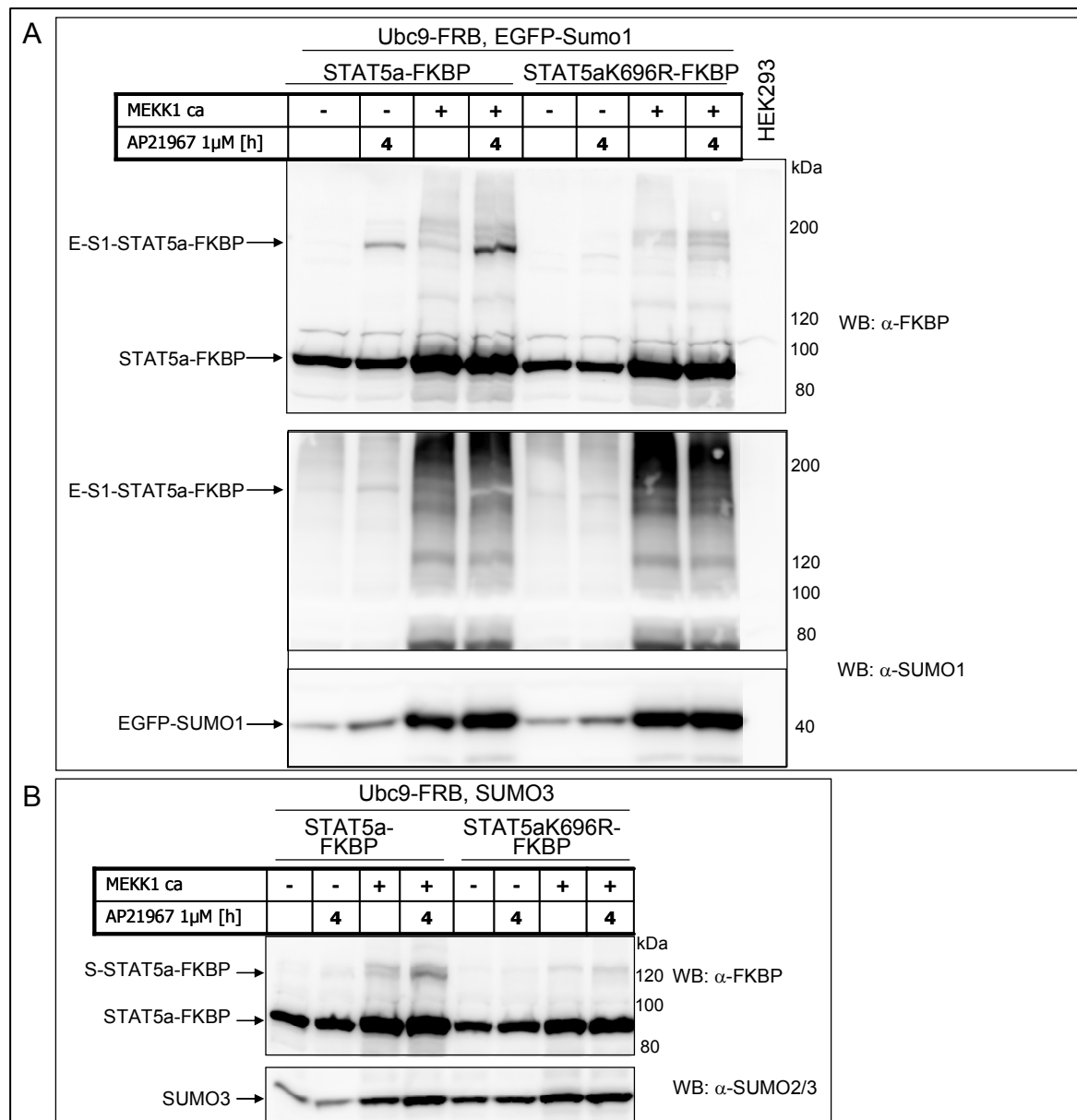


Abbildung 18: Identifizierung von K696 als eine SUMOylierungsstelle von STAT5a. K696 ist in STAT5a Konjugationsstelle für (A) EGFP-SUMO1 und (B) für SUMO3. Für die USDDS wurden Expressionsplasmide für Ubc9-FRB und EGFP-SUMO1 mit STAT5a-FKBP oder STAT5aK696R-FKBP allein (-) oder mit (+) MEKK1ca in HEK293-Zellen kotransfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen wie angegeben mit AP21967 behandelt. Die Proteine der Transfektanten wurden im Western Blot mittels FKBP-Antikörper (α -FKBP) und nach dem Strippen mit einem SUMO1-Antikörper (α -SUMO1) nachgewiesen. MEKK1ca = MEKK1 *constitutive active*; E-S1-STAT5a-FKBP = STAT5a-FKBP-Fusionsprotein konjugiert mit EGFP-SUMO1; S-STAT5a-FKBP = STAT5a-FKBP-Fusionsprotein konjugiert mit SUMO3.

Die WB-Analysen für STAT3- und STAT3K707R-FKBP sowie für STAT4- und STAT4K691R-FKBP zeigten jeweils eine sehr schwache, aber gleichmäßige SUMOylierung mit EGFP-SUMO1 (Daten nicht gezeigt).

Da weder die Analyse der Mutanten durch UFDS noch durch USDDS Rückschlüsse auf die Position der SUMOylierungsstellen in STAT3 und STAT4 zuließen, wurde versucht die SUMOylierungsstellen durch eine massenspektrometrische Analyse zu identifizieren. Eine Methode für die Bestimmung von SUMOylierungsstellen sollte zunächst durch die Identifizierung der bekannten STAT1-SUMOylierungsstelle K703 entwickelt werden. Für die

SUMOylierung des zu untersuchenden Proteins wurde die SUMO-Mutante SUMO3Q87/89RP hergestellt. Der Aminosäureaustausch von Gln (Q)87 nach Arg (R) ermöglicht durch enzymatischen Verdau vor der massenspektrometrischen Analyse die Abspaltung hinderlicher SUMO-Fragmente. Der zusätzliche Austausch von Gln (Q)89 nach Pro (P) wurde analog zu der Aminosäuresequenz des natürlich vorkommenden SUMO4 durchgeführt. SUMO4 besitzt im Gegensatz zu SUMO1-3 C-terminal das Pro90, welches durch Proteasen nicht gespalten werden kann [123]. Die Verwendung dieser SUMO3-Mutante sollte die Möglichkeit bieten, die Ausbeute an SUMOyliertem Protein *in vivo* zu erhöhen. Der Vergleich der SUMOylierung verschiedener Proteine (z.B. STAT1, p53 oder MK2) mit SUMO3Q87/89RP oder mit SUMO3-WT erfolgte durch die Kotransfektion der entsprechenden Expressionsplasmide in HEK293-Zellen und anschließender Western Blot-Analyse (Daten nicht gezeigt). Es konnte gezeigt werden, dass nach der Modifikation durch die Mutante mehr SUMOyliertes Protein vorhanden ist, als nach der Modifikation durch den SUMO3-WT. Weitere Beeinflussungen oder Unterschiede bezüglich der SUMOylierung konnten nicht nachgewiesen werden.

Für die massenspektrometrische Analyse wurde GST-STAT1-Ubc9 und SUMO3Q87/89RP in HEK293-Zellen exprimiert, über Glutathion-Beads gereinigt, im SDS-Gel getrennt und mit Coomassie sichtbar gemacht. Für die Massenspektroskopie (MS) wurden SUMOyliertes GST-STAT1-Ubc9 (Abbildung 19, Bande2) und unmodifiziertes Protein (Abbildung19, Bande1) eingesetzt. Die weitere Probenaufbereitung sowie die Proteinanalyse wurden durch das MS-Labor der Medizinischen Hochschule Hannover (Prof. Dr. A. Pich) übernommen.

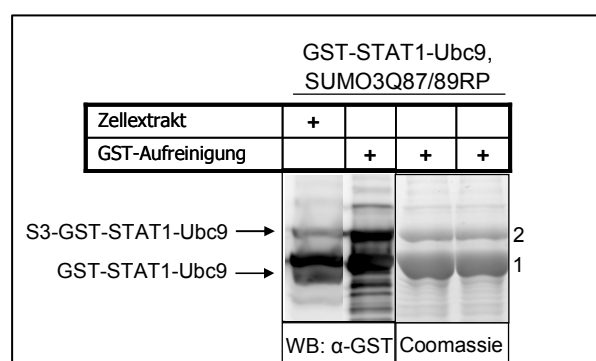


Abbildung 19: Präparation der STAT1-Fusionsproteine für die massenspektrometrische Analyse und die Überprüfung im Western Blot. Expressionsplasmide wurden wie angegeben in HEK293-Zellen transfiziert. Die über Glutathion-Beads gereinigten Proteine wurden in einer SDS-PAGE getrennt und im Western Blot mit einem GST-Antikörper (α -GST) nachgewiesen oder durch Coomassie angefärbt. Bande1 und Bande2 wurden massenspektrometrisch analysiert. S3-GST-STAT1-Ubc9 = GST-STAT1-Ubc9-Fusionsprotein konjugiert mit koexprimiertem SUMO3.

Vor der MS-Analyse wurden die Proteine durch tryptischen In-Gel-Verdau nach jedem Lysin (K) und jedem Arginin (R) gespalten und somit in charakteristische Peptidmassen zerlegt. Die Bestimmung der Peptidmassen erfolgte durch MALDI-MS-Analyse. Für die Auswertung wurden die sogenannten Peptidmassen-*fingerprints* des unmodifizierten STAT1 mit den

fingerprints des SUMOylierten STAT1 verglichen. Unterschiede in den Massen entstehen theoretisch unmittelbar an dem Lysin der SUMOylierungsstelle des modifizierten Proteins, da dort die zusätzlichen Aminosäuren des SUMOs angeknüpft sind und keine Spaltung erfolgt. Von dem verwendeten SUMO3Q87/89RP verbleiben nach dem Verdau 5 Aminosäuren (Q-P-T-G-G) die einer Masse von 441,42 Da entsprechen. Diese zusätzliche Masse kann in der Auswertung genutzt werden, um die SUMOylierungsstelle zu identifizieren.

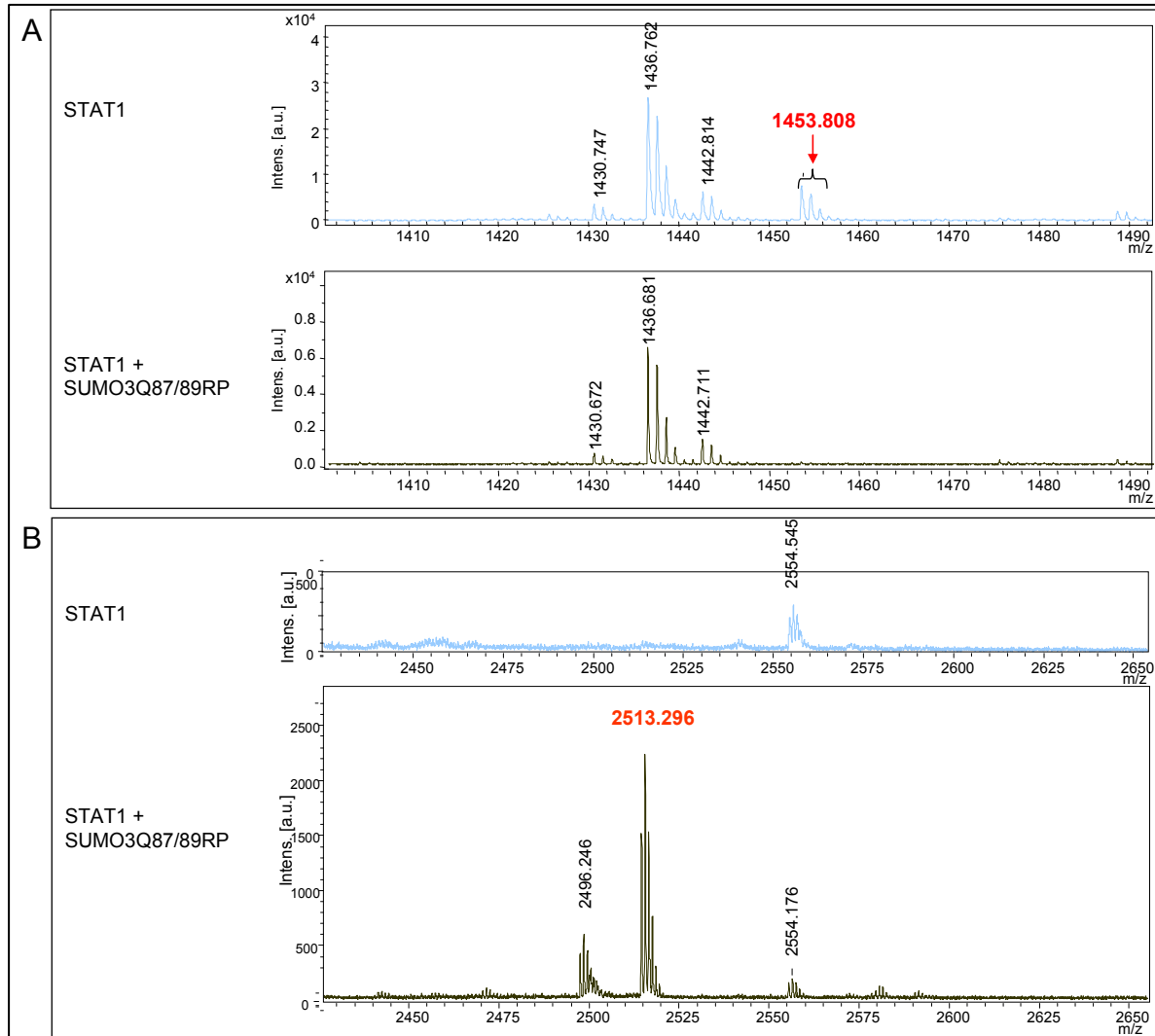


Abbildung 20: Ausschnitt aus dem Peptidmassen-fingerprint von STAT1 und S3-STAT1. m/z = Masse/Ladung

Für STAT1 konnten folgende relevanten Massen bestimmt werden: 1453,808 Da für das Peptid T704-R716 und 2072,091 Da für das Peptid G698-R716. Die Masse 1453,808 Da für das Peptid T704-R716 konnte für das SUMOylierte STAT1 nicht gezeigt werden (Abbildung 20A), jedoch eine Masse von 2513,296 Da für das Peptid G698-R716 (Abbildung 20B). Das entspricht der Masse des unmodifizierten Peptids (G698-R716=2072,091 Da) plus der Masse der 5 verbleibenden Aminosäuren des SUMO3 (441,42 Da). Da in STAT1-AS-Sequenz zwischen G698 und R716 nur das K703 vorhanden ist, entspricht dieses der

SUMOylierungsstelle in STAT1. Leider gelang es trotz ausgiebiger Versuche nicht, ein aussagekräftiges MS/MS-Spektrum von dieser Masse zu erhalten. Der Nachweis der SUMOylierung war trotz hoher Massengenauigkeit der Analyse nicht sicher, da es für eine definierte Masse zu viele mögliche Peptide gab, vor allem, wenn man bedenkt, dass in der verwendeten STAT1 Präparation noch viele weitere Proteine enthalten waren. Dennoch konnte mit diesem Verfahren die bekannte STAT1-SUMOylierungsstelle bestätigt werden. Für die Identifizierung einer unbekanntenen SUMOylierungsstelle sollte allerdings ein aussagekräftiges MS/MS-Spektrum vorliegen. Für die weitere Analyse der SUMOylierungsstellen in STAT3 und STAT4 konnte das MS-Labor ein LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific) Massenspektrometer einsetzen, das über die Möglichkeit der Elektrospray-Ionisierung (ESI) verfügt. Dieses Massenspektrometer ist direkt an ein LC-System gekoppelt und erlaubt sehr schnell hochaufgelöste und informationsreiche MS-Spektren zu erzeugen. Im Gegensatz zu STAT1 wurde jedoch kein GST-Fusionsprotein verwendet, sondern Ubc9-STAT-Konstrukte, die N-terminal mit einem Strep-Tag fusioniert worden waren (Strep-Ubc9-STAT). Durch diese Variante konnte die Menge an SUMOyliertem STAT3 und STAT4 deutlich erhöht werden. Des Weiteren wurde SUMO3QT89/90PR für die Kotransfektion verwendet, wodurch die SUMOylierung einerseits erhöht wurde (Q89P) und andererseits den Vorteil bot, dass nach dem tryptischen Verdau nur noch ein Doppelglycin (G-G) als Modifizierung am Lysin (K) verbleibt [124]. Nach der Transfektion der entsprechenden Expressionsplasmide in HEK293-Zellen wurden die Fusionsproteine über Strep-Tactin-Beads aufgereinigt. Im Coomassie gefärbten SDS-Gel (Abbildung 21 C) konnten für Strep-Ubc9-STAT3 drei klare SUMOylierungsbanden erkannt werden (Banden 1-3), die für die MS-Analyse eingesetzt wurden. Die Banden 4 und 5, die das SUMOylierte Strep-Ubc9-STAT4 enthalten sollten, wurden ebenfalls massenspektrometrisch analysiert.

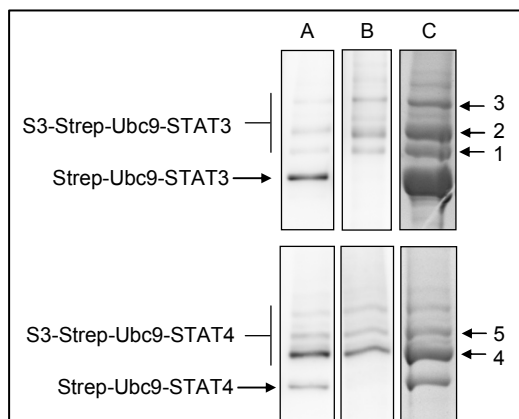
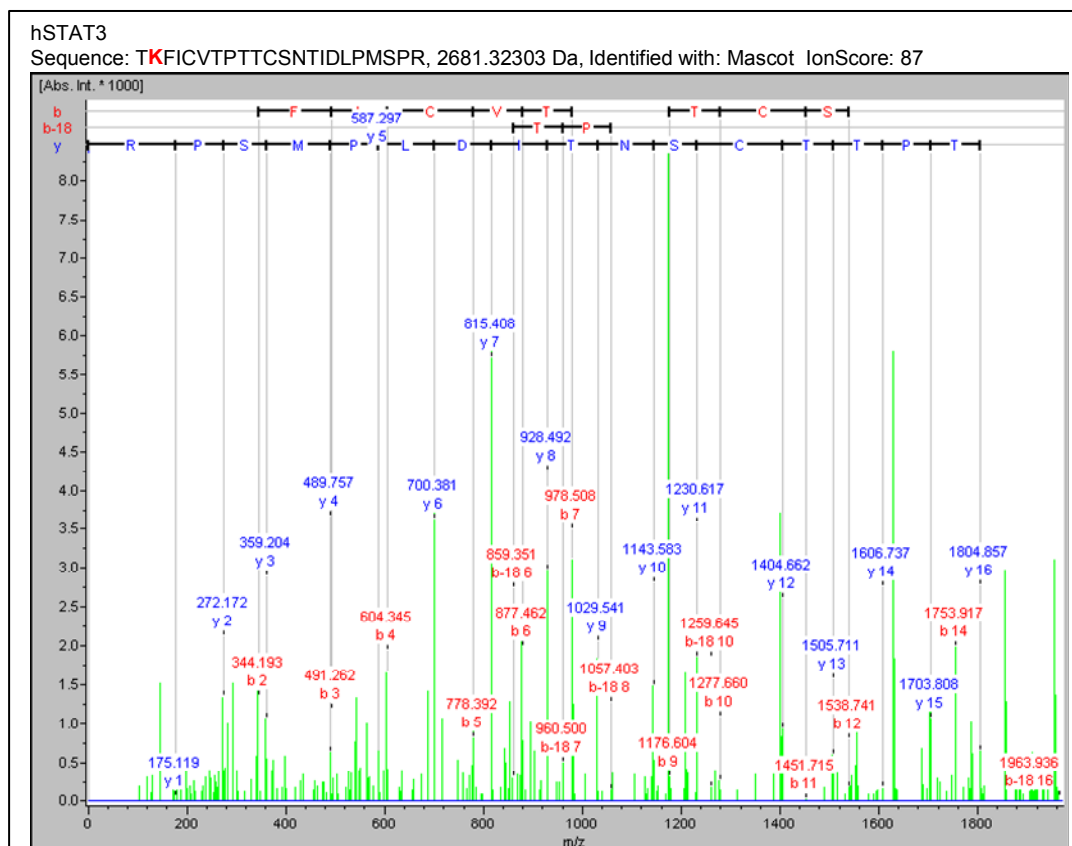


Abbildung 21: Wahl der SUMOylierten Fusionsproteine für die massenspektrometrische Analyse und ihre Verifikation im Western Blot. Expressionsplasmide für Strep-Ubc9-STAT3 oder Strep-Ubc9-STAT4 wurden mit SUMO3QT89/90PR in HEK293-Zellen kotransfiziert. Die aus den Proteinextrakten über eine Strep-Tactin-Beads aufgereinigten Fusionsproteine wurden im Western Blot mit (A) einem Ubc9-Antikörper (α -Ubc9) und (B) SUMO2/3-Antikörper (α -SUMO2/3) identifiziert. (C) Coomassie-Färbung der aufgereinigten Proteine. Banden 1-5 wurden für die MS-Analyse eingesetzt. S3-Strep-Ubc9-STAT = Strep-Ubc9-STAT-Fusionsprotein konjugiert mit koexprimiertem SUMO3QT89/90PR.

Für die Analyse wurde die verdauete Probe mittels reversed phase Chromatografie getrennt. Die direkte Analyse wurde im LTQ-Orbitrap-Velos MS mit einer Top10-Methode durchgeführt, bei der nach jedem MS-Scan die 10 intensivsten Massen mit MS/MS analysiert wurden. Die Fragmentierung erfolgte mit der HCD-Technik. Die Auswertung aller Spektren erfolgte mittels Datenbankanalyse und dem MASCOT-Suchalgorithmus (Matrix Science UK). Da nach SUMO3QT89/90PR-Modifizierung und dem tryptischen Verdau noch zwei Glycin-Reste (G-G) am SUMOylierten Lysinrest verbleiben, ist für entsprechende Peptide eine Massenerhöhung von 114,1 Da zu erwarten, die bei der Analyse berücksichtigt wurde. Für die Beurteilung der Qualität der MS/MS-Spektren und der Datenbankanalyse wurde der *peptide Ion Score* berechnet. Dieser Wert ist ein statistisches Qualitätskriterium, welches Auskunft darüber gibt wie signifikant das erhaltene Ergebnis im Vergleich zu einem zufälligen Treffer in der Datenbank ist. Werte > 30 entsprechen einem p-Wert < 0,01 und gelten daher als statistisch signifikant. Auf diese Weise konnten für STAT3 der Lysinrest K709 und für STAT4 die Lysinreste K667, K669, K673 sowie K691 als SUMOylierungsstellen identifiziert werden.



Ionenserie vorhanden. Da mit einem *Ion Score* von 87 jedoch ein signifikantes MS/MS-Spektrum vorliegt, die Muttermasse (2681,323 Da) des STAT3-Peptids T708-R729 die Modifizierung eines Lysins (K) mit zwei Glycinresten berücksichtigt und dieses Peptid nur ein Lysin enthält, ergibt sich nur eine Möglichkeit für die SUMOylierungsstelle: K709.

Die SUMOylierungsstelle STAT4K691 könnte auf die gleiche Weise indirekt bestimmt werden, da in dem analysierten Peptid STAT4G689-R705 nur ein Lysin vorhanden ist (Abbildung 23). Durch das Vorhandensein einer vollständigen b-Ionenserie kann die SUMOylierungsstelle jedoch auch direkt identifiziert werden: Die Masse eines Lysins in der Aminosäurekette, welches mit einem Doppelglycin modifiziert ist, beträgt 242,14 Da. Die Differenz zwischen dem b3-Ion (415,193 Da) und dem b2-Ion (173,056 Da) beträgt genau diese Masse. Das ist der Beweis, dass hier an diesem Lysin eine Modifizierung mit zwei Glycinen vorliegen muss. Dieses Vorgehen bei der Auswertung der MS/MS-Spektren ermöglicht die Identifizierung einer SUMOylierungsstelle, auch bei Vorhandensein eines weiteren Lysins in dem analysierten Peptid, wie im Fall des Peptids STAT4Y660-K673 (Abbildung 24).

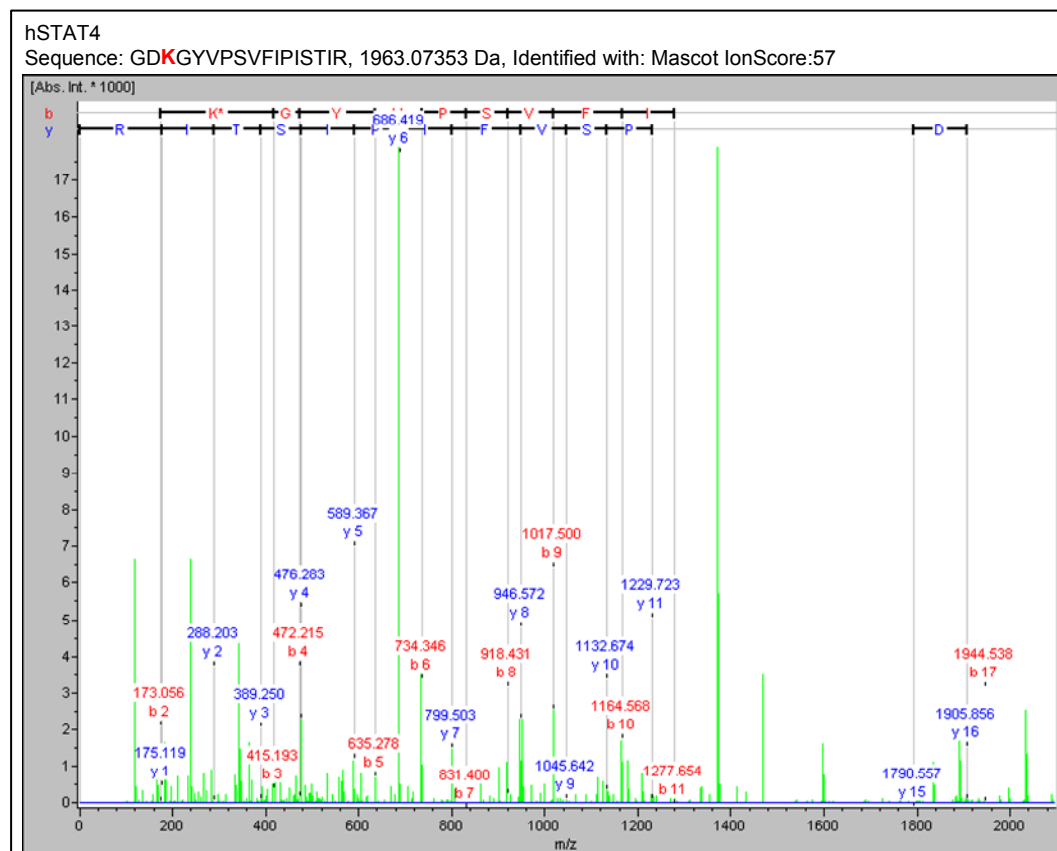


Abbildung 23: MS/MS-Spektrum des STAT4-Peptides G689-R705. Die SUMOylierung erfolgt an STAT4K691. Dargestellt sind die y- und b-Ionenserien des Peptides. Das modifizierte Lysin ist durch einen Stern markiert. m/z = Masse/Ladung

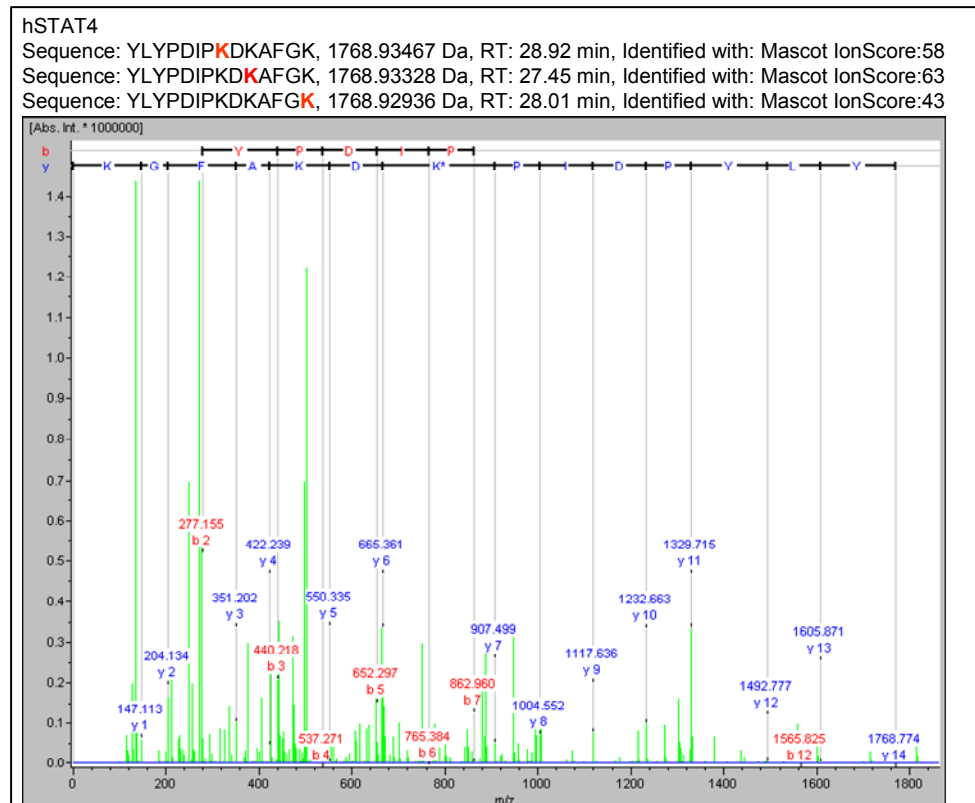


Abbildung 24: MS/MS-Spektrum des STAT4-Peptides Y660-K673. Die SUMOylierung erfolgt an STAT4K669. Dargestellt sind die y- und b-Ionenserien des Peptides. Das modifizierte Lysin ist durch einen Stern markiert. m/z = Masse/Ladung

In diesem Peptid sind drei Lysinreste vorhanden (K667, K669 und K673). Die SUMOylierung des Lysins 669 kann mit Hilfe der vollständigen Y-Ionenserie der MS/MS-Spektren analog zu Lysin 691 identifiziert werden. Für K667 und K673 konnte ebenfalls die SUMOylierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die identische Muttermasse von 1768,935 Da ergab aussagekräftige Spektren für eine SUMOylierung an K667 (*Ion Score* = 58) und K673 (*Ion Score* = 43). Zudem konnten drei leicht unterschiedliche Retentionszeiten (RT) nachgewiesen werden, was ebenfalls dafür spricht, dass drei unterschiedliche Peptide von der HPLC existieren und tatsächlich alle drei Lysine modifiziert wurden. Dieses Ergebnis sollte jedoch durch weitere Analysen, die falsch positive Resultate ausschließen (z.B. durch eine Mutationsanalyse), abgesichert werden.

A	Protein	Peptide	Muttermasse	SUMOylierungsstelle
	STAT3	T708-R729	2681.32 Da	K709
	STAT4	G689-R705	1963.07 Da	K691
		Y660-K673	1768.93 Da	K667, K669, K673

B	660	670	680	690	700	710	
	STAT3 AEIIMGYKIM	DATNILVSPL	VLYPDIPKE	EAFGKYCRPE	SQEHPEADPG	SAAPY	LKTKF
	720	730	740	750	760	770	
	ICVTPTTCSN	TIDLPMSPRT	LDSLMLQFGNN	GEAEPSSAGG	QFESLTFDME	LTSECATSPM	
	640	650	660	670	680	690	
STAT4 GRLSALPFAD	ILRDYKVIMA	ENIPENPLKY	LYPDIPKDKA	FGKHYSSQPC	EVSRRPTERGD		
700	710	720	730	740			
KGYVPSVFIP	ISTIRSDSTE	PHSPDLLPM	SPSVYAVLRE	NLSPTTIETA	MKSPYSAE		

Abbildung 25: Identifizierte SUMOylierungsstellen in STAT3 und STAT4 durch Massenspektrometrie. (A) Zusammenstellung der Peptide und deren Muttermassen, die durch Fragmentierung in der MS/MS-Analyse die Identifizierung der SUMOylierungsstellen ermöglichten sowie die daraus identifizierten SUMOylierungsstellen. (B) Positionen der identifizierten SUMOylierungsstellen innerhalb Aminosäuresequenz des C-Terminus. Die bekannten Y-Phosphorylierungsstellen sind blau gekennzeichnet, identifizierte SUMOylierungsstellen rot.

3.2.3.2 Y694-Phosphorylierung an STAT5a ist durch Interferon- β induzierbar

Nach der Identifizierung von K696 als SUMOylierungsstelle in STAT5a stellte sich nun die Frage, ob sich die Y694-Phosphorylierung und die K696-SUMOylierung von STAT5a gegenseitig beeinflussen. Diese Interaktion wurde *in vivo* im USDDS-System untersucht. STAT5a-FKBP, Ubc9-FRB und EGFP-SUMO1 wurden in HEK293-Zellen kotransfiziert. Zur Induktion der Y694-Phosphorylierung wurden die Transfektanten zunächst für 1h mit Interferon- β stimuliert [125]. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Heterodimerisierer AP21967. Abbildung 26 zeigt die Y694-Phosphorylierung von STAT5a-FKBP (pSTAT5a-FKBP) und endogenem STAT5 (pSTAT5). Deutlich schwächer als das phosphorylierte Protein wird auch das überexprimierte, nicht induzierte STAT5a-FKBP von dem pY694STAT5-Antikörper erkannt. SUMOyliertes pSTAT5a-FKBP ist nicht nachweisbar, jedoch sind in dem gleichen Bereich sehr schwache SUMOylierungsunabhängige Banden vorhanden. Die Blot-Entwicklung mit einem FKBP-spezifischem Antikörper zeigt deutlich die SUMOylierung nach 1h, 2h und 4h Inkubation mit AP21967.

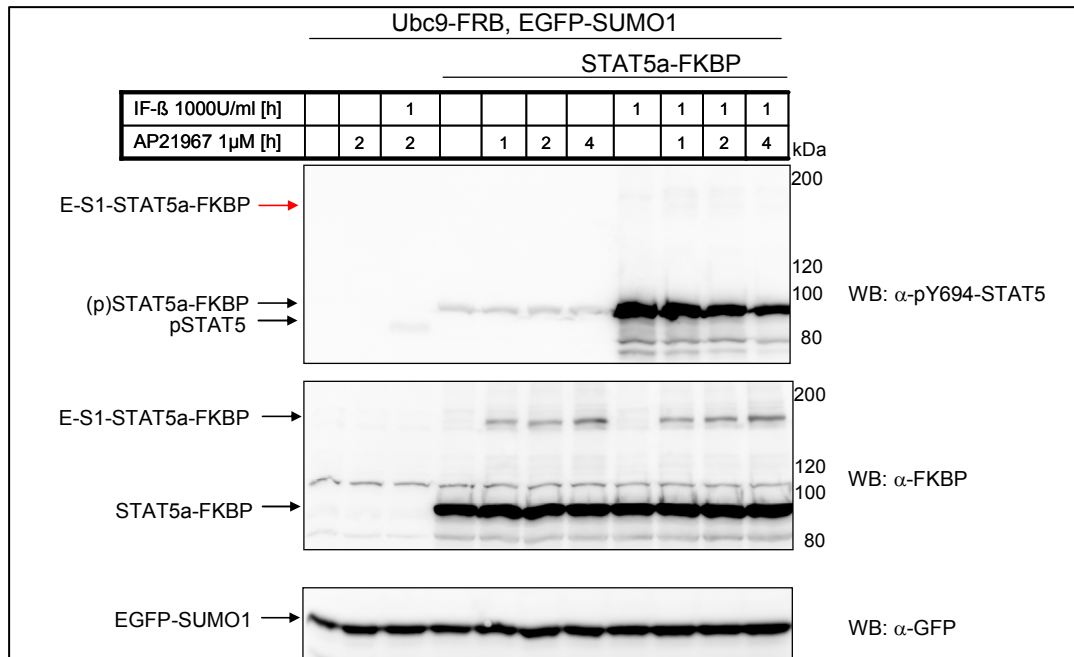


Abbildung 26: Y694 phosphoryliertes STAT5a wird nicht SUMOyliert. Für USDDS wurden Expressionsplasmide für Ubc9-FRB und EGFP-SUMO1 allein oder mit STAT5a-FKBP in HEK293-Zellen kotransfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen wie angegeben 1h mit IF- β stimuliert (1) oder unbehandelt weiterinkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit AP21967 für die angegebene Dauer. Die Proteine der Transfektanten wurden im Western Blot mittels phospho (p)Y694STAT5-Antikörper (α -pY694STAT5), FKBP-Antikörper (α -FKBP) und GFP-Antikörper (α -GFP) nachgewiesen. IF- β = Interferon- β ; E-S1-STAT5a-FKBP = STAT5a-FRB-Fusionsprotein konjugiert mit EGFP-SUMO1; pSTAT5 = phosphoryliertes, endogenes STAT5; pSTAT5a-FKBP = STAT5a-FKBP phosphoryliert an Y694; der rote Pfeil gibt die Position an, an der Y694 phosphoryliertes E-S1-STAT5a-FKBP, wenn vorhanden, durch den pY694STAT5-Antikörper (α -pY694STAT5) detektiert werden sollte.

Die Tatsache, dass Y701-Phosphorylierung und K703-SUMOylierung von STAT1 sich gegenseitig ausschließende Modifikationen sind, lässt vermuten, dass dieses Wechselspiel möglicherweise auch in STAT5a stattfinden könnte. Daher wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die STAT5aK696-SUMOylierung die STAT5aY694-Phosphorylierung beeinflusst. Die entsprechenden Expressionsplasmide wurden in HEK293-Zellen kotransfiziert und die Transfektanten erst, zur Induktion der Phosphorylierung, mit Interferon- β stimuliert und anschließend, zur Induktion der SUMOylierung, mit AP21967 bzw. umgekehrt. Die Western Blot-Analyse von STAT5a-FKBP (Abbildung 27) zeigt, dass keine Doppelmodifikation durch K696-SUMOylierung und Y694-Phosphorylierung von STAT5a-FKBP erkennbar ist, obwohl Einzelphosphorylierung und -SUMOylierung in jedem Stimulationsszenario deutlich sichtbar sind.

Alle Daten zur STAT5aY694-Phosphorylierung und K696-SUMOylierung deuten daraufhin, dass an STAT5a, wie schon von uns für STAT1 beschrieben, einen gegenseitigen Ausschluss von Y694-Phosphorylierung und K696-SUMOylierung vorliegt.

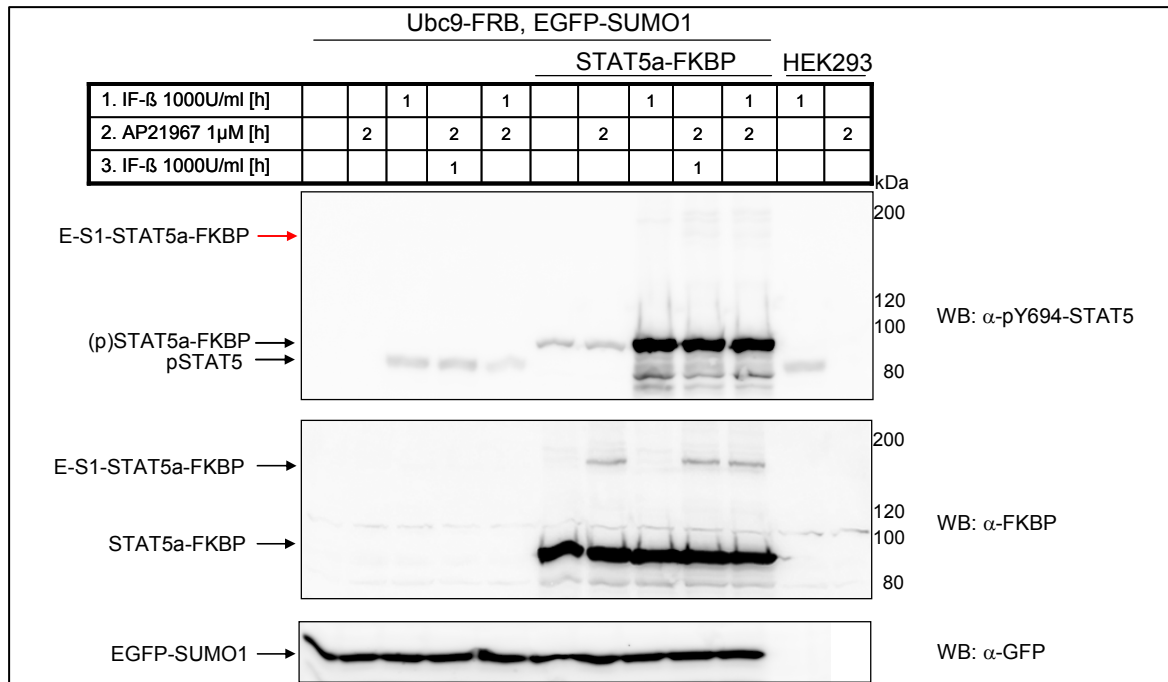


Abbildung 27: Wechselspiel zwischen Y694-Phosphorylierung und K696-SUMOylierung anSTAT5a. Für USDDS wurden Expressionsplasmide für Ubc9-FRB und EGFP-SUMO1 allein oder mit STAT5a-FKBP in HEK293-Zellen kotransfiziert. 24h nach der Transfektion wurden untransfizierte Zellen (HEK293) oder die Transfektanten wie angegeben 1h mit IF- β stimuliert (1) oder unbehandelt weiterinkubiert und anschließend für 2h mit AP21967 (1 μ M) behandelt. Wie angegeben wurden einige Transfektanten zuerst für 2h mit AP21967 behandelt und dann mit IF- β stimuliert (1h) oder unbehandelt (-) weiterinkubiert. Die Proteine der Zellextrakte wurden im Western Blot mittels phospho (p)Y694STAT5-Antikörper (α -pY694STAT5), FKBP-Antikörper (α -FKBP) und GFP-Antikörper (α -GFP) nachgewiesen. IF- β = Interferon- β ; E-S1-STAT5a-FKBP = STAT5a-FRB-Fusionsprotein konjugiert mit EGFP-SUMO1; pSTAT5 = phosphoryliertes, endogenes STAT5; pSTAT5a-FKBP = STAT5a-FKBP phosphoryliert an Y694; der rote Pfeil gibt die Position an, an der Y694 phosphoryliertes E-S1-STAT5a-FKBP, wenn vorhanden, durch den pY694STAT5a-Antikörper (α -pY694STAT5a) detektiert werden sollte.

3.2.4 Immortalisierung von STAT5^{-/-}-Zellen

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die STAT1K703-SUMOylierung die transkriptionelle Aktivität verschiedener Proteine, wie GBP1, TAP1 oder IRF1, herab reguliert und dass die Mutation dieser SUMOylierungsstelle zu einer verlängerten DNA-Bindungsaktivität führt [126]. In den folgenden Untersuchungen bezüglich der Funktion der STAT5a-SUMOylierung sollte daher zunächst geklärt werden, ob die STAT5aK696-SUMOylierung möglicherweise die transkriptionelle Aktivität von STAT5a beeinflusst. Für die Charakterisierung der transkriptionellen Aktivität von STAT5a und STAT5aK696R müssen immortalisierte Zellen, die das zu untersuchende Protein stabil exprimieren, in einer Microarray-Analyse eingesetzt werden.

Hierfür erhielten wir aus der Arbeitsgruppe Lothar Hennighausen in Bethesda, Maryland, primäre MEF STAT5^{-/-}-Zellen, die einen *knockout* für STAT5a und STAT5b haben [114]. Diese wurden durch die Transfektion eines Expressionsplasmides für das SV40 LT-Antigen immortalisiert. Eine zusätzliche Selektion wurde durch die Kotransfektion des Expressionsplasmides pREP8 (enthält Histidinol-Resistenz) erreicht. Nach Kultivierung der Zellen in Selektionsmedium bildeten sich drei unabhängig immortalisierte Klone, die

weiterkultiviert und analysiert wurden. Zuerst erfolgte die Überprüfung der STAT5a-Proteinexpression der immortalisierten MEF STAT5^{-/-}-Zellen. Zur Kontrolle der Proteinexpression dienten MEF WT-Zellen, MEF-MK2/3^{-/-}-Zellen und HEK293-Zellen. Für die drei analysierten Klone konnte bei gleicher endogener GAPDH-Expression keine STAT5-Expression im Western Blot festgestellt werden (Abbildung 28).

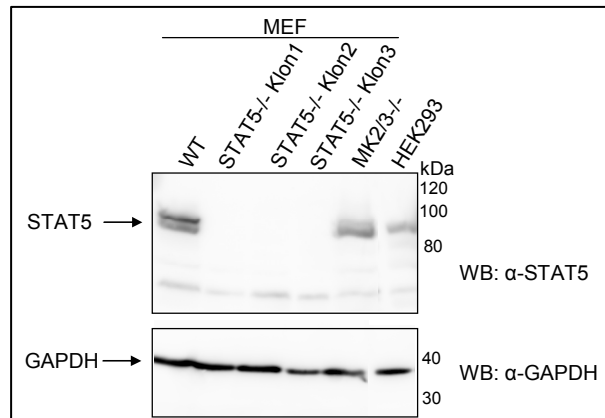


Abbildung 28: Überprüfung der STAT5 Expression in immortalisierten MEF STAT5^{-/-}-Zellen. Proteinextraktanalyse kultivierter MEF- oder HEK293-Zellen im Western Blot. Der Nachweis erfolgte mit einem STAT5-Antikörper (α-STAT5) und GAPDH-Antikörper (α-GAPDH).

3.2.5 Komplementation von MEF STAT5^{-/-}-Zellen

Die Komplementation wurde mit dem Klon1 durchgeführt. Hierfür wurde zunächst c-DNA, die für STAT5a oder STAT5aK696R kodiert, in den Expressionsvektor pIRES2-EGFP, der eine *internal ribosome entry site* (IRES) zwischen dem zu untersuchenden Gen und der Region die EGFP (*enhanced GFP*) enthält, kloniert. Anschließend wurde STAT5a-IRES-EGFP bzw. STAT5aK696R-IRES-EGFP in den retroviralen Expressionsvektor pMSCV durch Klonierung eingebracht. Die bizistronische mRNA, die von diesem Vektor kodiert wird, führt zu der unabhängigen Translation des gewünschten Proteins STAT5a und EGFP. Durch Fluoreszenzmessung mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) ist es möglich die erfolgreiche Integration in die Zielzellen sichtbar zu machen, die Expressionsstärke abzuschätzen sowie die EGFP-exprimierenden Zellen zu sortieren.

Die immortalisierten Zellen wurden durch retrovirale Infektion mit dem Leervektor (pMSCV), dem STAT5a-WT (pMSCV-STAT5a-IRES-EGFP) oder der SUMOylierungsmutante (pMSCV-STAT5aK696R-IRES-EGFP) transduziert, so dass drei verschiedene Zelllinien entstanden. Nach 11-tägiger Kultivierung der Zellen in Selektionsmedium (Hygromycin B 200µg/ml) wurde die Gesamtpopulation der EGFP-exprimierenden Zellen (Abbildung 29A) durch FACS in jeweils zwei Populationen mit unterschiedlicher EGFP und somit auch unterschiedlicher STAT5a-Expression getrennt (schwache und mittlere Expression) und weiterkultiviert. 10 Tage nach der FACS-Sortierung wurde die EGFP-Expression der Populationen durch FACS-Analyse überprüft (Abbildung 29B, 29C) und anschließend die Proteinextrakte dieser Zellen

im WB analysiert. Die Analyse zeigt, dass jeweils beide Populationen (Expression schwach und mittel) STAT5a oder STAT5aK696R stärker exprimieren als MEF-WT-Zellen. In MEF STAT5^{-/-}-Zellen, die nur mit Leervektor (pMSCV) transduziert wurden, konnte keine STAT5-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 30).

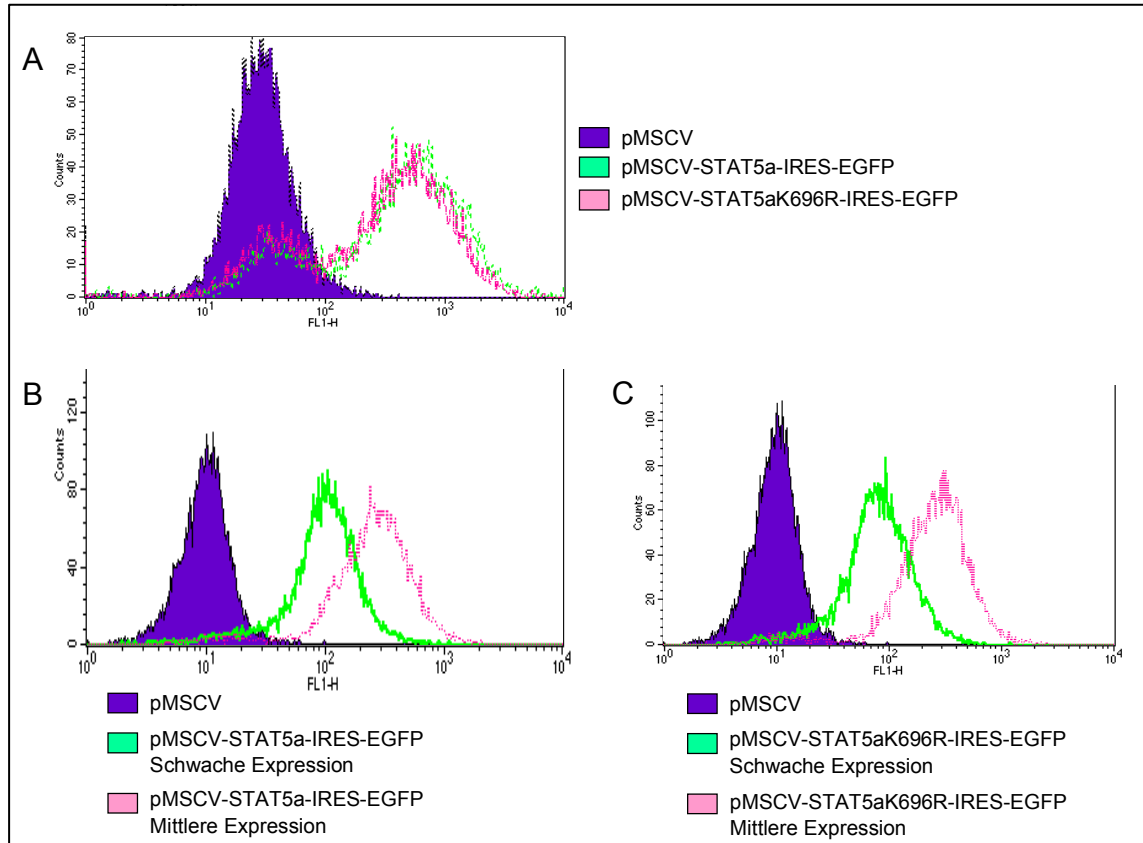


Abbildung 29: FACS-Analyse komplementierter MEF STAT5^{-/-}-Zellen. (A) EGFP-Expression (FL1H) der Gesamtzellpopulationen (counts) in Abhängigkeit von den verwendeten Expressionskonstrukten nach 11 Tagen Selektion (B-C) Zellpopulationen (counts) unterschiedlicher EGFP (STAT5a)-Expressionen 10 Tage nach FACS-Sortierung.

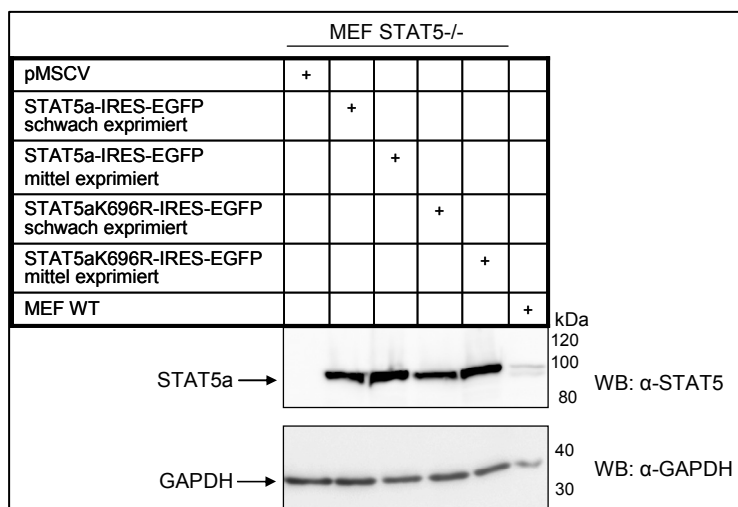


Abbildung 30: STAT5a-Expression komplementierter MEF STAT5^{-/-}-Zellen. MEF STAT5^{-/-}-Zellen wurden durch virale Infektion mit den angeführten Expressionskonstrukten komplementiert. Die STAT5a- und GAPDH-Expression in den Proteinextrakten verschiedener Zellpopulationen wurde im Western Blot mit einem STAT5-Antikörper (α-STAT5) und GAPDH-Antikörper (α-GAPDH) nachgewiesen.

Immortalisierte MEF $STAT5^{-/-}$ -Zellen unterscheiden sich morphologisch deutlich von den in unserem Labor vorhandenen MEF-WT-Zellen. $STAT5^{-/-}$ -Zellen sind wesentlich größer und langgestreckter (Abbildung 31). Des Weiteren zeichnet sie eine geringere Wachstumsrate aus. Während der Kultivierung erreichten ca. 1×10^5 MEF-WT-Zellen auf einer 10cm-Schale nach 3 Tagen eine vollständige Konfluenz, wohingegen ca. 3×10^5 MEF $STAT5^{-/-}$ -Zellen benötigt werden, um eine konfluente Platte nach 3 Tagen zu erhalten. Nach der Komplementation wurden keine Veränderungen in der Morphologie oder der Wachstumsrate im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (Abbildung 32).

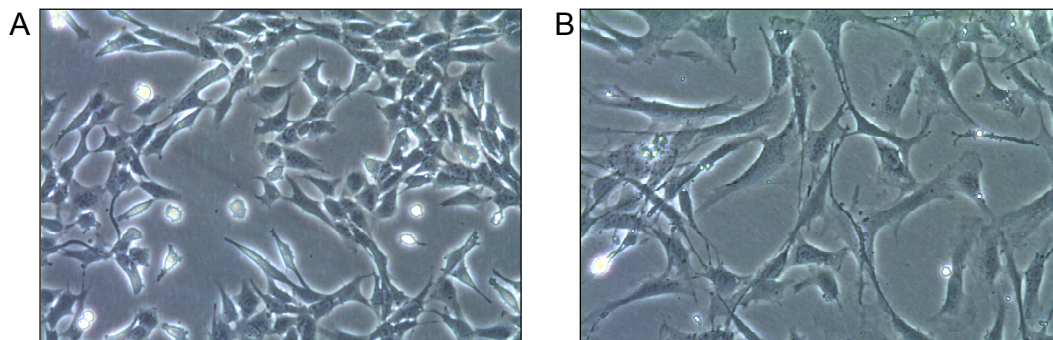


Abbildung 31: Immortalisierte MEF-Zellen in Kultur. 24h nach Aussaat von (A) ca. 1×10^5 Zellen MEF WT und (B) ca. 3×10^5 Zellen MEF $STAT5^{-/-}$ in einer 10cm Schale; Aufnahme erfolgte im Hellfeld mit 10x Vergrößerung.

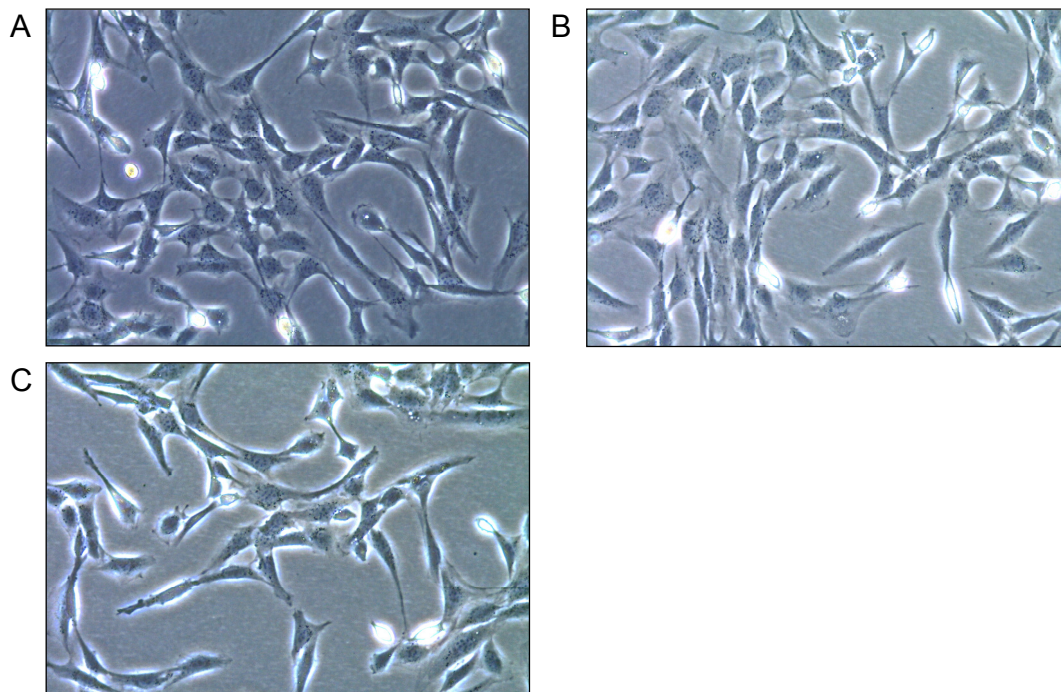


Abbildung 32: Komplementierte MEF $STAT5^{-/-}$ -Zellen in Kultur. 24h nach Aussaat von ca. 3×10^5 Zellen in einer 10cm Schale. Zellen sind komplementiert mit (A) pMSCV-Vektor (B) pMSCV-STAT5a-IRES-EGFP (C) pMSCV-STAT5aK696R-IRES-EGFP; Aufnahme erfolgte im Hellfeld mit 10x Vergrößerung.

Für alle weiteren Analysen wurde jeweils die Zellpopulation mit der stärkeren STAT5a-Expression verwendet.

Zur weiteren Charakterisierung der komplementierten Zellen wurde zunächst die Phosphorylierbarkeit des Proteins durch Stimulation der Zellen mit verschiedenen Interferonen getestet. Die STAT5aY694-Phosphorylierung konnte jedoch weder durch Interferon- α (30min; 1000U/ml) noch mit Interferon- β (60min; 1000U/ml) gezeigt werden, wohingegen die STAT1Y701-Phosphorylierung, als Kontrolle für die Interferon-Stimulation, nachweislich stattgefunden hat (Daten nicht gezeigt).

3.2.5.1 Microarray-Analyse STAT5a- und STAT5aK696 komplementierter MEF-Zellen

Um die funktionelle Bedeutung der STAT5aK696-SUMOylierung zu ermitteln, wurde ein „*Whole Mouse Genome Oligo Microarray*“ durchgeführt. Hierbei wurden die mRNA-Level von 45 018 Oligonukleotiden des Maus-Transkriptoms dreier verschiedener Zelllinien analysiert und miteinander verglichen: MEF STAT5^{-/-}-Zellen zum einen transduziert mit dem Leervektor (pMSCV; Mock-Zellen) und zum anderen komplementiert mit den beiden STAT5a-Proteinen (STAT5a-WT oder STAT5aK696R). Hierzu wurden unstimulierte Zellen verwendet, da der phosphorylierungsunabhängige Einfluss der STAT5a-SUMOylierung auf die Änderung der Genexpression im Vordergrund stand und Untersuchungen zu Folge auch unphosphorylierte STATs in der Lage sind in Verbindung mit anderen Transkriptionsfaktoren an DNAs zu binden und die Transkription zu regulieren [127-129]. Je 2x wurde die Gesamt-RNA der entsprechenden Zelllinien isoliert und mittels RT-PCR in c-DNA umgeschrieben, die dann für die Microarray-Analyse eingesetzt werden konnte. Für die Auswertung und Sortierung der Daten wurde die Erfüllung verschiedener Kriterien festgelegt: (1) Die detektierte Fluoreszenzintensität für ein einzelnes Gen muss für eine der komplementierten Zelllinien mindestens 50 betragen, (2) die Ergebnisse aus zwei verschiedenen RNA-Präparationen (z.B. für STAT5a) dürfen nicht mehr als Faktor 2 voneinander abweichen und (3) das Verhältnis zwischen den Signalen aus STAT5a- und STAT5aK696R-Zellen muss mindestens 1,5 betragen. Unter Berücksichtigung dieser Eigenschaften wurden 420 Gene identifiziert, die eine veränderte Expression in STAT5a- oder STAT5aK696R-Zellen gegenüber den STAT5^{-/-}-Zellen (Mock) zeigen. In STAT5a-WT-Zellen wurden 54 Gene gefunden, deren Expression hoch und 217 Gene, deren Expression herunter reguliert war. Die Expression in STAT5aK696R-Zellen wurde von 117 Genen hoch und von 266 Genen herunter reguliert. Bei 32 Genen konnte ein Unterschied in der Genexpression zwischen STAT5a- und STAT5aK696R-Zellen festgestellt werden. Hierbei waren 15 Gene in den STAT5a-Zellen stärker exprimiert (Tabelle 3A) und 17 Gene schwächer exprimiert (Tabelle 3B) als in den STAT5aK696R-Zellen.

Tabelle 3: Expressionsänderung STAT5a- bzw. STAT5aK696R-abhängiger Gene.

	Genname	x-fache Expressionsänderung in Bezug auf STAT5 ^{-/-} -Zellen	
		STAT5a	STAT5aK696R
A	Fmod	-1,65	-2,75
	Igsf10	-1,52	-2,76
	Akap6	3,18	1,55
	BC049816	-2,56	-4,73
	Gria4	-3,82	-6,40
	AK048907	-4,62	-7,91
	Slc5a7	-3,78	-7,42
	Elavl2	-2,05	-5,90
	Pitx2	-7,84	-12,23
	Lman1l	8,85	1,41
	Car3	-6,43	-14,07
	Mmp3	-7,50	-21,44
	Kcna1	-5,15	-21,20
	Cdh11	-10,32	-30,21
	5430401H09Rik	56,12	1,00
B	Ccdc19	1,42	2,39
	A930004K21Rik	1,17	2,31
	Cdh13	1,68	2,91
	Kif1a	-2,80	-1,56
	Stmn2	2,26	3,97
	ENSMUST00000073378	-3,89	-1,74
	Syt13	-4,82	-2,61
	AK149472	2,18	4,39
	E330013P04Rik	1,37	3,62
	Tgtp	0,06	2,36
	S100a15	2,76	5,10
	AK050947	-4,74	-2,35
	Cish	2,53	5,09
	Cxcl5	3,53	6,54
	TC1481003	-9,94	-4,57
	Anxa10	-8,23	-1,62
	8430417A20Rik	1,00	12,97

Zusammengestellt sind 32 Gene, die durch Sortierung nach den im Text beschriebenen Kriterien einen Unterschied in der Genexpression zwischen STAT5a- und STAT5aK696R-Zellen zeigen. (A) Gene, die in STAT5a-Zellen stärker exprimiert werden als in STAT5aK696R-Zellen und (B) Gene mit stärkerer Expression in den STAT5aK696R-Zellen als in STAT5a-Zellen bezogen auf STAT5^{-/-}-Zellen. Genaue Genbeschreibung im Anhang (Tabelle 4).

Betrachtet man die Differenz der Expressionsänderungen zwischen den STAT5a-Zellen und STAT5aK696R-Zellen wird das Ausmaß der fehlenden STAT5a-SUMOylierungsmöglichkeit auf die Genexpression deutlich. 9 Gene zeigten hierbei eine mehr als 5-fache Veränderung der Genexpression zwischen dem STAT5a-WT und der STAT5aK696R-Mutante und 5 dieser Gene sogar eine mehr als 10-fache Änderung. Grundsätzlich sind größere Auswirkungen bei den Genen zu erkennen, die in dem WT stärker exprimiert wurden als in der Mutante (Tabelle 3A). Hier sind 6 der 9 Gene mit mehr als 5-facher Veränderung der

Genexpression anzutreffen: Cdh11, Kcna1, Mmp3, Car3 und Lman1l. Cdh11 weist hierbei eine fast 20-fache Veränderung auf. Cdh11 gehört zu der Familie der Cadherine. Cadherine sind integrale Membranproteine, die Kalzium-abhängige Zell-Zell-Adhäsion vermitteln [130] und Cdh11 zeigt beispielsweise tumorunterdrückende Eigenschaften *in vivo* und *in vitro* bei murinen Netzhautgeschwülsten durch die Förderung des Zelltods [131]. Kcna1 ist ein Membranprotein, welches spannungsabhängig die Durchlässigkeit von Kalium-Ionen an Außenmembranen vermittelt [132]. Mmp3 gehört zur Familie der Matrixmetalloproteinasen, die in die Proteolyse normaler physiologischer Prozesse wie embryonaler Entwicklung und Fortpflanzung, aber auch in Krankheitsprozessen, wie Arthritis und der Metastasenbildung involviert sind [133]. Car3 ist eine Karbonatdehydratase des Zytoplasmas und katalysiert die reversible Wasseranlagerung an Kohlenstoffdioxid. Lman1l (*Lectin mannose-binding 1-like*) ist ein integrales Membranprotein, das sich im Bereich zwischen ER und Golgi befindet und möglicherweise an dem Recycling zwischen den beiden Kompartimenten beteiligt ist [134]. Betrachtet man die Gene, die in STAT5a-K696R-Zellen stärker exprimiert waren als in STAT5a-WT-Zellen (Tabelle 3B), ist nur Anxa10 mit einer 6,6-fache Änderung der Genexpression zu nennen. Anxa10 ist ein Protein der Annexin-Familie, die zu den Kalzium-abhängigen Phospholipid-Bindeproteinen gehören. Deren Mitglieder sind generell an der Regulation des Zellwachstums und Signaltransduktionswegen beteiligt. Die Funktion von Anxa10 ist bisher jedoch nicht genau bekannt [135]. 5430401H09Rik, 8430417A20Rik und TC1481003 erreichen zwar auch eine mehr als 5-fache Expressionsänderung, sind aber cDNAs von wenig bzw. nicht funktionell charakterisierten Proteinen ohne offiziellem Gen-Symbol und werden daher nicht zur weiteren Auswertung herangezogen. Abbildung 33 verdeutlicht grafisch die Expressionsänderung der Gene in STAT5a und STAT5aK696R-Zellen gegenüber STAT5^{-/-}-Zellen sowie die Differenz der Änderung der Genexpression zwischen den beiden komplementierten Zelllinien, die in der Darstellung von links nach rechts zunimmt.

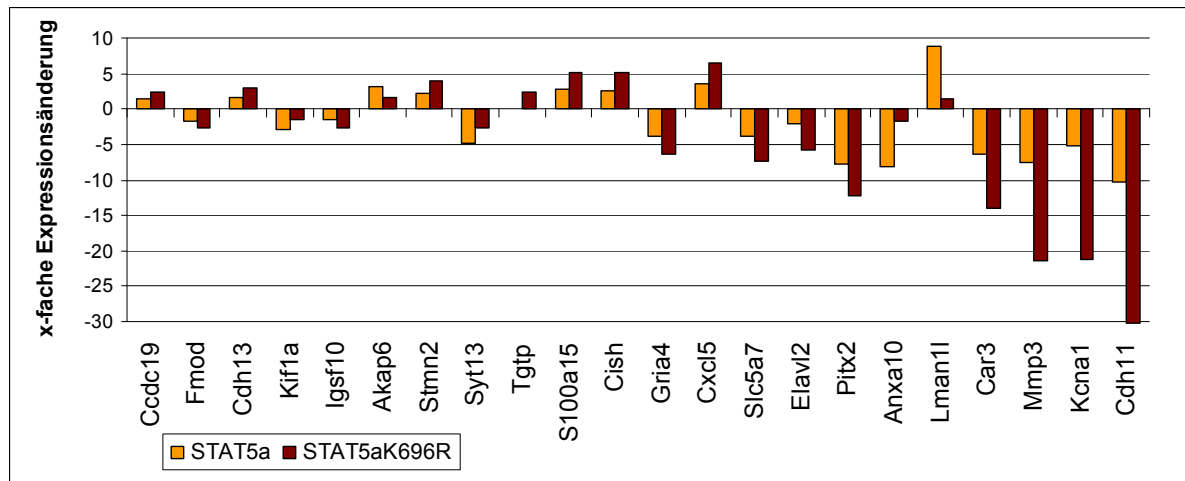


Abbildung 33: Expressionsänderung STAT5a und STAT5aK696 beeinflusster Gene. Die Identifizierung erfolgte durch Microarray-Analyse. Die Gene wurden nach den im Text beschriebenen Kriterien identifiziert und in Abhängigkeit des Expressionsunterschiedes zwischen STAT5a und STAT5aK696R-Zellen aufgetragen (links kleine Unterschiede, rechts große Unterschiede). Genaue Genbeschreibung im Anhang (Tabelle 4).

3.3 Untersuchungen zur SUMOylierung und Phosphorylierung der MAPKAP Kinase 2

MAPKAP Kinase 2 (MK2) wird *in vivo* durch die Stimulation der p38 MAP Kinase-Kaskade aktiviert und ist an verschiedenen zellulären Prozessen wie Zytokinproduktion [111, 112], Endozytose [136], Reorganisation des Zytoskeletts [108], Kontrolle des Zellzyklus [106] oder der Regulation von mRNA-Stabilität [111] beteiligt. Die optimalen Motive der Phosphorylierungsstellen für MK2 sind festgelegt und die Mechanismen der MK2-Aktivierung durch Phosphorylierung und der damit verbundene Export aus dem Zellkern sind sehr gut erforscht [98, 105, 106]. In Bezug auf den Kerntransport von Proteinen ist die SUMOylierung eine häufig diskutierte Proteinmodifikation, die generell für den Transport oder direkt für den Durchtritt an der Kernpore notwendig ist.

In diesem Teil der Arbeit stehen die Charakterisierung der MK2-SUMOylierung, ihre mögliche funktionelle Bedeutung und das Wechselspiel mit den MK2-Phosphorylierungen im Focus.

Als erstes wurde MK2 *in vivo* im UFDS-System auf SUMOylierung getestet. Die SUMOylierung des MK2-Ubc9-Fusionsproteins konnte nach Koexpression von EGFP-SUMO1 in HEK293-Zellen im Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 34).

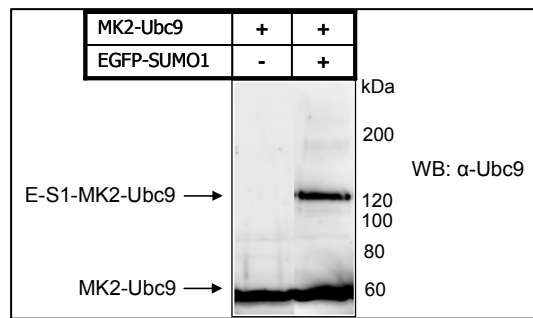


Abbildung 34: SUMOylierung von MK2-Ubc9 *in vivo*. Transfektion von Expressionsplasmiden für MK2-Ubc9 allein (-) oder mit EGFP-SUMO1 (+) in HEK293-Zellen. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Proteine im Western Blot mit einem Ubc9-Antikörper (α -Ubc9) nachgewiesen. E-S1-MK2-Ubc9 = MK2-Ubc9-Fusionsprotein konjugiert mit EGFP-SUMO1.

Da die statische Fusion des Ubc9 an dem zu untersuchenden Protein nicht die natürlich vorkommende Struktur von MK2 darstellt, wurde zur weiteren Analyse die Untersuchung in einem weniger artifiziellen System angestrebt und versucht die SUMOylierung durch die Kotransfektion entsprechender Expressionsplasmide für Ubc9, MK2 und SUMO zu erreichen.

3.3.1 Induktion der MK2-SUMOylierung und -Phosphorylierung an T208, S258 und T320 durch die Koexpression von MEKK1ca

Die stimulationsabhängige SUMOylierung konnte in früheren Versuchen für Proteine wie CDC37, CSNK2B, TAF10, HSF2BP, PSMC3 oder DRG1 gezeigt werden, wenn MAP Kinase-Kaskaden durch die Koexpression von MEKK1ca aktiviert wurden [119]. Für die Charakterisierung der MK2-SUMOylierung im Wechselspiel mit der MK2-Phosphorylierung wurde *in vivo* untersucht, ob ebenfalls durch die Koexpression von MEKK1ca MK2-Phosphorylierung und eine verstärkte MK2-SUMOylierung gezeigt werden kann. Die entsprechenden Expressionsplasmide wurden in HEK293-Zellen transfiziert und die Proteinextrakte im Western Blot analysiert (Abbildung 35). Für GST-MK2 konnte im GST-Blot neben einer verstärkten GST-MK2-Expression eine stimulationsabhängige MK2-SUMOylierung nachgewiesen werden. In MK2 wurden die Aminosäuren T208, S258 und T320 eindeutig durch die Koexpression der konstitutiv aktiven MEKK1 phosphoryliert. T-phosphoryliertes GST-MK2 zeigte gleichzeitig auch SUMOylierung, wohingegen für S258-phosphoryliertes GST-MK2 keine SUMOylierung detektiert werden konnte.

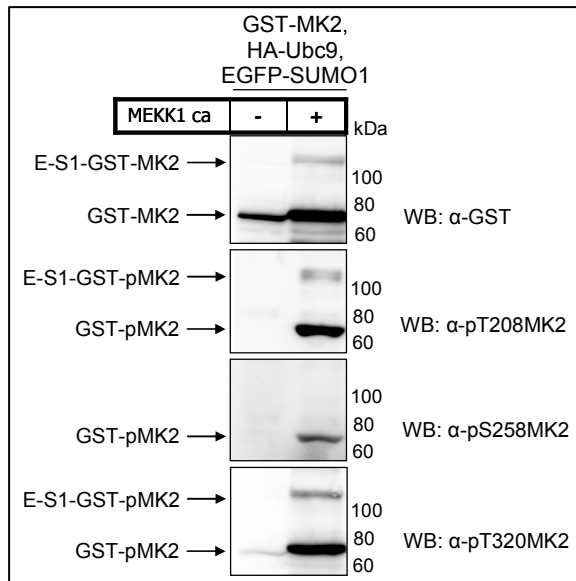


Abbildung 35: Induktion der MK2-Phosphorylierung durch MEKK1ca. GST-MK2, HA-Ubc9 und EGFP-SUMO1 wurden allein (-) oder mit (+) MEKK1ca in HEK293-Zellen koexprimiert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Proteine der Zellextrakte im Western Blot mit GST-Antikörper (α -GST) und verschiedenen phospho (p)MK2-Antikörpern (α -pT208MK2, α -pS258MK2 und α -pT320MK2) nachgewiesen. E-S1-GST-MK2 = GST-MK2-Fusionsprotein konjugiert mit EGFP-SUMO1; pMK2 = an T208, S258 oder T320 phosphoryliertes MK2.

3.3.2 Beeinflussung der T208-, S258- und T320-Phosphorylierungen und der MK2-SUMOylierung

Da die GST-MK2-SUMOylierung stimulationsabhängig durch die Koexpression der konstitutiv aktiven MEKK1 erhöht wurde, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die wichtigen MK2-Phosphorylierungsstellen T208, S258 und T320 direkt Einfluss auf die MK2-SUMOylierung haben.

Für diese Untersuchung wurden MK2-Mutanten hergestellt, bei denen durch einen Aminosäureaustausch zu Alanin (A) die zu untersuchende Phosphorylierungsstelle inaktiviert wird (GST-MK2T208A, GST-MK2S258A und GST-MK2T320A). Diese MK2-Mutanten, HA-Ubc9 und EGFP-SUMO1 wurden in An- und Abwesenheit von MEKK1ca in HEK293-Zellen koexprimiert, die Zellen lysiert und die Proteinextrakte im Western Blot analysiert (Daten nicht gezeigt). Der Verlust der Phosphorylierung durch den Aminosäureaustausch konnte für alle drei Mutanten bestätigt werden. Die Mutation der Phosphorylierungsstelle T208 und T320 zeigten im Vergleich zum GST-MK2-WT keine Auswirkungen auf die stimulationsabhängige MK2-SUMOylierung durch MEKK1ca oder auf die Phosphorylierung an S258 und T208 bzw. T320. Für GST-MK2S258A hingegen wurden zum einen eine schwächere MK2-SUMOylierung und zum anderen eine verringerte Phosphorylierung an T208 und T320 nachgewiesen.

Für eine detaillierte Analyse der Zusammenhänge zwischen der MK2-Phosphorylierung und der MK2-SUMOylierung, sollte der Beitrag der einzelnen Phosphorylierung zur SUMOylierung weiter analysiert werden sowie bestimmt werden, ob sich die drei

untersuchten Phosphorylierungen in MK2 gegenseitig beeinflussen. Die zu untersuchenden Phosphorylierungsmutanten, wurden hierbei durch den Aminosäureaustausch zu Glutaminsäure (E) hergestellt (GST-MK2T208E, GST-MK2S258E und GST-MK2T320E), wodurch die Phosphorylierung an dieser Position imitiert wird. Die Konstrukte wurden, wie in Abbildung 36 angegeben, koexprimiert und die Proteinextrakte im Western Blot analysiert.

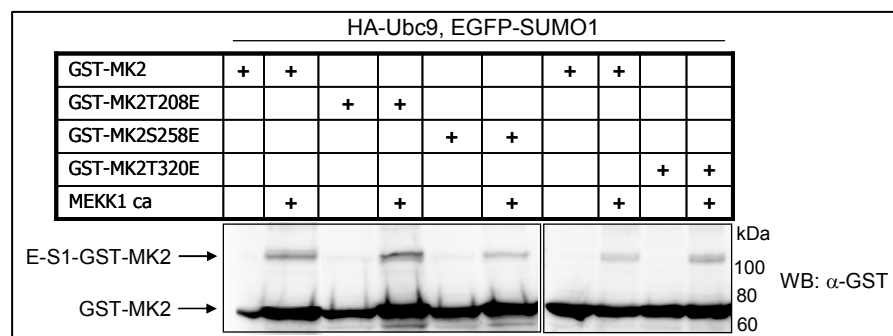


Abbildung 36: *In vivo* SUMOylierung verschiedener MK2-Phosphorylierungsmutanten. HA-Ubc9 und EGFP-SUMO1 wurden mit verschiedenen GST-MK2-Phosphorylierungsmutanten allein oder mit (+) MEKK1ca in HEK293-Zellen koexprimiert. 24h nach der Transfektion wurden die Proteine der Zellextrakte im Western Blot mit einem GST-Antikörper (α -GST) nachgewiesen. E-S1-GST-MK2 = GST-MK2-Fusionsprotein konjugiert mit EGFP-SUMO1.

Für alle Phosphorylierungsmutanten konnte durch die Kotransfektion von MEKK1ca MK2-SUMOylierung nachgewiesen werden, wobei GST-MK2S258E im Vergleich zum WT eine etwas schwächere SUMOylierung zeigt. Das Imitieren einer der drei Phosphorylierungsstellen kann die SUMOylierung nicht in der Menge erhöhen wie die Koexpression der MEKK1ca. Deshalb sollte im nächsten Schritt geklärt werden, ob die SUMOylierung möglicherweise von zwei der drei Phosphorylierungsstellen oder gar von allen dreien abhängig ist und ob die Phosphorylierungen sich gegenseitig beeinflussen.

Hierzu wurden Doppel- und Dreifachmutanten hergestellt (GST-MK2TS208/258E, GST-MK2ST258/320E, GST-MK2T208/320E und GST-MK2TST208/258/320E) und in gleicher Weise wie die Einzelmantanten getestet. Die Auswertung der Western Blot-Analyse (Abbildung 37) lässt erkennen, dass weder die Kombination zweier Phosphorylierungen noch die Imitation aller drei Phosphorylierungen an T208, S258 und T320 zu einer gleichermaßen starken MK2-SUMOylierung führt wie die Koexpression der MEKK1ca.

Des Weiteren führt bei den Doppelmutanten die Kombination mit S258E (GST-MK2TS208/258E und GST-MK2ST258/320E) immer zu einer Reduktion der verbleibenden T-Phosphorylierung. GST-MK2T208/320E zeigt im Gegensatz dazu eine erhöhte S258-Phosphorylierung.

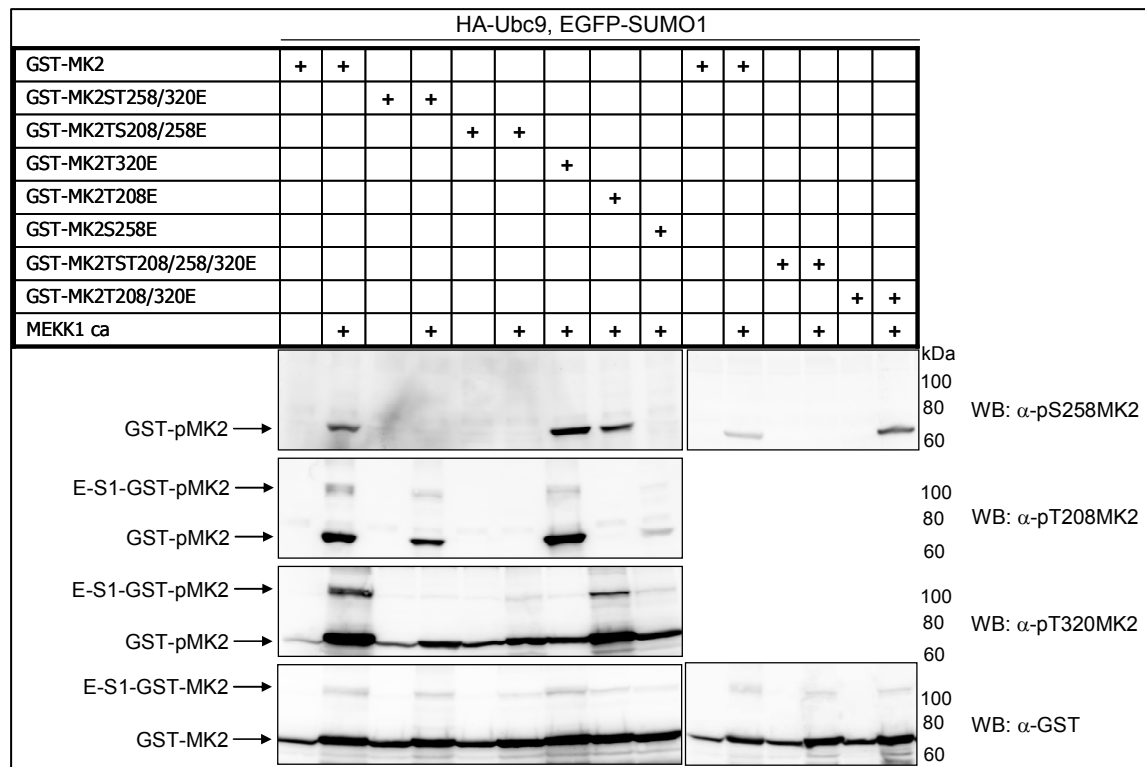


Abbildung 37: Phosphorylierung und SUMOylierung verschiedener GST-MK2-Phosphorylierungsmutanten *in vivo*. HEK293-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und im Western Blot mit einem GST-Antikörper (α -GST) sowie verschiedenen phospho (p)MK2-Antikörpern (α -pT208MK2, α -pS258MK2 und α -pT320MK2) analysiert. E-S1-GST-MK2 = GST-MK2-Fusionsprotein konjugiert mit EGFP-SUMO1; pMK2 = an T208, S258 oder T320 phosphoryliertes MK2.

3.3.4 Identifizierung der MK2-SUMOylierungsstellen

3.3.4.1 Western-Blot-Analyse

mMK2				
1	MLSGSPGQTP	PAPFPSPPPP	APAQPPPPFP	QFHVKSGLQI RKNAITDDYK
51	VTSQVLGLGI	NGKVLRFDK	RTQQKFAKLM	LQDCPKARRE VELHWASQC
101	PHIVHIVDVY	ENLYAGRKCL	LIVMECLDGG	ELFSRIQDRG DQAFTEREAS
151	EIMKSIGAEI	QYLHSINIAH	RDVKPENLLY	TSKRPNAILK LTDFGFAKET
201	TSHNSLTTPC	YTPYYVAPEV	LGPEKYDKSC	DMWSLGVIMY ILLCGYPPFY
251	SNHGLAISP	MKTRIRMGQY	EFNPWESEV	SEEVKMLIRN LLKTEPTQRM
301	TITEFMNHPW	IMQSTKVPQT	PLHTSRVLKE	DKERWEDVKE EMTSALATMR
351	VDYEQIKIKK	IEDASNPLLL	KRRKKARAVE	DAALAH

Abbildung 38: Aminosäuresequenz von mMK2. Die Sequenz von mMK2 besteht aus 386 Aminosäuren. Die in MK2 vorhandenen Lysine (K) sind rot markiert, wichtige Phosphorylierungsstellen blau.

Für die Identifizierung der MK2-SUMOylierungsstelle wurden Lysine für die Mutation ausgewählt, die mit dem Konsensusmotiv Ψ KxE/D vollkommen übereinstimmen (K174, K293, K329, K339, K359/360). Für die Analyse wurden die entsprechenden Expressionsplasmide für GST-MK2-Mutanten, HA-Ubc9 und MEKK1ca allein oder mit (+) EGFP-SUMO1 in HEK293-Zellen kotransfiziert. Die SUMOylierungen der einzelnen Mutanten und des WT wurden im Western Blot miteinander verglichen. Die Mutationen

K329R und K339R zeigten keine Veränderung im Vergleich zum WT. Abbildung 39 zeigt die Analyse der GST-MK2K174R und GST-MK2K359/360R im Vergleich zum WT. Die SUMOylierungsbande des WT zeigt sich als eine distinkte Bande, der sich im oberen und unteren Bereich je eine schwächere diffuse Bande anschließt. In der Gegenüberstellung scheint für GST-MK2K174R die diffuse Bande im oberen Bereich zu verschwinden und für GST-MK2K359/360R verstärkt sich die distinkte Bande, wodurch die schwächeren Banden entweder weniger gut zu erkennen sind oder auch tatsächlich verschwinden. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass wie in Abbildung 39 zu sehen ist, GST-MK2 bei einer MEKK1ca Stimulation auch durch das endogene SUMOylierungssystem modifiziert wird. Diese endogene SUMOylierung ist bei der Mutante GST-MK2K359/360R verstärkt. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden beide Mutationen kombiniert (GST-MK2K174/359/360R) um die Auswirkung auf die MK2-SUMOylierung zu untersuchen. Im Western Blot zeigte sich für diese Mutante das gleiche Bild wie für GST-MK2K359/360R: eine distinkte Bande.

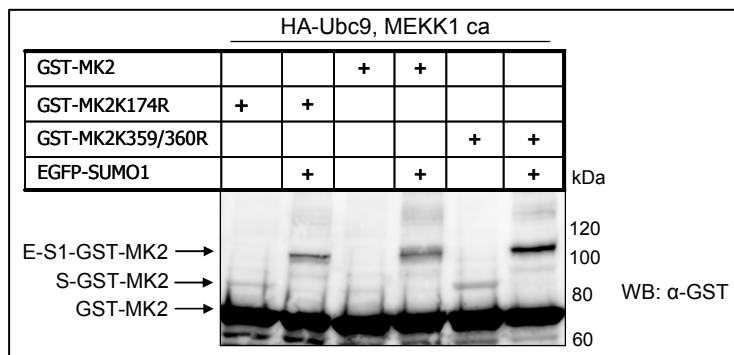


Abbildung 39 : Veränderte SUMOylierung von GST-MK2-Mutanten nach dem Aminosäureaustausch von K174 oder K359/360 durch Arginin (R). Expressionsplasmide für die GST-Fusionsproteine wurden mit HA-Ubc9 und MEKK1ca allein oder mit (+) EGFP-SUMO1 in HEK293 kotransfiziert. Die Zellen wurden 24h nach der Transfektion lysiert und die Proteine im Western Blot mit einem GST-Antikörper (α -GST) nachgewiesen. E-S1-GST-MK2 = GST-MK2-Fusionsprotein konjugiert mit EGFP-SUMO1; S-GST-MK2 = GST-MK2-Fusionsprotein konjugiert mit endogenem SUMO.

In Abbildung 40 sind die Ergebnisse der MK2-K293-Analyse zusammengefasst. GST-MK2K293R zeigte im Western Blot bei gleicher EGFP-SUMO1-Expression keine SUMOylierung und eine geringere Expression im Vergleich zu GST-MK2. Bei der Untersuchung des Einflusses der SUMOylierung auf die Phosphorylierung wurde festgestellt, dass die GST-MK2K293R nicht phosphorylierbar ist (α -pS258MK2-Blot). Demzufolge könnte die Mutation eine ungewollte Konformationsänderung hervorgerufen haben. Es wurden daher zur K293-Analyse zwei weitere Mutanten, K293M und K293A, hergestellt und analysiert. Im Western Blot zeigten diese Mutanten keine Unterschiede zu dem Wildtyp.

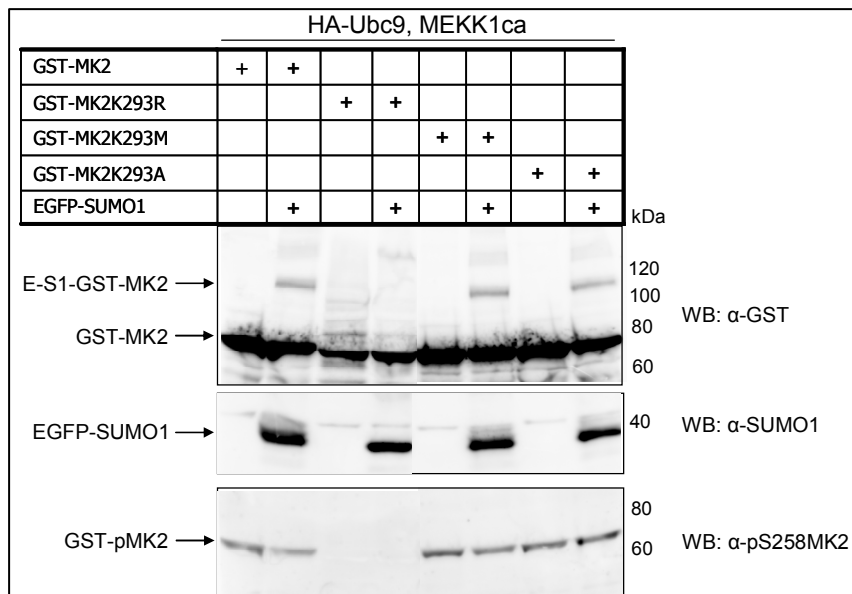


Abbildung 40: *In vivo* SUMOylierung unterschiedlicher GST-MK2K293-Mutanten. Expressionsplasmide für GST-MK2 und GST-MK2-Mutanten, Ubc9 und EGFP-SUMO1 wurden mit MEKK1ca in HEK293 kotransfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Proteine der Zellextrakte im Western Blot mittels GST-Antikörper (α -GST) sowie SUMO1- und pS258MK2-Antikörper (α -SUMO1 und α -pS258MK2) analysiert. E-S1-GST-MK2 = GST-MK2-Fusionsprotein konjugiert mit EGFP-SUMO1; GST-pMK2 = S258 phosphoryliertes GST-MK2.

Zur weiteren Identifizierung der MK2-SUMOylierungsstelle wurden nun Motive für die Mutation gewählt, die nur eingeschränkt mit dem Konsensusmotiv übereinstimmen. Einzelmutanten der Lysine K154, K183, K228, K262, K285, K332, K371 und K374/375 wurden hergestellt und als GST-MK2-Fusionsproteine mit Ubc9, EGFP-SUMO1 und in An- und Abwesenheit von MEKK1ca in HEK293-Zellen exprimiert. Die Proteine der lysierten Zellextrakte wurden im Western Blot analysiert. Im Vergleich der einzelnen Mutanten mit dem Wildtyp konnte für keines der mutierten Lysine ein Unterschied in der SUMOylierung detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

3.3.4.2 Massenspektrometrie

Da der sequentielle Austausch verschiedener Aminosäuren in MK2 und die Western Blot-Analysen leider keine eindeutigen Hinweise auf die Position der MK2-SUMOylierungsstelle gaben, wurde versucht diese durch massenspektrometrische Analytik zu ermitteln. Hierfür wurden, wie in Abbildung 41 angegeben, GST-MK2, Ubc9, SUMO3 und MEKK1ca in HEK293-Zellen koexprimiert. Die Aufreinigung des Zellextraktes erfolgte über Glutathion-Beads. Die aufgereinigten und angereicherten Proteine wurden für die Massenspektrometrie im SDS-Gel getrennt und mit Coomassie angefärbt. Zur Überprüfung der aufgereinigten Proteine wurden diese zusätzlich im Western Blot mit einem MK2-Antikörper nachgewiesen. Die weitere Probenaufbereitung sowie die Proteinanalyse erfolgte in Kooperation mit der Core Facility massenspektrometrische (MS-) Proteinanalytik der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas Pich.

Zunächst erfolgte die Bestimmung der Peptidmassen analog zu STAT1 durch MALDI-TOF/TOF-MS. Zur Identifizierung der SUMOylierungsstellen wurden die Peptidmassen-*fingerprints* des unmodifizierten MK2 mit dem SUMOyliertem MK2 verglichen und auf Unterschiede hin untersucht. Die manuelle Auswertung gestaltete sich als sehr schwierig und lieferte keine eindeutigen Ergebnisse, da für die Analyse einer unbekanntes SUMOylierungsstelle ein eindeutiges MS/MS-Spektrum vorliegen muss. Der Nachweis einzelner Massen war trotz hoher Massengenauigkeit in diesem Fall nicht ausreichend, da für eine definierte Masse zu viele mögliche Peptide vorhanden waren.

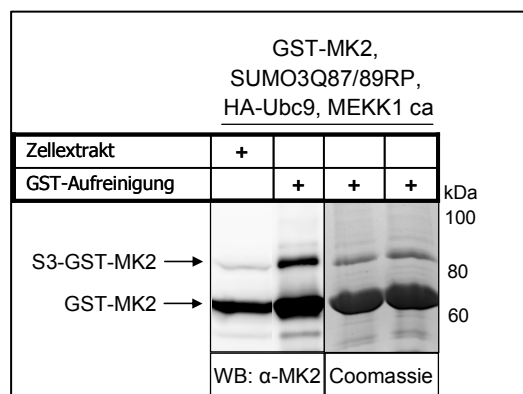


Abbildung 41: Überprüfung der GST-MK2 Präparation. Expressionsplasmide wurden wie angegeben in HEK293-Zellen transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, die Proteinextrakte über Glutathion-Beads aufgereinigt und im SDS-Gel durch Coomassie-Färbung sowie im Western Blot mit einem MK2-Antikörper (α -MK2) nachgewiesen. S3-GST-MK2 = GST-MK2-Fusionsprotein konjugiert mit koexprimiertem SUMO3.

Daher erfolgte eine weitere Analyse, analog zu STAT3 und STAT4 unter Verwendung der Mutante SUMO3QT89/90PR, durch LC-ESI-Massenspektroskopie im LTQ-Orbitrap-Velos MS. Auf diese Weise konnten für MK2 K339, K359 sowie K360 als SUMOylierungsstellen identifiziert werden (Abbildungen 42-44).

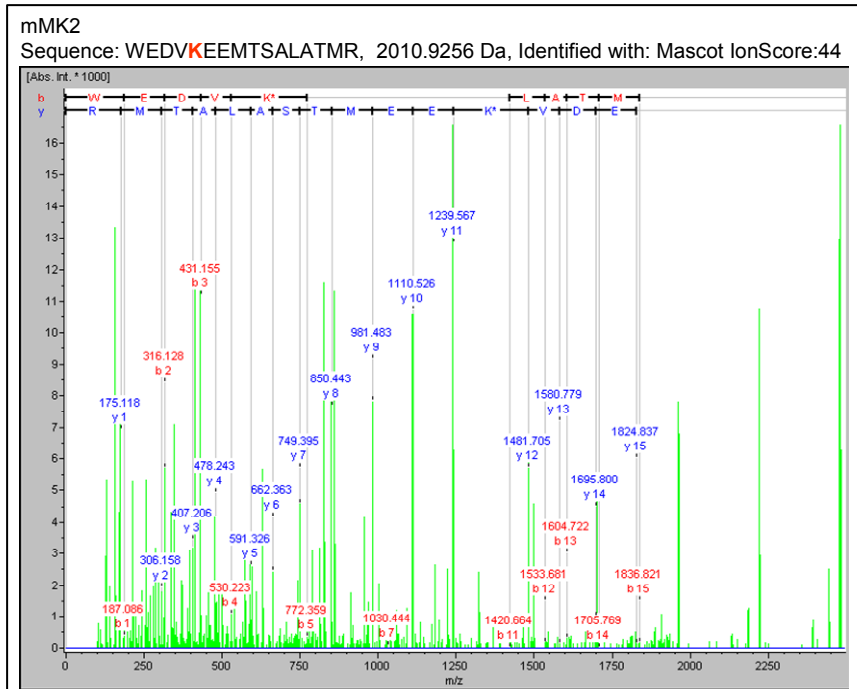


Abbildung 42: MS/MS-Spektrum des MK2-Peptides W335-R350. Die SUMOylierung erfolgt an MK2K339. Dargestellt sind die y- und b-Ionenserien des Peptides. Das modifizierte Lysin ist durch einen Stern markiert. m/z = Masse/Ladung

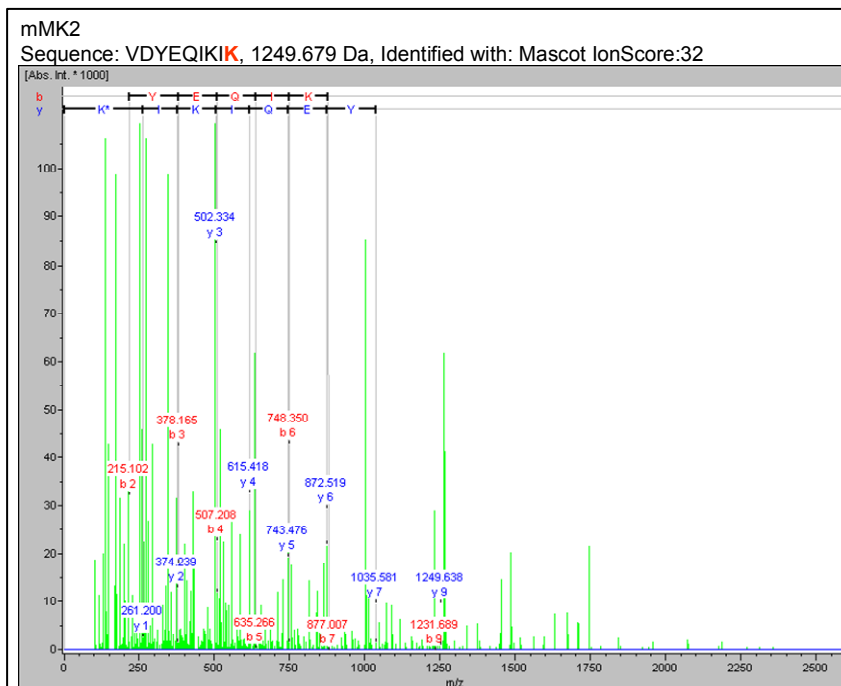


Abbildung 43: MS/MS-Spektrum des MK2-Peptides V351-K359. Die SUMOylierung erfolgt an MK2K359. Dargestellt sind die y- und b-Ionenserien des Peptides. Das modifizierte Lysin ist durch einen Stern markiert. m/z = Masse/Ladung

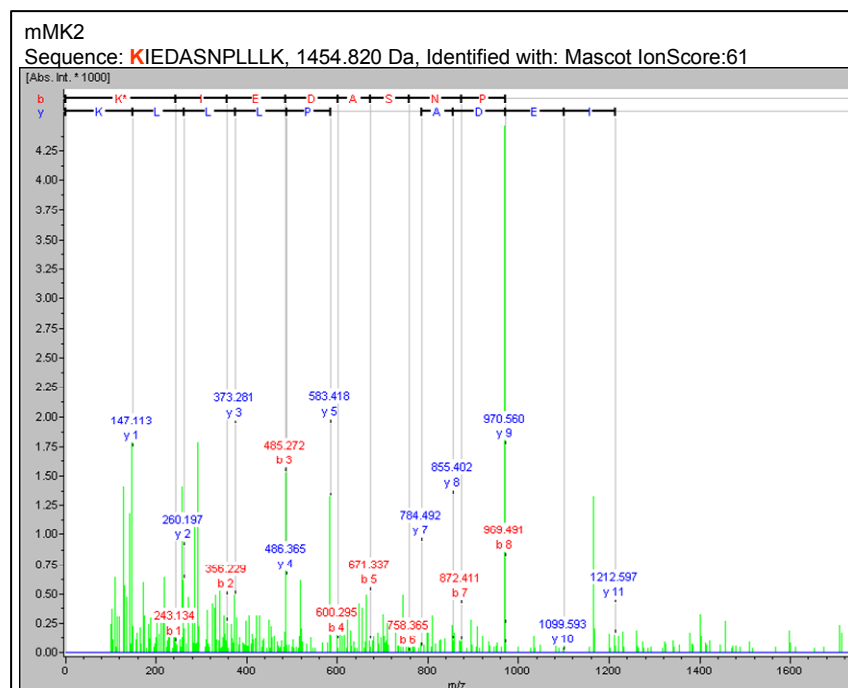


Abbildung 44: MS/MS-Spektrum des MK2-Peptides V360-K371. Die SUMOylierung erfolgt an MK2K360. Dargestellt sind die y- und b-Ionenserien des Peptides. Das modifizierte Lysin ist durch einen Stern markiert. m/z = Masse/Ladung

Des Weiteren wurde mit derselben Methodik versucht die SUMOylierungsstellen für MK3 und MK5 zu identifizieren. Die Analyse scheiterte jedoch bereits daran, dass keine ausreichend große Proteinmenge des modifizierten Proteins *in vivo* hergestellt werden konnte.

3.3.5 Charakterisierung der SUMOylierungsmutante MK2K339/359/360R

3.3.5.1 Western Blot-Analysen

Nach der massenspektrometrischen Identifizierung der Lysine (K) 339, 359 und 360 als SUMOylierungsstelle von MK2 wurden diese in GST-MK2 zu Arginin (R) mutiert und im Western Blot die SUMOylierbarkeit und die Phosphorylierbarkeit, als Test der Funktionalität, untersucht. GST-MK2 und GST-MK2K339/359/360R wurden mit HA-Ubc9 und EGFP-SUMO1 allein oder mit MEKK1ca in HEK293-Zellen koexprimiert und die Extrakte der Transfektanten im Western Blot analysiert. Abbildung 45A zeigt deutlich weniger SUMOyliertes GST-MK2K339/359/360R als SUMOyliertes GST-MK2. Ein Unterschied in der Phosphorylierbarkeit dieser Mutante ist im Vergleich zum Wildtyp jedoch nicht zu erkennen (Abbildung 45B), so dass die Funktionalität dieser Mutante nicht eingeschränkt zu sein scheint.

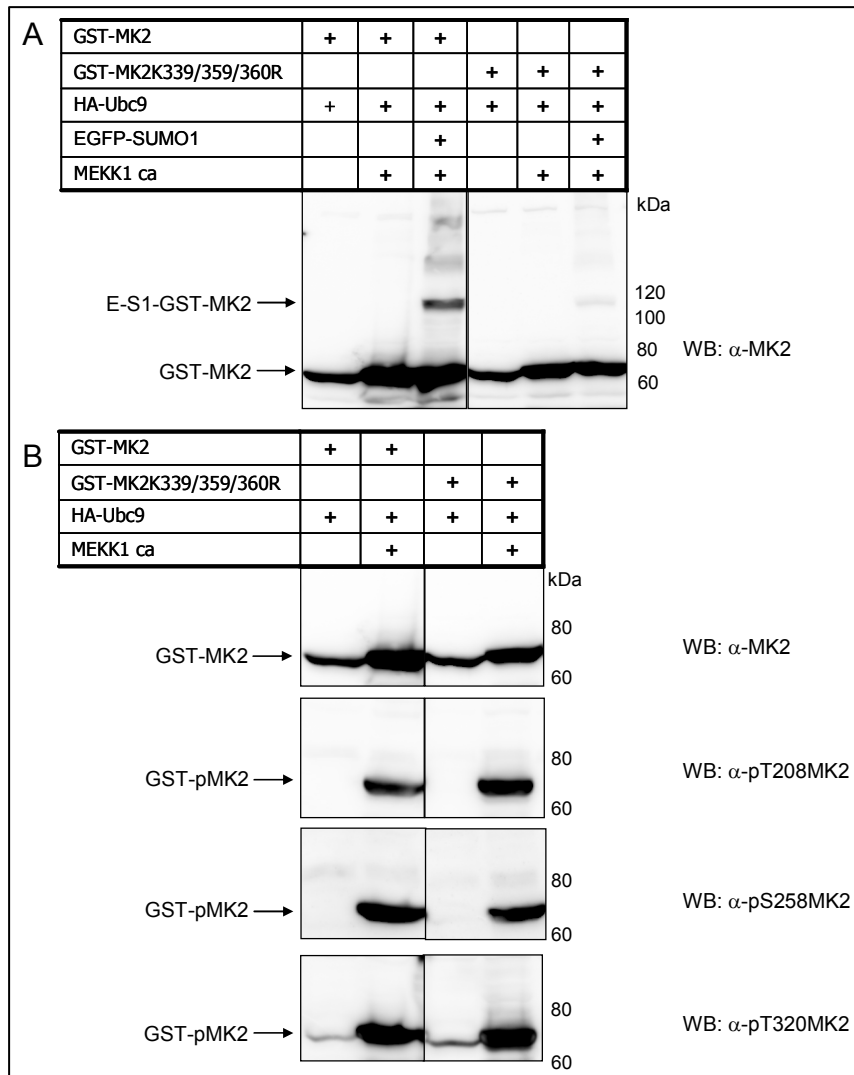


Abbildung 45: *In vivo* SUMOylierung und Phosphorylierung von GST-MK2K339/359/360R. Die Expressionsplasmide der angegebenen Proteine wurden in HEK293-Zellen transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Proteinextrakte im Western Blot mittels MK2-Antikörper (α -MK2) sowie verschiedenen phospho (p) MK2-Antikörpern (α -pT208MK2, α -pS258MK2 und α -pT320MK2) analysiert. E-S1-GST-MK2 = GST-MK2-Fusionsprotein konjugiert mit EGFP-SUMO1; pMK2 = an T208, S258 oder T320 phosphoryliertes MK2.

3.3.5.2 Komplementation von MEF MK2/3^{-/-}-Zellen

Aus der Arbeitsgruppe Gaestel/Kotlyarov (Zentrum für Biochemie, MHH) erhielten wir für weitere Analysen gut charakterisierte immortalisierte MEF MK2/3^{-/-}-Zellen [112]. Für die Komplementation dieser Zellen wurden zunächst die c-DNAs, die für MK2 oder MK2K339/359/360R kodieren, in den Expressionsvektor pIRES2-EGFP, der eine *internal ribosome entry site* (IRES) zwischen dem zu untersuchenden Gen und der Region für EGFP (*enhanced GFP*) enthält, kloniert. Anschließend wurde das MK2-IRES-EGFP- bzw. das MK2K339/359/360R-IRES-EGFP-Fragment in den retroviralen Expressionsvektor pMSCV durch Klonierung eingebracht. Die bizistronische mRNA, die von diesem Vektor kodiert wird, führt zu der unabhängigen Translation des gewünschten Proteins MK2 und EGFP. Durch Fluoreszenzmessung mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) ist es möglich die erfolgreiche Integration in die Zielzellen sichtbar zu machen und eine relative

Expressionsabschätzung durchzuführen. Die Komplementation erfolgte durch retrovirale Infektion der MK2/3^{-/-}-Zellen mit dem Leervektor (pMSCV) als Negativkontrolle, dem MK2-WT (pMSCV-MK2-IRES-EGFP) oder der SUMOylierungsmutante (pMSCV-MK2K339/359/360R-IRES-EGFP). Es entstanden daher drei verschiedene Zelllinien. Nach 11-tägiger Kultivierung der Zellen in Selektionsmedium (Hygromycin B 200µg/ml) wurde die Gesamtpopulation der EGFP-exprimierenden Zellen (Abbildung 46A) durch FACS in jeweils zwei Populationen mit unterschiedlicher EGFP (MK2)-Expression getrennt (schwache und mittlere Expression) und weiterkultiviert. 7 Tage nach der FACS-Sortierung wurde die EGFP-Expression der Populationen durch eine erneute FACS-Analyse überprüft (Abbildung 46B) und die aus diesen Zellen gewonnenen Proteinextrakte im WB analysiert (Abbildung 47).

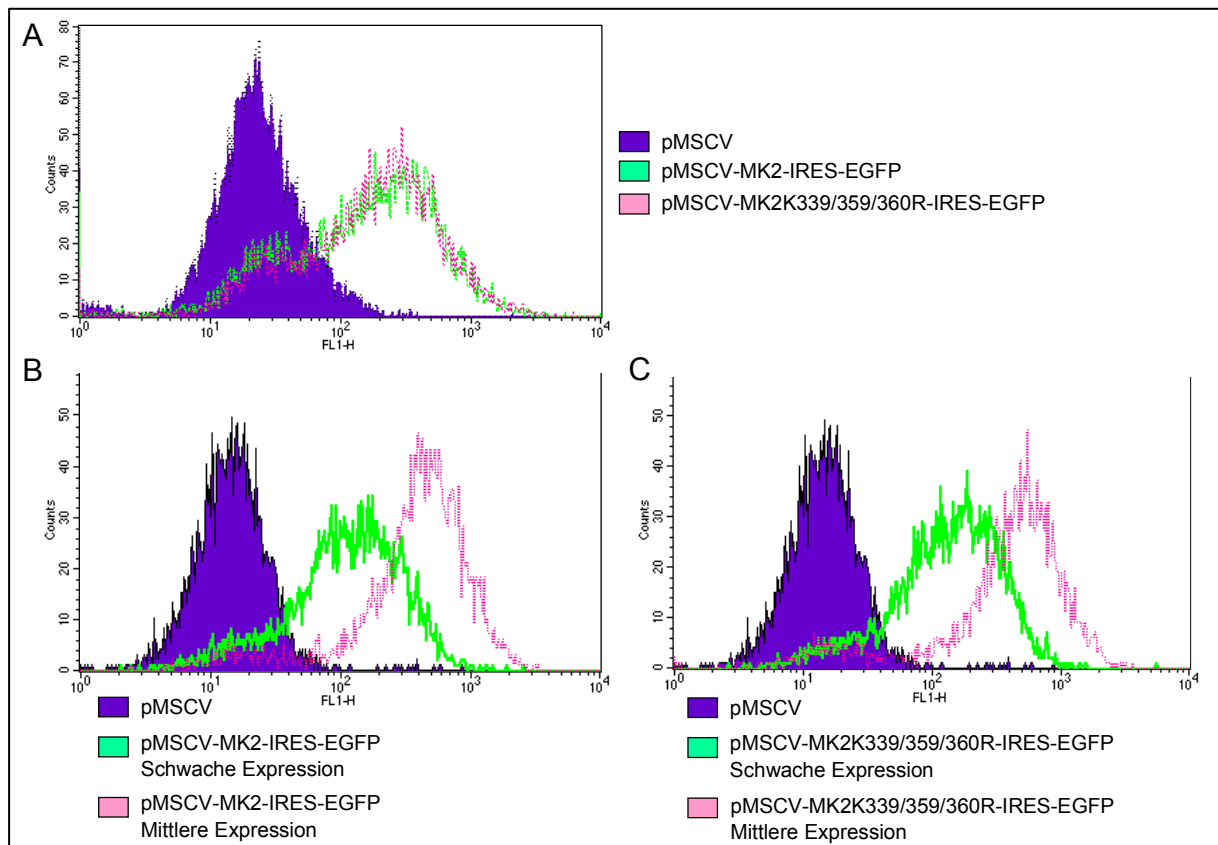


Abbildung 46: FACS-Analyse komplementierter MEF MK2/3^{-/-}-Zellen. (A) EGFP-Expression (FL1H) der Gesamtzellpopulationen (counts) in Abhängigkeit von den verwendeten Expressionskonstrukten nach 11 Tagen Selektion (B-C) Zellpopulationen (counts) unterschiedlicher EGFP (MK2)-Expressionen 7 Tage nach FACS-Sortierung.

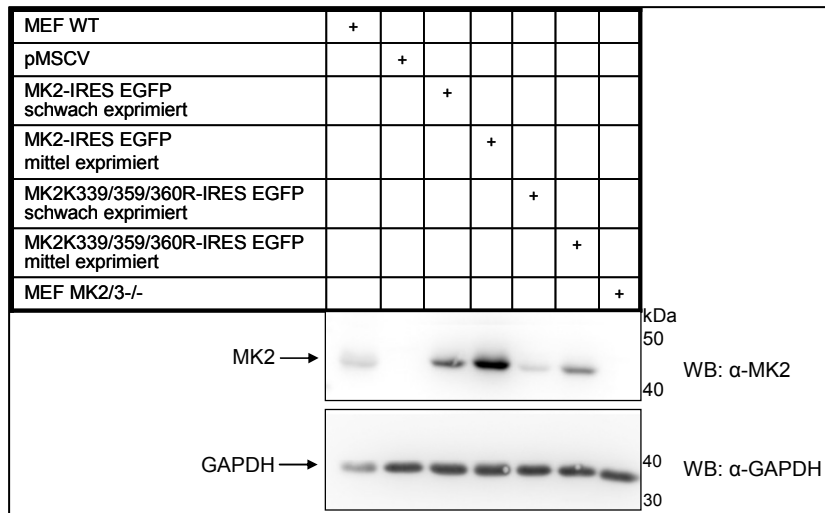


Abbildung 47: MK2-Expression komplementierter MEF MK2/3^{-/-}-Zellen. MEF MK2/3^{-/-}-Zellen wurden durch virale Infektion mit den angeführten Expressionskonstrukten komplementiert. Die MK2- und GAPDH-Expression in den Proteinextrakten verschiedener Zellpopulationen wurden im Western Blot mit einem MK2-Antikörper (α -MK2) und GAPDH-Antikörper (α -GAPDH) nachgewiesen.

Die WB-Analyse zeigt, dass in MEF MK2/3^{-/-}-Zellen, die nur mit dem Leervektor (pMSCV) transduziert wurden, keine MK2-Expression nachgewiesen werden konnte. In den weiteren komplementierten Zellen wird MK2 in beiden Populationen (schwache und mittlere Expression) im Vergleich zu MK2K339/359/360R stärker exprimiert. Das MK2-Expressionslevel in MEF-WT-Zellen ist ungefähr mit dem in schwach exprimierenden MK2- oder mittel exprimierenden MK2K339/359/360-Zellen zu vergleichen. Für alle weiteren Analysen wurde jeweils die Population mit der mittleren MK2-Expression verwendet.

3.3.5.1 Stimulation der MK2-Phosphorylierung in komplementierten MEF MK2/3^{-/-}-Zellen

Die MK2-Phosphorylierung ist essentiell für die Aktivierung und Funktion von MK2. Daher wurden die mit MK2 oder MK2K339/359/360R komplementierten Zellen zuerst auf die Phosphorylierbarkeit von MK2 überprüft. Die Stimulation der MEF-Zellen erfolgte nach 16h Serumangel. Nach der UV-Bestrahlung mit 200J/cm² (Daten nicht gezeigt) oder der Inkubation mit 10 μ g/ml Anisomycin für 60 bzw. 90min (Abbildung 48) konnte für MK2 und MK2K339/359/360R die T208- und T320-Phosphorylierung im Western Blot nachgewiesen werden. Generell ist zunächst auch hier zu beobachten, dass die Expression des MK2K339/359/360R im Vergleich zu der Expression des MK2-WTs geringer ist. Die Phosphorylierung der MK2-Mutante scheint in beiden Fällen etwas schwächer als bei dem MK2-WT zu sein. Die p38 α -Level sowie deren deutliche Aktivierung (pp38 α) nach 60 oder 90min sind nach der Komplementation mit MK2 oder MK2K339/359/360R höher als nach der Transduktion mit dem Leervektor pMSCV.

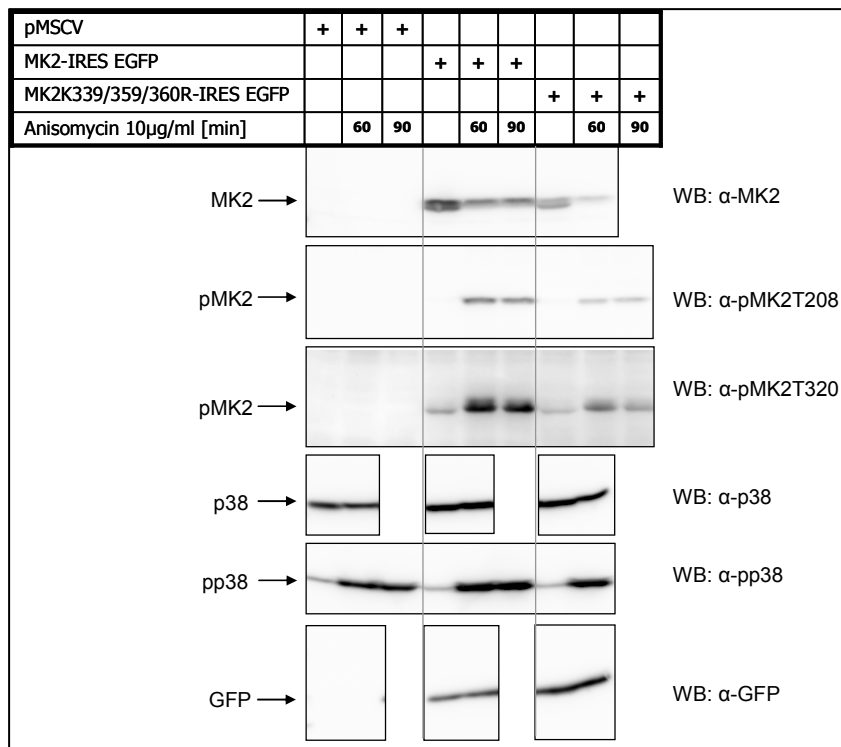


Abbildung 48: Proteinexpression komplementierter MEF MK2/3^{-/-}-Zellen. MEF MK2/3^{-/-}-Zellen wurden durch virale Infektion mit den angeführten Expressionskonstrukten komplementiert und nach 16h Serummangel mit Anisomycin wie angegeben behandelt. Nach der Zellyse wurde die Proteinexpression der angeführten Proteine in den Zellextrakten der verschiedenen Zellpopulationen im Western Blot mit entsprechenden Antikörpern (α-MK2, α-pMK2T208, α-pMK2T320, α-p38α, α-pp38α und α-GFP) nachgewiesen.

3.3.5.2 Real-time PCR

Die Rolle der MAP Kinase p38 bei der Regulation stimulationsabhängiger Expression von *Immediate early genes* (IEG) ist seit langer Zeit bekannt [137-140] und die Interaktion zwischen IEGs und MK2 zum Teil näher untersucht. So ist beispielsweise MK2 essentiell für die Ttp-mRNA- und Proteinstabilisierung. Die Phosphorylierung durch MK2 führt zur Verringerung der ARE (adenine/uridine-rich element)-Affinität in der 3' UTR (untranslatierte Region) der mRNA des Tumornekrosefaktors (TNF) und verhindert somit die destabilisierende Wirkung des Ttps [113].

Für die Charakterisierung der Rolle der MK2-SUMOylierung wurde die stressinduzierte Genexpression der bekannten IEGs Fos, Jun, Egr-1 und Ttp in transduzierten MEF MK2/3^{-/-}-Zellen (pMSCV, MK2, MK2K339/359/360R) analysiert. Gesamt-RNA der entsprechenden Zelllinien wurde isoliert und mittels reverser Transkription in c-DNA umgeschrieben, die dann in der real-time PCR eingesetzt wurde. Für jeden Assay wurden biologische Duplikate jeder Zelllinie eingesetzt, aus denen jeweils im Doppelansatz cDNA für den Einsatz in der real-time PCR synthetisiert wurde. Die errechneten Werte beziehen sich demnach auf je 4 Messungen. Die anisomycinabhängige Änderungen der relativen mRNA-Level der einzelnen Gene, bezogen auf „Mock unbehandelt“ (enthält Leervektor pMSCV), sowie die Standardabweichungen sind für die einzelnen Zelllinien in Abbildung 49 zusammengestellt.

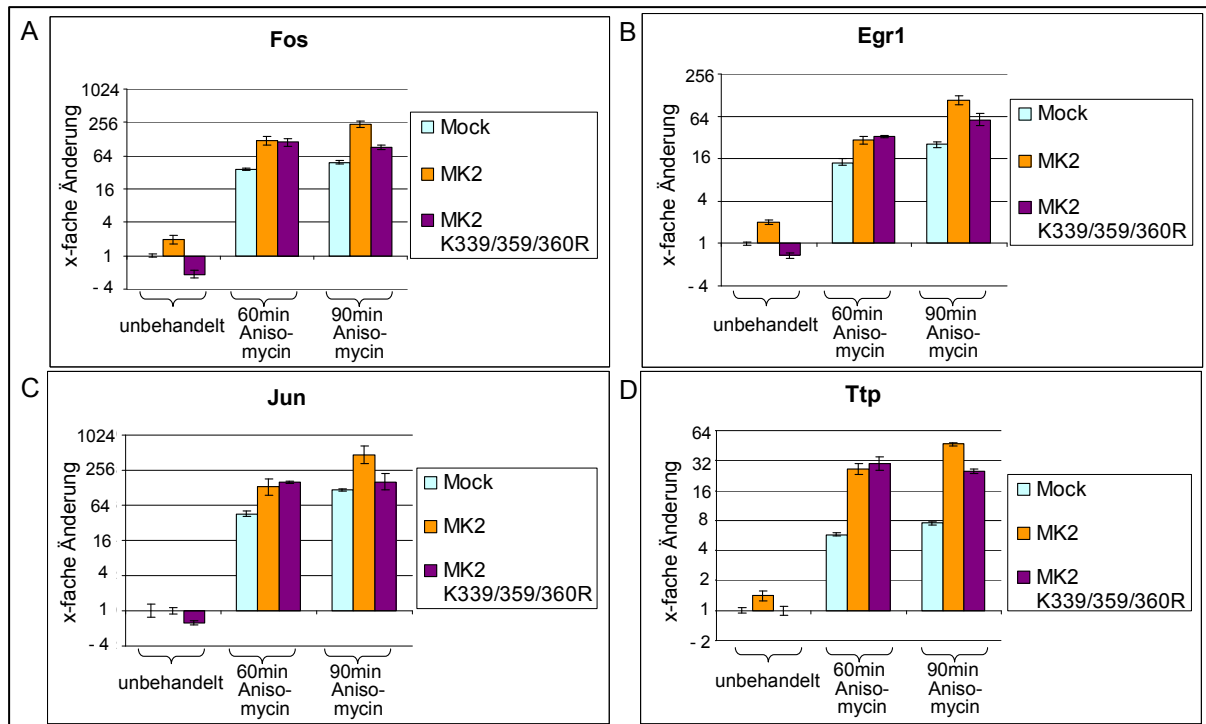


Abbildung 49: Änderung der Genexpression in Abhängigkeit der MK2- oder MK2K339/359/360R-Komplementation und Stimulation. Immortalisierte MEF MK2/3^{-/-}-Zellen wurden mit Leervektor pMSCV (Mock), MK2 oder MK2K339/359/360R transduziert. Nach 16h Serummangel wurden die Zellen für 60min oder 90min mit 10µg/ml Anisomycin stimuliert oder unbehandelt weiterinkubiert. Gesamt-RNA wurde isoliert und die Expressionslevel angegebener mRNAs durch real-time PCR bestimmt (A) Fos (B) Egr-1 (C) Jun und (D) Ttp.

In den unbehandelten Zellen sind die Fos-, Egr1- und Ttp-Expressionen in den MK2-Zellen höher als in den Mock-Zellen und die Jun-Expression ist auf dem gleichen Niveau wie in den in den Mock-Zellen. Die Expressionen der untersuchten Gene sind unbehandelt in den MK2-Zellen höher als in den MK2K339/359/360R-Zellen. In allen drei Zelllinien konnte eine anisomycinabhängige Expressionserhöhung für Fos, Egr1, Jun und Ttp nach 60min nachgewiesen werden. In Mock- und MK2-Zellen ist nach 90min eine weitere Erhöhung der Expressionen zu beobachten. In den MK2K339/359/360R-Zellen hingegen ist die Genexpression im Vergleich zu 60min annähernd gleich und in jedem Fall geringer als in den MK2-Zellen.

4 Diskussion

4.1 Entwicklung des *Ubc9/substrate dimerization-dependent SUMOylation (USDDS)-Systems*

Proteinfunktionen können durch posttranslationale Proteinmodifikationen kontrolliert werden, die getrennt von einander, gemeinsam oder sogar entgegengesetzt wirken. Dadurch erreichen sie die Weiterleitung und Verarbeitung extrazellulärer Signale und die spezifische Proteinfunktion am Wirkungsort innerhalb der Zelle [34]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die SUMOylierung der STAT Proteine sowie der MAPKAP Kinase 2, ihre Wechselwirkung mit der Phosphorylierung dieser Proteine und ihre Funktion in der Genexpression untersucht. Es war bereits bekannt, dass SUMOylierung in die Regulation verschiedener anderer Proteine involviert ist und dabei mit anderen regulierenden Modifikationen in Wechselwirkung tritt. Einige Transkriptionsfaktoren wie HSF-1, GATA-1 und MEF2A werden durch phosphorylierungsabhängige SUMOylierung reguliert [20, 141, 142], wohingegen MEF2D, HIC1, NF-IL6 und SP-3 ein Wechselspiel zwischen SUMOylierung und Acetylierung zeigen [143-146]. Zur besseren Charakterisierung der Funktion SUMOylierter Proteine und der Untersuchung des Einflusses der SUMOylierung auf spätere Proteinmodifikationen *in vivo* wurde das *Ubc9 fusion-directed SUMOylation (UFDS)*-System entwickelt [115]. Durch die dauerhafte Substrat-Ubc9-Fusion ist dieses System jedoch für kinetische SUMOylierungsstudien oder Studien bezüglich der Wechselwirkung verschiedener aufeinander folgender Proteinmodifikationen nicht einsetzbar.

In dieser Arbeit wurde das *Ubc9/substrate dimerization-dependent SUMOylation (USDDS)*-System entwickelt, um die Wechselwirkungen verschiedener Modifikationen an einem Protein besser untersuchen zu können [118]. Im USDDS-System ist die Ubc9-Substrat-Bindung hierbei zu jedem Zeitpunkt *in vivo* chemisch induzierbar. Für die bekannten SUMOylierungssubstrate STAT1 und p53 wurde zunächst diese Induzierbarkeit der SUMOylierung gezeigt. Die Modifikation konnte nach einstündiger Inkubation der transfizierten HEK293-Zellen mit dem Rapamycinderivat AP21796 nachgewiesen werden, die Menge an SUMOyliertem Protein konnte durch eine AP21796 Inkubation von zwei Stunden erhöht werden. Dabei war es unerheblich, welche der Proteindomänen (FRB, FKBP), die durch die chemische Substanz gebunden werden, an das Substrat und das Ubc9 fusioniert wurde. Die generelle Funktionalität des Systems wurde mit möglichen SUMOylierungsprodukten überprüft, die bereits durch UFDS getestet worden waren [115]. Die SUMOylierung von CRSP9, FOS, CSNK2B, TCF21 bzw. die ausbleibende SUMOylierung von VDRIP, STK16, CKS2, RFXANK durch UFDS konnte im USDDS-System bestätigt werden. Die beiden Proteine MYF6 und HES1 konnten als neue SUMOylierungssubstrate durch USDDS identifiziert werden. Möglicherweise konnten die

SUMOylierungsstellen dieser Proteine durch die vielleicht etwas flexiblere Ubc9-Anlagerung im USDDS-System im Vergleich zum UFDS-System besser erreicht werden. Die schwache SUMOylierung hingegen von CDK4, MAPK13, CDKN3 und CDKN2D im UFDS-System, konnte durch USDDS nicht bestätigt werden.

Für den Nachweis der SUMOylierung an substratspezifischen SUMOylierungsstellen im USDDS-System wurde die SUMOylierung der Proteine mit mutierter SUMOylierungsstelle (STAT1K703R, p53K386R) untersucht. Für diese STAT1- und p53-Mutanten konnte durch USDDS keine SUMOylierung der Mutante festgestellt werden. Demnach erfolgt die SUMOylierung an der substratspezifischen SUMOylierungsstelle und das System kann für die Analyse dynamischer Wechselbeziehungen verschiedener Proteinmodifikationen eingesetzt werden.

Durch die sterisch verkürzte Verbindung im USDDS-System zwischen dem Substratprotein und dem Ubc9 im Vergleich zum UFDS-System könnte durch USDDS möglicherweise weniger artifizielle SUMOylierung erreicht werden. Bestärkt wird diese Vermutung dadurch, dass bei der Entfernung der Haupt-SUMOylierungsstellen im UFDS-System bei STAT1 und p53 weitere, sehr schwache SUMOylierungen nachweisbar waren, im USDDS-System jedoch nicht.

4.2 Untersuchungen zum Wechselspiel der SUMOylierung und Tyrosin-Phosphorylierung der STAT-Proteine

Bei der Regulation der SUMOylierung kann die Phosphorylierung als positives oder als negatives Signal dienen. So wird nach der Phosphorylierung von c-JunS63/73 oder c-FosT232 die SUMOylierung dieser Transkriptionsfaktoren reduziert [147, 148]. Die Phosphorylierung von HSF1 an S303 hingegen ist für eine effiziente SUMOylierung an Lys298 notwendig [142]. Die STAT1Y701-Phosphorylierung kann durch verschiedene Liganden wie Interferon oder EGF (*epidermal growth factor*) induziert werden [149], und die STAT1-SUMOylierungsstelle K703, die sich unweit von Y701 befindet, scheint an der Unterdrückung STAT1-abhängiger Genexpression beteiligt zu sein [126]. Es ist zwar nicht bekannt wie die SUMOylierung die Genexpression beeinflusst, die unmittelbare Nähe zweier modifizierbarer Aminosäuren macht eine gegenseitige Beeinflussung jedoch möglich. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Wechselspiel zwischen STAT-SUMOylierung und Y-Phosphorylierung mit dem USDDS-System untersucht werden. Durch UFDS konnte bereits gezeigt werden, dass die SUMOylierung von STAT1K703 die Y701-Phosphorylierung inhibiert [115]. Dieses Ergebnis konnte durch die Verwendung des USDDS-Systems bestätigt werden. Die weitere Charakterisierung dieses dynamischen Wechselspiels zeigte, dass auch Y701-Phosphorylierung die STAT1-SUMOylierung an K703 inhibiert. Die Möglichkeit, dass der pY701-STAT1-Antikörper das phosphorylierte und SUMOylierte

Protein nicht erkennt, kann hierbei ausgeschlossen werden [115]. Daraus ergibt sich, dass die einzelnen Modifikationen nur exklusiv, also entweder STAT1Y701-Phosphorylierung oder STAT1K703-SUMOylierung, erfolgen können. Da die Y701-Phosphorylierung für die Expression einer Vielzahl von Genen notwendig ist [126, 150-152], könnte die SUMOylierung ein Inhibitor dieser Funktion darstellen. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob SUMOyliertes STAT1 möglicherweise selbst, unabhängig von jeder Phosphorylierung, ein Aktivator oder Repressor der Transkription ist. In diesem Zusammenhang sind unsere weiteren Ergebnisse zu STAT5a sehr interessant, die aufzeigen, dass es möglicherweise eine Anzahl von Genen gibt, die in Abhängigkeit von der SUMOylierbarkeit von STAT5a unterschiedlich exprimiert werden.

Da alle Mitglieder der STAT-Proteinfamilie (STAT1-STAT6) diese konservierte Y-Phosphorylierungsstelle (ungefähr bei AS 700) aufweisen [153, 154], war folglich zu klären, ob sich in allen STAT-Proteinen in relativer Nähe zu dieser Phosphorylierungsstelle auch eine SUMOylierungsstelle befindet, und ob die Modifikationen möglicherweise ähnlich wie in STAT1 reguliert werden. STAT3, STAT4 und STAT5a wurden zunächst durch UFDS als SUMOylierungssubstrate identifiziert. Die Analysen der möglichen SUMOylierungsstellen der jeweiligen Proteine (STAT3K707, STAT4K691 und STAT5aK696) zeigten im UFDS-System keinen erkennbaren Unterschied bezüglich der SUMOylierung im Vergleich zum Wildtyp. Durch USDDS konnte zumindest STAT5aK696 als SUMOylierungsstelle identifiziert werden. Da K696 als SUMOylierungsstelle von STAT5a in unmittelbarer Nähe zur Phosphorylierungsstelle Y694 liegt, ist eine gegenseitige Beeinflussung dieser beiden Modifizierungen durchaus denkbar. Die Y694-Phosphorylierung wurde *in vivo* nach Transfektion der entsprechenden Konstrukte durch Interferon- β -Induktion erreicht. Eine gleichzeitige STAT5aY694-Phosphorylierung und K696-SUMOylierung konnte in keinem Szenario nachgewiesen werden. Diese Daten deuten daraufhin, dass es an STAT5a, wie schon von uns für STAT1 beschrieben, einen gegenseitigen Ausschluss von Y694-Phosphorylierung und K696-SUMOylierung gibt. Tatsächlich fehlt momentan noch der Beweis, dass kein phosphoryliertes SUMOyliertes STAT5a vorhanden ist, oder ob der pY694STAT5a-Antikörper bei dem Vorliegen einer K696SUMOylierung die Y694-Phosphorylierung möglicherweise nicht erkennt. Der Mechanismus der sich ausschließenden Modifikationen in STAT1 (Abbildung 50) und STAT5a führt zu dem Vorhandensein verschieden modifizierter STAT-Proteine, die möglicherweise im Transportzyklus zwischen Zytoplasma/Zellkern und Aktivierung/Deaktivierung eine wichtige Rolle spielen könnten. Durch die STAT Y-Phosphorylierung im Zytoplasma erfolgen die Dimerisierung und der Transport in den Zellkern, wo es Teil des Transkription-Initiations-Komplexes STAT-spezifischer Gene wird. Nach der STAT-Dephosphorylierung im Zellkern könnte SUMOyliertes STAT eine schnelle Wiederphosphorylierung vor dem Kernexport verhindern.

Des Weiteren könnten zwei verschieden modifizierte STAT-Populationen auch wichtige Bestandteile unterschiedlicher transkriptioneller Komplexe sein, die für die Aktivierung unterschiedlicher Gene verantwortlich sind. Dementsprechend wäre es möglich, dass SUMOyliertes STAT nach der Dephosphorylierung an der transkriptionellen Neuprogrammierung beteiligt ist, bei der es als Voraussetzung für andere Modifizierungen wie z.B. der Acetylierung dienen könnte [155].

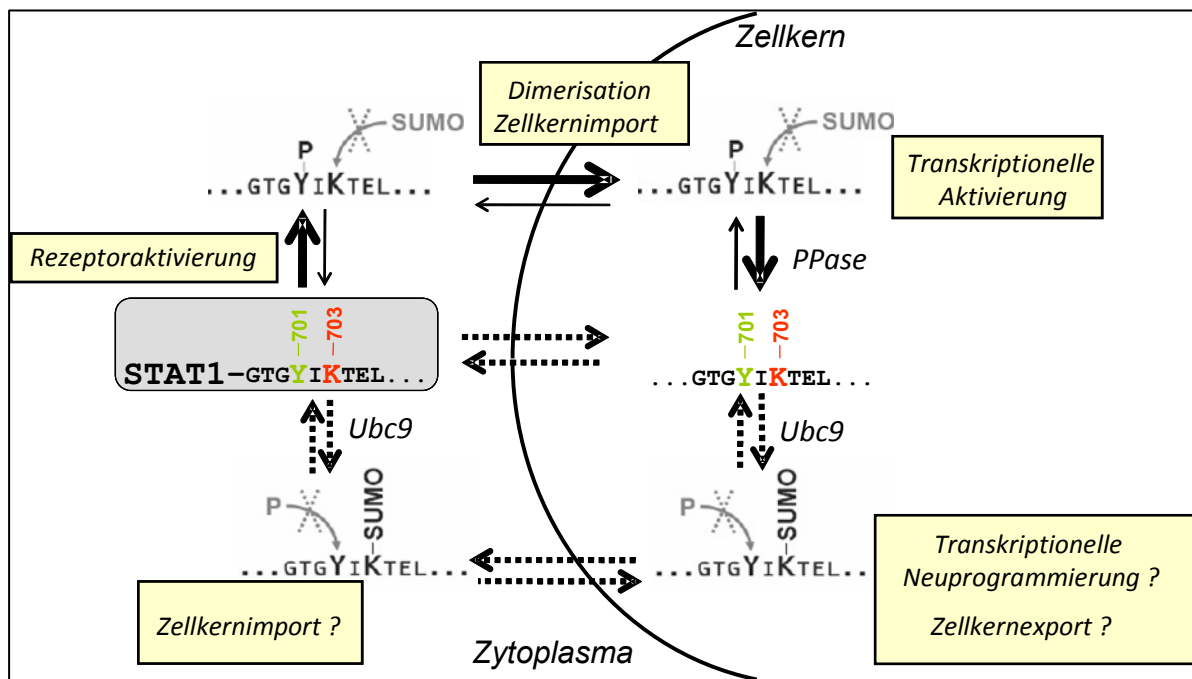


Abbildung 50: Schematische Darstellung der möglichen Funktion der exklusiven Modifikationen in STAT1. Durch Rezeptoraktivierung wird die STAT1Y701-Phosphorylierung ausgelöst, welche Voraussetzung für die Dimerisierung, den Kernimport und der anschließenden transkriptionellen Aktivierung ist und die SUMOylierung an K703 inhibiert. Nach der STAT1-Inaktivierung durch Zellkernphosphatasen (PPase) ist dephosphoryliertes STAT1 ein mögliches SUMOylierungssubstrat und verhindert so die Wiederphosphorylierung an Y701 im Zellkern. SUMOyliertes STAT1 könnte an der transkriptionellen Neuprogrammierung, Zellkernexport oder an der Regulation anderer STAT1-Modifikationen beteiligt sein.

Die Identifizierung der SUMOylierungsstellen in STAT3 und STAT4 durch USDDS gestaltete sich als schwierig, da die hergestellten Mutanten an den vermuteten SUMOylierungsstellen keine Hinweise auf die tatsächlichen SUMOylierungsstellen ergaben. Deshalb wurde eine massenspektrometrische Analyse eingesetzt. Obwohl neben der Proteinidentifizierung, mittlerweile auch posttranskriptionelle Modifikationen wie Phosphorylierung und Glykosylierung eines Proteins [156] oder die genaue Identifizierung der einzelnen modifizierten Aminosäuren [157-159] routinemäßig durchgeführt werden, musste die Identifizierung von SUMOylierungsstellen durch massenspektrometrische Analysen erst noch etabliert werden. Daher wurde zunächst die MALDI-TOF/TOF-Analyse für die Identifizierung der bekannten STAT1 SUMOylierungsstelle durchgeführt. Bei der Auswertung wurden die Peptidmassen-*fingerprints* des unmodifizierten STAT1 mit denen des SUMOylierten STAT1 abgeglichen und die bekannte SUMOylierungsstelle K703 für STAT1

konnte als SUMOylierungsstelle bestätigt werden. Für die Analyse einer unbekanntenen SUMOylierungsstelle hat sich diese Methode jedoch als unvorteilhaft erwiesen, denn für die Auswertung muss ein eindeutiges MS/MS-Spektrum vorliegen. Der Nachweis einzelner Massen war jedoch trotz hoher Massengenauigkeit in diesem Fall nicht ausreichend, da es für eine definierte Masse zu viele mögliche Peptide gab, die u. a. auch auf Proteinverunreinigungen der verwendeten STAT1-Präparation zurückzuführen war. Für die Identifizierung der SUMOylierungsstellen in STAT3 und STAT4 wurde deshalb die LC-ESI-Massenspektroskopie eingesetzt. Die Auswertung der Spektren der SUMOylierten Strep-Ubc9-STAT-Fusionsproteine erfolgte mittels Datenbankanalyse und dem MASCOT-Suchalgorithmus, wodurch ein Vergleich zum unmodifizierten Protein nicht mehr nötig war. So konnten für STAT3 K709 und für STAT4 K667, K669, K673 sowie K691 als SUMOylierungsstellen identifiziert werden. Alle SUMOylierungsstellen befinden sich in der Aminosäuresequenz in näherer Umgebung zu den konservierten Phosphorylierungsstellen STAT3Y705 und STAT4Y693. STAT3 wird nicht an dem in der AS-Sequenz nächsten Lysin (K707) nach der Phosphorylierungsstelle SUMOyliert, sondern an dem übernächsten Lysin (K709), welches C-terminal das Letzte ist. Sollte es eine Beeinflussung dieser beiden modifizierbaren Aminosäuren geben, könnte möglicherweise die Anordnung innerhalb der 3-D-Proteinstruktur eine Erklärung liefern, warum K707 nicht SUMOyliert wird. Für STAT4 wurden die vier Lysine, die sich unmittelbar vor der Y693-Phosphorylierungsstelle befinden, als SUMOylierungsstellen identifiziert. C-terminal befindet sich, fast 50 Aminosäuren entfernt, nur noch das Lysin K742. Interessant wäre hierbei die eventuelle Beeinflussung der STAT3-SUMOylierung im USDDS System zu analysieren und zu klären, welche der SUMOylierungsstellen in STAT4 die Y-Phosphorylierung beeinflussen. Da die Identifizierung der STAT3- und STAT4-SUMOylierungsstellen auf die Verwendung des UFDS-Systems nicht verzichten konnte, die SUMOylierung aber durch die Ubc9-Fusion unnatürlich verstärkt wird, muss die Relevanz dieser SUMOylierungsstellen *in vivo* ohne Ubc9-Fusion überprüft werden. Zusammenfassend kann man sagen, dass allein die Positionen der SUMOylierungsstellen von STAT3, STAT4 und STAT5a zu der jeweiligen Y-Phosphorylierungsstelle Parallelen zu STAT1 erkennen lassen und folglich die gegenseitige Beeinflussung durchaus möglich wäre. Zur Charakterisierung der Funktion der STAT5a-SUMOylierung wurden MEF-STAT5^{-/-}-Zellen mit dem STAT5a-WT oder mit der STAT5aK696R-Mutante komplementiert und miteinander verglichen. In beiden Zelllinien konnten gleiche Mengen an exprimiertem STAT5a-Protein nachgewiesen werden. Deren Interferon-induzierte Y694-Phosphorylierung, im Vergleich zu endogenem STAT5 in HEK293-Zellen, nicht gezeigt werden konnte. Warum die Y-Phosphorylierung nicht nachzuweisen war, konnte nicht geklärt werden. Die Sequenzierung des exprimierten STAT5a-WT zeigt zumindest keinen Grund, warum das Protein nicht phosphoryliert werden

könnte. Da auch die Bindung unphosphorylierter STATs in Verbindung mit anderen Transkriptionsfaktoren an DNAs bekannt ist [127-129], und hier möglichst nur die SUMOylierungsabhängige Transkriptionaktivierung/-inaktivierung bestimmt werden sollte, wurde hier der phosphorylierungsunabhängige Einfluss der STAT5a-SUMOylierung auf die Änderung der Genexpression in einer Microarray-Analyse durch Vergleich der komplementierten MEF-Zellen überprüft. Von den 45018 untersuchten Oligonukleotiden des Maus-Transkriptoms wurden in den STAT5a-Zellen im Vergleich zu Mock-Zellen (STAT5^{-/-}-Zellen) die Expression von 54 Genen hoch und die Expression von 217 Genen herunter reguliert. Die Expressionserhöhung in den STAT5aK696R-Zellen betraf 117 Gene. Schwächere Expressionen als in den Mock-Zellen wurden von 266 Genen in den STAT5a-Mutanten-Zellen erreicht. Generell konnte bei 32 Genen ein Unterschied in der Genexpression zwischen STAT5a- und STAT5aK696R-Zellen festgestellt werden. Hierbei waren 15 Gene in den STAT5a-Zellen stärker exprimiert und 17 Gene schwächer exprimiert als in den STAT5aK696R-Zellen. Für 6 Proteine konnte eine mehr als 5-fache Veränderung der Genexpression zwischen dem STAT5a-WT und der STAT5a-Mutante gezeigt werden. 5 Proteine wiesen eine erhöhte Genexpression im WT (Cdh11, Kcna1, Mmp3, Car3 und Lman1l) auf und nur eines in der Mutante (Anxa10). 4 dieser 6 Proteine werden als Membranproteine beschrieben. Eine Verbindung der identifizierten Membranproteine zu STAT5 oder generell dem Jak/STAT-Signalweg ist bisher nicht bekannt. Ein gut untersuchter Zusammenhang besteht allerdings zwischen STAT5 und Cish (*Cytokine inducible SH2 containing protein*). Dieses Gen wurde in STAT5a-Zellen 2,5-fach und in den STAT5aK696R-Zellen sogar 5-fach höher im Vergleich zu den Mock-Zellen exprimiert. Cish wird auch als Synonym für Cis verwendet und ist neben SOCS1-SOCS7 ein Mitglied der SOCS-Familie. SOCS (*suppressors of cytokine signaling*) sind Proteine, die durch negative Rückkopplung den Jak/STAT-Signalweg regulieren [160]. Nach der zytokinabhängigen STAT5-Aktivierung, Dimerisierung und Wanderung in den Zellkern aktiviert STAT5 die Cis-Expression. Cis bindet an den aktivierten Zytokinrezeptor (z. B. Epo- oder IL-3-Rezeptor) und inhibiert diesen somit für die STAT5-Bindung [161]. Obwohl die untersuchten Zellen vor der RNA-Präparation keine exogene Zytokininduktion der STAT5-Phosphorylierung erhielten, wird Cis in den STAT5a-Zellen 2,5-fach stärker exprimiert als in den Mock-Zellen und in den STAT5aK696R-Zellen wurde sogar eine Verdopplung der Expressionsänderung auf 5-fach in Bezug auf die STAT5a-Zellen erreicht. Möglicherweise liegt STAT5 auch ohne Stimulus von außen in geringen Mengen phosphoryliert vor und führt zur Cis-Aktivierung oder es existiert ein alternativer, phosphorylierungsunabhängiger Cis-Aktivierungsmechanismus. In jedem Fall wird die Cis-Aktivierung durch die fehlende Möglichkeit der SUMOylierung in der STAT5a-Mutante erhöht, bzw. durch die SUMOylierung des WTs die Aktivierung verringert. Die Unterdrückung eines alternativen

Aktivierungsmechanismus könnte auf zwei Wegen erfolgen. Zum einen könnte die SUMOylierung direkt die STAT5a-Bindung an den für die Cis-Aktivierung erforderlichen Promotor, beispielsweise durch eine Konformationsänderung oder Maskierung der Bindungsstelle, beeinflussen. Zum anderen könnte STAT5a als transkriptioneller Koregulator fungieren, deren Bindungseigenschaften zu Cis-regulierenden Interaktionspartnern durch die SUMOylierung verändert werden. Diese Art der Regulation ist in verschiedenen Studien untersucht worden. Sie konnten zeigen, dass unphosphorylierte STATs im Zytoplasma durchaus mehr Funktionen aufweisen, als der Aktivierung zur Verfügung zu stehen [127-129]. So wirkt unphosphoryliertes STAT1 auch als Koregulator der Transkription für Runx2 oder unphosphoryliertes STAT3 kann kappaB-abhängige Gene durch die Bindung von unphosphoryliertem NFkappaB aktivieren [127].

4.3 Untersuchungen zur SUMOylierung und Phosphorylierung der MAPKAP Kinase 2

Die MK2-Aktivierung kann durch unterschiedliche Faktoren wie die Stimulation mit Zytokinen Interleukin-1 (Il-1) [92] oder dem Tumornekrosefaktor (TNF) [163] ausgelöst werden sowie durch verschiedene Stressbedingungen wie UV-Bestrahlung, Hitze- oder osmotischer Schock und die Behandlung mit Arsenit oder Anisomycin [82, 164, 165]. Eine weitere Möglichkeit der MAPK-Aktivierung ist die Kotransfektion entsprechender MAPKK Kinase [166, 167]. Es gibt einige MK2-Aminosäurereste, die stressinduziert *in vivo* phosphoryliert werden können. Aber nur vier zeigen Phosphorylierung durch die MAPKinase p38 α in einem *in vitro* Kinase-Assay (human MK2: Thr25, Thr222, Ser272 and Thr334). Dabei ist die Phosphorylierung an zwei der drei Aminosäuren Thr222, Ser272 und Thr334 für die Aktivierung der MK2 unverzichtbar [97]. Die MK2-Phosphorylierung erfolgt in murinen Zellen am endogenen Protein an T208 (in der T-Schleife), an S258 (in der katalytischen Domäne) und an T320 (in der Scharnierregion zwischen dem katalytischem Kern und der autoinhibierenden Helix). Die Aktivierung der im Kern lokalisierten MK2 durch Phosphorylierung geht einher mit dem Transport der MK2 in das Zytoplasma. Da der Kernimport oder auch Kernexport bei verschiedensten Proteinen von einer SUMOylierung abhängig ist oder begleitet wird, wurde untersucht, ob MK2 SUMOyliert wird, und ob diese SUMOylierung phosphorylierungsabhängig ist. Die Phosphorylierung der drei MK2 Phosphorylierungsstellen T208, S258 und T320 konnte in dieser Arbeit durch die Koexpression einer konstitutiv aktiven MEKK1 an GST-MK2 gezeigt werden. Unter Verwendung von MK2-Mutanten wurde untersucht, ob die drei Phosphorylierungsstellen miteinander interagieren. Hierbei zeigte sich, dass unter den untersuchten Bedingungen die Phosphorylierungen an T208 und T320 von der Phosphorylierung von S258 abhängig zu sein scheinen. Eine Abhängigkeit der S258-Phosphorylierung von den beiden T-

Phosphorylierungen konnte jedoch nicht gezeigt werden. Diese Ergebnisse stehen möglicherweise im Widerspruch zu publizierten Daten, die gezeigt haben, dass die Phosphorylierung von zwei der genannten Stellen ausreicht um eine Aktivierung der MK2 zu erzielen [97], während man von unseren Daten ausgehend erwarten sollte, dass die S258-Phosphorylierung immer benötigt wird, um eine MK2-Aktivierung zu erzielen. Untersuchungen in wie weit die Phosphorylierbarkeit der einzelnen Phosphorylierungsstellen für eine Aktivierung von MK2 notwendig sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Vielmehr wurde, da gleichzeitig zur Phosphorylierung die SUMOylierung von GST-MK2 stimulationsabhängig erhöht wird, versucht zu klären, ob und in welcher Weise MK2-Phosphorylierung und -SUMOylierung zwei interagierende Prozesse sind. Durch die Inaktivierung der Phosphorylierungsstelle S258 (GST-MK2S258A) konnte eine geringe Reduktion der MK2-SUMOylierung sowie der T208- und T320-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Die Imitation dieser S258-Phosphorylierung (GST-MK2S258E) allein oder auch aller drei Phosphorylierungsstellen gleichzeitig (GST-MK2TST208/258/320E) reichten jedoch nicht aus, um die MK2-SUMOylierung in gleichem Maße wie durch die Koexpression der konstitutiv aktiven MEKK1 zu erhöhen. Dies deutet zwar auf eine mögliche Beteiligung der S258 an der MK2-SUMOylierung hin, zeigt aber auch die Notwendigkeit anderer durch MEKK1ca induzierter Faktoren für die MK2-SUMOylierung. Eine phosphorylierungsabhängige SUMOylierung wie sie bereits für andere Proteine beschrieben wurde [20], scheint für die MK2-SUMOylierung bezüglich der Phosphorylierungsstellen T208, S258 und T320 nicht vorzuliegen, jedoch könnte sich die Induktion struktureller Änderungen in MK2 auf die SUMOylierbarkeit von MK2 auswirken. Für die Charakterisierung der Funktion der MK2-SUMOylierung, kann die Identifizierung des Akzeptorlysins sehr hilfreich sein, da durch die Position des Akzeptorlysins innerhalb des Proteins mögliche Funktionen abgeleitet werden können. So wurden in dieser Arbeit zuerst durch Mutationsanalysen und später durch massenspektrometrische Analytik die Lysine K339, K359 und K360 als SUMOylierungsstellen für MK2 identifiziert. K339 und K359 sind jeweils Bestandteil des Konsensusmotives Ψ KxE/D. Die hydrophobe Aminosäure vor K339 ist Leucin (L) und das Motiv endet mit Asparaginsäure (D). Isoleucin (I) ist die hydrophobe Aminosäure vor K359, am Ende dieser Sequenz steht Glutaminsäure (E). K360 kann, obwohl es nicht Teil der eigentlichen Konsensussequenz ist, ebenfalls SUMOyliert werden. Die Positionen der SUMOylierungsstellen sind im C-terminalen Bereich der Maus (m)MK2-Sequenz, die in ihrer Gesamtlänge aus 386 Aminosäuren besteht. Die räumliche Nähe der SUMOylierungsstelle K339, die sich hinter der katalytischen Domäne, unmittelbar vor dem Kernexportsignal (NES AS M342-V351) befindet und der SUMOylierungsstellen K359/360, die Teil des Kernlokalisierungssignals (NLS AS K359-K375) (Abbildung 51A) sowie der überlappenden p38 α -Bindestelle (AS D352-A376) sind, könnte auf eine Beeinflussung dieser

Lokalisationssignale hindeuten. Hierbei gibt es mehrere Möglichkeiten bei denen die SUMOylierung eingreifen könnte um eine Wirkung zu erzielen. Denkbar wäre, dass die SUMOylierung an K359/360 die Interaktion zwischen p38 α und MK2 beeinflusst. Dabei könnte die MK2-SUMOylierung die Interaktion durch Maskieren der p38 α -Bindungsstelle verhindern oder möglicherweise den Komplex destabilisieren, so dass aktiviertes MK2 gelöst von p38 α den Kern verlassen kann (Abbildung 51B1). Tatsächlich gibt es vorläufige Daten (Jakobs und Niedenthal, nicht publiziert) die zeigen, dass eine p38 α -Überexpression die MK2-SUMOylierung scheinbar reduzieren kann. Für die Translokation verschiedener Substrate wie zum Beispiel RanGAP1 ist die Beteiligung der SUMOylierung sehr gut untersucht [168, 169]. Für MK2 ist auch vorstellbar, dass die SUMOylierung das NES abschwächt oder das NLS verstärkt und somit erreicht, dass eine Subpopulation von MK2, welche möglicherweise für die Beeinflussung von der Transkription nötig ist, im Kern bleibt (Abbildung 51B2). Eventuell ist die SUMOylierung direkt an der Kernpore notwendig um das NLS abzuschwächen bzw. das NES zu verstärken bzw. den Kernimport/-export zu ermöglichen (Abbildung 51B3). Die SUMOylierung könnte auch im Zytoplasma stattfinden und vielleicht das NLS maskieren, so dass MK2 vorerst im Zytoplasma bleibt (Abbildung 51B4).

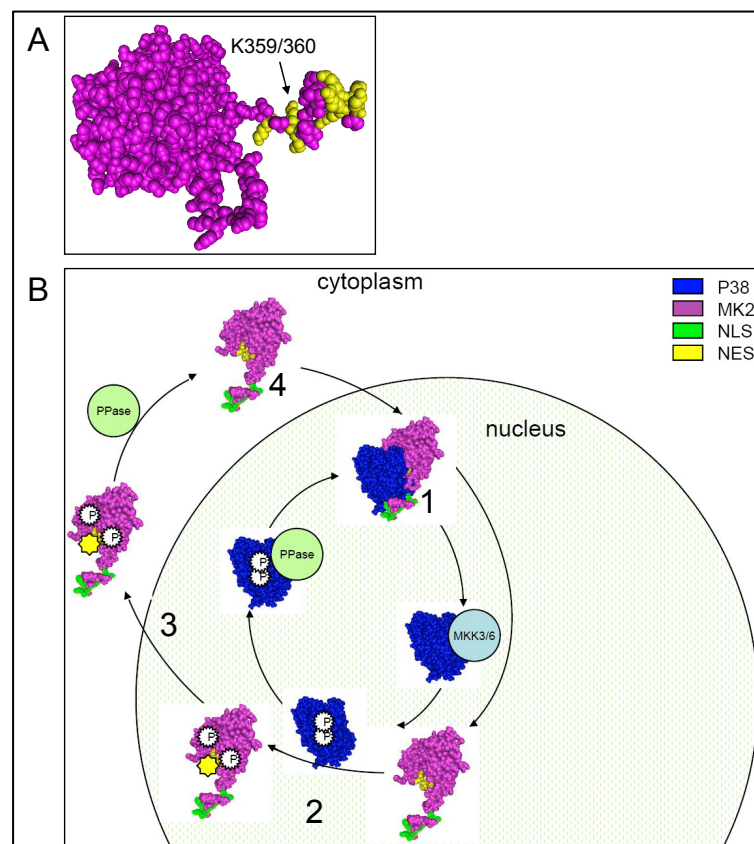


Abbildung 51: Modell der möglichen Wirkungsorte der MK2-SUMOylierung. MK2 (magenta) (A) gelb gekennzeichnete basische Aminosäuren innerhalb des NLS (AS K359-K375) (B) Wirkungsorte der MK2-SUMOylierung (1) Beeinflussung der p38 α /MK2-Interaktion, (2) Verstärkung NLS oder Inaktivierung NES, (3) Beteiligung am Kernexport oder (4) Maskierung des NLS. NES = Kernexportsignal, NLS = Kernlokalisierungssignal. Abbildung verändert nach Ronkina et al. 2008 [99]

Die verschiedenen Szenarien machen deutlich, dass es auf Grund der fehlenden Kenntnisse über den MK2-*in vivo*-SUMOylierungsort und der vorwiegenden Lokalisation von SUMOyliertem MK2, schwierig ist eine Aussage über eine mögliche Funktion der MK2-SUMOylierung zu treffen. Erste *in vivo* Untersuchungen haben in einer Western Blot-Analyse gezeigt, dass eine MK2-NES-Mutante stärker SUMOyliert wird als die MK2, die durch ein funktionelles NES aus dem Kern transportiert werden kann. Eine Möglichkeit für diese erhöhte SUMOylierung könnte sein, dass MK2 bei dem Transport aus dem Kern oder im Zytoplasma deSUMOyliert wird. Des Weiteren wurden mikroskopische Analysen durch die Expression von EGFP-MK2 bezüglich der Lokalisationsänderung durch MK2-SUMOylierung durchgeführt, lieferten jedoch keine eindeutigen Ergebnisse. Hier sind detaillierte Studien nötig, wie die Nutzung einer der identifizierten SUMOylierungsstellen die MK2-Lokalisierung und/oder den Transport beeinflusst. Fakt ist jedoch, dass die Position der SUMOylierungsstellen auf eine eventuelle Beteiligung der SUMOylierung an der Regulation der MK2-Lokalisation/-Transport oder der Beeinflussung des p38 α /MK2-Komplexes hindeutet. Zur weiteren Charakterisierung der Funktion der MK2-SUMOylierung wurden in dieser Arbeit weiterhin MEF MK2/3^{-/-}-Zellen zum einen mit dem mMK2-WT und zum anderen mit der Mutante mMK2K339/359/360R komplementiert. Hierbei war auffällig, dass das MK2-Protein der Mutante immer schwächer exprimiert war, als das des WT-MK2-Proteins. Dies könnte darauf hindeuten, dass die MK2-SUMOylierung eine Funktion in der Erhöhung der Proteinstabilität hat, wie dies für viele andere Proteine wie z.B. Smad4 beschrieben ist [170]. Allerdings scheint für eine Stabilisierung der MK2 die MK2-SUMOylierungsstärke zu gering zu sein. So konnten wir zwar die SUMOylierung von GST-MK2 in HEK293-Zellen durch das endogene SUMOylierungssystem zeigen, jedoch nicht die endogene SUMOylierung des endogenen MK2s. Weitere Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien wurden nicht festgestellt. Beide exprimieren gleiche Mengen an p38 α und die p38 α -Phosphorylierung konnte durch UV-Bestrahlung oder Induktion mit Anisomycin in gleichem Maße erreicht werden. Da die Rolle der MAPKinase p38 α bei der Regulation stressinduzierter Genexpression bekannter *Immediate early genes* (IEGs) seit langer Zeit bekannt ist [137-140], und kürzlich die Beteiligung der MK2 an der stressinduzierten Genexpression der IEGs gezeigt wurde (Manoj, nicht publiziert) wurde im Rahmen dieser Arbeit in einer real-time-PCR untersucht, ob die MK2-SUMOylierung in die Regulation der Transkription der IEGs Fos, Jun, Egr-1 und Ttp involviert ist. Der Verlust der MK2-SUMOylierungsstellen K339/359/360 bewirkt im Vergleich zum MK2-WT nach 60min Anisomycinstimulation eine minimal stärkere Erhöhung der Expression dieser Gene, die jedoch nach 90min wesentlich geringer als die des MK2-WT ist. Die fehlende SUMOylierung von MK2 scheint somit zu einer Reduktion der jeweiligen mRNA zu führen. Möglicherweise ist die SUMOylierung notwendig, um die Signalwirkung von MK2 aufrecht zu erhalten. Zu berücksichtigen ist auch,

dass Anisomycin in der verwendeten Konzentration (10µg/ml) nicht nur aktivierend auf die MAP Kinase p38α wirkt, sondern auch die Proteinsynthese inhibiert. Die fehlende SUMOylierung könnte, wie oben diskutiert, möglicherweise eine destabilisierende Wirkung auf MK2 selbst haben, so dass MK2K339/359/360R schneller abgebaut wird und die Wirkung auf die Transkription schneller nachlässt. Die Analyse der MK2-SUMOylierung konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeschlossen werden, hat aber eine Reihe von Hinweisen erbracht, wie die SUMOylierung möglicherweise in die Funktionen der MK2 involviert ist.

Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg, R	Arginin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosindinukleotidtriphosphat
Bp	Basenpaare
ca	<i>constitutiv activ</i>
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EB	Elution Buffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ERK	<i>Extrazellular signal-regulated kinase</i>
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fötale Kälberserum
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	<i>Lurea Bertani</i>
Lys, K	Lysin
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase</i>
MAPKK	<i>Mitogen-activated protein kinase-kinase</i>
MAPKKK	<i>Mitogen-activated protein kinase-kinase-kinase</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MK2	MAPKAP Kinase 2
MK3	MAPKAP Kinase 3
NES	<i>Nuclear export signal</i>
NLS	<i>Nuclear localisation signal</i>
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser, S	Serin

STAT1	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitinlike Modifier</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'Tetramethylethylendiamin
Thr, T	Threonin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tyr, Y	Tyrosin
U	Unit
Ub	Ubiquitin
ÜN	Über Nacht
UFDS	<i>Ubc9 fusion-directed SUMOylation</i>
USDDS	<i>Ubc9/substrate dimerization-dependent SUMOylation</i>
UV	Ultraviolett
WB	Western Blot

Anhang

Tabelle 4: Genbeschreibung der 23 im Microarray identifizierten Gene.

Genname	Beschreibung
5430401H09Rik	Mus musculus 6 days neonate head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:5430401H09 product:unclassifiable, full insert sequence [AK017255]
8430417A20Rik	Mus musculus 7 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A730049H05 product:hypothetical protein, full insert sequence. [AK043032]
A930004K21Rik	Mus musculus adult male thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:5830442F04 product:hypothetical Translation initiation factor SU11/Band 4.1 family containing protein, full insert sequence. [AK030883]
AK048907	Mus musculus 0 day neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C230080H17 product:unclassifiable, full insert sequence. [AK048907]
AK050947	Mus musculus 9 days embryo whole body cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D030042L12 product:unclassifiable, full insert sequence. [AK050947]
AK149472	Mus musculus lung RCB-0558 LLC cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:G730026I11 product:unclassifiable, full insert sequence [AK144717]
Akap6	Mus musculus A kinase (PRKA) anchor protein 6 (Akap6), mRNA [NM_198111]
Anxa10	Mus musculus annexin A10 (Anxa10), mRNA [NM_011922]
BC049816	Mus musculus cDNA sequence BC049816 (BC049816), mRNA [NM_198612]
Car3	Mus musculus carbonic anhydrase 3 (Car3), mRNA [NM_007606]
Ccdc19	Mus musculus adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:1700028D05 product:nasopharyngeal epithelium specific protein 1, full insert sequence. [AK006449]
Cdh11	Mus musculus cadherin 11 (Cdh11), mRNA [NM_009866]
Cdh13	Mus musculus cadherin 13 (Cdh13), mRNA [NM_019707]
Cish	Mus musculus cytokine inducible SH2-containing protein (Cish), mRNA [NM_009895]
Cxcl5	Mus musculus chemokine (C-X-C motif) ligand 5 (Cxcl5), mRNA [NM_009141]
E330013P04Rik	Mus musculus cDNA clone IMAGE:30626608. [BC076607]
Elavl2	Mus musculus ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 2 (Hu antigen B) (Elavl2), transcript variant 1, mRNA [NM_207685]
ENSMUST0000073378	Mus musculus activated spleen cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:F830110B15 product:Putative G-protein coupled receptor homolog [Mus musculus domesticus], full insert sequence [AK156961]
Fmod	Mus musculus fibromodulin (Fmod), mRNA [NM_021355]
Gria4	Mus musculus glutamate receptor, ionotropic, AMPA4 (alpha 4) (Gria4), mRNA [NM_019691]
Igsf10	PREDICTED: Mus musculus immunoglobulin superfamily, member 10, transcript variant 2 (Igsf10), mRNA [XM_887155]
Kcna1	Mus musculus potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 1 (Kcna1), mRNA [NM_010595]
Kif1a	Mus musculus mRNA for mKIAA4102 protein [AK220487]
Lman1l	Mus musculus lectin, mannose-binding 1 like (Lman1l), mRNA [NM_199222]
Mmp3	Mus musculus matrix metalloproteinase 3 (Mmp3), mRNA [NM_010809]
Pitx2	Mus musculus paired-like homeodomain transcription factor 2 (Pitx2), transcript variant 2, mRNA [NM_011098]
S100a15	Mus musculus S100 calcium binding protein A7A (S100a7a), mRNA [NM_199422]
Slc5a7	Mus musculus solute carrier family 5 (choline transporter), member 7 (Slc5a7), mRNA [NM_022025]
Stmn2	Mus musculus stathmin-like 2 (Stmn2), mRNA [NM_025285]
Syt13	Mus musculus synaptotagmin XIII (Syt13), mRNA [NM_030725]
TC1481003	CBF5_YEAST (P33322) H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4 (Centromere/microtubule-binding protein CBF5) (Centromere-binding factor 5) (Small nucleolar RNP protein CBF5) (H/ACA snoRNP protein CBF5) (p64'), partial (7%) [TC1651824]
Tgtp	Mus musculus T-cell specific GTPase (Tgtp), mRNA [NM_011579]

Tabelle 5: Für die Arbeit klonierte Konstrukte.

Plasmidname	Vektor (Spaltung mit)	Insert	Vervielfältigung Insert	Verwendete Primer 5'-xxx-3'
Ubc9-FKBP	pNU (EcoRI/XbaI)	FKBP	PCR auf pC4EN-F1E	GCG CGA ATT CTC CAG AGG AGT GCA GGT GGA AAC CAT C GCG CTC TAG ATT AAC TAG TTT CCA GTT TTA GAA GCT C
FKBP-Ubc9	pCU (BamHI/EcoRI)	FKBP	PCR auf pC4EN-F1E	GCG CGG ATC CGT TAT GTC CAG AGG AGT GCA GGT GGA AAC CAT C GCG CGA ATT CAA CTA GTT TCC AGT TTT AGA AGC TC
Ubc9-FRB	pNU (EcoRI/XbaI)	FRB	PCR auf pC4RHE	GCG CGA ATT CTC CAG AAT CCT CTG GCA TGA GAT GTG G GCG CTC TAG ATT AAC TAG TCT TTG AGA TTC GTC GGA ACA CAT GAT A
FRB-Ubc9	pCU (BamHI/EcoRI)	FRB	PCR auf pC4RHE	GCG CGG ATC CGT TAT GGC TTC CAG AAT CCT CTG GCA TGA GAT GTG G GCG CGA ATT CAC TAG TCT TTG AGA TTC GTC GGA ACA CAT GAT A
STAT1-FKBP	Ubc9-FKBP (BamHI/EcoRI)	STAT1	STAT1-Ubc9 (BamHI/EcoRI)	
STAT1-FRB	Ubc9-FRB (BamHI/EcoRI)	STAT1	STAT1-Ubc9 (BamHI/EcoRI)	
p53-FKBP	Ubc9-FKBP (BamHI/EcoRI)	p53	p53-Ubc9 (BamHI/EcoRI)	
p53-FRB	Ubc9-FRB (BamHI/EcoRI)	p53	p53-Ubc9 (BamHI/EcoRI)	
Stat1K703R-FRB	Ubc9-FRB (BamHI/EcoRI)	STAT1K703	STAT1K703-Ubc9 (BamHI/EcoRI)	
p53K386R-FRB	Ubc9-FRB (BamHI/EcoRI)	p53K386R	p53K386-Ubc9 (BamHI/EcoRI)	
Ubc9-STAT3	pNU	STAT3	LR-Reaktion (Gateway)	
Ubc9-STAT4	pNU	STAT4	LR-Reaktion (Gateway)	
Ubc9-STAT5a	pNU	STAT5a	LR-Reaktion (Gateway)	
Ubc9-STAT3K707R			Mutagenese auf Ubc9-STAT3	TGCCCCATACCTGAGGCCAAGTTTATC GATAAACCCTGGTCTCAGGTATGGGGCA
Ubc9-STAT4K691R			Mutagenese auf Ubc9-STAT4	AGAAAGGGTGACAGAGGTTATGTTCTT AGGAACATAACCCTGTCACCCCTTCT
Ubc9-STAT5aK696R			Mutagenese auf Ubc9-STAT5a	GATGGATGTGAGACCACAGATCAAG CTTGATCTGTGCTCACATATCCATC
pcDNA3-FKBP	pcDNA3 (HindIII/EcoRV)	FKBP	PCR auf pC4EN-F1E	GCGAAGCTTGTATGTCGAGAGGAGTGCAGGTGGAACCATC GCGGATATCAACTAGTTTCCAGTTTGAAGCTC
pcDNA3-FKBP	pcDNA3 (EcoRV/XhoI)	FKBP	PCR auf pC4EN-F1E	GCGGATATCCAGAGGAGTGCAGGTGGAACCATC GCGCTCGAGTTAACTAGTTCCAGTTTGAAGCTC
pcDNA3-FRB	pcDNA3 (HindIII/EcoRV)	FRB	PCR auf pC4RHE	GCGAAGCTTGTATGTCGAGAGGAGTGCAGGTGGAACCATC GCGGATATCAACTAGTTTCCAGTTTGAAGCTC
pcDNA3-FRB	pcDNA3 (EcoRV/XhoI)	FRB	PCR auf pC4RHE	GCGGATATCCAGAGGAGTGCAGGTGGAACCATC GCGCTCGAGTTAACTAGTTCCAGTTTGAAGCTC
STAT3-FKBP	pcDNA3-FKBP (HindIII/EcoRV)	STAT3	PCR auf Ubc9-STAT3	GCGGATATCCAGAGGAGTGCAGGTGGAACCATC GCGCTCGAGTTAACTAGTTCCAGTTTGAAGCTC
STAT3aK707R-FKBP	pcDNA3-FKBP (HindIII/EcoRV)	STAT3K703	PCR auf Ubc9-STAT3K703	GCGGATATCCAGAGGAGTGCAGGTGGAACCATC GCGCTCGAGTTAACTAGTTCCAGTTTGAAGCTC
STAT4-FKBP	pcDNA3-FKBP (BamHI/EcoRV)	STAT4	PCR auf Ubc9-STAT4	GCGGATATCCAGAGGAGTGCAGGTGGAACCATC GCGCTCGAGTTAACTAGTTCCAGTTTGAAGCTC
STAT4K691R-FKBP	pcDNA3-FKBP (BamHI/EcoRV)	STAT4K691R	PCR auf Ubc9-4K691R	GCGGATATCCAGAGGAGTGCAGGTGGAACCATC GCGCTCGAGTTAACTAGTTCCAGTTTGAAGCTC
STAT5a-FKBP	pcDNA3-FKBP (HindIII/EcoRV)	STAT5a	PCR auf Ubc9-STAT5a	GCGGATATCCAGAGGAGTGCAGGTGGAACCATC GCGCTCGAGTTAACTAGTTCCAGTTTGAAGCTC
STAT5aK696R-FKBP	pcDNA3-FKBP (HindIII/EcoRV)	STAT5aK696R	PCR auf Ubc9-STAT5aK696R	GCGGATATCCAGAGGAGTGCAGGTGGAACCATC GCGCTCGAGTTAACTAGTTCCAGTTTGAAGCTC

Tabelle 6: Für die Arbeit klonierte Konstrukte.

Plasmidname	Vektor (Spaltung mit)	Insert	Vervielfältigung Insert	Verwendete Primer 5'-xxx-3'
GST-STAT3	pDest27	STAT3	LR-Reaktion (Gateway)	
GST-STAT4	pDest27	STAT4	LR-Reaktion (Gateway)	
GST-STAT5a	pDest27	STAT5a	LR-Reaktion (Gateway)	
GST-STAT1-Ubc9	pDest27	STAT1-Ubc9	LR-Reaktion (Gateway)	
Strep-Ubc9-STAT3	pEXPR-IBA105 (Ehel)	Ubc9-STAT3	PCR auf Ubc9-STAT3	GCCTGGGGATCGCCCTCAGCCGCCCTTG GCCTCACATGGGGAGGTAGCCACATCCGGAG
Strep-Ubc9-STAT4	pEXPR-IBA105 (Ehel)	Ubc9-STAT4	PCR auf Ubc9-STAT4	GCCTGGGGATCGCCCTCAGCCGCCCTTG GCCTCATTCAGCAGAATAAGGAGACTTCATTGC
hSTAT5a-IRES2-EGFP	pIRES2-EGFP (BgIII/Sall)	STAT5a	PCR auf STAT5a-FKBP	CCCTCAGATCTGCCACCATGGCCGGCTGGATCCAGGCCGAG CCCTGTCGACTCATGAGAGGGAGCCCTCTGGAGAG
hSTAT5aK696A-IRES2-EGFP	pIRES2-EGFP (BgIII/Sall)	STAT5aK696R	PCR auf STAT5aK696R-FKBP	CCCTCAGATCTGCCACCATGGCCGGCTGGATCCAGGCCGAG CCCTGTCGACTCATGAGAGGGAGCCCTCTGGAGAG
Stat5a-IRES EGFP	pMSCV/hygro (BgIII/XhoI)	Stat5a-IRES EGFP	PCR auf hSTAT5a-IRES2-EGFP	CCCTCAGATCTGCCACCATGGCCGGCTGGATCCAGGCCGAG CCCTCTCGAGTTACTTGTACAGCTGCTCCATGC
Stat5aK696R-IRES EGFP	pMSCV/hygro (BgIII/XhoI)	Stat5aK696R-IRES EGFP	PCR auf hSTAT5aK696A-IRES2-EGFP	CCCTCAGATCTGCCACCATGGCCGGCTGGATCCAGGCCGAG CCCTCTCGAGTTACTTGTACAGCTGCTCCATGC
GST-MK2	pDest27	mMK2	LR-Reaktion (Gateway)	
pENTR/D-MK2	pENTR/D	mMK2	BP-Reaktion (Gateway)	
MK2-Ubc9	pCU (BamHI)	mMK2	PCR auf pENTR/D-MK2	CCCTGGATCCGGTTATGCTGTCGGGGCTCTCCGGGCCA CGCGTGGATCCCGCTGGGGAGAGCCGCA
GST-MK2T208E	pDest27		Mutagenese auf GST-MK2	AGTCACAACCTTTGACCCGACCGTGTATACACCA TGGTGATATAACACGGCTCGTCAAAGTTGTGACT
GST-MK2S258E	pDest27		Mutagenese auf GST-MK2	CAGGGCTTGCCATCGAGCCGGCCATGAAGACT AGTCTTCATGCCGGCTCGATGGCAAGGCCGTG
GST-MK2T320E	pDest27		Mutagenese auf GST-MK2	ACGAAAGTCCCTCAGGAGCCACTGCACACCAGC GCTGGTGTGCAGTGGCTCCTGAGGGACCTTCGT
GST-MK2TS208/258E	pDest27		Mutagenese auf GST-MK2T208E	CAGGGCTTGCCATCGAGCCGGCCATGAAGACT AGTCTTCATGCCGGCTCGATGGCAAGGCCGTG
GST-MK2S258/320E	pDest27		Mutagenese auf GST-MK2T320E	CAGGGCTTGCCATCGAGCCGGCCATGAAGACT AGTCTTCATGCCGGCTCGATGGCAAGGCCGTG
GST-MK2T208/320E	pDest27		Mutagenese auf GST-MK2T320E	AGTCACAACCTTTGACCCGACCGTGTATACACCA TGGTGATATAACACGGCTCGTCAAAGTTGTGACT
GST-MK2TST208/258/320E	pDest27		Mutagenese auf GST-MK2ST258/320E	AGTCACAACCTTTGACCCGACCGTGTATACACCA TGGTGATATAACACGGCTCGTCAAAGTTGTGACT
GST-MK2K154A	pDest27		Mutagenese auf GST-MK2	GTCAGAGATCATGCCAGCATCGGGGAGGG GCCTCGCCGATGCTGGCCATGATCTCTGAC
MK2K174R	pENTR/D		Mutagenese auf pENTR/D-MK2	CTCACCCGGGATGTCAGGGCCCTGAGAACCCTCTT AAGAAGTTCTCAGGCCTGACATCCCGGTTGAG
GST-MK2K174R	pDest27	mMK2K174R	LR-Reaktion (Gateway)	
GST-MK2K174A	pDest27		Mutagenese auf GST-MK2	CACCCGGATGTCGGCCCTGAGAACCTCTTA TAAGAGGTTCTCAGCCGCGACATCCCGGTTG
GST-MK2K183A	pDest27		Mutagenese auf GST-MK2	CTCTTATATACTCCGCCAGGCCCAATGCC GGCATGGCCCTGGCGAAGTATATAAGAG

Tabelle 7: Für die Arbeit klonierte Konstrukte.

Plasmidname	Vektor (Spaltung mit)	Insert	Vervielfältigung Insert	Verwendete Primer 5'-xxx-3'
GST-MK2K228A	pDest127		Mutagenese auf GST-MK2	GGAGAAGTATGACGCCCTCCTGTGACATGTGG CCACATGTCACAGGAGCGTACATCTCTCC
GST-MK2K262A	pDest127		Mutagenese auf GST-MK2	CTCTCCGGGCAATGGCCACTCGTATTGGAATGG CCATTCCGAATACGAGTGGCCATGCCCGGAGAG
GST-MK2K285A	pDest127		Mutagenese auf GST-MK2	GATTCAGAAGAAGTGGCCATGCTTATCCGGAATC GATTCGGGATAAGCATGGCCACTTCTTCTGATAC
GST-MK2K239R	pDest127		Mutagenese auf GST-MK2	CGGAACTGCTTCGAACAGAGACCCACCCAG CTGGTGGGCTCTGTTTCGAAGCAGATTCCG
GST-MK2K239A	pDest127		Mutagenese auf GST-MK2	CGG AAT CTG CTA GCT ACA GAG CCC ACC CAG CTG GGT GGG CTC TGT AGC TAG CAG ATT CCG
GST-MK2K239M	pDest127		Mutagenese auf GST-MK2	CGG AAT CTG CTA ATG ACA GAG CCC ACC CAG CTG GGT GGG CTC TGT CAT TAG CAG ATT CCG
GST-MK2K329R	pDest127		Mutagenese auf GST-MK2	CCA GCC GTG TCC TGC GCG AGG ACA AGG AAC G CGT TCC TTG TCC TCG CGC AGG ACA CGG CTG G
GST-MK2K332R	pDest127		Mutagenese auf GST-MK2	CTGAAGGAGGACCCGCGAACGATGGGAG CTCCCATCGTTCGGGGTCTCTCCCTTCAG
GST-MK2K339R	pDest127		Mutagenese auf GST-MK2	CGA TGG GAG GAT GTT CGC GAG GAG ATG ACC AG CTG GTC ATC TCC TCG CGA ACA TCC TCC CAT CG
GST-MK2K359/360R	pDest127		Mutagenese auf GST-MK2	CTATGAGCAGATCAAGATTCCGAAGGATAGAAGCGC GGATGCGTCTTCTATCCTTCGAATCTTGATCTGCTC
MK2K359/360R	pDONR201	ImMK2K359/360R	BP-Reaktion (Gateway)	
MK2K359/360R	pENTR/D	ImMK2K359/360R	LR-Reaktion (Gateway)	
GST-MK2K359/360A	pDest127		Mutagenese auf GST-MK2	CAGATCAAGATAGCGGCCCATAGAGACGCA TGGCTCTATGGCCGCTATCTTGTATCTG
GST-MK2K371R	pDest127		Mutagenese auf GST-MK2	CCTGTGCTTCAGAAAGCGGAAAGAAAGCT AGCTTCTTCCGCCCTCTGAGAAGCAGAGG
GST-MK2K374/375R	pDest127		Mutagenese auf GST-MK2	CTCAAGAGGCGGCGCAGGGCTCGTGTGTG CACAGCACAGCCCTGGCCGCCCTCTTGAG
GST-MK2K174/359/360R	pDest127		Mutagenese auf GST-MK2K174R	CTATGAGCAGATCAAGATTCCGAAGGATAGAAGCGC CGA TGG GAG GAT GTT CGC GAG GAG ATG ACC AG
MK2K339/359/360R	pENTR/D		Mutagenese auf MK2K359/360R	CTG GTC ATC TCC TCG CGA ACA TCC TCC CAT CG
GST-MK2K339/359/360R	pDest127	ImMK2K339/359/360R	LR-Reaktion (Gateway)	
MK2-IRE2S-EGFP	pIRES2-EGFP (XhoI/BamHI)		PCR auf GST-MK2	CCTCTCGAGCCACCATGCTGTCTGGGCTCTCCGGCCAG CCTCGGATCCTCAGTGGGCGGAGAGCCGCATCC
MK2K339/359/360R-IRE2S-EGFP	pIRES2-EGFP (XhoI/BamHI)		PCR auf GST-MK2K339/359/360R	CCTCTCGAGCCACCATGCTGTCTGGGCTCTCCGGCCAG CCTCGGATCCTCAGTGGGCGGAGAGCCGCATCC
SUMO3Q89P	pcDNA3 (BamHI/XhoI)		PCR auf SUMO3	CCTCGGATCCGCGCCACATGTCGAGGAGAGCCCAAGG CCTCTCGAGCTAACCTCCCGTTGGCTGTGGAACAC
SUMO3Q87/89RP	pcDNA3		Mutagenese auf pcDNA3-SUMO3Q89P	AGACAGCCAACGGGAGGTTAGCTCGAG GAACAGTCGATGGTGTCTCTCGTC
Strep-SUMO3Q189/90PR	pEXPR-IBA105 (EheI/XhoI)	SUMO3Q189/90PR	Mutagenese auf SUMO3Q89P	GGCTCCGAGGAGAAAGCCCAAGGAG CCTCTCGAGCTAACCTCCCGTTGGCTGTGGAACAC
EGFP-SUMO1	pEGFP-C1 (BglIII/SalI)	SUMO1 (BamHI/XhoI)	Mutagenese auf SUMO1	GGATCCCAATGCTGACAGGCAAAAC C CTC GAG AGA ACT GTT GAA TGA CCC CCC GTT

Literaturverzeichnis

1. Dohmen, R.J., *SUMO protein modification*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1695**(1-3): p. 113-31.
2. Muller, S., et al., *SUMO, ubiquitin's mysterious cousin*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(3): p. 202-10.
3. Hunter, T., *The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond*. Mol Cell, 2007. **28**(5): p. 730-8.
4. Bhaumik, S.R., E. Smith, and A. Shilatifard, *Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(11): p. 1008-16.
5. Latham, J.A. and S.Y. Dent, *Cross-regulation of histone modifications*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(11): p. 1017-1024.
6. Taverna, S.D., et al., *Long-distance combinatorial linkage between methylation and acetylation on histone H3 N termini*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(7): p. 2086-91.
7. Sun, Z.W. and C.D. Allis, *Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast*. Nature, 2002. **418**(6893): p. 104-8.
8. Schwartz, D.C. and M. Hochstrasser, *A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(6): p. 321-8.
9. Wang, C., et al., *TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK*. Nature, 2001. **412**(6844): p. 346-51.
10. Hoege, C., et al., *RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO*. Nature, 2002. **419**(6903): p. 135-41.
11. Johnson, E.S., *Protein modification by SUMO*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 355-82.
12. Guo, D., et al., *A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes*. Nat Genet, 2004. **36**(8): p. 837-41.
13. Meulmeester, E. and F. Melchior, *Cell biology: SUMO*. Nature, 2008. **452**(7188): p. 709-11.
14. Hay, R.T., *SUMO-specific proteases: a twist in the tail*. Trends Cell Biol, 2007. **17**(8): p. 370-6.
15. Mukhopadhyay, D. and M. Dasso, *Modification in reverse: the SUMO proteases*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(6): p. 286-95.
16. Li, S.J. and M. Hochstrasser, *A new protease required for cell-cycle progression in yeast*. Nature, 1999. **398**(6724): p. 246-51.
17. Li, S.J. and M. Hochstrasser, *The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(7): p. 2367-77.
18. Verger, A., J. Perdomo, and M. Crossley, *Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation*. EMBO Rep, 2003. **4**(2): p. 137-42.
19. Melchior, F., M. Schergaut, and A. Pichler, *SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(11): p. 612-8.
20. Hietakangas, V., et al., *PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(1): p. 45-50.
21. Yang, S.H., et al., *An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO*. Embo J, 2006. **25**(21): p. 5083-93.
22. Kagey, M.H., et al., *Multiple activities contribute to Pc2 E3 function*. Embo J, 2005. **24**(1): p. 108-19.
23. Di Bacco, A., et al., *The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(12): p. 4489-98.
24. Nishida, T., H. Tanaka, and H. Yasuda, *A novel mammalian Smt3-specific isopeptidase 1 (SMT3IP1) localized in the nucleolus at interphase*. Eur J Biochem, 2000. **267**(21): p. 6423-7.
25. Zhang, H., H. Saitoh, and M.J. Matunis, *Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(18): p. 6498-508.
26. Hang, J. and M. Dasso, *Association of the human SUMO-1 protease SENP2 with the nuclear pore*. J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19961-6.
27. Mukhopadhyay, D., et al., *SUSP1 antagonizes formation of highly SUMO2/3-conjugated species*. J Cell Biol, 2006. **174**(7): p. 939-49.
28. Gong, L., et al., *Differential regulation of sumoylated proteins by a novel sumoylation-specific protease*. J Biol Chem, 2000. **275**(5): p. 3355-9.
29. Bailey, D. and P. O'Hare, *Characterization of the localization and proteolytic activity of the SUMO-specific protease, SENP1*. J Biol Chem, 2004. **279**(1): p. 692-703.
30. Kim, K.I., et al., *A new SUMO-1-specific protease, SUSP1, that is highly expressed in reproductive organs*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14102-6.
31. Ubersax, J.A. and J.E. Ferrell, Jr., *Mechanisms of specificity in protein phosphorylation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 530-41.

32. Turk, B.E., *Understanding and exploiting substrate recognition by protein kinases*. Curr Opin Chem Biol, 2008. **12**(1): p. 4-10.
33. Diella, F., et al., *Phospho.ELM: a database of phosphorylation sites--update 2008*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D240-4.
34. Seet, B.T., et al., *Reading protein modifications with interaction domains*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(7): p. 473-83.
35. Manning, G., et al., *The protein kinase complement of the human genome*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1912-34.
36. Hornbeck, P.V., et al., *PhosphoSite: A bioinformatics resource dedicated to physiological protein phosphorylation*. Proteomics, 2004. **4**(6): p. 1551-61.
37. Bradshaw, J.M. and G. Waksman, *Molecular recognition by SH2 domains*. Adv Protein Chem, 2002. **61**: p. 161-210.
38. Heldin, C.H., A. Ostman, and L. Ronnstrand, *Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1378**(1): p. F79-113.
39. Hunter, T., *Signaling--2000 and beyond*. Cell, 2000. **100**(1): p. 113-27.
40. Schulze, W.X., L. Deng, and M. Mann, *Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family*. Mol Syst Biol, 2005. **1**: p. 2005 0008.
41. Sicheri, F., I. Moarefi, and J. Kuriyan, *Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck*. Nature, 1997. **385**(6617): p. 602-9.
42. Yaffe, M.B. and A.E. Elia, *Phosphoserine/threonine-binding domains*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(2): p. 131-8.
43. Darnell, J.E., Jr., I.M. Kerr, and G.R. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. Science, 1994. **264**(5164): p. 1415-21.
44. Schindler, C. and I. Strehlow, *Cytokines and STAT signaling*. Adv Pharmacol, 2000. **47**: p. 113-74.
45. Leonard, W.J. and J.J. O'Shea, *Jaks and STATs: biological implications*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 293-322.
46. Levy, D.E. and J.E. Darnell, Jr., *Stats: transcriptional control and biological impact*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(9): p. 651-62.
47. Remy, I., I.A. Wilson, and S.W. Michnick, *Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change*. Science, 1999. **283**(5404): p. 990-3.
48. Vinkemeier, U., et al., *Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4*. Science, 1998. **279**(5353): p. 1048-52.
49. Schindler, U., et al., *Components of a Stat recognition code: evidence for two layers of molecular selectivity*. Immunity, 1995. **2**(6): p. 689-97.
50. Horvath, C.M., Z. Wen, and J.E. Darnell, Jr., *A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain*. Genes Dev, 1995. **9**(8): p. 984-94.
51. Ma, J. and X. Cao, *Regulation of Stat3 nuclear import by importin alpha5 and importin alpha7 via two different functional sequence elements*. Cell Signal, 2006. **18**(8): p. 1117-26.
52. Yang, E., et al., *The linker domain of Stat1 is required for gamma interferon-driven transcription*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(7): p. 5106-12.
53. Lufe, C., et al., *GRIM-19, a death-regulatory gene product, suppresses Stat3 activity via functional interaction*. Embo J, 2003. **22**(6): p. 1325-35.
54. Gupta, S., et al., *The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN-alpha signals*. Embo J, 1996. **15**(5): p. 1075-84.
55. Darnell, J.E., Jr., *STATs and gene regulation*. Science, 1997. **277**(5332): p. 1630-5.
56. Schindler, C., et al., *Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor*. Science, 1992. **257**(5071): p. 809-13.
57. Decker, T. and P. Kovarik, *Serine phosphorylation of STATs*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2628-37.
58. Zhang, J.J., et al., *Ser727-dependent recruitment of MCM5 by Stat1alpha in IFN-gamma-induced transcriptional activation*. Embo J, 1998. **17**(23): p. 6963-71.
59. Ouchi, T., et al., *Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN-gamma target genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5208-13.
60. Lim, C.P. and X. Cao, *Structure, function, and regulation of STAT proteins*. Mol Biosyst, 2006. **2**(11): p. 536-50.
61. Wen, Z., Z. Zhong, and J.E. Darnell, Jr., *Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation*. Cell, 1995. **82**(2): p. 241-50.

62. Zhang, X., et al., *Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes*. Science, 1995. **267**(5206): p. 1990-4.
63. Kovarik, P., et al., *Specificity of signaling by STAT1 depends on SH2 and C-terminal domains that regulate Ser727 phosphorylation, differentially affecting specific target gene expression*. Embo J, 2001. **20**(1-2): p. 91-100.
64. Visconti, R., et al., *Importance of the MKK6/p38 pathway for interleukin-12-induced STAT4 serine phosphorylation and transcriptional activity*. Blood, 2000. **96**(5): p. 1844-52.
65. Yamashita, H., et al., *Differential control of the phosphorylation state of proline-juxtaposed serine residues Ser725 of Stat5a and Ser730 of Stat5b in prolactin-sensitive cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30218-24.
66. Beuvink, I., et al., *Stat5a serine phosphorylation. Serine 779 is constitutively phosphorylated in the mammary gland, and serine 725 phosphorylation influences prolactin-stimulated in vitro DNA binding activity*. J Biol Chem, 2000. **275**(14): p. 10247-55.
67. Dittrich, E., et al., *A di-leucine motif and an upstream serine in the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 mediate ligand-induced endocytosis and down-regulation of the IL-6 receptor*. J Biol Chem, 1996. **271**(10): p. 5487-94.
68. Yu, C.L. and S.J. Burakoff, *Involvement of proteasomes in regulating Jak-STAT pathways upon interleukin-2 stimulation*. J Biol Chem, 1997. **272**(22): p. 14017-20.
69. Callus, B.A. and B. Mathey-Prevot, *Hydrophobic residues Phe751 and Leu753 are essential for STAT5 transcriptional activity*. J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 16954-62.
70. Wang, D., et al., *A small amphipathic alpha-helical region is required for transcriptional activities and proteasome-dependent turnover of the tyrosine-phosphorylated Stat5*. Embo J, 2000. **19**(3): p. 392-9.
71. Ohtani, T., et al., *Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3- and SHP2-mediated signals in immune responses*. Immunity, 2000. **12**(1): p. 95-105.
72. Irie-Sasaki, J., et al., *CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 349-54.
73. Liao, J., Y. Fu, and K. Shuai, *Distinct roles of the NH2- and COOH-terminal domains of the protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 (PIAS1) in cytokine-induced PIAS1-Stat1 interaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5267-72.
74. Chung, C.D., et al., *Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3*. Science, 1997. **278**(5344): p. 1803-5.
75. Kondoh, K., S. Torii, and E. Nishida, *Control of MAP kinase signaling to the nucleus*. Chromosoma, 2005. **114**(2): p. 86-91.
76. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation*. Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 807-69.
77. Widmann, C., et al., *Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human*. Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 143-80.
78. Johnson, G.L. and R. Lapadat, *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1911-2.
79. Katsoulidis, E., et al., *The p38 mitogen-activated protein kinase pathway in interferon signal transduction*. J Interferon Cytokine Res, 2005. **25**(12): p. 749-56.
80. Zarubin, T. and J. Han, *Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway*. Cell Res, 2005. **15**(1): p. 11-8.
81. Roux, P.P. and J. Blenis, *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(2): p. 320-44.
82. Rouse, J., et al., *A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins*. Cell, 1994. **78**(6): p. 1027-37.
83. Ludwig, S., et al., *3pK, a novel mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase, is targeted by three MAP kinase pathways*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(12): p. 6687-97.
84. Fukunaga, R. and T. Hunter, *MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates*. Embo J, 1997. **16**(8): p. 1921-33.
85. Deak, M., et al., *Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB*. Embo J, 1998. **17**(15): p. 4426-41.
86. Soloaga, A., et al., *MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14*. Embo J, 2003. **22**(11): p. 2788-97.
87. Waskiewicz, A.J., et al., *Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2*. Embo J, 1997. **16**(8): p. 1909-20.

88. Kant, S., et al., *Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5*. J Biol Chem, 2006. **281**(46): p. 35511-9.
89. Schumacher, S., et al., *Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development*. Embo J, 2004. **23**(24): p. 4770-9.
90. Seternes, O.M., et al., *Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway*. Embo J, 2004. **23**(24): p. 4780-91.
91. Stokoe, D., et al., *Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins*. FEBS Lett, 1992. **313**(3): p. 307-13.
92. Freshney, N.W., et al., *Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27*. Cell, 1994. **78**(6): p. 1039-49.
93. McLaughlin, M.M., et al., *Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase*. J Biol Chem, 1996. **271**(14): p. 8488-92.
94. Plath, K., et al., *Characterization of the proline-rich region of mouse MAPKAP kinase 2: influence on catalytic properties and binding to the c-abl SH3 domain in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **203**(2): p. 1188-94.
95. Kotlyarov, A., et al., *Distinct cellular functions of MK2*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(13): p. 4827-35.
96. Engel, K., K. Plath, and M. Gaestel, *The MAP kinase-activated protein kinase 2 contains a proline-rich SH3-binding domain*. FEBS Lett, 1993. **336**(1): p. 143-7.
97. Ben-Levy, R., et al., *Identification of novel phosphorylation sites required for activation of MAPKAP kinase-2*. Embo J, 1995. **14**(23): p. 5920-30.
98. Clifton, A.D., P.R. Young, and P. Cohen, *A comparison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAP kinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress*. FEBS Lett, 1996. **392**(3): p. 209-14.
99. Ronkina, N., A. Kotlyarov, and M. Gaestel, *MK2 and MK3--a pair of isoenzymes?* Front Biosci, 2008. **13**: p. 5511-21.
100. Tanoue, T., et al., *A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 110-6.
101. Ben-Levy, R., et al., *Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2*. Curr Biol, 1998. **8**(19): p. 1049-57.
102. Engel, K., A. Kotlyarov, and M. Gaestel, *Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation*. Embo J, 1998. **17**(12): p. 3363-71.
103. Neining, A., H. Thielemann, and M. Gaestel, *FRET-based detection of different conformations of MK2*. EMBO Rep, 2001. **2**(8): p. 703-8.
104. Sudo, T., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase plays a key role in regulating MAPKAPK2 expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **337**(2): p. 415-21.
105. Sithanandam, G., et al., *3pK, a new mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase located in the small cell lung cancer tumor suppressor gene region*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(3): p. 868-76.
106. Manke, I.A., et al., *MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation*. Mol Cell, 2005. **17**(1): p. 37-48.
107. Rogalla, T., et al., *Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation*. J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 18947-56.
108. Guay, J., et al., *Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27*. J Cell Sci, 1997. **110 (Pt 3)**: p. 357-68.
109. Bulavin, D.V., et al., *Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase*. Nature, 2001. **411**(6833): p. 102-7.
110. Hegen, M., et al., *MAPKAP kinase 2-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis*. J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1913-7.
111. Kotlyarov, A., et al., *MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(2): p. 94-7.
112. Ronkina, N., et al., *The mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinases MK2 and MK3 cooperate in stimulation of tumor necrosis factor biosynthesis and stabilization of p38 MAPK*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(1): p. 170-81.
113. Hitti, E., et al., *Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(6): p. 2399-407.

114. Cui, Y., et al., *Inactivation of Stat5 in mouse mammary epithelium during pregnancy reveals distinct functions in cell proliferation, survival, and differentiation*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(18): p. 8037-47.
115. Jakobs, A., et al., *Ubc9 fusion-directed SUMOylation (UFDS): a method to analyze function of protein SUMOylation*. Nat Methods, 2007. **4**(3): p. 245-50.
116. Choi, J., et al., *Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP*. Science, 1996. **273**(5272): p. 239-42.
117. Rivera, V.M., et al., *A humanized system for pharmacologic control of gene expression*. Nat Med, 1996. **2**(9): p. 1028-32.
118. Zimnik, S., M. Gaestel, and R. Niedenthal, *Mutually exclusive STAT1 modifications identified by Ubc9/substrate dimerization-dependent SUMOylation*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(4): p. e30.
119. Jakobs, A., et al., *Ubc9 fusion-directed SUMOylation identifies constitutive and inducible SUMOylation*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(17): p. e109.
120. Ihle, J.N., et al., *Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs*. Trends Biochem Sci, 1994. **19**(5): p. 222-7.
121. Ungureanu, D., et al., *PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1*. Blood, 2003. **102**(9): p. 3311-3.
122. Rogers, R.S., C.M. Horvath, and M.J. Matunis, *SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation*. J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 30091-7.
123. Owerbach, D., et al., *A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **337**(2): p. 517-20.
124. Knuesel, M., et al., *A method of mapping protein sumoylation sites by mass spectrometry using a modified small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1) and a computational program*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(10): p. 1626-36.
125. Su, L. and M. David, *Distinct mechanisms of STAT phosphorylation via the interferon-alpha/beta receptor. Selective inhibition of STAT3 and STAT5 by piceatannol*. J Biol Chem, 2000. **275**(17): p. 12661-6.
126. Ungureanu, D., et al., *SUMO-1 conjugation selectively modulates STAT1-mediated gene responses*. Blood, 2005. **106**(1): p. 224-6.
127. Yang, J., et al., *Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB*. Genes Dev, 2007. **21**(11): p. 1396-408.
128. Yang, J., et al., *Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation*. Cancer Res, 2005. **65**(3): p. 939-47.
129. Chatterjee-Kishore, M., et al., *How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene*. Embo J, 2000. **19**(15): p. 4111-22.
130. Takeichi, M., *Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion*. Annu Rev Biochem, 1990. **59**: p. 237-52.
131. Marchong, M.N., et al., *Cdh11 acts as a tumor suppressor in a murine retinoblastoma model by facilitating tumor cell death*. PLoS Genet. **6**(4): p. e1000923.
132. <http://www.uniprot.org/uniprot/P16388>, U.K.
133. Massova, I., et al., *Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification*. Faseb J, 1998. **12**(12): p. 1075-95.
134. "Entrez Gene: LMAN1 lectin, m.-b., 1". <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=3998>.
135. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=11199, E.G.A.
136. Zaru, R., et al., *The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways*. Nat Immunol, 2007. **8**(11): p. 1227-35.
137. Lim, C.P., N. Jain, and X. Cao, *Stress-induced immediate-early gene, egr-1, involves activation of p38/JNK1*. Oncogene, 1998. **16**(22): p. 2915-26.
138. Hazzalin, C.A., et al., *p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient*. Curr Biol, 1996. **6**(8): p. 1028-31.
139. Hazzalin, C.A., et al., *Effects of the inhibition of p38/RK MAP kinase on induction of five fos and jun genes by diverse stimuli*. Oncogene, 1997. **15**(19): p. 2321-31.
140. Deleault, K.M., S.J. Skinner, and S.A. Brooks, *Tristetraprolin regulates TNF TNF-alpha mRNA stability via a proteasome dependent mechanism involving the combined action of the ERK and p38 pathways*. Mol Immunol, 2008. **45**(1): p. 13-24.

141. Gregoire, S., et al., *Control of MEF2 transcriptional activity by coordinated phosphorylation and sumoylation*. J Biol Chem, 2006. **281**(7): p. 4423-33.
142. Hietakangas, V., et al., *Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(8): p. 2953-68.
143. Gregoire, S. and X.J. Yang, *Association with class IIa histone deacetylases upregulates the sumoylation of MEF2 transcription factors*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(6): p. 2273-87.
144. Stankovic-Valentin, N., et al., *An acetylation/deacetylation-SUMOylation switch through a phylogenetically conserved psiKXEP motif in the tumor suppressor HIC1 regulates transcriptional repression activity*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(7): p. 2661-75.
145. Ross, S., et al., *SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization*. Mol Cell, 2002. **10**(4): p. 831-42.
146. Wang, J.M., et al., *Functional role of NF-IL6beta and its sumoylation and acetylation modifications in promoter activation of cyclooxygenase 2 gene*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(1): p. 217-31.
147. Muller, S., et al., *c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification*. J Biol Chem, 2000. **275**(18): p. 13321-9.
148. Bossis, G., et al., *Down-regulation of c-Fos/c-Jun AP-1 dimer activity by sumoylation*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(16): p. 6964-79.
149. Shuai, K., et al., *Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins*. Nature, 1993. **366**(6455): p. 580-3.
150. Zimmerer, J.M., et al., *STAT1-dependent and STAT1-independent gene expression in murine immune cells following stimulation with interferon-alpha*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(11): p. 1845-52.
151. Soond, S.M., et al., *STAT1 regulates p73-mediated Bax gene expression*. FEBS Lett, 2007. **581**(6): p. 1217-26.
152. Takagi, K., et al., *Modulation of TNF-alpha gene expression by IFN-gamma and pamidronate in murine macrophages: regulation by STAT1-dependent pathways*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 1801-10.
153. Schindler, C. and J.E. Darnell, Jr., *Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 621-51.
154. Takeda, K. and S. Akira, *STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses*. Cytokine Growth Factor Rev, 2000. **11**(3): p. 199-207.
155. Kramer, O.H., et al., *Acetylation of Stat1 modulates NF-kappaB activity*. Genes Dev, 2006. **20**(4): p. 473-85.
156. Sickmann, A., M. Mreyen, and H.E. Meyer, *Identification of modified proteins by mass spectrometry*. IUBMB Life, 2002. **54**(2): p. 51-7.
157. Mann, M., et al., *Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome*. Trends Biotechnol, 2002. **20**(6): p. 261-8.
158. Gonzalez, J., et al., *A method for determination of N-glycosylation sites in glycoproteins by collision-induced dissociation analysis in fast atom bombardment mass spectrometry: identification of the positions of carbohydrate-linked asparagine in recombinant alpha-amylase by treatment with peptide-N-glycosidase F in 18O-labeled water*. Anal Biochem, 1992. **205**(1): p. 151-8.
159. Zhang, H., et al., *Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(6): p. 660-6.
160. Krebs, D.L. and D.J. Hilton, *SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling*. J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 16): p. 2813-9.
161. Yoshimura, A., et al., *A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors*. Embo J, 1995. **14**(12): p. 2816-26.
162. Harris, J., et al., *Socs2 and elf5 mediate prolactin-induced mammary gland development*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(5): p. 1177-87.
163. Beyaert, R., et al., *The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor*. Embo J, 1996. **15**(8): p. 1914-23.
164. Han, J., et al., *A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells*. Science, 1994. **265**(5173): p. 808-11.
165. Raingeaud, J., et al., *Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine*. J Biol Chem, 1995. **270**(13): p. 7420-6.

166. Xia, Y., et al., *MEK kinase 1 is critically required for c-Jun N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5243-8.
167. Thiefes, A., et al., *The Yersinia enterocolitica effector YopP inhibits host cell signalling by inactivating the protein kinase TAK1 in the IL-1 signalling pathway*. EMBO Rep, 2006. **7**(8): p. 838-44.
168. Matunis, M.J., E. Coutavas, and G. Blobel, *A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex*. J Cell Biol, 1996. **135**(6 Pt 1): p. 1457-70.
169. Mahajan, R., et al., *A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2*. Cell, 1997. **88**(1): p. 97-107.
170. Lin, X., et al., *SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4*. J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 31043-8.

Lebenslauf Susan Schwede

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

Geburtsname	Zimnik
Geburtstag	29.04.1980
Geburtsort	Blankenburg/Harz
Familienstand	verheiratet
Nationalität	deutsch

STUDIUM

10/2001 - 11/2006	Biologie an der Universität Braunschweig
Abschluss	Diplom-Biologin
12/2006 - 08/2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der MHH im Zentrum für Biochemie
08/2007 – 12/2010	Promotion an der MHH im Zentrum für Biochemie

BERUFSERFAHRUNG

08/2000 – 09/2001	BTA an der Tierärztlich Hochschule Hannover,
12/2001 – 02/2002	Abteilung für Lebensmitteltoxikologie

BERUFSAUSBILDUNG

09/1998 – 08/2000	Dr. Heinemann-Schule Braunschweig
Abschluss	staatlich geprüfte Biologisch-technische Assistentin (BTA)

SCHULAUSSILDUNG

1986 – 1992	Polytechnische Oberschule Westerhausen
1992 – 1998	Süderstadt-Gymnasium Quedlinburg
Schulabschluss	Abitur

Publikation

Zimnik, S., M. Gaestel, and R. Niedenthal, *Mutually exclusive STAT1 modifications identified by Ubc9/substrate dimerization-dependent SUMOylation*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(4): p. e30.

Lampen, A., S. Zimnik, and H. Nau, *Teratogenic phthalate esters and metabolites activate the nuclear receptors PPARs and induce differentiation of F9 cells*. Toxicol Appl Pharmacol, 2003. **188**(1): p. 14-23.

Erklärung zur Dissertation

gemäß §6(1) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover für die Promotion zum Dr. rer. nat.

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

Untersuchungen zum regulatorischen Wechselspiel zwischen SUMOylierung und anderen Proteinmodifikationen am Beispiel der STAT-Proteine und MAPKAP Kinase 2

selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, September 2010

(Susan Schwede)