

**Charakterisierung der Sumoylierung von p35,
dem Aktivator der Zyklin-abhängigen Kinase
5 (Cdk5), und der daraus resultierenden
funktionellen Konsequenz**

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

„Doctor rerum naturalium“

der Georg-August-Universität Göttingen

Im Promotionsprogramm der biologischen Fakultät

der Georg-August-University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

Anja Büchner

aus Weimar

Göttingen, 2013

Betreuungsausschuss

Prof. Dr. M. Bähr, Klinik für Neurologie, Universitätsmedizin Göttingen

Prof. Dr. S. Hoyer-Fender, Abteilung Entwicklungsbiologie, Johann-Friedrich-
Blumenbach-Institut für Zoologie und Anthropologie

Anleitung: Prof. Dr. Jochen H. Weishaupt, Abteilung Neurodegeneration,
Universität Ulm

Dr. Katrin Eckermann, Klinik für Neurologie, Universitätsmedizin
Göttingen

Mitglieder der Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. M. Bähr, Klinik für Neurologie, Universitätsmedizin
Göttingen

Korreferentin: Prof. Dr. S. Hoyer-Fender, Abteilung Entwicklungsbiologie,
Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für Zoologie und
Anthropologie

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission

Prof. Dr. N. Brose, Abteilung Molekulare Neurobiologie, Max-Planck-Institut
für Experimentelle Medizin

PD. Dr. T. Teichmann, Abteilung Zellbiologie der Pflanze, Schwann-Schleiden
Zentrum

Prof. Dr. H. Neumann, Abteilung Angewandte Synthetische Biologie, Institut
für Molekulare Strukturbiologie, GZMB

Prof. Dr. J. Wienands, Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie,
Universitätsmedizin Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2013

Promovierenden-Erklärung der Georg-August-Universität Göttingen

hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation: „Charakterisierung der Sumoylierung von p35, dem Aktivator der Zyklin-abhängigen Kinase 5 (Cdk5), und der daraus resultierenden funktionellen Konsequenz.“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die verfasste Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe.

Göttingen, März 2013
Anja Büchner

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Sumoylierung ist eine posttranslationale Modifikation.....	1
1.1.1 Der Sumoylierungszyklus.....	3
1.1.2 Molekulare Konsequenzen der Sumoylierung.....	6
1.1.3 Regulation der Sumoylierung.....	7
1.1.3.1 Lokalisation der Sumoylierung, einiger Zielproteine und der beteiligten katalysierenden Enzyme.....	7
1.1.3.2 Interferenz mit anderen posttranslationalen Modifikationen.....	8
1.1.3.3 Durch oxidativen Stress werden die Enzyme des Sumoylierungs-zyklus reguliert.....	9
1.1.4 Sumoylierung im zentralen Nervensystem.....	10
1.2 Die Zyklin-abhängigen Kinasen.....	12
1.2.1 Die Zyklin-abhängige Kinase 5 ist eine atypische Cdk.....	12
1.2.2 Funktion von Cdk5 und p35 im zentralen Nervensystem.....	13
1.2.3 Regulation des Cdk5-Aktivators p35.....	17
1.2.3.1 Die negative Rückkopplung des Aktivators p35 durch Cdk5.....	17
1.2.3.2 Regulation von p35 durch die Stress-induzierte Spaltung von p35 zu p25 und die Auswirkungen auf die Funktion von Cdk5.....	17
1.2.3.3 Der Cdk5-Aktivator p35 wird durch weitere posttranslationale Modifikation reguliert.....	18
1.3 Ziel der vorliegenden Arbeit.....	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Materialien.....	20
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	20
2.1.2 Verwendete Gerätschaften und entsprechende Software.....	23
2.1.3 Verwendete Kits.....	24
2.1.4 Plasmide.....	24
2.1.5 Oligonukleotide.....	25
2.1.5.1 Oligonukleotide für die gerichtete Mutagenese-PCR.....	25
2.1.5.2 Oligonukleotide für die FRET/FLIM Konstrukte.....	25
2.1.5.3 Oligonukleotide für Sequenzreaktionen.....	25

2.1.6	Antikörper	26
2.1.7	Zelllinien und kompetente Zellen	26
2.1.8	verwendete Puffer und Lösungen.....	27
2.1.8.1	Puffer für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese und für die Western Blot-Analyse	27
2.1.8.2	Colloidale Coomassie Färbelösungen	27
2.1.8.3	Puffer für die Minipräparation von DNA.....	27
2.1.8.4	Medien für Bakterien	27
2.1.8.5	Medien für die Zellkultur	28
2.1.8.6	DNA-Calciumphosphat Transfektionspuffer	28
2.1.8.7	Puffer für die Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie (Ni-NTA-Pulldown) von His ₆ - konjugierende Proteinen	28
2.1.8.8	Puffer und Lösungen für Immunohisto/Zytochemie Färbungen (IHC/ICC).....	29
2.1.8.9	weitere Puffer und Lösungen	29
2.2	Methoden	29
2.2.1	Klonierungstechniken	29
2.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) an Plasmid-DNA	30
2.2.1.2	Gerichtete Mutagenese mit Hilfe einer PCR.....	30
2.2.1.3	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	31
2.2.1.4	Gelelektrophorese von DNA.....	31
2.2.1.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	32
2.2.1.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
2.2.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten	32
2.2.1.8	Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA.....	32
2.2.1.9	Minipräparation von Plasmid-DNA	33
2.2.1.10	Herstellung von Bakterien-Glycerin-Stocks	33
2.2.1.11	Maxipräparation von Plasmid-DNA	33
2.2.1.12	Ethanol-fällung von DNA aus wässrigen Lösungen	33
2.2.2	Zellbiologische Methoden.....	34
2.2.2.1	Zellkultur eukaryotischer Zellen	34
2.2.2.2	Kultur von primären kortikalen Neuronen	35
2.2.3	Transfektionsverfahren eukaryotischer Zellkulturen	36
2.2.3.1	Lipofectamin 2000 TM Transfektion	36
2.2.3.2	DNA-Calcium-Phosphat Transfektionsverfahren	37
2.2.4	Identifizierung von sumoylierten Zielproteinen.....	37

2.2.4.1	Identifizierung sumoylierter Proteine mit Hilfe der Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie	37
2.2.4.2	Identifizierung von sumoylierten Proteinen in vivo aus transgenen His ₆ -SUMO2-Mausgehirnlysaten durch die Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie.....	38
2.2.4.3	Der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) / Fluoreszenz-Lebensdauer-Imaging-Mikroskopie (FLIM)	39
2.2.5	Proteinchemische Techniken	40
2.2.5.1	Isolierung von Gesamtprotein aus Zellkulturen	40
2.2.5.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	40
2.2.5.3	Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)	41
2.2.5.4	Western Blot-Analysen von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen.....	42
2.2.5.5	Inkubation von membran-gebundenen Proteinen mit Antikörpern.....	42
2.2.5.6	Methanol/Chloroform-Aufreinigung von Proteinen	43
2.2.5.7	Koimmunpräzipitation	43
2.2.5.8	Bestimmung der Cdk5-Aktivität	45
2.2.6	Histologische Techniken	45
2.2.6.1	Indirekte Immunfluoreszenz an Gehirnschnitten	45
2.2.7	Methoden zur subzellulären Lokalisation eines Proteins	46
2.2.7.1	ImmunZytochemische Färbung eukaryotischer Zellen	46
2.2.7.2	Lokalisationsanalysen von p35 in CSM14.1-Zellen	47
3	Ergebnisse	48
3.1	Nachweis der Sumoylierung von p35 in der humanen Zelllinie HEK 293 mittels der Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie.....	48
3.2	Nachweis von sumoyliertem p35 im zentralen Nervensystem	49
3.2.1	Sumoylierung von p35 in den Gehirnen von transgenen His ₆ -SUMO2-Mäusen	49
3.2.2	Sumoylierung von p35 in P1, P8 und P17 Wildtyp-Ratten.....	50
3.2.3	Analyse der Sumoylierung von p35 durch Behandlung der primären kortikalen Zellkultur mit His ₆ -SUMO2-rAAV2-Virus	51
3.2.4	Immunhistologische Kollokalisationsuntersuchungen von endogenem p35 und endogenem SUMO1 in Rattengehirnschnitten.....	52
3.3	Identifizierung der Sumoylierungsstellen von p35	53
3.3.1	Identifizierung der spezifischen Sumoylierungsstellen von p35 durch gerichtete Mutagenese-Analysen.....	53
3.3.2	FRET/FLIM Analyse von sumoyliertem p35 in der neuronalen CSM14.1 Zellkultur.....	57
3.3.3	Untersuchung der Ubiquitinierung von p35 Wildtyp und der SUMO-defizienten p35-Mutante in HEK 293-Zellen	60

3.4	Biochemische Untersuchungen für die Beeinflussung der Sumoylierung von p35 durch oxidativen Stress	61
3.5	Sumoylierung von p35 hat keinen Einfluss auf die Cdk5-Bindung	64
3.5.1	Analysen der Cdk5-Bindung von sumoyliertem p35 in CSM14.1-Zellen durch FRET/FLIM-Messungen.....	65
3.6	Die Sumoylierung von p35 verursacht eine erhöhte Cdk5-Aktivität	67
3.7	Die Sumoylierung von p35 führt zu einer subzellulären Lokalisationsveränderung von p35	68
4	Diskussion.....	73
4.1	Sumoylierung des p35-Proteins konnte in vitro und in vivo nachgewiesen werden...	73
4.2	Zwei spezifische Lysine werden in p35 kovalent sumoyliert	74
4.3	Die Sumoylierung von p35 wird durch oxidativen Stress biphasisch beeinflusst.	77
4.4	Die Sumoylierung von p35 induziert eine Lokalisationsveränderung von p35 innerhalb der Zelle und bewirkt eine erhöhte Cdk5-Aktivität ohne die Bindung an Cdk5 zu verändern.....	78
	Zusammenfassung.....	80
	Anhang	81
	Das TAR DNA-bindende Protein 43 (TDP-43) ist ein weiteres Substrat für die Sumoylierung	81
	Literaturverzeichnis	84
	Lebenslauf.....	92
	Publikationen	94
	Danksagung.....	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Die Tertiärstruktur von Ubiquitin und SUMO1 zeigen eine ähnliche Proteinstruktur [14].....	2
Abbildung 1.2 Der Sumoylierungszyklus [26].....	4
Abbildung 1.3 Molekulare Konsequenz der Sumoylierung	7
Abbildung 1.4 Regulierung des globalen Sumoylierungszyklus durch intrazellulären oxidativen Stress [75].....	10
Abbildung 1.5 Cdk5 beeinflusst verschiedene Zellprozesse und ist entscheidend für angemessene neuronale Funktionen.....	14
Abbildung 3.1 Sumoylierung von p35 in HEK 293-Zellen.....	48
Abbildung 3.2 Untersuchung der Sumoylierung von p35 <i>in vivo</i> durch Verwendung einer transgenen His ₆ -SUMO2-Maus.	50
Abbildung 3.3 Analyse der Sumoylierung von p35 in verschiedenen Wildtypstadien von Rattenhirngeweben.....	51
Abbildung 3.4 Nachweis der Kolo-kalisation von endogenem p35 und endogenem SUMO1.	53
Abbildung 3.5 Die sumoylierten Lysine von p35 sind evolutionär konserviert.	55
Abbildung 3.6 Die Sumoylierungsstellen von p35 sind die Lysine K246 und K290.....	56
Abbildung 3.7 Überprüfung der Sumoylierungsstellen von p35 durch eine zweite defiziente p35-Mutante (p35-2AA).	57
Abbildung 3.8 FRET/FLIM-Analysen der Sumoylierung von p35 in CSM14.1-Zellen.....	59
Abbildung 3.9 Überprüfung der Ubiquitinierungslevel von p35wt und der SUMO-defizienten Mutante 2KR.	60
Abbildung 3.10 Eine biphasische Beeinflussung der Sumoylierung von p35 durch oxidativen Stress.	61
Abbildung 3.11 Der biphasische Effekt auf die Sumoylierung von p35 durch oxidativen Stress wurde mit der FRET/FLIM-Methode analysiert.	63
Abbildung 3.12 Die Cdk5-Bindung von p35 ist nicht beeinflusst durch dessen Sumoylierung.	65
Abbildung 3.13. Cdk5-Bindungsuntersuchungen mit Hilfe der FRET/FLIM-Methode.	66
Abbildung 3.14 Die Sumoylierung vom Aktivator p35 resultiert in einer erhöhten Kinaseaktivität von Cdk5.....	68
Abbildung 3.15 Sumoylierung des Aktivatorproteins p35 beeinflusst die subzelluläre Lokalisation von p35 in einer Cdk5-abhängigen Art und Weise.	69
Abbildung 3.16 Die subzelluläre Lokalisation von sumoyliertem p35 wird durch eine Cdk5-abhängigen Art und Weise reguliert.	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Auswahl einiger Substrate von Cdk5 und deren funktionellen Kategorien..... 14

Abkürzungsverzeichnis

- AAV** - *adeno-associated virus* – Adeno-assoziiierender Virus
- AD** - *Alzheimer's disease* – Alzheimer-Erkrankung
- Amp** - Ampicillin
- A β** - Amyloid-Beta Peptid
- ATP** - Adenosinetriphosphat
- bp** - Basenpaar
- BCA** - *bicinchoninic acid* - Bicinchoninsäure
- BSA** - *bovine serum albumine* - Rinderserumalbumin
- bzw.** - beziehungsweise
- °C** – Grad Celsius
- ca.** – circa - ungefähr
- cDNA** - komplementäre DNA
- cm** - Zentimeter
- CNS** - *Central Nervous System* – zentrales Nervensystem
- DAPI** - 4', 6'-Diamidino-2-phenylindol
- DMEM** – *Dulbecco's modified Eagle's medium*
- DMSO** - Dimethylsulfoxid
- DNA** - Desoxyribonucleinsäure
- dNTP** - Desoxyribonukleosidtriphosphat
- DTT** - 1, 4 Dithiothreitol
- EDTA** - *ethylenediaminetetraacetic acid* - Ethylendiamintetraessigsäure
- EGTA** - *ethylene glycol tetraacetic acid* - Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure
- ER** - Endoplasmatisches Retikulum
- FBS** - fötales Kälberserum
- FLIM** - *Fluorescence lifetime imaging* - Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie
- Forward** - vorwärts
- FRET** - *Förster resonance energy transfer* - Förster-Resonanz-Energie-Transfer
- g** – Gramm, Erdbeschleunigungskonstante
- GFP** - grün fluoreszierendes Protein
- HBSS** - *Hanks' Balanced Salt Solution* – Hanks' volle Salzlösung

HDAC - Histon-Deacetylase
HEK - *human embryonic kidney* – humane embryonale Nierenzellen
HEPES - 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His - Histidin
HRP - *horseradish peroxidase*
HSF - *Heat shock transcription factor*
hSyn - *human Synapsin*
ICC - Immuncytochemie
IHC - Immunhistochemie
input – eingesetzte Proteinmenge, Gesamtmenge an Protein
Htt - Huntington
IR1+M - *Internal repeat 1 + middle domain*
kb - Kilobasenpaar
kDa - Kilodalton
LB - Luria Broth
μ -micro = 10^{-6}
μg – Mikrogramm
μl – Mikroliter
μm – Mikrometer
μM – Mikromolar
m – milli = 10^{-3}
M – Molar
mg – Milligramm
min - Minuten
ml - Milliliter
MOPS - 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA - *messenger RNA* – Boten-RNA
n – nano = 10^{-9}
NBM - Neurobasalmedium
NEM - N-Ethylmaleimid
NGS - *normal goat serum* – gewöhnliches Ziegen Serum
ng - Nanogramm
nm - Nanometer
Ni²⁺-NTA - *nickel nitrilotriacetic acid*
NLS - nukleares Lokalisationssignal
NPC - nuklearer Porenkomplex
PAGE - Polyacrylamid Gelelektrophorese

- PBS** - *phosphate buffered saline* – Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
- Pc2** - Polycomb Protein 2
- PCR** - *polymerase chain reaction* – Polymerasekettenreaktion
- PD** – Parkinson-Erkrankung
- PDSM** - *Phosphorylation dependent SUMOylation motif* – Phosphorylierungsabhängiges Sumoylierungsmotiv
- PFA** – Paraformaldehyd
- pH** – Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
- PIAS** - Proteininhibitor von aktiviertem STAT
- PML** - *Promyelocytic leukemia protein*
- PMSF** - Phenylmethylsulfonylfluorid
- RanGAP** – Ran-GTPase aktiviertes Protein
- Reverse** – rückwärts
- RNase** - Ribonuklease
- rpm** - *rounds per minute* – Umdrehung pro Minute
- ROS** - *Reactive oxygen species* – reaktive Sauerstoffspezies
- SAE1** - *SUMO-activating enzyme subunit 1*
- SAE2** - *SUMO-activating enzyme subunit 2*
- SDS** - *sodium dodecyl sulfate* - Natriumdodecylsulfat
- SENP** - Sentrin spezifische Protease
- SIM** – SUMO-Interaktionsmotiv
- SNpc** - Substantia Nigra pars compacta
- SUMO** - *Small ubiquitin-like modifier*
- Target** – Ziel, Zielprotein
- TEMED** - Tetramethylethyldiamin
- TB** - Transportpuffer
- TP** - *total protein* - Gesamtprotein
- U** – Unit = definierte Enzymeinheit
- Ubls** - *Ubiquitin-like modifiers*
- UV** – ultraviolettes Licht
- WB** - Western Blot
- WT** – Wildtyp
- z.B.** – zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Sumoylierung ist eine posttranslationale Modifikation

Posttranslationale Modifikationen sind Veränderungen von Proteinen, die es einer Zelle ermöglichen kurzfristig, reversibel und schnell auf externe Signale zu reagieren oder entwicklungsabhängige Reaktionen zu regulieren. Posttranslationale Modifikationen von Proteinen sind in allen zellulären Prozessen biologischer Systeme involviert. Es gibt verschiedene Modifikationsformen, die sich durch die Anheftung von spezifischen Proteinen, organischen oder anorganischen Molekülen unterscheiden und damit die Anordnung der Proteinfaltung, Stabilität, Aktivität, Verteilung und Funktion der Zielproteine regulieren. Darunter werden die Methylierung, Acetylierung, Glykosylierung und die am besten untersuchte posttranslationale Modifikation, die Phosphorylierung, gezählt. Bei der Phosphorylierung werden Phosphatgruppen auf organische Moleküle, meist Proteine, übertragen, wodurch deren Konformation in eine aktive oder inaktive Form verändert wird [1]. Während Kinasen Phosphatgruppen anheften können, so werden die Phosphatgruppen von Phosphatasen wieder entfernt. Es sind mehr als 520 Kinasen und mehr als 120 Phosphatasen bekannt [2], die über Serin-, Threonin- und Thyrosinresten in Eukaryonten und an Histidin, Arginin oder Lysin Seitenketten in Prokaryonten Signalkaskaden in Zelle regulieren [3].

Zu den Protein-anheftenden Modifikationsformen werden die **Ubiquitin-ähnlichen Modifikationen** (*ubiquitin-like modifications (UBL)*) gezählt. Bei der am besten untersuchten und namensgebenden Modifikation, der **Ubiquitinierung**, wird die Anheftung eines spezifischen Proteins, **Ubiquitin**, durch einen dreistufigen enzymatischen Reaktionsweg katalysiert. Dabei wird eine kovalente Isopeptidbindung zwischen Ubiquitin und einem spezifischen Lysin-Rest eines Substratproteins gebildet. Es sind bisher 12 humane UBLs beschrieben worden. Dazu werden ISG15 (*interferon inducible gene 15*), ATG8 und ATG12 (*Autophagic Ubiquitin-like protein*), FAT10 (*HLA-F adjacent transcript 10*), URM1 (*Ubiquitin-related modifier 1*), UFM1 (*Ubiquitin-fold modifier 1*), NEDD8 (*neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8*) und **SUMO** (*small ubiquitin-related modifier protein*) gezählt [4, 5]

Analog zu der Ubiquitinierung wird **SUMO** über eine enzymatische Kaskade kovalent an einen Lysin-Rest eines Substratproteins gebunden. In *C. elegans*, *S. cerevisiae* und *D. melanogaster* konnte nur ein SUMO-Gen identifiziert werden, wohingegen Pflanzen mehrere SUMO-Gene beinhalten [6]. In Säugetieren wurden vier evolutionär konservierte Isoformen von

SUMO nachgewiesen: SUMO1 (bislang bekannt als Sentrin, Ubl1, Smt3c, GMP1), SUMO2/3 (auch bekannt als Sentrin3, Smt3a und Sentrin2 und Smt3b) und SUMO4 [7-11].

Bei SUMO1 handelt es sich um ein 101 Aminosäure großes Protein (11 kDa). Die SUMO-Isoformen sind am N-terminalen Bereich um 10-25 Aminosäuren größer als Ubiquitin. Der N-terminale Bereich von SUMO weist in Lösungen eine starke Flexibilität auf [12]. Zu Ubiquitin weist SUMO1 nur eine rund 18%ige Sequenzidentität auf. In der drei-dimensionalen Proteinstruktur (Tertiärstruktur) zeigen SUMO1 und Ubiquitin jedoch eine ähnliche Faltung (Abbildung 1.1). Die negative Oberflächenladung der SUMO-Isoformen zeigt im Gegensatz zu der eher elektrostatisch positiv geladenen Oberfläche von Ubiquitin eine leicht abweichende räumliche Struktur [13].

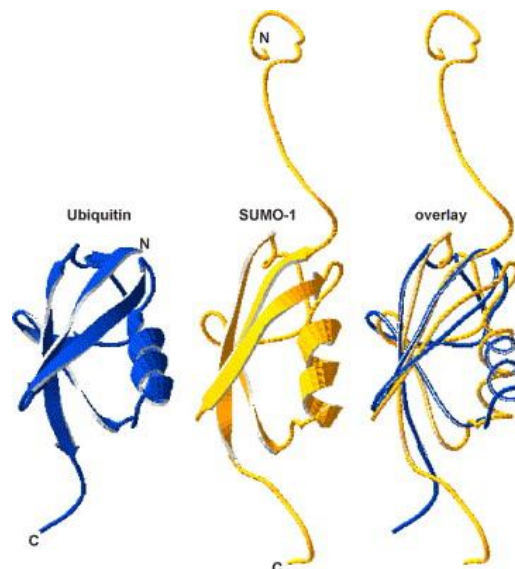


Abbildung 1.1 Die Tertiärstruktur von Ubiquitin und SUMO1 zeigen eine ähnliche Proteinstruktur [14]

Ubiquitin zeigt zu dem humanen SUMO1 nur eine rund 18%ige Sequenzübereinstimmung. N-terminal ist die Proteinstruktur von SUMO um 10-25 Aminosäure länger als Ubiquitin. Die dreidimensionale Proteinstruktur (Tertiärstruktur) von SUMO und Ubiquitin zeigt eine stark übereinstimmende charakteristische $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ Faltstruktur auf (*overlay*). SUMO hat eine eher negativ geladene Oberflächenladung, Ubiquitin dagegen besitzt eine elektrostatisch positiv geladene Oberfläche.

SUMO1 weist zu SUMO2/3 eine rund 47%ige Sequenzübereinstimmung auf [5]. In nur drei N-terminalen Aminosäuren unterscheiden sich SUMO2 und SUMO3 (~ 97% Sequenzhomologie). Die SUMO2/3-Isoformen können funktionell nicht voneinander differenziert werden [7, 15] und werden daher als Subfamilie bezeichnet. Es können einige Proteine sowohl durch SUMO1 als auch durch SUMO2/3 sumoyliert werden [16, 17], wodurch jeweils unterschiedliche zelluläre Funktionen induziert werden [15]. Zellen beinhalten ein

großes Reservoir an freien, nicht konjugierten SUMO2/3 Proteinen, aber nahezu keine Ansammlung von freien SUMO1, welches meist an Zielproteine konjugiert ist [15, 18]. Einzelne SUMO-Moleküle können an ein Lysin (Monosumoylierung) oder an verschiedene Lysine (Polysumoylierung) innerhalb eines Substratproteins binden [19, 20]. SUMO2/3 können zudem Poly-SUMO-Ketten bilden. Durch ein internes Akzeptorlysin an der 11. Position des verlängerten flexiblen N-terminalen Aminosäureschwanzes von SUMO2 und -3 (was als SUMO-Konsensus-Bindungsstelle Ψ KXE fungiert) wird die Bildung von SUMO-Polyketten ermöglicht [7]. Mit modernen massenspektrometrischen Untersuchungen kann der direkte *in vivo* Nachweise von SUMO2/3 Polyketten ermöglicht werden, dabei deutet die Bindung von SUMO1 an SUMO2/3-Polyketten auf eine Limitierung der Kettenverlängerung durch SUMO1 hin [21-24].

Über die Isoform SUMO4 ist bisher nur wenig bekannt. Es weist eine beschränkte Gewebeverteilung (vor allem Expression in Nierenzellen) auf. Die Umwandlung in eine reife (*mature*) SUMO4 Form ist verhindert, wodurch eine kovalente Bindung an Substratproteinen nicht möglich ist. Es könnte jedoch sein, dass SUMO4 ein Pseudogen ist oder durch nicht-kovalente Interaktionen über sogenannte SUMO-Interaktionsmotive (*SUMO interaction motifs* (SIM)) an Proteine bindet [8].

1.1.1 Der Sumoylierungszyklus

Wie Ubiquitin und Ubiquitin-ähnliche Proteine werden die SUMO-Isoformen als Vorstufenproteine (*precursor protein*) exprimiert. Das für die Konjugation an ein Zielprotein wichtige C-terminale Di-Glycin-Motiv in einem SUMO-Protein muss durch einen Reifungsprozess bzw. Abspaltung eines variablen C-terminalen Aminosäureschwanzes von 2-11 Aminosäuren durch die Endopeptidaseaktivität der SENP-Isopeptidasen freigelegt werden [25]. Die dadurch entstandene reife aktive Form von SUMO wird über einen mehrstufigen enzymatischen Reaktionsweg auf ein Zielprotein übertragen (Abbildung 1.2.). Dabei kann SUMO kovalent an ein Zielprotein binden oder nicht-kovalent mit dem Substratprotein interagieren. Die kovalente Bindung von SUMO erfolgt über eine Isopeptidbindung zwischen der Carboxylgruppe des C-terminalen Glycin-Restes von SUMO und der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes eines Substrateproteins.

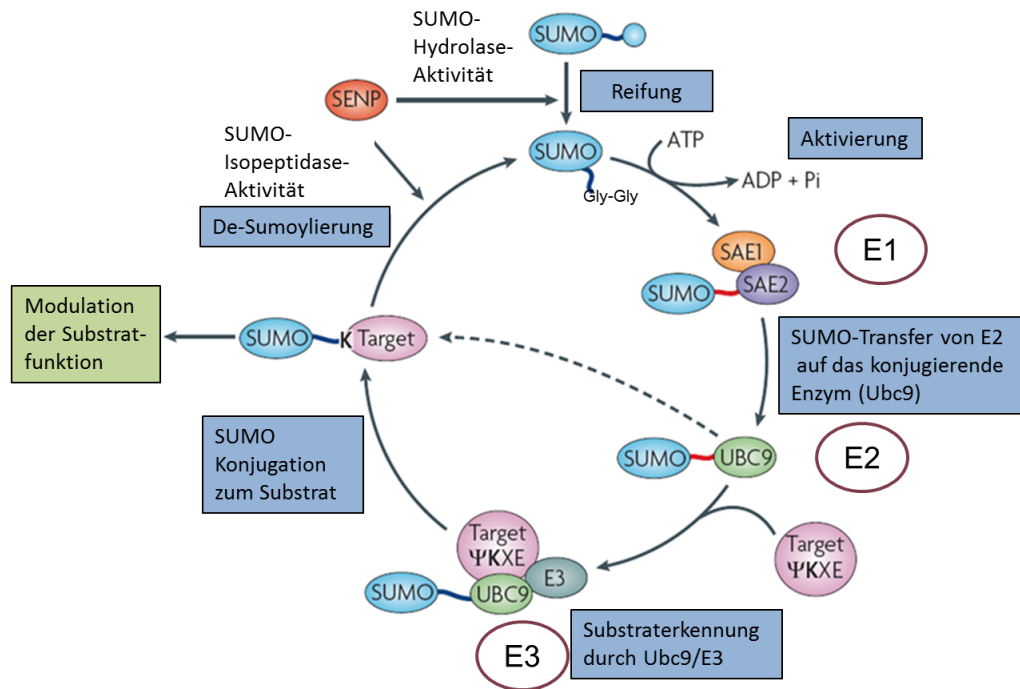


Abbildung 1.2 Der Sumoylierungszyklus [26]

Die Konjugation aller drei SUMO-Isoformen beginnt durch die SUMO-Isopeptidasen (spezifische SUMO-Isopeptidasen, z.B. SENPs), die das Di-Glycin-Motiv im SUMO-Protein freilegen. SUMO wird in einem ATP-abhängigen Schritt an das aktivierende SUMO-Enzym (E1-SAE1/SAE2) durch eine Thioesterbindung gebunden. Von den E1-Enzymen wird SUMO auf das E2-konjugierende SUMO-Enzym übertragen (Ubc9). Ubc9 interagiert direkt mit dem Substratprotein und kann SUMO entweder sofort an dieses konjugieren oder zusätzlich durch eine E3-Ligase übertragen. Dabei entsteht zwischen der C-terminalen Carboxylgruppe des SUMO-Proteins und der ε-Aminogruppe des Lysins im Zielsubstrat eine Isopeptidbindung. Die Dekonjugation wird durch verschiedene Isopeptidasen (SENP und DeSI) katalysiert. Sie spalten die Isopeptidbindung zwischen dem Substratprotein und SUMO, wodurch freies SUMO entsteht. Die Konjugation und Dekonjugation des Sumoylierungszyklus befinden sich in einem dynamischen Gleichgewicht, wodurch die Sumoylierung als ein reversibler und hoch dynamischer Prozess bezeichnet wird [26].

Die in dem Sumoylierungszyklus involvierten Enzyme unterscheiden sich von den Enzymen der anderen UBL Systeme [27, 28]. Im ersten Konjugationsschritt des Sumoylierungszyklus wird das entstandene reife SUMO-Protein unter ATP-Verbrauch auf das aktivierende Enzym (E1) übertragen. Das E1-Enzym ist aus zwei Untereinheiten von SAE1 und SAE2 (in Hefe als Aos1 und Uba2 bekannt) zusammengesetzt [19, 29, 30]. Über das E1-Enzym wird anschließend das SUMO auf das konjugierende Enzym E2, Ubc9, übertragen. Durch Ubc9 kann SUMO an ein Zielsubstrat angeheftet werden oder mit Hilfe von verschiedenen E3-Ligasen auf ein Zielprotein übertragen werden. SUMO wird über eine Isopeptidbindung mit einem Lysin im Zielprotein konjugiert. Dieses Lysin ist typischerweise Bestandteil einer konservierten Sequenz. Solch ein charakteristisches Konsensus-Motiv wird durch die Aminosäureabfolge von Ψ -K-X-[D/E] beschrieben, wobei Ψ für eine aliphatische Aminosäure (meist Isoleucin, Valin und Leucin), K das zu modifizierende Lysin ist, X für eine beliebige

Aminosäure steht und D/E meist Aspartat und Glutamat sind [11, 31, 32]. Wichtig für den Transfer von SUMO auf das Zielprotein ist, dass das zu modifizierende Lysin innerhalb einer zugänglichen Konformation oder in einer unstrukturierten Sequenzabfolge liegt [33]. Dadurch kann Ubc9 die Lysine innerhalb vom SUMO-Konsensusmotiv erkennen und direkt mit diesem Motiv interagieren, wodurch der Transfer des SUMO-Proteins über das Akzeptorlysin innerhalb des Zielproteins erfolgen kann [32, 34]. Für RanGAP1 und Sp100 ist Ubc9 allein für die Konjugation des SUMO-Proteins auf das Zielsubstrat ausreichend [30, 35]. In den meisten Fällen werden für den letzten konjugierenden Schritt jedoch noch substratspezifische E3-Ligasen benötigt. Drei Typen von E3-Ligasen sind bisher beschrieben worden [27, 28]. Dazu gehören die SP-RING Ligasen [36], RanBP2 (*Ran binding protein 2*) [37] und Pc2 (*polycomb group protein 2*) [38]. Die SP-RING-Ligasen sind SUMO-spezifische Gegenstücke der RING-Ligasen des Ubiquitinsystems. Durch die direkte Interaktion der SP-RING-Ligasen mit Ubc9 und einem Zielprotein wird der Ubc9-SUMO-Komplex in eine günstige Orientierung zu dem Akzeptorlysin des Zielproteins gebracht und die Konjugation von SUMO auf das Substrat katalysiert [39, 40]. Zu den SP-RING-Familie gehören MMS21 (*Methyl methanesulfonate-sensitivity protein 21*), auch bekannt als NSE2 (DNA-reparierendes Hefeprotein) [41], das Zip3-Protein (Meiose-spezifisches Hefeprotein) [42] und die PIAS-Familie (*protein inhibitors of activated STAT (signal transducer and activator of transcriptional)*) [43]. Es sind fünf PIAS-Familien-Mitglieder in Säugetieren bekannt: PIAS1, PIAS3, PIAS α , PIAS β und PIAS γ [36, 44]. Im Gegensatz zu den SP-RING-Ligasen zeigen die RanBP2 und Pc2-Ligasen keine Homologien zu den Ubiquitin-E3-Ligasen auf. Das Polycomb-Protein Pc2 [38] besitzt keine RING-Domäne, zeigt aber eine E3-Ligaseaktivität und bindet direkt an CtBP (*C-terminal-binding protein*), Ubc9 und SUMO, wodurch ein grundlegender Komplex gebildet wird [45, 46]. Es wurden weitere E3-Ligasen ohne RING-Domänen in den letzten Jahren identifiziert. Dazu gehört die HDAC4 (*histone deacetylase 4*), HDAC7 (*histone deacetylase-7*), das G-Protein Rhes, das RNA-bindende Protein TLS (*translocated in liposarcoma*) und TRAF7 (*tumour-necrosis-factor-associated protein 7*) [47].

Bei der Dekonjugation wird die Isopeptidbindung zwischen dem SUMO und dem entsprechenden Substratprotein durch SUMO-Isopeptidasen gespalten. Zwei spezifische SUMO-Isopeptidasen, Ulp1 und Ulp2, wurden in Hefe identifiziert [48]. In Säugetieren wurden sechs homologe SUMO-Isopeptidasen aus der Familie der Ulp-Cysteinproteasen als SENP1-3 (*sentrinin-specific isopeptidases*) und SENP5-7 beschrieben. Diese sechs bekannten SENP-Isoformen werden durch ihre katalytische Aktivität in der Reifung und Dekonjugation von SUMO sowie in ihrer Spezifität gegenüber den SUMO-Isoformen unterschieden. Die SENP Enzyme haben unterschiedliche Funktionen: SENP1/2 sind hauptsächlich in Reifungsprozessen der SUMO-Proteine innerhalb einer Zelle beteiligt und katalysieren die Dekonjugation der SUMO1- und SUMO2/3-Proteine von Substraten. SENP3/5 entfernt Monomere SUMO2/3-

Proteine von Substraten. SENP6/7 reagieren eher auf SUMO2/3 bestehende Polyketten [46, 49, 50]. Als zweite Klasse der dekonjugierenden Isopeptidasen wurden in Säugetieren die DeSI 1 und 2 (*DeSumoylating Isopetidase 1/2*) identifiziert. Die Substratproteine werden nur jeweils durch eine der spezifischen Isopeptidase-Familien desumoyliert [51].

Insgesamt entsteht somit ein reversibles und hoch dynamisches Gleichgewicht zwischen Konjugation und Dekonjugation von SUMO innerhalb einer Zelle.

Für einige Proteine konnte auch eine Konjugation von SUMO mit einem Lysin beschrieben werden, welches nicht innerhalb einer Konsensussequenz liegt. Dazu gehören zum Beispiel das humane E2-25K (*ubiquitin-conjugating enzyme*) [52] und der Kaliumkanal K2P1 [53]. SUMO kann auch nicht-kovalent über ein SUMO-interagierendes Motiv (SIM) mit einem Substratprotein interagieren. Gekennzeichnet wird dieses Motiv durch hydrophobe Aminosäuren in einer spezifischen V/I-X-V/I-V/I Reihenfolge, wobei das Lysin durch saure Aminosäuren oder Serinreste umgeben ist [54-56]. Für das Protein USP25 (*ubiquitin specific peptidase 25*) wurde ein SIM-Motiv beschrieben. Eine Mutation innerhalb dieses SIM-Motivs führt zu einem Verlust der SUMO-Interaktion [57]. SIMs formen einen β -Strang, der parallel oder anti-parallel (gegensätzlich) mit einem zweiten β -Strang von SUMO interagiert [55, 56]. Die Arbeitsgruppe um Palvimo konnte zeigen, dass SIM-Motive nicht nur in Substratproteinen von SUMO vorhanden sind, sondern auch in SUMO-E3-Enzymen, wodurch deren Aktivität essenziell reguliert wird [58].

1.1.2 Molekulare Konsequenzen der Sumoylierung

Für die Sumoylierung sind drei verschiedene molekulare Konsequenzen für die Funktionen verschiedener Zielproteine bekannt. Durch die Sumoylierung werden Bindungsstellen für substratspezifische Proteine im Zielprotein blockiert und damit die Interaktion inhibiert. Somit wird die Substratspezifität einzelner Proteine, sowie die Protein-Protein oder -DNA-Bindung verändert. Des Weiteren können neue Bindungsstellen am Substratprotein durch SUMO gebildet werden oder eine Konformationsänderung durch die Bindung von SUMO im Substratprotein induziert werden, was die Funktion oder Stabilität der Proteine reguliert [27] (Abbildung 1.3). Damit spielt die Sumoylierung z.B. in der Genexpression und Repression der Transkription eine kritische Rolle. Zum Beispiel verursacht eine SUMO1-Modifikation des Transkriptionsfaktors Sp3 (*stimulating protein 3*) dessen Inaktivierung und eine Blockierung der DNA-Bindung (GC-Box) [59-61]. Auch für die Prozesse der DNA-Reparatur, der DNA-Replikation und die Chromatiden-Modellierung konnte eine Regulierung durch die Sumoylierung nachgewiesen werden. Die Sumoylierung der DNA-Methyltransferase1 (DNMT1) zeigt nach der SUMO1-Konjugation eine erhöhte Methylaseaktivität von DNMT1 an den Chromatiden [62]. Die Sumoylierung kann zudem einige Schritte innerhalb der Zytokinese und des Zellzyklus regulieren. Hier führt beispielsweise die SUMO1-Konjugation des

Aktivators von Cdk4 und Cdk6 (*cyclin-dependent kinase*), Zyklin D1, zu dessen nukleären Lokalisation und beeinflusst damit die Regulation des Zellzyklus und der Seneszenz (Alterungsprozesse) [63].

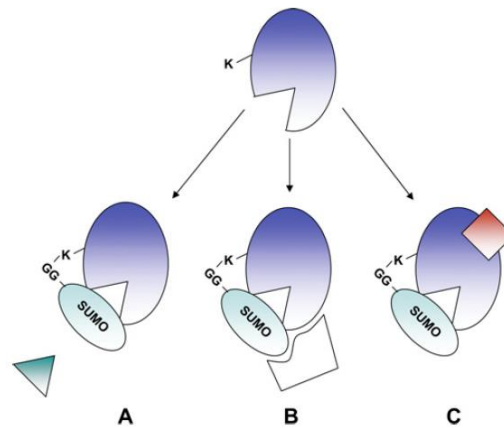


Abbildung 1.3 Molekulare Konsequenz der Sumoylierung

Die Sumoylierung kann drei verschiedene Konsequenzen auf Substratproteine haben. (A) Die Sumoylierung inhibiert die Interaktion mit substratspezifischen Proteinen durch die Blockierung der Bindungsstelle. (B) SUMO-Konjugationen können neue Bindungsstellen am Substratprotein bilden, so dass in SUMO-abhängiger Weise mit neuen Bindungspartnern interagiert werden kann. (C) Die Bindung von SUMO-Isoformen kann eine Konformationsänderung des Substratproteins hervorrufen [46].

Eine weitere Möglichkeit Proteine durch Sumoylierung zu beeinflussen, ist die Veränderung von deren subzellulären Lokalisation [27, 41, 64-66]. Das Kernporenprotein, RanBP2 (*Ran binding protein 2*, auch bekannt als Nup358) hat eine SUMO-E3-Ligasenaktivität [37] und interagiert mit der SUMO-modifizierten Form von RanGAP1 und Ubc9, wodurch sie cytoplasmatisch an den Kernporenkomplex (*nuclear pores complex (NPC)*) lokalisiert sind [18, 30, 67, 68]. SENP2, eine SUMO-Isopeptidase, interagiert mit Nucleoporin Nup153, wodurch sie ebenfalls nukleär an das NPC lokalisiert ist [69]. Der Sumoylierung kann daher eine entscheidende Rolle im nukleocytoplasmatischen Transport zugeschrieben werden.

1.1.3 Regulation der Sumoylierung

1.1.3.1 Lokalisation der Sumoylierung, einiger Zielproteine und der beteiligten katalysierenden Enzyme

Alle SUMO-Isoformen weisen eine zelltypische Expression auf und haben eine einzigartige subzelluläre Lokalisation. SUMO1 ist hauptsächlich an der nukleären Membran zu finden.

SUMO2 und SUMO3 sind überwiegend im Cytoplasma und Kern lokalisiert. Die Mehrheit der sumoylierten Proteine wurden innerhalb des Kerns identifiziert (siehe vorheriges Kapitel 1.1.2.). Es konnten aber auch SUMO-modifizierte Proteine im Cytoplasma gefunden werden. Dazu gehört FAK (*focal adhesion kinase*), eine Kinase, welche an die Aktinmikrofilamente assoziiert und durch SUMO1 modifiziert wird [70]. Die MK2 Kinase (*MAPK-activated protein kinase-2*) reguliert durch die SUMO3-Konjugation die Umformung der Aktinfilamente [71]. Das cytoplasmatische RanGAP1-Protein, welches erst als SUMO-modifiziertes Protein identifiziert wurde, zeigt nach der Konjugation von SUMO1 eine Lokalisation zum Kernporenkomplex [18, 68]. Ebenso werden die ER-assoziierende Tyrosinphosphatase PTP1B [72] und der in der Plasmamembran verankerte Kalziumkanal Kv1.5 [73] durch SUMO im Cytoplasma modifiziert.

Der aktivierende Enzymkomplex (E1) SAE1/SAE2 des Sumoylierungszykluses zeigt durch die Modifizierung mit SUMO eine verstärkte nukleocytoplasmatische Bewegung [74]. Das konjugierende Enzym Ubc9 zeigt eine erhöhte nukleäre Lokalisation und nur ein geringer Anteil von Ubc9 konnte an dem cytoplasmatischen Filament des NPC gefunden werden [37, 69, 75]. Die für die Dekonjugation notwendigen Isopeptidasen zeigen eine Lokalisation in beiden Zellkompartimenten. SENP1 bewegt sich zwischen Zellkern und Cytoplasma [76, 77], SENP2 ist mit der nukleären NPC-Region assoziiert [78]. SENP5 ist im Zellkern angereichert [49], wobei auch eine cytoplasmatische Lokalisation detektiert wurde [76]. SENP6 ist im Zellkern [79] und im Cytoplasma [80] lokalisiert. Somit können Proteine in allen Kompartimenten der Zelle mit SUMO konjugiert oder dekonjugiert werden. Jedoch kann die Sumoylierung von Proteinen durch verschiedene posttranslationale Modifikationen zusätzlich reguliert werden.

1.1.3.2 Interferenz mit anderen posttranslationalen Modifikationen

Die Sumoylierung kann durch andere posttranslationale Modifikationen wie Ubiquitinierung, Phosphorylierung und Acetylierung beeinflusst werden. Die posttranslationalen Modifikationen wie Ubiquitinierung, Acetylierung, Methylierung und Sumoylierung können alternativ ein Lysin modifizieren und dadurch das Zielprotein unterschiedlich regulieren. I_kB α wird an Lysin K21 ubiquitiniert und sumoyliert. Die Ubiquitinierung von I_kB α verursacht einen proteasomalen Abbau des Inhibitors (I_kB α) von NF- κ B. Die SUMO1-Konjugation blockiert die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von I_kB α [81]. Eine weitere Beeinflussung der Sumoylierung durch Ubiquitin konnte im Zusammenhang mit dem PML (*Promyelocytic Leukemia*) - Protein gezeigt werden. PML wird durch verschiedene SUMO-Isoformen modifiziert, wobei SUMO2/3 eine Polymerkette an PML bildet, was zu dessen Ubiquitinierung und proteasomalem Abbau führt. Hingegen ist die SUMO1-Modifikation für die nukleäre Lokalisation von PML an die nukleäre Domäne (*PML nuclear bodies*) erforderlich [46, 82, 83]. Durch die Phosphorylierung von PML wird die SUMO1-Konjugation erleichtert [84]. Die Phosphorylierung von HSF1 (*heat shock factor 1*) ist

auch die Voraussetzung für dessen Sumoylierung [85]. HSF1 besitzt ein SUMO-Konsensusmotiv, welches durch die folgenden phosphorylierbaren Serin (S)- und Prolin (P)-Reste als PDSM (*phosphorylation-dependent sumoylation motif*) bezeichnet wird. Gekennzeichnet wird solch ein PDSM durch eine Aminosäureabfolge von Ψ -K-X-E-X-X-pS-P [86]. Die Phosphorylierung von MEF2A (*transcription factor myocyte enhancer factor 2A*) induziert ebenfalls die Sumoylierung des transkriptionellen Repressors an der Lysin-Position 403. Hingegen führt die Clacineurin-vermittelte Dephosphorylierung des Serins 408 von MEF2A zu einem Wechsel der SUMO-Modifikation zu einer Acetylierung an dem Lysin 403. Dadurch wird die Differenzierung der Dendriten inhibiert. Somit reguliert der Wechsel zwischen Sumoylierung und Acetylierung die aktivitätsabhängige Synapsenentwicklung und demzufolge die Plastizität des Gehirns [26, 87].

1.1.3.3 Durch oxidativen Stress werden die Enzyme des Sumoylierungszyklus reguliert

Änderungen in der Sumoylierung werden durch umweltbedingte Stressfaktoren wie Viren, Hypoxie, genotoxischer Stress, starke Temperaturschwankungen, nach einem osmotischen Schock oder oxidativen Stress ausgelöst [15, 88]. Als Antwort auf verschiedene Stressarten werden die SUMO2/3-Bindungen induziert [15]. Die Bereitstellung eines freien Kontingents an SUMO-Proteinen für Stressreaktionen könnte eine Funktion von SUMO2/3 sein. In Abhängigkeit von dem oxidativen Stresslevel innerhalb einer Zelle werden die konjugierenden und dekonjugierenden Enzyme unterschiedlich reguliert. Dabei führt eine geringe Menge an ROS (*reactive oxygen species*) zur Bildung einer Disulfidbindung zwischen dem aktivierenden Enzym (E1) und dem konjugierenden Enzym Ubc9 (E2). Die Konjugation von SUMO auf Substratproteine wird dadurch inhibiert. Bei einer hohen Konzentration von Wasserstoffperoxid werden hingegen die SENP-Isopeptidasen blockiert, wodurch eine Anreicherung der SUMO-konjugierten Proteine erfolgt. Solch eine biphasische Beeinflussung des SUMO-Zyklus durch oxidativen Stress zeigt, wie sensibel und stark die Sumoylierung durch Veränderungen innerhalb der Zelle reguliert werden kann [75] (Abbildung 1.4.).

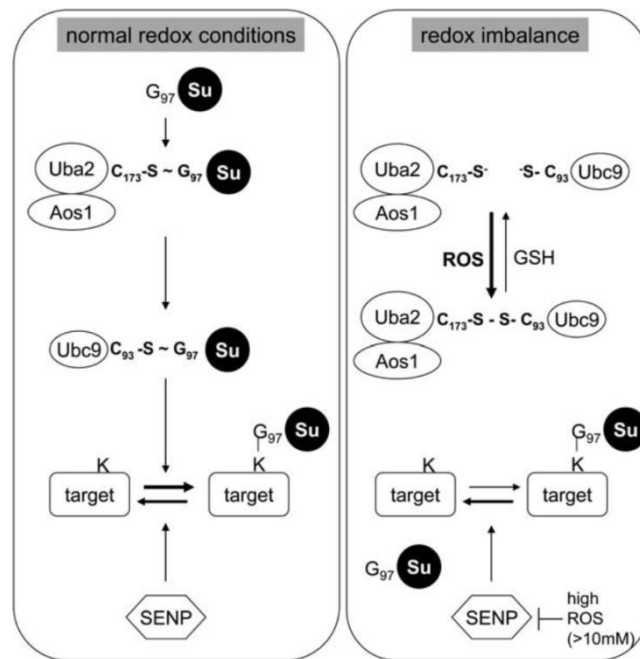


Abbildung 1.4 Regulierung des globalen Sumoylierungszyklus durch intrazellulären oxidativen Stress [75]

Unter normalen Redoxbedingungen (linke Seite) gibt es eine Balance zwischen SUMO-Konjugation und Dekonjugation. Zwischen den katalytischen Cysteinen der E1- (Aos1/Uba2 (in Hefe)) und E2- (Ubc9) Enzyme werden normalerweise während der Konjugation Thioesterbindungen ausgebildet und zwischen SUMO und dem Zielprotein eine Isopeptidbindung formiert. Die spezifischen Isopeptidasen, zum Beispiel die Mitglieder der SENP Familie, katalysieren den Dekonjugationsschritt. Wenn die zelluläre Umgebung mit oxidativem Stress global oder lokal angereichert wird (rechte Seite), wird zwischen den Cysteinresten der E1- und E2-Enzyme eine Disulfidbindung formiert und damit die SUMO-Konjugationen reduziert. Weil die SUMO-Isopeptidasen nicht beeinflusst werden außer bei einer hohen anwesenden Konzentration von ROS (*reactive oxidativ species*), wird die vorkommende Balance zwischen der SUMO-Konjugation und Dekonjugation in Richtung der Dekonjugation von modifizierten Proteinen verschoben.

1.1.4 Sumoylierung im zentralen Nervensystem

Posttranslationale Modifikationen, wie die Sumoylierung, haben einen wesentlichen Einfluss im zentralen Nervensystem, wie beispielsweise in der Kommunikation zwischen Neuronen [26]. Durch die Sumoylierung von GluR6, einer Untereinheit des Kainatrezeptors, wird die Endozytose des Kainatrezeptors reguliert und die synaptische Transmission von Nervenzellen modifiziert [61]. MEF2A (*transcription factor myocyte enhancer factor 2A*), ein transkriptioneller Repressor, spielt für die postsynaptische Morphogenese (Synapsenformation) innerhalb der Dendritenverzweigung eine entscheidende Rolle und wird durch SUMO aktiviert [26, 46, 87]. Dass die Sumoylierung Differenzierungsprozesse beeinflusst, konnte auch bereits mit dem Tumorsuppressorprotein p53 gezeigt werden. Dieser Suppressor wird ebenfalls sumoyliert und hat in der Differenzierung und Apoptose von Neuronen und Oligodendrozyten einen entscheidenden Einfluss [47, 89, 90].

Dass die Sumoylierung eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des zentralen Nervensystems spielt, zeigen auch Studien zu der mRNA und der Proteinexpression von Ubc9 während der Entwicklung von Rattengehirnen. Es kann eine mögliche Rolle von Ubc9 und der Sumoylierung in synaptischer und neuronaler Plastizität des Gehirns suggeriert werden [47]. Ubc9 wird in neuronalen Stammzellen stark exprimiert und zeigt eine mäßige Expression in differenzierenden Neuronen der embryonalen Stadien. Im adulten Tier konnte eine mittelmäßige Expression von Ubc9 in einer Teilmenge von Neuronen beobachtet werden, beispielsweise in granulierten Nervenzellen und pyrimidalen Nervenzellen der hippocampalen Formation und innerhalb der großen pyrimidalen Neuronen des cerebalen Cortex. Das suggeriert, dass Ubc9 und SUMO die Differenzierung und Proliferation von neuronalen Zellen während der Entwicklung des Gehirns und die neuronale Plastizität im adulten Gehirn von Ratten herbeiführen können [91]. In der Studie von der Arbeitsgruppe um Loriol wurden die entwicklungsabhängige Regulation und die räumliche-zeitliche Verteilung der SUMO-Enzyme und der globalen SUMO-Konjugate im zentralen Nervensystem der Ratte untersucht. In den frühen Entwicklungsstadien des Gehirns konnte eine Anhäufung von SUMO1-modifizierten Proteinen, SUMO2/3-konjugierten Proteinen, sumoyliertem Ubc9 und der SENP1- und SENP6-Isopeptidasen beobachtet werden. Eine entwicklungsabhängige Expression des aktivierenden SUMO (E1) Enzym konnte dagegen nicht gezeigt werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Sumoylierung stark in die Entwicklung des Gehirns, besonders in der Synaptogenese, die im E12 Rattenstadium beginnt, involviert ist [35, 92].

Bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise der Huntington'sche Krankheit, der Alzheimer-Krankheit (AD) oder der Parkinson-Krankheit (PD), hat Sumoylierung ebenfalls eine entscheidende Rolle. Das pathologische Fragment von Huntington (Httex1p) ist an den N-terminalen Lysinen 6, 10 und 15 durch SUMO1 modifiziert und führt zu einer Erhöhung der transkriptionellen Repression durch Huntington (Htt). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Sumoylierung von Htt die Bildung von Htt-Aggregaten in der Huntington'schen Krankheit reduziert [93]. Die Alzheimer-Krankheit wird durch einen starken Verlust von Neuronen in kortikalen und subkortikalen Gehirnbereichen charakterisiert. Der Morbus Alzheimer ist die häufigste Form der Demenz, die durch Missfaltung von Proteinen und deren unnormale Akkumulation, wie Amyloid- β (A β) und Tau, in Form von amyloide Plaques und neurofibrillären Bündeln charakterisiert ist [94]. Tau bildet durch Aggregation ebenfalls intrazelluläre Bündel. Bisher konnte gezeigt werden, dass Tau an Lysin 340 durch SUMO1 modifiziert wird und dadurch der proteasomale Abbau geblockt und das Sumoylierungslevel von Tau erhöht wird [95]. Für die Parkinson-Krankheit konnten bisher drei krankheitsspezifische Proteine, DJ-1, Parkin und α -Synuklein, als Substratproteine für die Sumoylierung beschrieben werden. Für α -Synuklein wurde eine alternative Sumoylierung an den Lysinen K96 und K102 nachgewiesen. Die kovalente Bindung von SUMO an α -Synuklein

reguliert die α -Synuklein induzierte Toxizität und Aggregation. Dies konnte *in vivo* an dopaminergen Substantia-Nigra-Neuronen bestätigt werden. Somit könnte die Sumoylierung von α -Synuklein ein neuartiger Regulierungsfaktor der charakterisierten Neurotoxizität und Fibrillenbildung von α -Synuklein im zentralen Nervensystem von Parkinson-Erkrankten sein [96].

1.2 Die Zyklin-abhängigen Kinasen

Die Zyklin-abhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinases* (Cdks)) regulieren den Zellzyklus. In Vertebraten sind 10 Cdks bekannt. Die Cdks sind Prolin-gerichtete Serin/Threonin-Kinasen, die untereinander eine Sequenzhomologie von mehr als 40% aufweisen [97]. Die meisten Kinasen der Cdk-Familie werden durch die Assoziation mit einer regulatorischen Untereinheit, den Zyklinen, moduliert [98, 99]. Diese Zykline erhielten historisch bedingt ihren Namen durch ihre Synthese und den anschließenden Abbau während der Zellteilung. Es sind 15 Zyklin Gene im humanen Genom bekannt. Die Mitglieder der Zyklin-Proteinfamilie unterscheiden sich nur gering in ihrer Struktur. Für die Bindung und die Aktivierung der Cdks enthalten die Zykline eine 100 Aminosäure große Region, die so genannte Zyklin-gefaltete-Box (*cyclin-box fold*) [97]. Nach der Bindung der Zykline an die Cdks werden die Zyklin/Cdk-Komplexe anschließend durch die CAK (*Cdk-activating kinase*) an dem konservierten T-Loop der Cdks phosphoryliert und dadurch aktiviert. Durch die Phosphorylierung der Wee1- und Myt1-Kinasen an den benachbarten Threonin- oder Tyrosin-Reste der Cdks werden die Zyklin/Cdk-Komplexe negativ reguliert. Diese inhibierende Phosphorylierung kann jedoch durch eine Cdc25-Phosphatase aufgehoben werden und dient damit als ein positiver Regulator der Zyklin/Cdk-Aktivität [100]. Die Autophosphorylierung der Zykline durch die Zyklin/Cdk-Komplexe verursacht den Abbau des Zyklins und eine Inaktivierung der Kinase. Da die Cdks an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind, müssen ihre Aktivitäten zu verschiedenen Zeitpunkten genau koordiniert werden. Dies wird durch den kontrollierten Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbau ermöglicht [101, 102]. Nur wenige Cdk's zeigen eine funktionelle Rolle außerhalb des Zellzyklus [99]. Cdk4 und Cdk6 sind essenziell für die Proliferation von einigen endokrinen und hematopoetischen Zellen. Cdk2 ist entscheidend für die ersten meiotischen Teilung von männlichen und weiblichen Keimzellen [100].

1.2.1 Die Zyklin-abhängige Kinase 5 ist eine atypische Cdk

Wie alle Cdks wird die Zyklin-abhängige Kinase 5 (Cdk5) ubiquitär exprimiert und ist eine Prolin-gerichtete Serin/Threonin-Kinase, welche unmittelbar die nach einem Prolinrest folgenden Serin- und Threoninreste im Substratprotein phosphoryliert. Der monomerische

Zustand der Cdk5 zeigt keine enzymatische Aktivität und wird durch die Phosphorylierung und die Bindung der Zyklin-verwandten neuronalen Proteine p35 und p25 sowie durch p39 aktiviert [97, 103]. Die Aktivatoren von Cdk5 werden hauptsächlich in den Neuronen exprimiert und gehören zu den funktionellen Gegenspielern der Zykline. Dadurch wird die Aktivität der Cdk5 durch seine homologen Aktivatoren p35 und p39 auf das zentrale Nervensystem begrenzt. [104, 105]. Die Cdk5 wird an p35 über eine minimale Bindungsstelle, den Aminosäuren 150 bis 200 in p35, gebunden [106-108]. Die Bindung von p35 an Cdk5 kann durch die Phosphorylierung der essenziellen Aminosäure Serin 159 in Cdk5 durch die Proteinkinase A inhibiert werden [97, 109].

Eine Vielzahl an Substraten der Cdk5 sind bisher beschrieben worden. Die Cdk5 ist eine atypische Cdk, die Funktionen im Pankreas, den Lymphknoten, der Spermatogenese [97] und in den Muskelzellen hat [110]. Jedoch wird die p35/Cdk5-Aktivität hauptsächlich im zentralen Nervensystem detektiert.

1.2.2 Funktion von Cdk5 und p35 im zentralen Nervensystem

Die Cdk5-Aktivität spielt bei der Regulierung verschiedenster Reaktionen bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems, der Axonen- und Dendritenentwicklung, der neuronalen Migration und der Neurogenese eine bedeutende Rolle. Weitere physiologische Bedeutungen hat die Cdk5 für die Regulierung des Verhaltens, der Wahrnehmung, der Organisation und Bewegung des Zytoskeletts, der Freisetzung von Transmittern und in der synaptischen Übertragung [97, 99, 111-117]. Auf zellulärer Ebene ist die Cdk5 in verschiedene Funktionen, wie zum Beispiel in Zelladhäsion sowie in der Exo- und Endozytose involviert [115, 117, 118] (Abbildung 1.5.). Zytoskelettproteine (wie *doublecortin* (DCX)), synaptische Proteine (z. B. Synapsin I, PSD95) und Transkriptionsfaktoren (wie MEF2) werden durch die Cdk5 reguliert [103, 116, 117]. Zum Beispiel wird β -Catein (reguliert Zelladhäsion), NUDEL (reguliert Dynein-vermittelten Transport), Synapsin (reguliert die synaptische Transmission) und Amphiphysin 1 (reguliert Endozytose der synaptischen Vesikel) durch den p35/Cdk5-Komplex phosphoryliert [117] [siehe Tabelle 1].

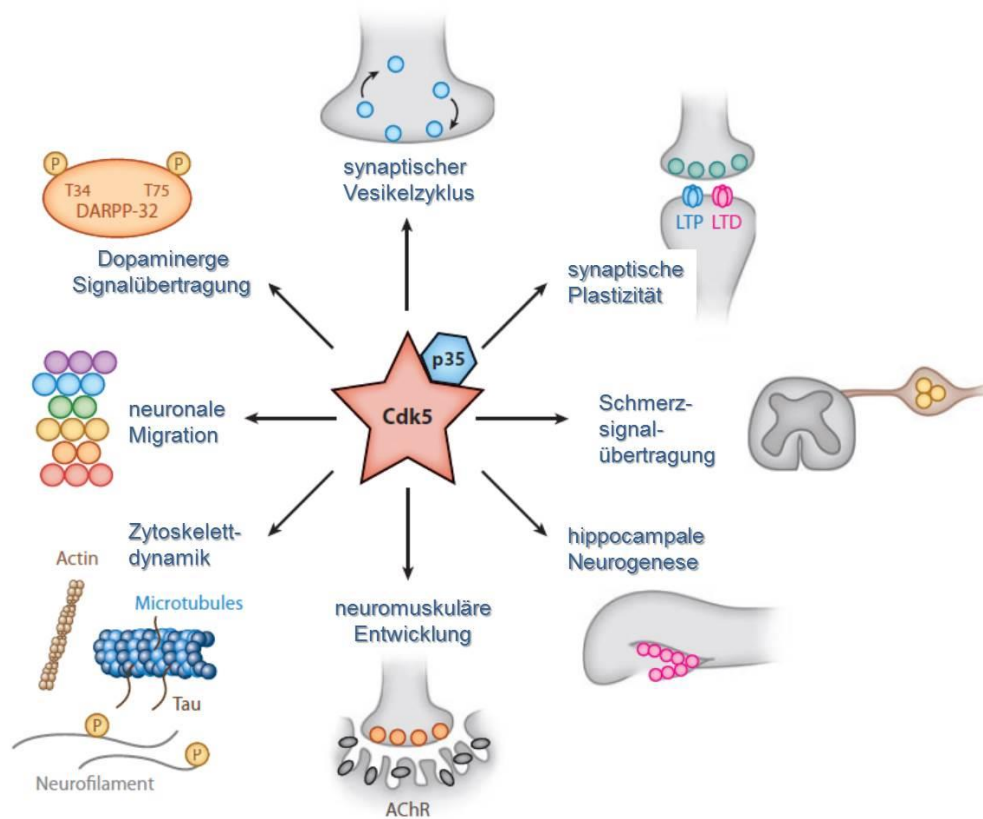


Abbildung 1.5 Cdk5 beeinflusst verschiedene Zellprozesse und ist entscheidend für angemessene neuronale Funktionen.

Cdk5 benötigt die p35-Bindung für die Cdk5-Aktivität und reguliert viele Prozesse innerhalb der neuronalen Migration, Zytoskelettbewegung, Neuronenauswuchs, Signalwege von dopaminerge Neuronen und einige Komponenten des synaptischen Vesikelzyklus. Es gibt Hinweise, dass die Cdk5 eine entscheidende Rolle in der synaptischen Plastizität, im Verhalten und in der Wahrnehmung spielt. Zudem ist die Cdk5 an einigen molekularen Reaktionswegen beteiligt, wie in der Schmerzreaktionen, in der adulten Neurogenese und der neuromuskulären Entwicklung. Abkürzungen: **AChR** (acetylcholine receptor); **DARPP** (dopamine cyclic-AMP regulated phosphoprotein); **LTD** (long-term depression); **LTP** (long-term potentiation); **P** (Phosphat) [117]

Tabelle 1 Auswahl einiger Substrate von Cdk5 und deren funktionellen Kategorien

[117].

Kategorie	funktionelle Auswirkungen	Phosphorylierungsstellen
neuronale Migration		
β-Catenin	N-Catenin vermittelte Zelladhäsion, Bindung	multiple
Doublecortin	geringer Affinität zu Mikrotubulin, reduzierter Effekt an der Polymerisierung	S297
FAK	nukleäre Translokation durch Mikrotubulinabspaltung	S732
NUDEL	Regulierung von Dynein und axonalem Transport	S198, T219;S231
p27(kip1)	Aktin-Organisation, kortikale neuronale Migration	S10, T187
Neuritenauswuchs		
Cables	Abgrenzung von Cdk5/Cables/c-Abl Komplex, Neuritenauswuchs	multiple
c-Src	neuronale Entwicklung, Neuritenauswuchs	S75
p39	Regulierung der Aktin-Zytoskelettbewegung	multiple

Kategorie	funktionelle Auswirkungen	Phosphorylierungsstellen
PAK1	Aktin-Polymerisierung, Zytosklettneuorganisation	T212
synaptischer Vesikelzyklus		
Amphiphysin1	Regulierung der Endozytose synaptischer Vesikel	S262, S272, S276, S285, T310
Dynamin1	Clathrin vermittelte synaptische Vesikel-Endozytose	S774, S778
Munc18	Modulierung synaptischer Vesikel-Exozytose	T574
Synapsin1	Auswirkung auf Komponenten des Zytoskelett, Aktinbündel	S551, S553
synaptische Übertragung und Plastizität		
DARPP-32	Signaltransduktionsmodulierung in striatalen Neuronen	T75
δ-Catenin	Morphogenese der Dendriten, synaptische Aktivität	S300, S357
PP-1 Inhibitor	multiple zelluläre Funktionen und Signalwege	T72
PSD-95	Häufung von K ⁺ Kanälen am dendritischen Dorn	T19, S25
neurodegenerative Erkrankungen		
APP	potentielle Lokalisation von Amyloid-β Protein	T668
Huntington	Reduzierung der Aggregatbildung von Huntington	S434, S1181, S1201
MEF2D	Inhibierung des Transkriptionsfaktors und Zelltod	S444
NF	Regulierung des axonalen Transports von NF	multiple
Parkin	Modulierung von Synphilin-1/α-Synuklein Einschlüsse	S131
Prx2	Einstellung der Sensitivität von Neuronen auf oxidativen Stress	T89
Tau	Akkumulation und Zerstörung des axonalen Transports	multiple
Andere		
Ape1	involviert in die Regulation von DNA-Schäden, Zelltod	T232
Bcl-2	neuroprotektive Effekte, neuronales Überleben	S70
JNK3	Inhibierung der JNK Aktivität und Reduzierung der Apoptose	T131
MEK1	Herrunterregulierung des MAPK-Signalwegs	T286
mSds3	HDAC-transkriptionaler Co-Repressor-Komplex	S228
p35	Förderung der Ubiquitin vermittelten Proteolyse	S8, T138, S170, T197
p53	Erhöhung der Zellzyklusgene oder Zelltodgene	S33, S315
Paxillin	involviert in oligodendrozytische Differenzierung	S244
Rb	zelluläres Wachstum, Differenzierung, Apoptose	multiple
STAT3	Transkription von Substratproteinen c-fos und junB	S727

Abkürzungen für: **Ape1**-*apurinic/aprimidinic endonuclease 1*; **APP**-*amyloid precursor protein*; **Cables**-Cdk5 und Abl enzymatisches Substrat; **c-Scr**-*non-receptor tyrosine kinase*; **DARPP-32**-*Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein*, Mr 32 kDa; **FAK**-*focal adhesion kinase*; **JNK3**-*c-jun N-terminal kinase 3*; **MEK1**-*MAP kinase kinase-1*; **MEF2D**-*myocyte enhancer factor 2D*; **Munc18**-*mammalian uncoordinated 18*; **NF**-Neurofilament; **p27(kip1)**-*cyclin-dependent kinase inhibitor*; **p35**-regulierender Aktivator der Cdk5, Mr 35 kDa; **p39**-Aktivator der Cdk5; **p53**-*tumor protein 53*; **PAK1**-*p21-activated Kinase*; **paxillin**-*focal adhesion-associated adaptor protein*; **PP-1**-*protein phosphatase-1*; **PSD-95**-*postsynaptic density protein 95*; **Rb**-*retinoblastoma protein*; **STAT3**-*signal transducer and activator of transcription 3*.

Durch die Bindung von p35 an Mikrotubulin und F-Aktin, den Bestandteilen des Zytoskeletts, werden deren strukturellen Eigenschaften verändert, was durch die Phosphorylierung von Cdk5 ausgelöst wird [119, 120]. Die Phosphorylierung von p35 durch die Cdk5 induziert die Mikrotubulinpolymerisierung und Homodimerisierung von F-Aktin. Demzufolge hat die Phosphorylierung von p35 durch die Cdk5 eine entscheidende Rolle bei dem Auswachsen der Neuriten [121]. Ein weiterer direkter Einfluss von p35/Cdk5 auf z.B. die neuronale Morphogenese kann durch die Interaktion der *mind bomb 1* (Mib1) Ubiquitin-Ligase mit p35 erklärt werden. Mib1 bindet mit seiner N-terminalen Region an p35 und induziert

dadurch die Relokalisation des p35-Aktivators und der Cdk5 von der Zellmembran, nicht aber den Abbau des p35/Cdk5-Komplexes. Die Aktivität des p35/Cdk5-Komplexes verursacht hingegen die Herunterregulierung des Mib1-Proteinlevels, wodurch der inhibierende Effekt von Mib1 in der Neuritenmorphologie unterdrückt wird [122].

Der p35/Cdk5-Komplex beeinflusst verschiedene Differenzierungs- und Entwicklungsprozesse im Gehirn. Mehrere Studien zeigen eine variierende Proteinexpression von Cdk5 und p35 während der Entwicklung des zentralen Nervensystems in zeitlicher und regionaler Hinsicht. Die mRNA-Expression von p35 wurde in post-mitotischen Neuronen des zentralen Nervensystems von Mausembryonen detektiert [103]. Eine sehr geringe Expression von p35 wurde im 12. Embryonalstadium (E12) beschrieben. Diese steigt während des 18. Embryonalaltages (E18) bis in das postnatale Stadium P14 deutlich an. Jedoch verringert sich das Expressionslevel von p35 stetig bis zu einem Minimalwert im adulten Tier [123]. Eine Expression von Cdk5 zeigt sich ebenfalls in post-mitotischen Neuronen im zentralen Nervensystem [103]. In der Ratte steigt das Expressionslevel von Cdk5 vom embryonalen Stadium E12 bis zum postnatalen Tag P7 an und erreichte dann ein konstantes Niveau [123].

Regional konnte während der Entwicklung des zentralen Nervensystems eine signifikant erhöhte p35/Cdk5-Aktivität im cerebralen Cortex und im Hippocampus von Nagetieren nachgewiesen werden, wohingegen im adulten Tier nur eine geringe Cdk5-Aktivität im Cerebellum und dem Striatum detektiert wurde [123, 124]. p35-Knock-out (KO)-Mäuse zeigen eine umgekehrt geschichtete Anordnung kortikaler Neurone und eine leichte Störung der Hippocampusregion. Die Cerebellumregion in p35-KO-Mäusen ist allerdings normal entwickelt [111]. Cdk5-KO-Mäuse zeigen auch kortikale Veränderungen, sind jedoch nicht lebensfähig [97].

Auf der zellulären Ebene verändert sich während der neuronalen Entwicklung bei Nagetieren auch die Lokalisation von Cdk5 und p35. Die Cdk5 ist während der Entwicklung der Neurone hauptsächlich in den Zellkörpern lokalisiert. Später ist die Lokalisation der Cdk5 auf den Zellkern oder das Axon beschränkt. Nach einer kurzen entwicklungsabhängigen frühen axonalen Lokalisation ist p35 aber dann hauptsächlich in den Dendriten und Zellkörpern von Neuronen zu finden [125].

Der p35-Aktivator zeigt auch eine dynamische Lokalisation zwischen Cytoplasma und Zellkern. Dieser Transport erfolgt durch die Bindung von p35 an Importin- β , Importin-5 und Importin-7 über das nukleäre Lokalisationssignal (*nuclear localisation signal* (NLS)) von p35. p35 und Cdk5 gelangen jedoch getrennt voneinander in den Zellkern [126]. Im Zellkern hat Cdk5 zum Beispiel eine hemmende Funktion auf den Zellzyklus [127].

Die deutlichen Veränderungen in der Lokalisation und der Expression von der Cdk5 und seinem p35-Aktivator und die Bindung an spezifische Substratproteine während der

Differenzierung und Entwicklung von Neuronen, gibt Hinweise auf eine dynamische und reversible Regulation von p35, welche meist durch posttranslationale Modifikationen hervorgerufen werden kann.

1.2.3 Regulation des Cdk5-Aktivators p35

Das Cdk5 aktivierende Proteine p35 wird bereits auf zellulärer Ebene durch unterschiedliche Mechanismen reguliert: Durch oxidativen Stress wird die Spaltung des aktivierenden Proteins p35 zu p25 induziert. Die Phosphorylierung von p35 durch die Cdk5 verursacht dagegen eine negative Rückregulation, wodurch der proteasomale Abbau und die Lokalisation von p35 beeinflusst werden.

1.2.3.1 Die negative Rückkopplung des Aktivators p35 durch Cdk5

p35 kann an vier Stellen durch Cdk5 phosphoryliert werden: Serin 8, Threonin 138, Serin 170 und Threonin 197 [103]. Der Cdk5-Aktivator p35 allein zeigt eine Halbwertszeit von 20 Minuten. Die Halbwertszeit von p35 reduziert sich in Verbindung mit der Cdk5 dramatisch [102, 128]. Die Arbeitsgruppe um Patrick zeigte, dass die Phosphorylierung von p35 durch die Cdk5 die Ubiquitinierung von p35 induziert und dadurch den proteasomalen Abbau begünstigt [102]. Durch die Ubiquitinierung von p35 kann die Aktivität von Cdk5 schnell reguliert werden. Dabei wird das Ubiquitin als Polymer an p35 konjugiert. Bisher konnten die Lysine für die Ubiquitinierung von p35 nicht identifiziert werden.

1.2.3.2 Regulation von p35 durch die Stress-induzierte Spaltung von p35 zu p25 und die Auswirkungen auf die Funktion von Cdk5

In verschiedenen pathologischen Situationen konnte eine gestörte Regulation von Cdk5 identifiziert werden, welche zum neuronalen Zelltod führen kann. Untersuchungen zur Neurotoxizität konnten die Erzeugung von Amyloid- β ($A\beta$) nachweisen. Durch neurotoxische Bedingungen oder oxidativen Stress wird ein Calciumeinstrom induziert und Calpain aktiviert. Calpain spaltet p35 in einer Prolin-reichen Aminosäureregion (Position 96-111) in ein N-terminales Fragment (p10) und in ein C-terminales Fragment (p25) [129-131]. Der Cdk5-Aktivator p39 kann ebenso in Anwesenheit von Calcium durch Calpain in seinen C-terminales Fragment p29 gespalten werden [129, 131]. Durch die Entstehung des p25/Cdk5-Komplexes wird die Cdk5-Aktivität erhöht [131, 132], was zur Pathogenese in verschiedenen Modellen neurodegenerativer Erkrankungen, wie zum Beispiel der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS), Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und Chorea Huntington beiträgt [97, 113, 117, 133-136]. Auch in post-mortem-Gewebe von Alzheimer-Erkrankten wird eine Akkumulation des Cdk5-Aktivators p25 und eine erhöhte Cdk5-Aktivität detektiert [102]. Durch eine längere Halbwertszeit von p25 (mehr als 60 Minuten) im Gegensatz zu p35 (20-30 Minuten) wird die

Aktivität von Cdk5 verstärkt. Damit ist der p25/Cdk5 Komplex stabiler und aktiver [97, 132, 137]. Der p35/Cdk5-Komplex ist im Cytoplasma lokalisiert. Durch das Fehlen des N-terminalen Myristoylierungssignal in p25 wird der Komplex nicht an die Zellmembran gebunden und diffundiert frei in der Zelle [129, 131, 132]. Dadurch werden andere Substratproteine, wie Tau, von p25/Cdk5 hyperphosphoryliert [97]. Zudem wurde eine erhöhte Aktivität von p25/Cdk5 im Zellkern nachgewiesen [138].

1.2.3.3 Der Cdk5-Aktivator p35 wird durch weitere posttranslationale Modifikation reguliert

Das Protein p35 besitzt in seiner N-terminalen Aminosäuresequenz ein Glycin in der zweiten Aminosäureposition. Die Myristinsäure ist für die subzelluläre Lokalisation von p35 und damit für den p35/Cdk5-Komplex an die Zellmembranen verantwortlich [106, 109, 132, 137]. Die Phosphorylierung des p35 Proteins durch die Cdk5 in der Nähe der Myristoylierungsstelle an Serin 8 und Threonin 138 [139, 140] beeinflusst die Interaktion von myristilierenden Proteinen zur Zellmembran [141]. Die Arbeitsgruppe um Asada zeigte, dass die Phosphorylierung durch die Cdk5 an Serin 8 in der Nähe des Myristoylierungsmotivs von p35 die Lokalisation von p35 zu der cytoplasmatisch/perinukleären Region induziert [142].

Neben der Phosphorylierung und Ubiquitinierung von p35 kann p35 durch eine weitere posttranslationale Modifikation, die Sumoylierung, reguliert werden. In *in vitro* Sumoylierungsassays konnte mit den rekombinanten SUMO Enzymen, E1, E2 und E3 sowie den SUMO-Isoformen und dem rekombinanten p35/Cdk5-Komplex im Rahmen der Dissertation von Frau Dr. Petranka Krumova [2009] in unserer Arbeitsgruppe die Sumoylierung von p35 erstmals nachgewiesen werden. Mit dem SUMO1-Protein wies Sie eine robuste, starke Konjugation mit p35 nach. Mit der Isoform SUMO2 konnte hingegen keine SUMO2-Konjugation von p35 detektiert werden. Da es sich bei p35 um den Aktivator der Cdk5 handelt, wurde auch diese funktionelle Komponente (Cdk5) des Komplexes auf SUMO2 Konjugation untersucht. Es konnte keine Sumoylierung der Cdk5 unter den entsprechenden Bedingungen nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte untersucht werden, ob die Sumoylierung p35 *in vivo* reguliert und welche potentiellen Funktionen diese Konjugation für p35 hat.

1.3 Ziel der vorliegenden Arbeit

Eine dynamische zeitliche und räumliche Regulation ist für den p35/Cdk5-Komplex von herausragender Bedeutung, da er in verschiedene neuronale Zellfunktionen, wie die Endo- und Exozytose in Synapsen, bei der synaptischen Übertragung und Entwicklungsvorgängen des zentralen Nervensystems, involviert ist. [97, 115]. Die Calpain-induzierte Spaltung von p35 zu p25 ist ein entscheidender Schritt für die Deregulation von Cdk5, wodurch Substratproteine, wie Tau, hyperphosphoryliert werden [97]. In diesem Kontext wird eine erhöhte Aktivität von p25/Cdk5 im Zellkern beschrieben [138] wie auch bei neurologischen Erkrankungen, wie Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und Chorea Huntington [117, 136].

Eine Form der Verringerung der p35/Cdk5-Aktivität ist bereits bekannt: Die Phosphorylierung des Aktivators p35 durch Cdk5 induziert die Ubiquitinierung und den anschließenden proteosomalen Abbau von p35 [102]. Damit kann die Cdk5-Aktivität reguliert werden. Nicht für alle funktionellen Vorgänge ist jedoch der Abbau und die Neusynthese des p35-Aktivators schnell genug, wie zum Beispiel für die synaptische Übertragung. Die Möglichkeit, Zielproteine mit SUMO durch die Enzyme des Sumoylierungssystems zu modifizieren und zu dekonjugieren, macht die posttranslationale Modifikation zu einem reversiblen und hoch dynamischen System, welches die Modifikation von Proteinen im Bereich von Minuten erlaubt. Daher stellt die Sumoylierung eine gute Möglichkeit für eine rasche Regulierung besonders von synaptischen Proteinen wie p35 dar. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation soll die Sumoylierung des Cdk5-aktivierenden Proteins p35 wie folgt untersucht werden:

- 1.) Charakterisierung von p35 als SUMO-konjugiertes Protein in der HEK 293-Zelllinie durch die Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie
- 2.) Untersuchungen der Sumoylierung von p35 in verschiedenen Entwicklungsstadien von Rattengehirnen und mit Hilfe einer transgenen His₆-SUMO2-Maus
- 3.) Identifizierung der spezifischen Sumoylierungsstellen in dem Aktivatorprotein p35
- 4.) Untersuchung der Cdk5-Bindung mit den SUMO-konjugierten p35-Protein
- 5.) Einfluss der Sumoylierung von p35 auf die Aktivität der Cdk5
- 6.) Untersuchung der Lokalisation von p35 durch die Sumoylierung

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Hersteller
2-Propanol	<i>Applichem</i> (Darmstadt, Deutschland)
24-Well-Platten	<i>Greiner Bio One</i> (Frickenhausen, Deutschland)
12-Well-Platten	<i>Greiner Bio One</i> (Frickenhausen, Deutschland)
96-Well-Platte	<i>Nunc</i> (Wiesbaden, Deutschland)
Agarose	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
Ammoniumperoxid	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Ampicillin (Natriumsalz)	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
Aprotinin	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
ATP	<i>Cell Signaling/BioLabs</i> (Ipswich, UK)
B27-Zusatz	<i>Gibco</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Bis-Tris Gele 4-12%; 1.5mm/10 Taschen	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Bromphenol-Blausalzlösung (BPB)	<i>Serva</i> (Heidelberg, Deutschland)
Calciumchlorid-Di-Hydrat	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Chloroform	<i>Fluka</i> (Steinheim, Deutschland)
COMPLETE Proteaseinhibitorcocktail	<i>Roche</i> (Mannheim, Deutschland)
CoverSlides 24x60 mm; ø 10 mm	<i>Menzel Gläser</i> (Braunschweig, Deutschland)
CoverSlides 24x60 mm; ø 15 mm	<i>Menzel Gläser</i> (Braunschweig, Deutschland)
D(+)-Glucose, wasserfrei	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
DAPI	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$)	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Dithiothreitol (DTT)	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
DMEM	<i>PAA</i> (Cölbe, Deutschland)
DNA-Restriktionsenzyme	<i>New England Biolabs</i> (Ipswich, USA)

Chemikalien	Hersteller
DNase I	<i>Roche</i> (Mannheim, Deutschland)
dNTP Set (100mM)	<i>GE Healthcare</i> (Chalfont St. Giles, UK)
Dual Proteinstandard	<i>BIO-RAD</i> (München, Deutschland)
EDTA	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
EGTA	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
Essigsäure	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol absolut	<i>Applichem</i> (Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromid	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
FBS	<i>PAA</i> (Cölbe, Deutschland)
Gel-Blottingpapier (Whatmanpapier)	<i>Whatman</i> (Part of GE Healthcare, UK)
Glycin	<i>Applichem</i> (Darmstadt, Deutschland)
G-Sepharose 4B	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
Guanidin Hydrochlorid	<i>Applichem</i> (Darmstadt, Deutschland)
Glycerol	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Harnstoff,	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
HBSS	<i>Gibco</i> (Karlsruhe, Deutschland)
HEPES	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
Histon H1	<i>New England Biolabs</i> (Ipswich, USA)
Imidazol	<i>Applichem</i> (Darmstadt, Deutschland)
Kanamycin	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
L-Glutamin	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
Laminin	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
LB Agar	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
LB Medium (Lennox)	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Leupeptin	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
Lipofectamin 2000	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)*6 H ₂ O	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)* 7 H ₂ O	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Menzel Gläser 76 x 26 mm	<i>Thermo scientific</i> (Dreeich, Deutschland)
Methanol	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Milchpulver	<i>Applichem</i> (Darmstadt, Deutschland)
MOPS	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
Natiumazid	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
Natriumacetat, wasserfrei	<i>Fluka</i> (Steinheim, Deutschland)

Chemikalien	Hersteller
Natriumchlorid (NaCl)	<i>Appllichem</i> (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdeoxycholat	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
Natrium-Di-Hydrogenphosphat Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$)	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Natrium-dodecyl-sulfat (SDS)	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumfluorid (NaF)	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydroxidpellets	<i>Appllichem</i> (Darmstadt, Deutschland)
Natriumvanadat (Na_3VO_4)	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
N-Ethylmaleimid (NEM)	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
Neurobasalmedium (NBM)	<i>Gibco</i> (Karlsruhe, Deutschland)
NGS	<i>PAA</i> (Cölbe, Deutschland)
Ni^{2+} -NTA-Agarose	<i>QIAGEN</i> (Hilden, Deutschland)
Nitrozellulosemembran	<i>Schleicher & Schüll</i> (Dassel, Deutschland)
NP-40	<i>Appllichem</i> (Darmstadt, Deutschland)
NuPage 4-12% Bis Tris Gele 1,5 mm	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Paraformaldehyd (PFA)	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin (P/S) für Primärzellkultur	<i>Gibco</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin (P/S) für Zellkultur	<i>PAA</i> (Cölbe, Deutschland)
Pepstatin A	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
PMSF	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Poly-L-Lysin	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
Poly-L-Ornithin	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
Poly-Prep-Chromatographiesäulen (10ml und 25ml)	<i>BIO-RAD</i> (München, Deutschland)
Proteinstandart	<i>Fermentas/Thermo scientific</i> (Dreeich, Deutschland)
Roscovitin	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
Rothiphorese	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
SuperSignal West Pico Substrate (ECL-Kit)	<i>Thermo scientific</i> (Dreeich, Deutschland)
T4-Ligase	<i>New England Biolabs</i> (Ipswich, USA)
T4-Ligasenpuffer (10x)	<i>New England Biolabs</i> (Ipswich, USA)
TEMED	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Transferrin	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)

Chemikalien	Hersteller
Tris	<i>Applichem</i> (Darmstadt, Deutschland)
Triton X-100	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Tryptanblau	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
Trypsin/EDTA (0,5%/0,2% in PBS)	<i>PAA</i> (Cölbe, Deutschland)
Tween 20	<i>Applichem</i> (Darmstadt, Deutschland)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Whatman-3MM-Filterpapiere	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Zellkulturschalen	<i>Greiner Bio One</i> (Frickenhausen, Deutschland)

2.1.2 Verwendete Gerätschaften und entsprechende Software

Gerätschaften und Software	Hersteller
Peqlab Cyclone 35 PCR-Maschine	<i>Peqlab Biotechnologies</i> (Erlangen, Deutschland)
2000 TM UV-Transilluminator	<i>BioRad</i> (München, Deutschland)
Biophotometer	<i>Eppendorf</i> (Hamburg, Deutschland)
Sicherheitssterilwerkbank- <i>Heraguard</i>	<i>Heraeus</i> (Hannover, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	<i>Hecht-Assistent</i> (Sondheim, Deutschland)
Kryoröhrchen	<i>Nunc</i> (Wiesbaden, Deutschland)
Einfrierbox	<i>Nunc</i> (Wiesbaden, Deutschland)
Binokular- <i>Stemi 2000</i>	<i>Zeiss</i> (Jena, Deutschland)
<i>Heraeus Megafuge 1.0R</i> (Zentrifuge)	<i>Heraeus</i> (Hannover, Deutschland)
ELISA-Reader <i>TECAN Rainbow</i>	<i>TECAN</i> (Crailsheim, Deutschland)
easyWINbasic Software	<i>TECAN</i> (Crailsheim, Deutschland)
<i>Bio-Rad</i> Mini-PROTEAN 3 cell-System	<i>BioRad</i> (München, Deutschland)
Stromgerät-Power Pac 300	<i>Bio-Rad</i> (München, Deutschland)
XCell <i>SureLock</i> Mini-Cell-Elektrophoresekammern	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Mini Trans-Blot Cell Setup	<i>BioRad</i> (München, Deutschland)
Hyperfilme TM ECL TM	<i>Amersham Bioscience</i> (Freiburg, Deutschland)
Hypercassette TM	<i>Amersham Bioscience</i> (Freiburg, Deutschland)
Cruix 60 Maschine	<i>Agfa</i> (Köln, Deutschland)

Gerätschaften und Software	Hersteller
Rotationsschüttler-Rotator SB3	<i>Stuart</i> (Staffordshire, UK)
Thermomixer <i>compact</i>	<i>Eppendorf</i> (Hamburg, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop-Axioplan200	<i>Zeiss</i> (Jena, Deutschland)
40fach-Objektiv	<i>Zeiss</i> (Jena, Deutschland)
63fach-Öl-Objektiv	<i>Zeiss</i> (Jena, Deutschland)
AxioVersionSE64 Rel. 4.8 Software	<i>Zeiss</i> (Jena, Deutschland)

2.1.3 Verwendete Kits

Kit-Name	Hersteller oder Firma
NucleoSpin Plasmid Kit	<i>Marchery Nagel</i> (Düren, Deutschland)
BCA-Proteinassay Kit	<i>Thermo scientific</i> (Dreeich, Deutschland)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	<i>QIAGEN</i> (Hilden, Deutschland)
Gel-Extraktions Kit	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
PCR Purification Kit	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Platinum <i>Pfx</i> DNA Polymerase-Amplifizierungs-Kit	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)

2.1.4 Plasmide

Plasmid	Herkunft
pcDNA 3.0	<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe, Deutschland
pEGFP	<i>Clontech</i> , Mountain View, USA
His-SUMO1 und His SUMO2 in pcDNA3.0	zur Verfügung gestellt von Frau Prof F. Melchior
His-Ubiquitin (x8) in pcDNA3.0	zur Verfügung gestellt von Frau Prof F. Melchior
mTFP in CB6	zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Bunt
mVenus N-Terminal und C-Terminal in CB6	zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Bunt
p35_L151/152N in pcDNA	zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Krumova
p35_D288A/L289A in pcDNA	zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Krumova
rAAVs-His ₆ -SUMO2 Virus	zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Krumova

2.1.5 Oligonukleotide

Alle aufgeführten Primer wurden von *Sigma* (Steinheim, Deutschland) erworben.

2.1.5.1 Oligonukleotide für die gerichtete Mutagenese-PCR

Name	Sequenz
p35_K246-Fw	ATCTCCTACCCGCTCAGGCCCTTCCTGGTGGA
p35_K246-rev	TCCACCAGGAAGGGCCTGAGCGGGTAGGAGAT
p35_K290-Fw	CACACAGGTCTTCTCCGACCTGAGGAACGAGAGCGGCCAGGA
p35_K290-rev	TCCTGGCCGCTCTCGTTTCTCAGGTCGGAGAAGACCTGTGTG
p35_F248-Fw2	GAGATCTCCTACCCGCTCAAGCCCGCCCTGGTG
p35_F248-rev	CTTGCAGCTCTCCACCAGGGCGGGCTTGAGCGG
p35_E292-Fw	GACCTGAAGAACGCGAGCGGCCAGGAGGACAAG
p35_E292-rev	CTTGTCTCCTGGCCGCTCGCGTTCCTCAGGTC

2.1.5.2 Oligonukleotide für die FRET/FLIM Konstrukte

Name	Sequenz
p35_BamHI_HApcDNA-Fw	AAAGGATCCATGGGCACGGTGCTGTCC
p35-SUMO2_p35-rev	GGACATCGCTGCCGATCCAGGCCTAGGAGAGCCG
p35-SUMO2_SUMO2-Fw	GCAGCGATGTCCGAGGAGAAGCCCAAGGAGGGTGTG
SUMO2-p35_SUMO2-rev	CGCTGCCGCTGCCGTCTGCTGTGGAACACGTCGAT
SUMO2-p35_p35-Fw	GCAGCGCAGCGATGGGCACGGTGCTGTCCCTGTCT
pcDNA-rev	TGGCTGGCAACTAGAAGGCACAGTCGA
SUMO2-NotI-Fw	AAATTTGCGGCCGCGGGCGGCATGTCCGAGGAGAAGCCCAAGGAG
p35-NotI-Fw	TTTAAAGCGGCCGCGATGGGCACGGTGCTGTCCCTGTCT
Cdk5-NotI-rev	AAATCGCGGCCGCGGGCGGACAGAAGTC
Fw-NotI-Cdk5	GCGGCCGCGATGCAGAAATACGAGAACTGG
HindIII-SUMO2-D7-Fw	AAAAAGCTTATGTCCGAGGAGAAGCC
SUMO2-D7-XhoI-rev	AAACTCGAGCTACGTCTGCTGCTGGAA

2.1.5.3 Oligonukleotide für Sequenzreaktionen

Name	Sequenz
seq pcDNA3 fw 826	TAACTAGAGAACCCACTGCTTA
T7-seq-primer	TAATACGACTCACTATAGGG
pcDNA-seq	TCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCA
p35-seq-rev	GCCCACGGTGGCCGCGCCATCCTC

Name	Sequenz
SUMO2-seq-rev	CGTCCTGCCCCGCCACCTTCAG
Teal-seq-Fw	GACTACAACAAGGTGACCGTTTACGAG

2.1.6 Antikörper

Antikörper	Firma oder Hersteller
Anti-p35 C-19	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Santa Cruz, USA
Anti-p35 N-20	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Santa Cruz, USA
Anti-Cdk5 C8	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Santa Cruz, USA
Anti-HA Klon 11 16B12	<i>Covance</i> , California, USA
Anti-c-myc Klon 9E10	zur Verfügung gestellt von Frau Prof F. Melchior
Anti-SUMO1 (GMP1)	<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe, Deutschland
Anti-SUMO2-goat	zur Verfügung gestellt von Frau Prof F. Melchior
Histone H1.0 [34]	<i>Abcam</i> , Cambridge, UK
Histone H1 (phospho)	<i>Abcam</i> , Cambridge, UK
Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz	Cy2, Cy3, Alex488, Cy5 gekoppelt an anti-mouse, anti-rabbit und anti-goat IgGs (<i>Dianova</i> , Hamburg, Deutschland)
Sekundärantikörper für Western-Blot Analyse	HRP-gekoppelte anti-mouse, anti-rabbit und anti-goat IgGs (<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Santa Cruz, USA)

2.1.7 Zelllinien und kompetente Zellen

	Beschreibung
<u>CSM14.1</u>	immortalisierte, nitrostriatale Ratten-Zelllinie [143]
<u>HEK 293</u>	transformierte Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenepithelzellen [144] (<i>ATCC</i> , Wesel, Deutschland)
<u>DH5α</u>	chemisch kompetente <i>Escherichia coli</i> -Stamm (<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe, Deutschland)

2.1.8 verwendete Puffer und Lösungen

2.1.8.1 Puffer für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese und für die Western-Blot-Analyse

Elektrophoresepuffer: 192 mM Glycin, 0.1% SDS, 25 mM Tris-HCl, pH 8.3

Blockpuffer für die Western-Blot-Analyse: 5% Milchpulver in TBS-T Puffer

(20x) MOPS-Puffer: 1 M MOPS, 1 M Tris-HCl, 20 mM EDTA, 2% SDS

(2x) SDS-Probenpuffer: 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 0.15 M DTT, 20% Glycerol, 0.01% Bromphenol Blau

Transferpuffer: 192 mM Glycin, 20% Methanol, 25 mM Tris-HCl, pH 8.3

TBS-T Puffer für die Western Blot-Analyse: 0.1% Tween in TBS, pH 7.6

TBS-Puffer: 10 mM Tris, 150 mM NaCl

2.1.8.2 Colloidale Coomassie Färbelösungen

Fixierlösung: 40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure

Farbstoff-Stocklösung: 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blau G250, 1% Ortho-Phosphorsäure, 10% (w/v) Ammoniumsulfat

Entfärbungslösung: 1% Essigsäure

2.1.8.3 Puffer für die Minipräparation von DNA

P1 Puffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A

P2 Puffer: 200 mM NaOH, 1% SDS

P3 Puffer: 3 M Natriumacetat, pH 5.5

2.1.8.4 Medien für Bakterien

Alle Medien für die Arbeiten mit Bakterien wurden autoklaviert.

LB-Medium (Luria-Bertani): 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl

LB-Platte: LB-Medium, 2% (m/v) Agar

SOC-Medium: 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 20% Glucose

Einfrier-Lösung: 15% Glycerin, 50 mM CaCl₂ versetzt

Antibiotika: Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (20 µg/ml)

2.1.8.5 Medien für die Zellkultur

Kulturmedium: DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium, PAA, Cölbe), 10% (v/v) FBS, 1000 U/ml Penicillin/ 1000 µg/ml Streptomycin

Einfrier-Medium: 10% DMSO in FCS

2.1.8.6 DNA-Calciumphosphat Transfektionspuffer

Lösung A: 2,5 M CaCl₂ in Millipore-Wasser

Lösung B: 1.4 mM Phosphate (Natriumsalz der H₂PO₄⁻ oder Natriumchlorid der HPO₄²⁻), 42 mM HEPES, 15 mM D-Glucose, 10 mM KCl, 274 mM NaCl. Der pH-Wert wurde bei Raumtemperatur mit NaOH oder HCl auf 7.05 eingestellt.

2.1.8.7 Puffer für die Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (Ni-NTA-Pulldown) von His₆-konjugierende Proteinen

Lysispuffer für denaturierenden Ni-Pulldown: 6 M Guanidin-HCl, 100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 und 10 mM Imidazol 10 mM NEM; 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin A

Waschpuffer A: 6 M Guanidin-HCl, 100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 und 10 mM Imidazol, 10 mM NEM; 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin A

Waschpuffer B: 8 M Harnstoff, 100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM Imidazol, 10 mM NEM; 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin A.

Waschpuffer C: 8 M Harnstoff, 100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 6.3, 10 mM Imidazol, 10 mM NEM; 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin A und 0,2% Triton X-100.

Waschpuffer D: 8 M Harnstoff, 100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 6.3, 10 mM Imidazol, 10 mM NEM; 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin A und 0,1% Triton X-100.

Waschpuffer E: 8 M Harnstoff, 100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 6.3, 10 mM NEM; 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin A und 10 mM Imidazol

Elutionspuffer: 8 M Harnstoff, 100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 6.3, 10 mM NEM; 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin A und 250 mM Imidazol

2.1.8.8 Puffer und Lösungen für Immunohisto/Zytochemie Färbungen (IHC/ICC)

Blockpuffer für IHC: 10% NGS, 0.1% Triton X-100 in PBS.

Blockpuffer für ICC: 5% NGS, 1% BSA, 0.1% Triton X-100 in PBS.

Antikörper-Inkubationspuffer: 2% NGS, 0.1% Triton X-100 in PBS.

Waschpuffer für IHC: 0.1% Triton X-100 in PBS.

DAPI-Lösung: 2 µg/ml in PBS

2.1.8.9 weitere Puffer und Lösungen

6x-DNA-Ladepuffer: 20% Glycerol, 60 mM EDTA, pH 8.0; 0.6% SDS, 0.003% Bromphenolblau.

PBS-Puffer (Phosphatpuffer): 3 mM NaH₂PO₄; 7 mM Na₂HPO₄ und 130 mM NaCl

TE-Puffer: 0.01 M Tris-HCL, pH 7.4, 1 mM EDTA, pH 8.0

TBE-Puffer: 42 mM Borsäure, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0

TBS-Puffer: 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0 (für Antigen-Rückgewinnung)

CMF-Medium: 90% (v/v) destilliertes Wasser, 10% (v/v) HBSS

2x Kinase-Puffer: 0.5 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 25 mM Hepes, pH 7.0, 0.4 mM ATP

2.2 Methoden

2.2.1 Klonierungstechniken

Bevor eine Klonierung erfolgen konnte, wurden alle erforderlichen Klonierungsschritte, inklusive des Primerdesigns, mit der GENTle Software simuliert und durchgeführt. Dabei wurden Sequenzen von Restriktionsschnittstellen der Enzyme in die Primer eingebaut, welche für die spätere Klonierung eines Fragmentes in ein Zielplasmid notwendig waren. Die cDNAs wurden mittels der entworfenen Primer während einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Reaktion amplifiziert und anschließend durch die entsprechend eingebauten Restriktionsstellen in ein Plasmid einkloniert.

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) an Plasmid-DNA

[145]

Die Reaktion wurde mit folgendem Ansatz durchgeführt:

200 ng	<i>template</i> -DNA
400 nM	Primer 1 (<i>forward</i>)
400 nM	Primer 2 (<i>reverse</i>)
200 µM	dNTPs
1x	<i>Pfx</i> Amplifications Puffer
1x	PCR _x <i>Enhancer</i> Puffer
1 µl	<i>Pfx</i> DNA-Polymerase (2.000 Units/ml)
25-50 µl	dH ₂ O

Die DNA-Amplifikation erfolgte in 30-35 Zyklen in einer Peqlab Cyclone 35 PCR-Maschine. Die Anzahl der Zyklen, die einzelnen Temperaturschritte und die jeweilige Dauer der Zyklen mussten für jedes DNA-Fragment und den dafür eingesetzten Primer neu gewählt werden. Ein Zyklus bestand aus folgenden Einzelschritten:

95°C	30 sec	Denaturierung
50-65°C	30 sec	Anlagerung
68°C	1 min per kb	Elongation

Vor Beginn des ersten Zyklus wurde 1-3 Minuten bei 95°C denaturiert. Nach Beendigung der gewünschten Zyklen schloss sich ein letzter Elongationsschritt von 10 Minuten bei 72°C an. Der PCR-Ansatz wurde je nach Größe des PCR-Produktes auf ein 0,8-1%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Durch das Gel-Extraktion-Kit wurde die DNA aus dem Agarosegel isoliert.

2.2.1.2 Gerichtete Mutagenese mit Hilfe einer PCR

Bei dieser Methode wurde eine Polymerase mit einer Korrekturlese-Funktion (*proof-reading*) genutzt, die das komplette Plasmid elongiert. Die Primer wurden komplementär zueinander erstellt und enthielten eine punktuelle Sequenzveränderung (Mutation), die in die originale DNA-Sequenz eingebaut werden sollte. Dabei wiesen sie mindestens 20 überhängende Basen auf jeder Seite der Mutation auf, damit der Mutationsbereich nicht durch die Polymerase korrigiert wird. Es wurde eine geringe Anzahl an PCR-Zyklen (z.B. 12) gewählt, da die Polymerase nach mehr als 10 Minuten pro Zyklus an Aktivität verliert.

Die PCR-Reaktion beinhaltete die *proof-reading* DNA-Polymerase *Pfx*, 10-20 ng *template* DNA, 1 μ M sense und antisense Primer, 1.6 mM dNTPs, 1x *Pfx* Amplifikations-Puffer (10x), 1x *PCR-Enhancer* Puffer (10x) in einem Gesamtvolumen von 25 μ l. Im PCR-Programm inbegriffen waren folgende Schritte: 1.) im ersten Zyklus wird die DNA für 5 Minuten bei 95°C denaturiert; 2.) In den 12 Amplifizierungszyklen wurde zuerst der DNA-Doppelstrang denaturiert, anschließend lagerten sich die Primer bei 50°C für 30 Sekunden an und im Elongationsschritt wurden bei 68°C für 2 Minuten pro Kilobase des DNA-Plasmids Nukleotide angelagert.

Am Ende wurde der PCR-Ansatz auf 4°C gekühlt und anschließend für 1 Stunde bei 37°C mit dem *DpnI* Enzym inkubiert. Dieses Enzym erkennt und schneidet ein methyliertes GATC Sequenzende (dam [methyliertes Adenin]) eines DNA-Stranges, welches parental aus einem Dam positiven *E.coli* Stamm isoliert wurde. Daher stammte die *template* DNA aus einem Dam⁺ *E.coli* Stamm. Das geschnittene PCR-Produkt wurde direkt in chemisch kompetente *E.coli* Zellen DH5 α transformiert.

Das PCR-Produkt ist eine lineare Doppelstrang-DNA mit Einzelstrangenden (*nick end*), welches nach der Transformation in *E.coli* Zellen DH5 α als zirkuläre Doppelstrang-DNA (*nick end repair*) vorlag. Die transformierten DH5 α -Zellen wurden auf Agar-Platten mit 100 μ g/ml Ampicillin ausplattiert, später wurden einige Klone gepickt und zur Analyse der Mutationsstelle sequenziert.

2.2.1.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur enzymatischen Spaltung von DNA wurde der Restriktionsansatz in einem Volumen von mindestens 10 μ l bei der für das Enzym optimalen Temperatur für 1-2 h inkubiert, wobei pro μ g DNA ca. 10 U des jeweiligen Restriktionsenzym eingesetzt wurden. Pro Restriktionsansatz wurde 5-10 μ g Plasmid-DNA oder das PCR-Produkt eingesetzt.

2.2.1.4 Gelelektrophorese von DNA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarose-Gelelektrophoresen durchgeführt. Je nach Größe der Fragmente wurden Gele mit 0,8-1,5% (w/v) Agaroseanteil verwendet. Die Agarose wurde in 50-150 ml 1x TBE-Puffer durch Kochen gelöst, mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,07 μ g/ml) versetzt und in den Gelträger überführt. Nach vollständiger Verfestigung des Gels wurde die Elektrophorese in einer mit 1x TBE-Puffer gefüllten Gelkammer bei konstanter Spannung von 100 Volt durchgeführt.

Die DNA wurde mit Ladepuffer gemixt und die Längenstandards parallel mitgeführt, um die DNA-Fragmente zu bestimmen. Dabei wurde der 1 kb DNA Marker und 100 bp DNA Marker genutzt. Die DNA-Banden wurden mit Hilfe von UV-Licht bei einer Wellenlänge von

302 nm im Gel-Dokumentation 2000TMUV-Transilluminator durch die Verwendung der Quality-One-Software (Version 4.2.1) dargestellt.

2.2.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des Gel Extraktions Kits. Die über ein Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten und nach dem Lösen der Agarose die DNA selektiv an Partikeln aus Silicagel in Anwesenheit von chaotropen Salzen gebunden und anschließend in Wasser eluiert. Dies erfolgte nach dem Protokoll der Firma *Invitrogen*.

2.2.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit einem Biophotometer bestimmt. Nach Abgleichen der Nullwerte gegen Wasser (H₂O) konnte das Absorptionsmaximum der gemessenen Nukleinsäuren (bei 260 nm) bestimmt und gleichzeitig Verunreinigungen durch Proteine (bei 280 nm) bzw. Salze (bei 320 nm) festgestellt werden. Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte über das Lambert'sche Gesetz.

2.2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation wurde zur Verknüpfung von linearer Plasmid-DNA mit DNA-Fragmenten genutzt. Dafür wurde die Vektor-DNA und das PCR-Produkt in einem 1:1 und/oder 1:3 molaren Verhältnis gemischt und anschließend mit dem 1x T4-DNA-Puffer und der T4-DNA-Ligase (1 µl = 2000 Units) in einem Gesamtvolumen von 10-20 µl versetzt. Die T4-DNA-Ligase katalysiert dabei die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden der linearisierten DNA, so dass doppelsträngige DNA-Moleküle entstehen. Die Ligation wurde für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz in chemisch kompetente DH5α Zellen transformiert.

2.2.1.8 Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA

Für die Transformation wurden zunächst die kompetenten DH5α Zellen 5 Minuten auf Eis aufgetaut, 5-20 µl des Ligationsansatzes zu 150 µl kompetenten Zellen hinzugefügt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen einem Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden ausgesetzt und sofort wieder für 2-3 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zufügen von 1 ml SOC-Medium (20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 20% Glucose) wurde der Transformationsansatz für 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden 50-200 µl der transformierten Zellen auf geeigneten Agar-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (20 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.9 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur schnellen Isolierung rekombinanter Plasmide wurde zunächst eine geringe Menge an Plasmid-DNA präpariert. Hierzu wurden 4 ml einer angeimpften Übernachtskultur bei 11 000 x g zentrifugiert und das Pellet in 250 µl P1-Lösung (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl P2-Puffer (200 mM NaOH, 1% SDS - modifizierte alkalische Lyse) und 250 µl P3-Lösung (3 M Natriumacetat, pH 5.5 - Neutralisierung) wurde die Probe bei 16 100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 0.7 Volumen Isopropanol versetzt, und bei 16 100 x g wurde die Plasmid-DNA gefällt. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 20-50 µl H₂O aufgenommen.

Häufig wurde das Mini-Kit von *Macherey & Nagel* (Düren, Deutschland) verwendet, um eine hohe Reinheit der Plasmid-DNA zu erlangen. Anhand des Firmenprotokolls wurde die Aufreinigung realisiert. Zusammengefasst beinhaltet die Prozedur die alkalische Lyse, bei der die Bakterienwand aufgebrochen wird, der entstehende Zellschrot sammelte sich im Pellet an. Anschließend wird mit dem Überstand weiter gearbeitet. Dieser Überstand beinhaltet die Nukleinsäure. Die RNA wird durch die RNase degradiert, anschließend wurde die Plasmid-DNA an eine Silikatgelmatrix gebunden und mit einer hochkonzentrierten Salzlösung gewaschen, um die chromosomale DNA und die Proteine zu entfernen. Zum Schluss wurde das Plasmid mittels 1x TE-Puffer (0.01 M Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, pH 8.0) eluiert. Die so isolierte Plasmid-DNA wurde meist zur Sequenzierung eingesetzt.

2.2.1.10 Herstellung von Bakterien-Glycerin-Stocks

1 ml einer Bakteriensuspension wurden mit 100 µl sterilem Glycerin versetzt, gut gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.11 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurde das Plasmid-Maxi Kit der Firma *Invitrogen* verwendet. Die DNA wird dabei über Säulen aus dem Kit affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die Aufarbeitung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.2.1.12 Ethanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen

Die Ethanolfällung wurde eingesetzt, um DNA zu konzentrieren und sie von Salzverunreinigungen zu befreien. Zur Fällung von Plasmid-DNA wurde der Ansatz mit 1/10 Volumen 3 M Kaliumacetat-Essigsäure, pH 5.0 – 5.3 versetzt. Die Präzipitation erfolgte durch die Zugabe von 2 Volumen eiskaltem 100%igen Ethanol und sofortigem Mischen der Lösungen. Der Ansatz wurde für 20 Minuten bei 4°C und 16 100 x g zentrifugiert und der

Überstand entfernt und das Pellet/Präzipitat mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneutem zentrifugieren bei 4°C für 10 Minuten wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur für 5-10 Minuten getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in einem gewünschten Volumen H₂O oder TE-Puffer resuspendiert.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zellkultur eukaryotischer Zellen

Humane embryonale Nieren (HEK) 293 Zellen wurden in DMEM-Medium mit Zusatz von 10% FBS und 1x Penicillin/Streptomycin in 10 cm-Zellkulturschalen bei 37°C, 5% CO₂ Zugabe, 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach Erreichen einer ungefähren 70%igen Konfluenz der Zellen wurden diese gesplittet und mit einer Zellzahl von 120 000 Zellen pro Platte für 5 Tage ausplattiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde zudem auch mit CSM14.1 neuronaler Zellkultur gearbeitet. CSM14.1 sind neuronale immortalisierte, nigrostriale Rattenzellen [143], die als dopaminerge Zelllinie charakterisiert sind, da sie die dopaminergen Marker Nurr1, Tyrosin Hydroxylase und ALDH2 exprimieren. Die CSM14.1-Zellen wurden in DMEM-Medium mit Zusatz von 10% FBS und 1x Penicillin/Streptomycin in 10 cm-Zellkulturschalen bei 32°C, 5% CO₂ Zugabe und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Wenn die CSM14.1-Neurone nahezu konfluent (ca. 90%) gewachsen waren und wurden sie in einer definierten Zellzahl ausplattiert (passagiert).

Die Arbeitsschritte für die Ausplattierung beider Zelllinien erfolgten unter sterilen Bedingungen, was durch das Arbeiten unter einer biologischen Sicherheitssterilwerkbank gewährleistet wurde. Das Kulturmedium wurde dafür abgesaugt, die Zellen mit PBS einmalig gewaschen, 1 ml auf 37°C vorgewärmte 0.05% Trypsin/ 0.02% EDTA Lösung auf die Zellen gegeben und anschließend für 2-3 Minuten bei 37°C (HEK293) oder 32°C (CSM14.1) inkubiert. Dies führte zum Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturschale. Die Zellen wurden dann mittels einer Pipette gemischt, von der Zellkulturschale zusätzlich mechanisch abgelöst und in ein 15 ml Falcon überführt. Die Aktivität des Trypsins wurde durch die Zugabe von 5 ml DMEM-Medium mit 10% FBS und 1x Penicillin/Streptomycin gestoppt. Anschließend wurden die Zellen bei 1000 x g bei Raumtemperatur für 4-5 Minuten abzentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes wurde das Zellpellet in einem gewünschten Volumen von Zellkulturmedium resuspendiert. Zuletzt wurden die HEK 293-Zellen oder CSM14.1-Zellen auf eine neue Zellkulturschale mit definierter Zellzahl ausplattiert.

Für das Ausplattieren einer definierten Zellzahl wurde die resuspendierten Zellsuspension 1:10 mit Trypanblau verdünnt und die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop gezählt.

Für die Kryokonservierung und Revitalisierung von eukaryotischen Zellen wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70-90% mit PBS gewaschen, trypsiniert und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in einer entsprechenden Lösung von 90% FBS/10% DMSO resuspendiert. Dieses Gemisch wurde in ein Kryoröhrchen überführt und nach 7 Tagen Aufbewahrung in einer Einfrierbox bei -80°C in flüssigen Stickstoff konserviert. Zur Revitalisierung wurden die Zellen schnell aufgetaut, in vorgewärmtes Kulturmedium überführt, abzentrifugiert und in Kulturmedium erneut resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen über Nacht in Kulturschalen oder -flaschen inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium zur vollständigen Entfernung des DMSO gewechselt.

2.2.2.2 Kultur von primären kortikalen Neuronen

Für die Kultivierung der kortikalen Neuronen wurden Coverslips in 24-Well-Platten mit Polyornithin/Laminin-Beschichtung verwendet. Dafür wurden die im Durchmesser 10 mm großen Coverslips in Ethanol gewaschen, anschließend mit einem Bunsenbrenner abgeflammt und mit einer Polyornithin-Lösung (500 μl /Well, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in sterilem Wasser) für 12-24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Coverslips in den 24-Well-Platten zweimal mit 500 μl sterilem Wasser pro Well gewaschen und dann mit Laminin (500 μl /Well, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Neurobasalmedium (NBM)) über Nacht in einen Inkubator bei 37°C , 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Vor der Präparation der kortikalen Neuronen wurde die Coverslips zweimal mit Neurobasalmedium gewaschen und zusätzlich dann mit 500 μl pro Well des kortikalen Kulturmediums (1x Penicillin/Streptomycin, 0.5 mM L-Glutamin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Transferrin, 1x B27 in Neurobasalmedium) versetzt.

Für die kortikale primäre Neuronenkultur wurde von 18 Tage alte Wista-Rattenembryonen präpariert. Dafür wurden adulte weibliche Wista-Ratten durch CO_2 -Begasung getötet und anschließend die Uteri entnommen. Diese wurden in CMF-Medium transferiert. Die daraus entnommenen Embryonen wurden abermals in neues eiskaltes CMF-Medium überführt. Unter einem Binokular wurden die Embryonen dekapitiert, das Gehirn herauspräpariert und anschließend der Cortex isoliert. Die präparierten kortikalen Gewebestücke wurden in eiskaltes CMF-Medium überführt und zentrifugiert (200 x g, 4°C , 4 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und das Gewebepellet in 1 ml Trypsin (0.25%) für 12 Minuten in einem 37°C warmen Wasserbad unter gelegentlichen Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurde das Trypsin mit Hilfe von 1 ml eiskaltem fötalem Kälberserum (FBS) inaktiviert. Die Suspension wurde mit 50 μl DNase1 (10 mg/ml) vermischt und erneut zentrifugiert (200 x g, 4°C , 4 Minuten). Das Pellet wurde in Neurobasalmedium mit 1x Penicillin/Streptomycin, 0.5 mM L-Glutamin,

5 µg/ml Transferrin, 1x B27 resuspendiert und durch anschließende Triturierung durch die 1000 ml Pipette mechanisch dissoziiert. Nach der Zentrifugation bei 200 x g und 4 °C für 4 Minuten lang wurde das Pellet in 1 ml eiskaltem kortikalem Kulturmedium resuspendiert und in die Polyornithin/Laminin beschichtete 24-Well-Platten mit einer Dichte von 250 000 Zellen pro Well ausplattiert. Die Zellen wurde in kortikalem Kulturmedium bei 37°C, 5% CO₂ Zugabe und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.2.3 Transfektionsverfahren eukaryotischer Zellkulturen

Mit der Transfektion durch die Verwendung von exogenen Plasmiden mit eukaryontischen Promotoren konnte die Expression der gewünschten Proteine in den Zielzellen gewährleistet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Transfektionsverfahren verwendet. Bei dem Transfektionsverfahren mit Lipofectamin 2000 wird mit Hilfe von kationischen Liposomen die Plasmid-DNA in die Zellen gebracht. Hingegen entsteht bei der Calcium-Phosphat-Präzipitation zwischen DNA und ausfallenden Calciumphosphat eine Bindung, wodurch Kristalle gebildet werden. Diese werden dem Medium der Zellkultur zugeben. Durch Endozytose werden die Kristalle mit der DNA von den Zellen anschließend aufgenommen.

Transfektionen ausgewählter Proteine in eukaryontischen Zellen werden zum Nachweis der subzellulären Lokalisation von Proteinen und Fusionsproteinen genutzt und zum Nachweis von Interaktionen (FRET/FLIM, Koimmunpräzipitation und Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie) verwendet.

2.2.3.1 Lipofectamin 2000TM Transfektion

Die transiente Transfektion mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 wurde übereinstimmend mit den Instruktionen des Herstellers verwendet. Dabei konnte im Falle der CSM14.1 Zellkultur eine 60-90% Transfektionseffizienz erlangt werden.

Für die verschiedenen Experimente wurden die CSM14.1-Zellen einen Tag vor der Transfektion mit definierten Zellzahlen (60 000 – 200 000 Zellen pro Well) in 12-Well-Platten mit DMEM-Medium plus 10% FBS und 1x Penicillin/Streptomycin ausplattiert. Wenn die adhärent wachsenden CSM14.1-Zellen eine Konfluenz von ca. 70-80% erreicht hatten, wurde die Transfektion mit dem Tranfektionsreagenz Lipofectamin 2000 durchgeführt. Dabei wurde für jeden Transfektionsansatz 0.8 -1.6 µg DNA in 50 µl DMEM-Medium ohne Zusätze verdünnt und entsprechend 2-4 µl Lipofectamin 2000 in 50 µl DMEM-Medium ohne Zusätze gemischt. Nach einer Inkubationszeit des Lipofectamin-Medium-Mixes von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die DNA-Suspension mit dem Lipofectamin-Mix in einem

Gesamtvolumen von 100 µl vereint und erneut 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit bildete sich der DNA-Lipofectamin-Komplex. Der in 100 µl Gesamtvolumen enthaltende DNA-Lipofectamin-Komplex wurde anschließend zu den 900 µl/Well DMEM-Medium ohne Zusätze der 12-Well-Platte zugegeben. Nach einer vier- bis sechs-stündigen Inkubationszeit wurde das Medium entnommen und durch frisches Kulturmedium (DMEM-Medium plus 10% FBS und 1x Penicillin/Streptomycin) ersetzt. Für die Expression der exogenen Proteine wurden die CSM14.1-Zellen für 24-48 Stunden bei 32°C, 5% CO₂ Zugabe und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.2.3.2 DNA-Calcium-Phosphat Transfektionsverfahren

Die humanen HEK 293-Zellen wurden mit Hilfe der DNA-Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode transfiziert. Dabei wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion auf 10 cm-Kulturschalen in einer Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ ausplattiert. Die Zellen mussten am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 60-70% aufweisen. Für eine 10 cm-Kulturschale mit $1,5 \times 10^6$ HEK 293-Zellen wurde 5-12,5 µg DNA mit 2,5 M CaCl₂-Lösung in purem Wasser (Lösung A) verdünnt, gemixt und auf ein Gesamtvolumen von 0.5 ml gebracht. Zu der DNA-Suspension in Lösung A wurde 0,5 ml 2x HBS (Lösung B: 1.4 M Phosphat, 50 mM HEPES) zu gegeben, mit Hilfe einer 1000 µl Pipette gemixt und für 50 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser kurzen Zeit bildete sich das Präzipitat, welches die Lösung leicht trüb erscheinen lässt. Die Präzipitationslösung von einem Gesamtvolumen von 1 ml wurde zu 8 ml 2% FBS-DMEM-Medium hinzu gegeben, welches vorher auf 37°C angewärmt wurde. Auf 10-cm Kulturschalen in diesem Medium wurden die HEK 293-Zellen für 10-12 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Danach wurden die Zellen für weitere 24 Stunden in DMEM-Medium mit 10% FBS und 1x Penicillin/Streptomycin inkubiert.

2.2.4 Identifizierung von sumoylierten Zielproteinen

2.2.4.1 Identifizierung sumoylierter Proteine mit Hilfe der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Ubiquitin und Ubiquitin-ähnliche Proteine („*ubiquitin-like modifiers*“ (Ubls)), wie SUMO, sind hoch dynamische und reversible Modifikationsformen. Daher ist nur ein sehr kleiner Teil an Proteinen sumoyliert, was die Erfassung und den Nachweis eines sumoylierten Proteins besonders problematisch macht. Daher wird die Aufreinigung bzw. Anreicherung von sumoylierten Proteinen notwendig. Durch die Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie können sumoylierte Proteine über His₆-SUMO-Proteine und Ni²⁺-NTA-Agarose angereichert und anschließend eluiert werden [146].

36 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in Guanidin-Lysispuffer (6 M Guanidin-HCl, 0.1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0 und 10 mM Imidazol, 10 mM NEM, Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A mit jeweils 1 µg/ml Konzentration zugegeben) lysiert und sonifiziert. Die Lysate wurde für 10 Minuten bei 1400 x g abzentrifugiert. Die Ni²⁺-NTA beads wurden vor der Inkubation mit den Lysaten einmal mit destillierten Wasser gewaschen und anschließend mit Guanidin-Puffer equilibriert. Danach wurden die Lysate mit der Ni²⁺-NTA-Agarose unter ständiger Rotation bei 4 °C in Poly-Prep-Chromatographiesäulen für 2-3 Stunden inkubiert, um die His-gebundenen Proteinkomplexe an die Ni²⁺-NTA beads zu binden. Zur Eliminierung von ungebundenen Material wurden die Ni²⁺-NTA-Agarose ausgiebig mit folgenden Waschpuffern gewaschen:

Waschpuffer A: 6 M Guanidin-HCl, pH 8.0

Waschpuffer B: 8 M Harnstoff, pH 8.0

Waschpuffer C: 8 M Harnstoff, pH 6.3 und 0,2% Triton X-100.

Waschpuffer D: 8 M Harnstoff, pH 6.3 und 0,1% Triton X-100.

Waschpuffer E: 8 M Harnstoff, pH 8.0

Zusätzlich wurden allen Puffern 100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 10mM Imidazol, 10 mM NEM und Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A mit jeweils 1 µg/ml Konzentration zugegeben. Die an die Ni²⁺-NTA-Agarose gebundenen Proteinkomplexe wurde mit Hilfe von 250 µl Elutionspuffer (8 M Harnstoff, 100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 und 250 mM Imidazol) eluiert. Danach wurden die Eluate mittels Methanol/Chloroform-Fällung präzipitiert. Die dadurch entstandenen Proteinpellets wurden Luft getrocknet und in 2x SDS Probenpuffer resuspendiert.

2.2.4.2 Identifizierung von sumoylierten Proteinen in vivo aus transgenen His₆-SUMO2-Mausgehirnlysaten durch die Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Das Gehirn von His₆-SUMO2-transgenen Mäusen wurde in Stickstoff eingefroren, in einem eisgekühlten Mörser pulverisiert und in 2 ml Puffer B (beschrieben in 2.2.4.1.) aufgenommen und homogenisiert. Anschließend wurde die Probe mit dem Puffer B auf ein Gesamtvolumen von 8 ml gebracht. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 100 000 x g für 45 Minuten, wobei überschüssige Zellreste sich als Pellet ansammelten. Der Überstand wurde abgenommen und erneut bei 100 000 x g für diesmal 15 Minuten zentrifugiert, wodurch alle Rückstände an Zellresten aus dem Überstand entfernt werden sollten. Anschließend wurden 250 µl Aliquots des Überstandes als Ladekontrolle (*input/total protein*) abgenommen und mittels Methanol/Chloroform-Fällung präzipitiert. Die Rest-Gehirn-Lysatmenge wurden mit 250 µl

Ni²⁺-NTA-Agarose für 3 Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die Ni²⁺-NTA-Agarose wurde ausgiebig mit verschiedenen Puffern (B,C,D,E beschrieben in 2.2.4.1) gewaschen und die gebundenen Proteinkomplexe wurden mit 500 µl Puffer B, welcher 250 mM Imidazol enthielt, unter 10-15 minütigem Schütteln bei Raumtemperatur eluiert. Danach wurden die Proben präzipitiert (Methanol/Chloroform-Aufreinigung), die Proteinpellets anschließen mit 50 µl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und über ein 4-12% NuPAGE Bis-Tris-Gradientengel aufgetrennt.

2.2.4.3 Der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) / Fluoreszenz-Lebensdauer-Imaging-Mikroskopie (FLIM)

Die CSM14.1-Zellen wurden mit verschiedenen mTFP-p35 Konstrukten, mit Cdk5-mVenus oder mVenus-SUMO2 transfiziert (siehe 2.2.3.1.). Das mTFP ist ein monomerisches Teal-Fluoreszenzprotein, welches eine Anregungswellenlänge von 458 nm aufweist und in der Arbeitsgruppe um Day als exzellentes Donorfluorophor in Kombination mit mVenus für Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) beschrieben wurde [147].

In den Experimenten zum Nachweis der Sumoylierung von p35 in CSM14.1-Zellen, wurden zwei unterschiedliche SUMO-Konstrukte verwendet. Zum einen das gereifte SUMO mit einem C-terminal liegenden Di-Glycin-Motive (mVenus-SUMO2) über welches SUMO an ein Zielprotein konjugiert wird und zum anderen wurde als Negativkontrolle ein SUMO-Konstrukt benutzt, welches durch die Mutation des Di-Glycin-Motivs nicht mehr kovalent an ein Zielprotein binden konnte (mVenus-SUMO2Δ7).

Nach 24-stündiger Kultivierung wurden die Zellen 15 Minuten mit 4% PFA in PBS fixiert, daraufhin gewaschen und mit Mowiol eingedeckelt. Die Fluoreszenz-Lebensdauer-Imaging-Mikroskopie (FLIM) wurde mit Hilfe eines inversen konfokalen Mikroskops (Leica DMI 6000 inversen konfokalen Mikroskop) ausgestattet mit einem Plan Fluor 63fachen-NA-1.32-Öl-Objektiv analysiert. Gekoppelt wurde das Mikroskop an einen Mai Tai HP mit einem integrierten Spectra-Physik 14 W Millennia® Pump-Laser, der eine Wellenlänge von 300 nm in einem gebräuchlichen Einstellungsbereich von 690 bis 1040 nm mit über 2.5 Watt der durchschnittlichen Energie und einem Puls bis zu 120 Femtosekunde lieferte. Die Photonen wurden durch die Nutzung des TCSPC *photon counting module board* (SPC-830, Becker und Hickl GmbH, Berlin, Deutschland) erfasst und durch den hochsensitiven HPM 100-50 Hybrid PMT angesammelt. Das mTFP wurde bei einer Wellenlänge von 840 nm mit einer Zwei-Photonen-Anregung und durch einen Filter 480/40 M die Emissionsphotonen gemessen. Für 120 bis 180 Sekunden wurden diese Photonen bis zu einer Grenze von 1000 bis 1500 Photonen pro Pixel erfasst. Die Fluoreszenzabnahme des Donorfluorophors (mTFP) wurde mit Hilfe der SPCIMAGE Software (Becker und Hickl GmbH) gemessen, diese wurde exportiert und mit einem ImageJ Algorithmus analysiert, welcher ausdrücklich dafür entwickelt wurde um den

einfach oder mehrfach exponentiellen Abbau der Fluoreszenz zu analysieren. In den Histogrammen wurden die durchschnittlichen Veränderungen der Fluoreszenz-Lebensdauer von den verschiedenen Bedingungen graphisch dargestellt, welche durch ImageJ abgeleitet und statistisch mit Igor Pro (Wave matrices) analysiert wurden.

2.2.5 Proteinchemische Techniken

Durch die Western Blot-Analyse oder durch immunzytochemische Färbung können über Primärantikörper spezifische Proteine und ihre entsprechende Menge in unterschiedlichen Proben bestimmt werden. 1.) Die Proben von rekombinant exprimierten Proteinen, Geweben oder Zellen werden in homogenisierenden Puffern lysiert, die die Proteine vor Degradation/Abbau schützen; 2.) Die Proteinproben werden über Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und für die Detektion mit Antikörpern auf Membranen übertragen; 3.) Die Membranen werden mit exemplarischen Proteinen (wie zum Beispiel Milchproteine) behandelt, damit die unbesetzten Stellen auf der Membran geblockt werden; 4.) Es werden Primärantikörper genutzt, die fähig sind die spezifischen Proteine zu erkennen; 5.) Ein sekundärer mit HRP-konjugiertem Antikörper (Zweitantikörper), der den Primärantikörper erkennt, wird auf die Membran gegeben und anschließend durch die Verwendung von einem ECL-Reagenz detektiert.

2.2.5.1 Isolierung von Gesamtprotein aus Zellkulturen

36 Stunden nach einer Transfektion wurde die 10 cm-Zellkulturschale (Konfluenz > 80%) mit PBS gewaschen und anschließend 0,5 - 3 ml entsprechender Lysispuffer zugefügt. Die adhären Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturplatte gelöst und in ein 15 ml-Falcon überführt. Für die Homogenisierung wurden die Lysate einem Ultraschall über 30 Sekunden von 41% Amplitude/der maximalen Leistung ausgesetzt, wobei die Zellen durch die Druckveränderung zum Platzen gebracht wurden. Zudem wurden die Zellmembranen durch die Salze und Detergenzien in dem Lysispuffer solubilisiert und Proteinkomplexe teilweise zerstört, wodurch die Proteine folglich frei vorliegen. Danach wurden die Proben zur weiteren Behandlung oder zur Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.2.5.2) in geeigneten Aliquots bei -80°C oder nach Aufbereitung bei -20°C gelagert.

2.2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Proteinbestimmung wurde der BCA-Protein-Test genutzt. Dieser beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der die Proteine in alkalischer Umgebung Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduzieren. Das Cu^{1+} -Kation bildet über eine Chelatbindung mit zwei Molekülen des BCAs einen lilafarbenen Komplex (Bicinchoninsäure), welcher wasserlöslich ist und eine stark lineare Absorption bei

der Wellenlänge von 562 nm mit entsprechend ansteigender Proteinkonzentration hat. Die Messwerte lagen in einem Konzentrationsbereich zwischen 3 µg/ml und 200 µg/ml.

Die BCA-Reaktion wurde in einer 96-Well-Platte bei Raumtemperatur dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung der Proteinlysate erfolgte in einer Doppelbestimmung. Dafür wurden die BCA-Lösungen A und B aus dem BCA-Assay Kit in einem Verhältnis von 1:50 gemischt und 200 µl der Mixtlösung pro benötigte Anzahl an Wells der 96-Well-Platte pipettiert. 1-2 µl der zu messenden Proteine wurden der Mixtlösung in den Wells zugefügt und gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 562 nm in einem ELISA-Reader TECAN *Rainbow* und mit der easyWINbasic Software gemessen. Durch die Verwendung eines Proteinstandards (BSA) in einem Konzentrationsumfang von 3 bis 200 µg/ml konnte eine Eichgerade erstellt werden. Durch lineare Regression wurde mit Hilfe des Microsoft Office 2010 Excel Software die unbekannte Proteinkonzentration der verwendeten Proben ermittelt.

2.2.5.3 Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung der denaturierenden Proteine anhand ihres Molekulargewichts erfolgte durch vertikale Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli. Polyacrylamid/Bis-Acrylamid im Verhältnis von 37,5:1 (Rothiphorese) bildete die Matrix für Tris-Glycin-SDS-Gele. Durch Zugabe von TEMED (Radikalerzeuger) und dem Ammoniumperoxid (APS – Start-Radikale) wurde die Polymerisationsreaktion gestartet und die Polymere miteinander vernetzt.

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurden zwei-Phasen-Gele verwendet, die sich hauptsächlich entsprechend der untersuchten Proteine aus einem 12%igen Trenngel und einem 5%igen Sammelgel zusammensetzten. Es wurde ein *Bio-Rad* Mini-PROTEAN 3 cell-System verwendet. Der Übergang von Sammelgel zum Trenngel mit einem pH-Sprung von 6.8 auf 8.8 diente der Fokussierung der Proteine.

Um das Molekulargewicht der geladenen Proteine bestimmen zu können, wurde als Molekularstandard der Dual-Protein-Marker verwendet und parallel zu den untersuchenden Proben auf das SDS-Gel geladen und laufen gelassen. Die Proteinproben wurden in SDS-Ladepuffer bei 5 Minuten bei 95°C erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt und in die Taschen der Gele geladen. Durch die Zugabe des SDS (1,4g SDS pro g Protein), was eine negative geladene Detergenz ist, werden die Polypeptidketten der Proteine durch die Anlagerung des SDS an die hydrophoben Regionen entfaltet. Da die Proteine auch negativ geladen sind, stoßen sie sich von den SDS-Molekülen ab und werden dadurch denaturiert. Die Denaturierung wird durch das DTT im SDS-Ladepuffer unterstützt, was die Disulfidbrückenbindungen in den Proteinen reduziert. Die erhöhte Dichte des Glycerol führt zum Absinken der Proteinprobe in

die Geltaschen. Die Proben wandern im elektrischen Feld zur Anode. Durch den Siebeffekt des Gelmaterials wandern kleine Moleküle schneller als große.

Die SDS-Gele wurden bei Raumtemperatur mit Tris-Glycin-Elektrophorese-Puffer in vertikalen Gelkammern (*Bio-Rad* Mini-PROTEAN 3 cell-System) und einem Stromgerät (Power Pac 300) bei anfänglich angelegten 80 Volt für 15 Minuten laufen gelassen. Dies ermöglicht ein sauberes Einlaufen der Proben. Anschließend wurde das Gel bei konstanten 100 Volt aufgetrennt. Das Gel wurde gestoppt wenn die Bromphenolblau-Bande das Ende der Kammer erreicht hatte.

Die NuPAGE Bis-Tris 4-12%ige Gradientengele für 2.2.4.2. wurden mit MOPS-Puffer in XCell *SureLock* Mini-Cell- Elektrophoresekammern laufen gelassen.

2.2.5.4 Western Blot-Analysen von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

[148, 149]

Für die Western Blot-Analyse wurde das dafür entwickelte Mini Trans-Blot Cell Setup von Bio-Rad verwendet. Um die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine immunologisch zu untersuchen, mussten diese zunächst auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden [150]. Dafür wurde das Polyacrylamid-Gel zwischen zwei Whatman-3MM-Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran gelegt. Alle Komponenten wurden vorher in Transferpuffer getränkt. Beim Aufbau wurden die Membran zur Anode hin und das Gel zu Kathode hin angeordnet. Der Transfer der Proteine erfolgte bei konstanten 100 Volt, 4°C für 60-90 Minuten.

2.2.5.5 Inkubation von membran-gebundenen Proteinen mit Antikörpern

Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran, wurde die Membran geblockt, wodurch eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers verhindert werden sollte. Dafür wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer Blocklösung (5% Magermilchpulver in 1x TBS-T Puffer) auf einem Kipp-Schüttler (Polymax, *Heidolph Instruments*) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bei einer für den jeweiligen Antikörper entsprechenden Verdünnung in 5% Milchpulver und 1x TBS-T Puffer bei 4°C über Nacht. Die Primärantikörper wurden wie folgt verwendet: anti-myc 9E10 (durch Affinitätschromatographie aufgereinigt), 1:1000; anti-p35 (C19), 1:300; anti-Cdk5 (C8), 1:300, anti-HA clone11, 1:1000 and anti-SUMO2, 1:500. Die Membran wurde dann 3x 10 Minuten mit TBS-T-Puffer gewaschen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung in 5% Magermilchpulver und 1x TBS-T Puffer) inkubiert. Alle Sekundärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:4000 und 1:3000 benutzt. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran erneut 3x 10 Minuten mit TBS-T Puffer gewaschen. Für die Detektion des sekundären Meerrettich-Peroxidase-(HRP)-markierten

Antikörpers wurde das ECL-Kit („enhanced“, verstärkte Chemolumineszenz) von *Thermo scientific* verwendet. Die ECL-Lösungen 1 und 2 wurden in einem 1:1 Verhältnis gemischt und für 3 Minuten auf eine abgetropfte Membran gegeben. Die Peroxidase am zweiten Antikörper verursachte durch eine enzymatische Umsetzung des Luminols (Bestandteil in der ECL-Lösung) eine Lichtreaktion, die als Chemolumineszenz bezeichnet wird. Für die Detektion der Chemolumineszenz wurden Autoradiographie-Filme (Hyperfilme™ECL™) verwendet, die für verschiedene Zeitspannen (empirisch ermittelt) auf die zwischen zwei Folien eingebettete Membran in eine Autoradiographie-Kassette (Hypercassette™) gelegt wurden. Anschließend wurden die Filme in einer Cruix 60 Maschine (*Agfa*) entwickelt.

2.2.5.6 Methanol/Chloroform-Aufreinigung von Proteinen

Für die Aufreinigung von Proteinen aus Lösungen, die Detergenzien enthielten, wurde eine modifizierte Version der von Wessel und Flugge beschriebenen Methode verwendet [151]. Zu einer 250 µl Proteinlösung wurde 0.6 ml 100% Methanol und 0.25 ml 100% Chloroform zugegeben. Anschließend wurden die Proben gemischt und mit 0.6 ml Wasser versetzt. Diese Mischung wurde bei 9 300 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Es sind drei Phasen erkennbar. Die obere Phase wurde verworfen. Es wurde zu den in der Zwischenphase befindenden aufgereinigten Proteine und dem Rest erneut 0.6 ml Methanol zugegeben. Die Proteinmischung wurde erneut gevortext und bei 16 100 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die aufgereinigten Proteine im Pellet an der Luft getrocknet, um anschließend in SDS-Probenpuffer resuspendiert zu werden.

2.2.5.7 Koimmunpräzipitation

Mit Hilfe der Immunpräzipitation lassen sich Proteine gezielt aus einem Zellysate isolieren. Hierzu werden spezifische Antikörper benutzt, die an eine Matrix gebunden werden. Die Proteine binden somit über den Antikörper an die Matrix und können durch Zentrifugation von den übrigen Proteinen getrennt werden. Als Matrix wird normalerweise an Agarose oder Sepharose gebundenes Protein A, G oder L benutzt. Durch nachfolgende SDS-PAGE und Western Blot-Analysen lassen sich unter anderem Protein/Protein-Interaktionen nachweisen (Koimmunpräzipitation). Hierfür werden zwei verschiedene Antikörper verwendet, die für die beiden zu untersuchenden Proteine spezifisch sind. Der eine Antikörper wird für die Immunpräzipitation verwendet und an die Matrix gebunden, der jeweils andere wird für die Western Blot-Analyse eingesetzt.

Die HEK 293-Zellen wurden mit Plasmiden kodierend für His₆-Cdk5, HA-p35wt und verschiedene p35-Mutanten transfiziert und für 36 Stunden kultiviert. Für die Proteinlyse wurde das Kulturmedium (DMEM-Medium mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin) abgesaugt, die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und in NP-40-Puffer (PBS, pH 7.4, 1% NP-40,

0.5% Natriumdeoxycholat, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20 mM NaF, 1 mM PMSF, 0.5 mM DTT und Proteaseinhibitoren-Mix aufgenommen. Dadurch wurden die Proteine extrahiert (siehe dazu 2.2.5.1.)

Die Immunpräzipitation wurde gegen p35 und alle erforderlichen Inkubationsschritte bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Die lysierten Proben wurden für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf folgte für 5 Minuten bei 6 000 x g ein Zentrifugationsschritt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und davon die Proteinkonzentration der Proben mit Hilfe des BCA-Test (siehe dazu 2.2.5.2) bestimmt. Da einige Proteine unspezifisch an Sepharose®4 Agarose-Beads binden, wurde zur Entfernung dieser Proteine das Protein-Lysat zunächst mit vorgewaschenen Protein G-Sepharosekügelchen vorinkubiert. Dafür wurden 400 µg Protein mit 60 µl der Protein G beschichteten Sepharose®4B Beads gemischt und für 1 Stunde bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Das an die Sepharose gebundene Protein G stammte aus der Zellwand von Streptokokken-Stämmen und bindet an die Fc-Region der meisten Säugetier-Immunglobuline mit einer hohen Spezifität. Für die Koimmunpräzipitation wurden das Proteinlysate mit 3 µg des p35-C19 Antikörpers durchgeführt und für 4 Stunden bei 4°C in einem Rotationsschüttler (Rotator SB3) inkubiert. Während dessen wurde die Protein G-Sepharose-Beads für die Koimmunpräzipitation (KoIP) vorbereitet. Pro KoIP wurden je 60 µl der Protein G-Sepharosekügelchen mit 1 ml RIPA-Puffer (20 mM NaP, pH7.4; 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS und Proteaseinhibitoren-Mix) gewaschen, indem vorsichtig gemischt und anschließend bei 6 000 x g für 5 Minuten zentrifugiert wurde. Dann wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Protein-Antikörper-Gemisch zugegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Während dieser Zeit konnte p35 über den spezifischen Antikörper an die Sepharosekügelchen gebunden werden. Zur Sammlung der Protein-Antikörper-Komplexe wurden die Ansätze für 5 Minuten bei 6 000 x g zentrifugiert und der Überstand entnommen. Zum Waschen wurde jeweils 1 ml des RIPA-Puffers auf die G-Sepharose-Beads gegeben, vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Waschschrift wurde 3x wiederholt. Anschließend wurde mit 40 µl SDS-Probenpuffer auf die Sepharosekügelchen gegeben und für 5 Minuten bei 95°C unter leichtem Schütteln auf dem Thermomixer inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Protein enthaltende Überstand wurde entnommen und für die nachfolgende Western Blot-Analyse eingesetzt. Für den Nachweis des p35/Cdk5-Komplexes wurde ein Antikörper gegen p35-C19 und Cdk5-C8 verwendet.

2.2.5.8 Bestimmung der Cdk5-Aktivität

Zuerst wurden die HEK 293-Zellen mit entsprechenden Plasmiden transfiziert und anschließend in einem nativen Puffer (300 mM NaCl pH 8.0, 50 mM NaH₂PO₄, 0.05% Tween 20 und 10 mM Imidazol) lysiert. Das His₆-Cdk5 bildete mit dem Wildtyp (HA-p35wt) oder den Fusionsproteinen von p35 (HA-p35-SUMO2 oder HA-SUMO2-p35) Komplexe, die mit Hilfe der nativen Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden sollten, dadurch wird die enzymatische Aktivität der zu reinigenden Komplexe erhalten. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden daher bei 4°C oder auf Eis durchgeführt, um die Denaturierung der Proteine und/oder Komplexe zu verhindern. Die Lysate wurden mit 250 µl vorgewaschener Ni²⁺-NTA-Agarose für 1 Stunde bei 4°C rotierend inkubiert. Mit den darauf folgenden Waschschrritten wurden mit 0.5 – 1 ml MOPS-Puffer (40 mM MOPS pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF und 1x Proteaseinhibitoren-Mix) die ungebundenen Proteine oder Komplexe entfernt. Die gebundenen p35/Cdk5-Komplexe wurden mittels 500 - 250 µl eines Elutionspuffers (20 mM Tris pH 7.0, 150 mM NaCl und 250 mM Imidazol) eluiert. Danach erfolgte die Kinasereaktion. Die Proteinkonzentrationen der Komplexe wurden mit Hilfe des BCA-Tests (siehe 2.2.5.2.) bestimmt und auf 100 ng in einem Gesamtvolumen von 25 µl eingesetzt. Dazu wurde der Komplex entsprechend mit einem Verdünnungs-Puffer (20 mM Tris pH 7.5, 0.05% NP-40, 10% Glycerol) und dem 2x Kinase-Puffer (10 mM MgCl₂, 50 mM HEPES pH 7.0) mit den finalen Konzentration der Zusätze von 0.01 mg/ml BSA, 0.5 mM DTT und verschiedenen Proteaseinhibitoren verdünnt. Anschließend wurde der Reaktion 0.1 mg/ml Histon H1 zugegeben und durch die Zugabe von ATP (finale Konzentration von 0.4 mM) die Kinasereaktion gestartet. Anschließend wurde die Reaktion bei 30°C für 45 Minuten inkubiert. Gestoppt wurde die Phosphorylierung des Histon H1 durch die verschiedenen p35/Cdk5-Komplexe mit der Zugabe von 2x SDS-Puffer und 5-minütigem Erhitzen bei 95°C.

2.2.6 Histologische Techniken

2.2.6.1 Indirekte Immunfluoreszenz an Gehirnschnitten

Die verwendeten Rattengehirne wurden transkardial perfundiert. Dies ist die allgemein bekannte Methode zur Fixierung immunhistologischer Proben. Dadurch kann die Grundgewebestruktur erhalten und die Proteine und deren Peptidkonformation stabilisiert werden. Die anschließende Vorfixierung des Gewebes in 4%igem Para-Formaldehyd (PFA) über Nacht und die nachfolgende drei-tägige Inkubation in 30%iger Sucroselösung verursacht eine Dehydrierung des Gewebes. Dieses konnte anschließend bei -80°C gelagert werden. Zur Herstellung von Cryoschnitten wurden die Gehirne in eine Cryomatrix eingebettet und koronare Schnitte von 16-30 µm Dicke der Cerebellumregion oder der Substantia-Nigra-Region mit

einem Leica Cryostat (Leica CM 3050 s) angefertigt. Die entsprechenden Gehirnschnitte wurden in eine mit PBS und 0.02% Natriumazid-Lösung befüllten 24-Well-Platte gegeben. Wenn eine „schwimmende“ Färbung von 30 µm dicken Gehirnschnitten (Substantia-Nigra) durchgeführt werden sollte, verblieben diese in der oben beschriebenen 24-Well-Platte. Die 16 µm dicken Cerebellum-Gehirnschnitte konnten direkt auf einen Objektträger gezogen und anschließend darauf gefärbt werden. Die Schnitte wurden in PBS-T-Puffer (0.1% Triton X-100 in PBS) gewaschen und anschließend für 6 Stunden bei 60°C in PBS-Lösung, pH 9.0, inkubiert. Dieser Schritt diente dazu, das PFA aus dem Fixierungsschritt zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Schnitte für 1 Stunde in Blockpuffer (1x PBS-T und 5% NGS, 1% BSA). Für vier Tage wurde anschließend der Primärantikörper mit den Rattengehirnschnitten in einer feuchten Kammer inkubiert. Dafür wurden die Antikörpern entsprechend in immunhistologischer Färbelösung (IHC-Lösung: PBS-T und 2% NGS) verdünnt. Der GMP1-SUMO1 Antikörper wurde in einer 1:100- und der anti-p35 Antikörper in einer 1:10-Verdünnung verwendet. Nach 3-maligem 30-minütigen Waschen der Schnitte mit PBS-T-Puffer wurden die an Alexa488- und Cy3-Fluorophore gekoppelte Sekundärantikörper (1:250 in IHC-Lösung) für zwei Tage bei 4 °C inkubiert. Die ungebundenen Sekundärantikörper wurden anschließend in 3x 30-minütigen Waschschritten mit PBS-T-Puffer entfernt. Die 30 µm Schnitte wurden auf die Objektträger gezogen, eine Stunde bei 37°C getrocknet und anschließend, wie die 16 µm Schnitte, mit 20 µl Mowiol eingebettet.

2.2.7 Methoden zur subzellulären Lokalisation eines Proteins

2.2.7.1 Immunzytochemische Färbung eukaryotischer Zellen

Die CSM14.1-Zellen wurden wie in 2.2.3.1. beschrieben mit Plasmiden transfiziert und bis zu einer 80%igen Konfluenz auf Glas-Coverslips (ø 15 mm) in 12 Well-Platten im angegebenen Medium kultiviert. Die Zellen wurden nach 24-48 Stunden einmal mit PBS gewaschen und in 4% Formaldehyd in PBS für 15 Minuten fixiert. Nach Permeabilisierung der Zellmembran für 5 Minuten in 0,1% Triton X-100 in PBS und für 5 Minuten in 50 mM Glycin in PBS wurden die Zellen kurz in PBS gewaschen und für 30-60 Minuten bei Raumtemperatur mit 5% „normal goat serum“ (NGS)-Ziegen Serum und 1% BSA in PBS inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (p35-C19 Antikörper; 1:100 oder HA.11 Antikörper; 1:1000) in PBS mit 2% NGS über Nacht bei 4°C oder für 3-4 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Die Zellen wurden 5 Minuten in PBS gewaschen und mit dem jeweiligen Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung (Alexa488- und Cy3-Sekundärantikörper; 1:250 in IHC-Lösung) für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach intensivem Waschen in PBS wurden in die Kerne der Präparate angefärbt, indem 1 ml DAPI-Lösung (2µg/ml) für 1 Minute auf die Zellen gegeben wurde. Anschließend wurden die Präparate nach mehrmaligem Waschen mit Mowiol eingedeckelt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan200) mit Hilfe eines 40fach-Objektivs oder eines 63fach-Öl-Objektivs wurden die immunZytochemischen Präparate fotografiert.

2.2.7.2 Lokalisationsanalysen von p35 in CSM14.1-Zellen

Durch die Lipofectamin 2000 Transfektion (siehe 2.2.3.1.) wurden die verschiedenen Kombinationen von HA-p35wt, HA-p35-SUMO2 und Cdk5-GFP in neuronalen CSM14.1-Zellen transfiziert. Anschließend wurden alle CSM14.1-Zellen fixiert und immunZytochemisch gefärbt (siehe dazu 2.2.7.1). Die Lokalisation von HA-p35wt und HA-p35-SUMO2 in den Neuronen (CSM14.1) wurden durch ein Fluoreszenzmikroskop (Axioplan200) und der AxioVersionSE64 Rel. 4.8-Software erfasst. Die Auswertung der Fluoreszenzbilder erfolgte verblindet. Die Lokalisation von p35 wurde in drei verschiedene Kategorien unterteilt: Nukleär (Nuk), cytoplasmatisch/perinukleär (Cyto) und gleichmäßig verteilt (gleichmäßig).

Als weitere Betrachtung wurden die CSM14.1-Zellen zusätzlich in Kombination von HA-p35-SUMO2 und Cdk5-GFP oder einer dominant-negativen Cdk5 Mutante (D/N Cdk5-GFP) transfiziert. Nach 24 Stunden wurde die CSM14.1-Zellen mit HA-p35-SUMO2 und Cdk5-GFP für 16 Stunden mit 20 µM Roscovitin behandelt. Bei Roscovitin handelt es sich um einen gebräuchlichen Cdk5-Aktivitätsinhibitor. Anschließend wurden die Zellen erneut einer ImmunZytologie (siehe dazu 2.2.7.1.) unterzogen und mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Axioplan200) und der AxioVersionSE64 Rel. 4.8-Software erfasst. Anhand der Verteilung von p35 wurden die Zellen in verblindet in drei verschiedene Kategorien unterteilt: Nukleär (Nuk), cytoplasmatisch/perinukleär (Zyto) und gleichmäßig (gleichmäßig) lokalisiert.

3 Ergebnisse

Die Sumoylierung von p35 wurde erstmals von Frau Dr. Petranka Krumova im Rahmen ihrer Dissertation 2009 gezeigt. Dabei wurden rekombinante Enzyme (E1- aktivierende Enzym (Aos1/Uba2), E2- konjugierendes Enzym (Ubc9) und verschiedene E3 Ligasen (PIAS1, PIAS_{xx}, BP2ΔFG und IR1+M) verwendet, die für die Sumoylierung notwendig sind. Die Sumoylierungsreaktion *in vitro* wurde mit einem rekombinanten p35/Cdk5-Komplex (Millipore, Temecuca, CA, USA) und rekombinanten SUMO1 oder SUMO2 Proteinen rekonstruiert. Es konnte eine robuste, starke SUMO1-Konjugation von p35 nachgewiesen werden.

3.1 Nachweis der Sumoylierung von p35 in der humanen Zelllinie HEK 293 mittels der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Um die Sumoylierung von p35 in einem zellulären System zu untersuchen wurden die HEK 293-Zellen durch die Calcium-Phosphat-Transfektionsmethode mit HA-p35wt und His₆-SUMO1, His₆-SUMO2 und als Kontrolle mit einem Leervektor (pcDNA3.0) transfiziert. Die Zellen wurden unter denaturierenden Bedingungen mit entsprechenden Puffern lysiert und freies SUMO, sowie SUMO-konjugierte Proteine, durch die Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie isoliert. Eine spezifische kovalente Bindung von SUMO2 mit p35 konnte in den Eluaten identifiziert werden. Das His₆-SUMO2-konjugierte p35 besitzt mit ~ 55 kDa ein höheres Molekulargewicht als p35 allein (35 kDa) (Abbildung 3.1.). Es wurde daher in den nachfolgenden Zellexperimenten die Modifikation von p35 durch SUMO2 untersucht.

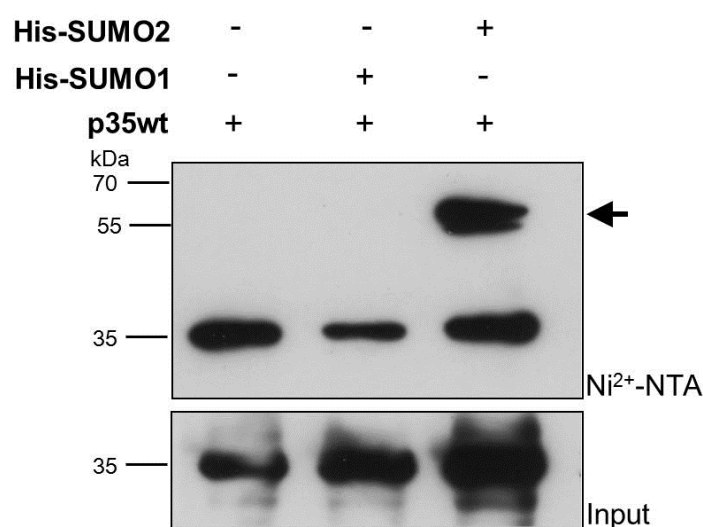


Abbildung 3.1 Sumoylierung von p35 in HEK 293-Zellen.

Freies SUMO und SUMO-Konjugate wurden durch die Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie aus den in HEK 293-Zellen aufgereinigt, die p35wt mit His₆-SUMO1 oder His₆-SUMO2 exprimierten.

Anschließend wurden die Lysate auf Proteinebene durch den p35-C19 Antikörper analysiert. Eine ~ 55 kDa Bande wurde immunpositiv für p35 gezeigt, die die kovalente Bindung von SUMO2 an p35 verdeutlicht.

3.2 Nachweis von sumoyliertem p35 im zentralen Nervensystem

Für die Untersuchung von sumoyliertem p35 *in vivo* wurde in der vorliegenden Arbeit Gehirngewebe von transgenen His₆-SUMO2-Mäusen oder Wildtyp-Rattenhirne aus verschiedenen Entwicklungsstadien isoliert. Alternativ wurde eine primäre kortikale Zellkultur präpariert und mit dem His₆-SUMO2-AAV2-Virus transfiziert, um sumoyliertes p35 in Neuronen des zentralen Nervensystems nachzuweisen. Außerdem wurde die Lokalisation von endogenem p35 und endogenem SUMO1 in Gehirnschnitten untersucht.

3.2.1 Sumoylierung von p35 in den Gehirnen von transgenen His₆-SUMO2-Mäusen

Meist ist nur ein geringer Anteil eines bestimmten Proteins in einer Zelle oder in einem Gewebe sumoyliert. In der vorliegenden Arbeit wurden transgene His₆-SUMO2-Mäuse verwendet, um eine Sumoylierung endogener Proteine nachzuweisen. Damit sollten zum einen die mit SUMO2-konjugierten Proteine angereichert werden, um die Detektion der Sumoylierung zu erleichtern. Zum anderen erlaubt die Expression von His₆-konjugierten SUMO2 die Anwendung der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie unter stark denaturierenden Bedingungen, wodurch die hohe Isopeptidaseaktivität und damit auch die Dekonjugation von SUMO während der Aufreinigung inhibiert wird. His₆-SUMO2-transgene Mäuse zeigen nach der Geburt eine geringfügige Überexpression des SUMO2-Transgens durch einen Neuronenspezifischen Thy1.2 Promotor im zentralen Nervensystem (ZNS). Die 14 Tage alte transgene His₆-SUMO2-Mäuse wurden freundlicherweise von Frau Dr. Marilyn Triard (Max Plank Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen) zur Verfügung gestellt. Durch die Western Blot-Analyse wurde mit Hilfe des spezifischen p35-C19 Antikörpers versucht die Sumoylierung von SUMO2 mit p35 zu detektieren. Der verwendete p35-C19 Antikörper erkennt nicht nur humane, sondern auch ratten- und mausspezifische Proteinisoformen von p35. Es wurde die vergleichbare Gesamtmenge von p35 in den Gehirnllysaten von Wildtyp und transgenen Mäusen untersucht (Abbildung 3.2.). Dabei konnte nur ein unsumoyliertes p35 (*input* in Abbildung 3.2.) im Wildtyp und den His₆-SUMO2-transgenen Mäusen detektiert werden, vermutlich als Folge einer unspezifischen Bindung an die Ni²⁺-NTA-Agarose. In den Eluat der Wildtyp- und auch in den transgenen Gehirnllysatenproben konnte keine Bande von ~ 55 kDa, entsprechend für die p35 Sumoylierung, mit dem p35-Antikörper detektiert werden.

In den 14 Tage alten His₆-SUMO2-transgenen Mäusen ist kein sumoyliertes p35 detektierbar.

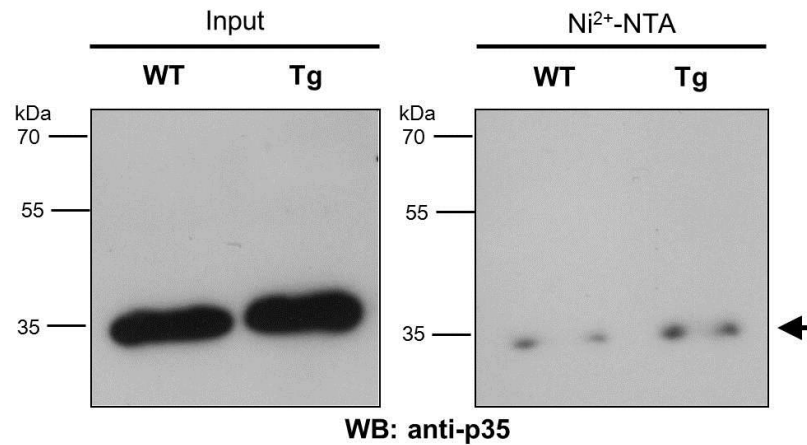


Abbildung 3.2 Untersuchung der Sumoylierung von p35 *in vivo* durch Verwendung einer transgenen His₆-SUMO2-Maus.

In 14 Tage alten Wildtyp (WT) und transgenen-His₆-SUMO2-Mäusen (Tg) wurden unter denaturierenden Bedingungen die SUMO-Konjugate mittels der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Durch den p35-C19 Antikörper konnte p35 allein in beiden Bedingungen (WT/Tg) nachgewiesen werden (*input*). Nach der Aufreinigung konnte mittels des p35-C19 Antikörpers keine SUMO-Modifikation von p35 in 14 Tage alten transgenen Mäusen nachgewiesen werden, welche an einer um ca. 15-20 kDa höheren p35-immunoreaktiven Bande zu erkennen gewesen wäre.

3.2.2 Sumoylierung von p35 in P1, P8 und P17 Wildtyp-Ratten

Die Proteinexpression von p35 wurde *in vivo* in post-mitotischen Neuronen nachgewiesen [103]. Da p35 eine entwicklungsabhängige Proteinexpression aufweist und in den P14 transgenen His₆-SUMO2-Mäusen keine Sumoylierung von p35 *in vivo* detektiert werden konnte, wurden in dem folgenden Experimenten zusätzlich Gehirngewebe von Wistar-Ratten in verschiedenen Entwicklungsstufen, also postnatalem Stadium von P1, P8 oder P17, auf Sumoylierung von p35 untersucht.

Die Gehirne aus P1, P8 und P17 alten Tieren wurden sofort nach der Präparation bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die Gehirne in einem Mörser homogenisiert, die Lysate aufgearbeitet und einer Immunpräzipitation unterzogen. Dabei wurde der SUMO1 Antikörper mit den P1, P8 und P17 Gehirnlysaten inkubiert. Anschließend wurde die Protein-Antikörper Mischung an Protein-G-Sepharose-4B gebunden und nach entsprechenden Waschschritten eluiert. Auf Proteinebene wurde mittels des p35-C19 Antikörpers die Gesamtmenge an sumoyliertem p35 in den Gehirnlysaten von P1-, P8- und P17-Ratten untersucht. In den

Immunpräzipitaten zeigte sich keine *in vivo* Sumoylierung von p35 in Form einer 55 kDa Bande (Abbildung 3.3. zeigt die Immunpräzipitation von P17 Rattengehirnen).

Durch die entwicklungsabhängige Expressionsveränderung von p35 ist die Sumoylierung von p35 *in vivo* schwer nachweisbar.

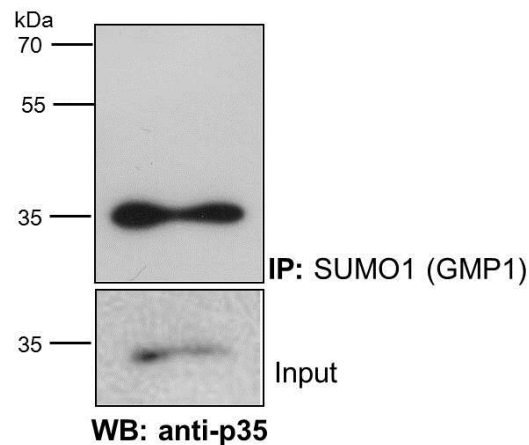


Abbildung 3.3 Analyse der Sumoylierung von p35 in verschiedenen Wildtypstadien von Rattenhirngeweben.

Aus verschieden alten Ratten P1, P8 und P17 wurden Gehirnlysate präpariert. Mit den P17 Ratten wurde die Immunpräzipitation mit dem SUMO1 (GMP1) Antikörper durchgeführt. Nach der Auftrennung der Proteine in SDS-Gelen, wurde auf Proteinebene durch den p35-C19 Antikörper die Gesamtmenge an p35 sowie die Immunpräzipitate untersucht. Bei den P17-Tieren konnte in der Gesamtmenge eine geringe p35-Expression beobachtet werden. In den Immunpräzipitaten konnte keine Bandenverschiebung von 35 kDa auf ~ 55 kDa detektiert werden.

3.2.3 Analyse der Sumoylierung von p35 durch Behandlung der primären kortikalen Zellkultur mit His₆-SUMO2-rAAV2-Virus

Neben der entwicklungsabhängigen Expression wird p35 in verschiedenen Gehirnregionen differentiell exprimiert. Hauptsächlich konnte im Cortex, Hippocampus und dem Cerebellum von Ratten eine p35-Expression ermittelt werden [123]. Es wurden primäre kortikale Zellkulturen präpariert. Nach 7 Tagen (DIV7) wurde diese Zellkultur mit einem rAAV2-His₆-SUMO2-Virus inkubiert. Das His₆-SUMO2-Transgen wurde unter dem humanen neuronenspezifischen Synapsin1 (hSyn1)-Promotor exprimiert [152].

Nach einer Virusinkubationszeit von vier Tagen und einer anschließend Expressionszeit von drei Tagen wurden die primären kortikalen Zellen lysiert und die Lysate durch die Ni²⁺-NTA-Chromatographie aufgereinigt. Die Proben wurden anschließend mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Auf Proteinebene wurde die Gesamtmenge an p35 in den Lysaten durch den p35-C19 Antikörper ermittelt. In den Eluaten des Nickel-Pulldowns konnte

auch mit dieser Methode keine Modifizierung von p35 mit SUMO2 in primären Neuronen gezeigt werden.

3.2.4 Immunhistologische Kolokalisationsuntersuchungen von endogenem p35 und endogenem SUMO1 in Rattengehirnschnitten

In den vorherigen Untersuchungen konnte kein sumoyliertes p35 in Neuronen nachgewiesen werden. p35, SUMO1 und SUMO2 werden während der Entwicklung des zentralen Nervensystems unterschiedlich stark exprimiert. Ein erhöhtes Expressionslevel zwischen dem E18- und P14-Stadium der Rattenentwicklung konnte für p35 beschrieben werden [123]. SUMO1- und SUMO2/3-modifizierte Proteine werden bis zum Entwicklungsstadium E12 der Ratte erhöht exprimiert. Zudem zeigen SUMO2/3-konjugierte Proteine einen zweiten Expressionshochpunkt bei der Geburt [92]. Somit konnte in den P1, P8 und P17 Wildtypmatten, wie auch in der transgenen His₆-SUMO2-Mause keine *in vivo* Sumoylierung von p35 detektiert werden, da nur ein geringer Anteil an p35-SUMO-Konjugaten für einen Nachweis der *in vivo* Sumoylierung von p35 vorhanden ist. Dennoch wurden Untersuchungen für eine mögliche Kolokalisation von p35 und SUMO durchgeführt, um die Lokalisation beider Proteine im Gehirn zu analysieren. Jedoch kann mit dieser Methode kein Beweis für eine kovalente Bindung zwischen p35 und SUMO erbracht werden.

Mit immunhistologischen Untersuchungen wurde anhand der Gehirnschnitte von P17-Ratten die Lokalisation von endogenem p35 und endogenem SUMO1 dargestellt. Dafür wurden Gehirnschnitte in der Cerebellumregion (16 µm Schnittdicke) oder der Hippocampusregion in der Substantia-Nigra-Ebene (30 µm Schnittdicke) (siehe 2.2.6.1.) verwendet. Es sollte gezeigt werden, dass in Form einer Kolokalisation der beiden für die Sumoylierung entsprechenden Proteine, die notwendige Nähe für die Sumoylierung in den Zellen gegeben ist, was eine Sumoylierung von p35 *in vivo* prinzipiell möglich macht. Im Bereich des Hippocampus- und in der Cerebellumregion wurde eine hauptsächlich nukleäre und geringe cytoplasmatische Lokalisation für das endogene SUMO1 detektiert. Das endogene p35 zeigte eine eher cytoplasmatische Lokalisation. Somit konnte nur eine geringfügige Kolokalisation von p35 und SUMO1 im Cytoplasma detektiert werden (Abbildung 3.4.). Ein Nachweis der Sumoylierung von p35 ist mit dieser Methode nicht möglich.

Die Sumoylierung von p35 konnte in den biochemischen Analysen mit Hilfe eines Überexpressionssystems detektiert werden. Im Gegensatz dazu ist die endogene Menge an sumoyliertem p35 in den Neuronen viel geringer. Die Sumoylierung von p35 könnte in sehr spezifischen Reaktionen involviert sein, wie zum Beispiel nur bei der Aktivierung der Cdk5, oder ist in speziellen Bereichen des Gehirns zu finden. Beispielsweise könnte die Sumoylierung

in den Synapsen lokalisiert sein. Der Nachweis der Sumoylierung von p35 ist schwierig, da die Sumoylierung zeitlich und räumlich in den Neuronen streng reguliert ist. Eine stark variierende Expression von p35 während der Gehirnentwicklung sowie in den Gehirnregionen und der Zellebene sowie durch die Regulation von p35 selbst, erschwert den Nachweis der SUMO-Konjugation von p35 *in vivo*. Die verschiedenen Modifikationsformen von p35, wie Phosphorylierung, Calpain-abhängige Spaltung zu p25, Ubiquitinierung und dem darauf folgendem Abbau von p35, ermöglichen den Nachweis von einer SUMO-Konjugation *in vivo* für p35 mit den ausgewählten Methoden im Rahmen dieser Dissertation nicht.

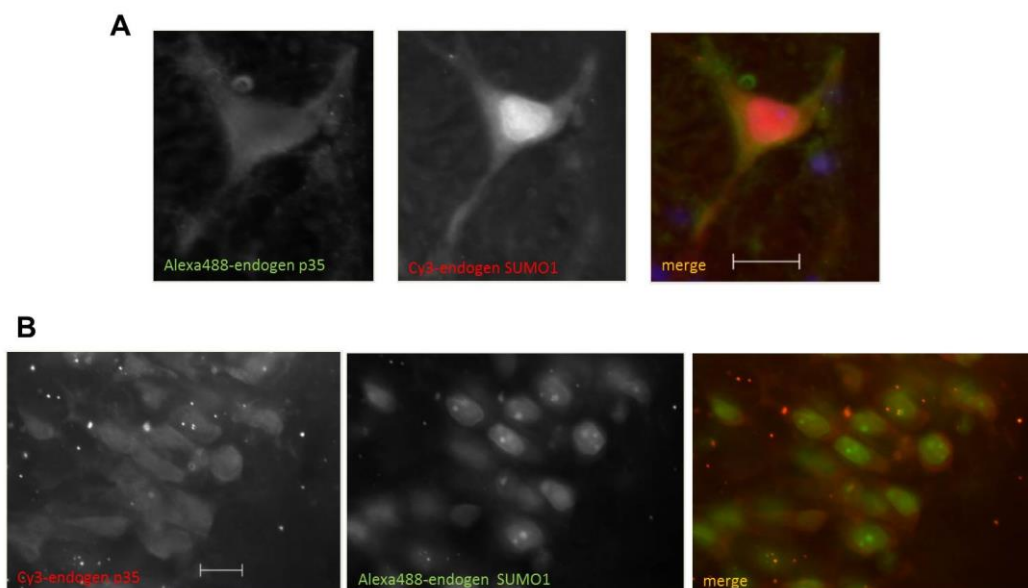


Abbildung 3.4 Nachweis der Kolo-kalisation von endogenem p35 und endogenem SUMO1.

Im Cerebellum (Kleinhirn) von P17-Rattengehirnschnitten (**A**) konnte durch den p35-C19 Antikörper und dem GMP1 (SUMO1) Antikörper eine geringe cytoplasmatische Kolo-kalisation von p35 und SUMO1 aufgezeigt werden. (**B**) Auch in der Hippocampusregion in der Ebene der Substantia-Nigra konnte mittels dieser Antikörper eine Kolo-kalisation von SUMO1 und p35 im Cytoplasma detektiert werden. Dadurch kann die Möglichkeit für die Sumoylierung von p35 nachgewiesen werden. Jedoch bedeutet die Kolo-kalisation nicht unbedingt eine Interaktion der beiden Proteine zum betrachteten Zeitpunkt. Für die Aufnahmen wurde ein Fluoreszenzmikroskopie Axioplan (Zeiss, Jena, Deutschland) mit einem 63fachen- Öl-Objektiv (**A**) oder einem 40fachen-Objektiv (**B**) verwendet.

3.3 Identifizierung der Sumoylierungsstellen von p35

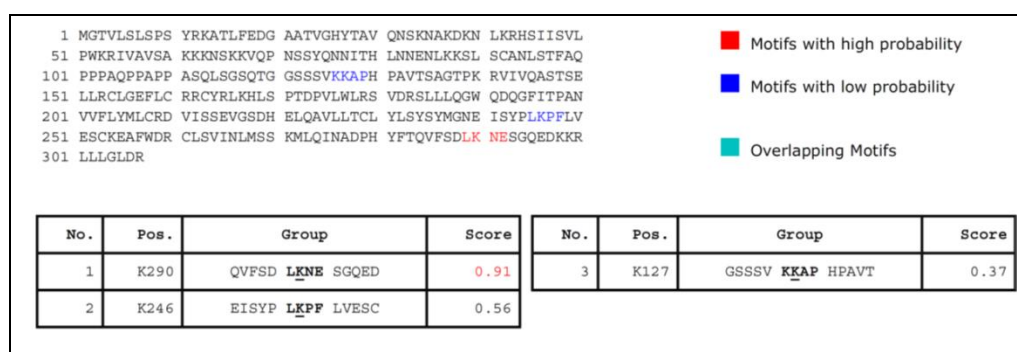
3.3.1 Identifizierung der spezifischen Sumoylierungsstellen von p35 durch gerichtete Mutagenese-Analysen

Für die kovalente Konjugation des aktivierten SUMO-Proteins wird ein Akzeptorlysin (K) innerhalb eines Substratproteins benötigt, welches oft in einer definierten Konsensussequenz

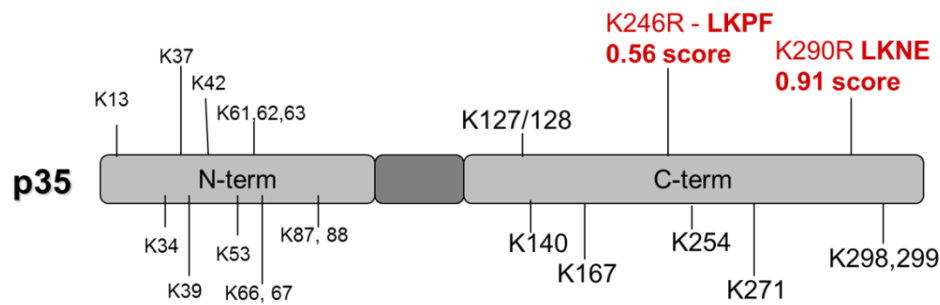
ψ KxE vorliegt [11, 31]. Darin steht ψ für eine große hydrophobe Aminosäure und x für jede beliebige Aminosäure. Jedoch konnten bisher auch SUMO modifizierte Lysine identifiziert werden, die sich nicht innerhalb einer solchen Konsensussequenz befinden, sondern innerhalb eines aus hydrophoben Aminosäuren bestehenden Motivs, welches in der Literatur als SUMO-interagierendes Motive (SIM) bezeichnet wird (siehe 1.1.1). Durch diese SIM-Motive wird eine nicht-kovalente Interaktion von SUMO mit einem Zielprotein ermöglicht [54-56].

Die Aminosäuresequenz von p35 weist 23 potentiell zur Verfügung stehende Lysine auf, die als Konjugationsstellen für SUMO-Modifikationen dienen können. Die Lysine 290 und 246 von p35 zeigten gemäß der bioinformatischen Analyse mittels SUMOplotTM (Abgent) die höchste Wahrscheinlichkeit für eine Sumoylierung (Abbildung 3.5. A, B). Lediglich das Lysin an der Position 290 (L-K²⁹⁰-N-E) von p35 liegt innerhalb des oben beschriebenen SUMO-Konsensusmotivs, wohingegen das Lysin 246 (L-K²⁴⁶-P-F) die strengen Konsensusmotivkriterien nicht erfüllt, dennoch einen hohen „SUMO score“ aufweist. Beide Stellen sind evolutionär konserviert (Abbildung 3.5.C). Diese Konsensussequenzen der möglichen SUMO-Bindungsstellen um die Lysine K246 und K290 sind in den homologen Proteinen oder Transkripten von p35 in verschiedenen Invertebraten (z.B.: *C. elegans*, *D. melanogaster* und *S. granularis*) enthalten. Das L-K-P-F Motiv des Lysinrestes 246 von p35 kommt exakt mit dieser Aminosäureabfolge in allen verglichenen Invertebraten vor, im Gegensatz dazu zeigt das potentielle SUMO-Motiv um K290 eine geringe Sequenzvarianz ohne jedoch seine SUMO-Konsensus-Eigenschaft zu verlieren (Abbildung 3.5.C).

A



B



C

Human	MGNEISYPLKPLVESCKEA	TQVFSDLKNESSGQE DKK
Mouse
Rat
Canis familiaris
Bos taurus
Danio rerioTS..T	...A...QK. EER
Xenopus laevisAG. D.	...A...GNRD EFS
DrosophilaDS. K	.E..TE..SCSQYH PTI
Sphaerechinus granularisED. DR	.D. L A...SFARS- ---
C. elegansIGNDRNT	SE.. T...HC. SS. ---

Abbildung 3.5 Die sumoylierten Lysine von p35 sind evolutionär konserviert.

Durch die Verwendung des Computerprogramms SUMOplotTM von Abgent (A) wurde die Möglichkeit der Sumoylierung der 23 Lysinreste von p35 kalkuliert. In (B) werden die Lysine mit geringer Wahrscheinlichkeit einer Sumoylierung in Schwarz dargestellt und die Lysinreste mit der höchsten Wahrscheinlichkeit (*score*) einer Sumoylierung in Rot hervorgehoben. (C) Beide Lysine und die entsprechenden SUMO-Konsensusmotive sind weitestgehend während der Evolution konserviert. Dies wurde anhand des Proteinsequenzvergleiches (*Alignment*) von unterschiedlichen Spezies ermittelt.

Um die potentiellen SUMO Konjugationsstellen von p35 experimentell zu ermitteln, wurden durch die zielgerichteten Mutagenese mittels PCR (siehe 2.2.1.2.) Einzelmutanten von p35 mit einem Aminosäureaustausch (Substitution) der Lysine (K) zu Arginin (R) generiert. Die entstandenen p35-Einzelmutanten wurden zusammen mit His₆-SUMO2 in HEK 293-Zellen koexprimiert. Nach der anschließenden Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie wurde das Sumoylierungsniveau der einzelnen Mutanten ermittelt. Dabei konnte eine Verringerung der SUMO-Konjugation von p35 in den K246R und K290R Mutanten im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden (Abbildung 3.6.). Dies weist daraufhin, dass die Lysine K246 und K290 als Modifikationsstellen für SUMO dienen können, jedoch konnte keine vollständige Reduzierung der SUMO-Modifikation von p35 beobachtet werden. Dafür wurde des Weiteren eine Doppelmutante von p35 generiert, die die Substitution beider Lysine (K246 und K290) zu Arginin beinhaltet. Im weiteren Text wird diese Mutante als 2KR-Mutante oder p35-2KR

bezeichnet. Mit der Doppelmutante von p35 konnte eine vollständige Reduktion der SUMO2-Konjugation von p35 nachgewiesen werden (Abbildung 3.6.). Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass diese beiden Aminosäurepositionen in p35 zusammen funktionell alternative SUMO-Konjugationsstellen von p35 sind. Interessanterweise liegen diese beiden Lysine auch im C-Terminus von p35 und sind im gefalteten Protein räumliche nah zueinander angeordnet [109].

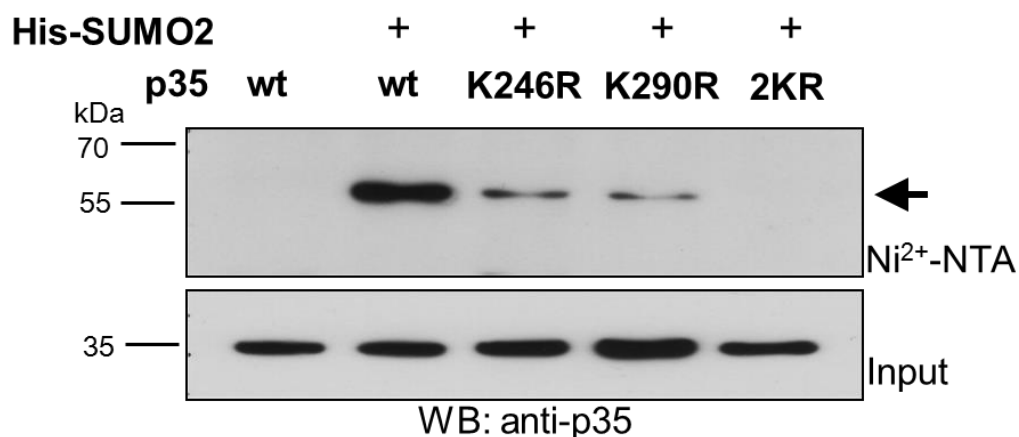


Abbildung 3.6 Die Sumoylierungsstellen von p35 sind die Lysine K246 und K290.

In den HEK 293-Zellen wurden His₆-SUMO2 und der Wildtyp (wt) sowie die entsprechenden Lysin- zu-Arginin Mutanten von p35 (p35-K246R und p35-K290R) koexprimiert. Die Einzelmutanten von den Lysinen 246 und 290 resultierten in einer signifikanten Reduktion des Sumoylierungslevels (Pfeil). Hingegen konnte mit der Doppelmutante der beiden mutierten Lysine von p35 (p35-2KR) eine vollständige Aufhebung der Sumoylierung von p35 beobachtet werden.

Bereits mehrfach konnte eine Verringerung der Sumoylierung von Zielproteinen durch die Mutation der sauren Aminosäure an der 2+ Position innerhalb des SUMO-Konsensusmotivs Ψ KxE gezeigt werden [60, 96]. Damit wird das SUMO-Konsensusmotiv eines Zielproteins zerstört ohne das für die eigentliche Konjugation notwendige Lysin zu verändern. Dieses Lysin kann somit prinzipiell weiterhin durch andere posttranslationale Modifikationsformen verändert werden. Um die zwei SUMO-Modifikationsmotive von p35 L-K²⁴⁶-P-F und L-K²⁹⁰-N-E zu deletieren, wurden die Aminosäuren Phenylalanin (Phe) und Glutaminsäure (Glu) mutiert. In der dabei generierten Doppelmutante (folgend als p35-2AA bezeichnet) wurden beide Phe248 und Glu292 Aminosäuren zu Alanin (A) substituiert. Diese p35-2AA-Mutante zeigte wie die p35-2KR-Mutante eine vollständige Reduktion der SUMO-Konjugation von p35 (Abbildung 3.7.). Mit diesem Ergebnis können die Lysine K246 und K290 als Sumoylierungsstellen von p35 bestätigt werden.

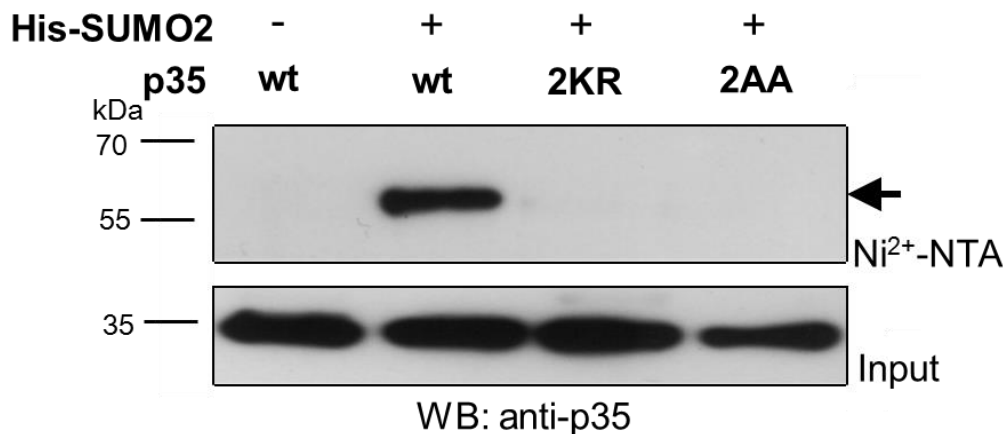


Abbildung 3.7 Überprüfung der Sumoylierungsstellen von p35 durch eine zweite defiziente p35-Mutante (p35-2AA).

Die Zerstörung der SUMO-Konsensusmotive um die Lysine K246 und K290 durch den Austausch der sauren Aminosäuren innerhalb der beiden SUMO Konjugationsstellen in der Doppelmutante p35-2AA (F248A und E292) resultierte ebenso in einer Sumoylierungs-defizienten p35 Mutante (Pfeil). Damit konnte wie auch schon mit p35-2KR eine vollständige Reduktion der Sumoylierung von p35 erreicht werden.

3.3.2 FRET/FLIM Analyse von sumoyliertem p35 in der neuronalen CSM14.1 Zellkultur

Ergänzend zu den bisherigen Untersuchungen wurde die Konjugation von SUMO2 mit p35 in morphologisch intakten neuronalen Zellen (CSM14.1) durch den Förster-Resonanzenergietransfer (FRET-Förster resonance energy transfer) mit Hilfe der Fluoreszenz-Lebensdauer Mikroskopie (FLIM-Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) untersucht.

Die FRET-Methode basiert auf einem Energietransfer von einem angeregten Donorfluorophor auf ein entsprechendes Akzeptorfluorophor. Notwendig dafür ist, dass sich das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors überlagert. Durch die Nähe der Fluorophore erfolgt der Energietransfer durch ein Photon des Donors zum Akzeptorfluorophor, wodurch dieses aufgenommen und anschließend emittiert wird. Da der Donor selbst keine Photonen emittiert, wird die Fluoreszenz-Lebensdauer des Donorfluorophors in Anwesenheit des Akzeptors verringert. Die Fluoreszenz-Lebensdauer des Donorfluorophors ist dabei unabhängig von der Anregungsintensität und der Konzentration des Donors. Die FRET-FLIM-Methode liefert daher eine räumliche Auflösung der Interaktion von zwei Proteinen in intakten Zellen. Dieser Vorteil wurde für die Untersuchung der p35-Modifikation mit SUMO2 in neuronalen CSM14.1-Zellen genutzt.

Für diese auf FRET basierende Methode, wurde das mTFP Fluorophor, ein monomerisches Teal Fluoreszenzprotein (cyan), als Donorfluorophor verwendet und N-terminal mit p35-

Wildtyp oder mit den p35 SUMO-defizienten Mutanten (p35-2KR, p35-2AA) fusioniert. Als Akzeptorfluorophor wurde mVenus, eine monomere Variante von YFP, N-terminal mit SUMO2 verbunden. [147, 153]. Es wurden zwei unterschiedliche SUMO2-Konstrukte für dieses Experimente verwendet: Die reife Form von SUMO2 mit dem C-terminalen Gly-Gly-Motiv, welches für die kovalente Bindung von SUMO zum Zielprotein notwendig ist (mVenus-SUMO2), sowie als Negativkontrolle für die kovalente Konjugation von SUMO ein mVenus-SUMO2 Δ 7-Konstrukt, in dem das Di-Glycin-Motiv deletiert wurde. Die CSM14.1-Zellen wurden mit mTFP-p35wt oder den Mutanten p35-2KR, p35-2AA in Kombination mit mVenus-SUMO2 transfiziert und die Interaktion zwischen diesen Molekülen mittels FRET durch die Verwendung von FLIM, in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Sundar Ganesan (Rockville, USA), bestimmt. Als Kontrollbedingung wurde mTFP-p35wt einzeln transfiziert und anschließend die basale Fluoreszenzlebensdauer von mTFP ermittelt. Ein intensiver Energietransfer (FRET) konnte durch die stark reduzierte Fluoreszenzlebensdauer von mTFP bei Koexpression von p35wt und SUMO2 beobachtet werden (FLIM). Dieses Ergebnis ist einen Hinweis, dass der Abstand zwischen den Fluorophoren und damit zwischen p35wt und SUMO2 in intakten neuronalen Zellen sehr gering ist, höchstwahrscheinlich durch eine Konjugation zwischen p35wt und SUMO2 (Abbildung 3.8. b, g, f). Es wurden zwei Peaks innerhalb dieser Bedingung aufgezeichnet (Abbildung 3.8. f). Eine weniger reduzierte Fluoreszenzlebensdauer von mTFP konnte in den Bedingungen mit den SUMO-defizienten Mutanten, mTFP-p35-2KR oder mTFP-p35-2AA, und mVenus-SUMO2 beobachtet werden. Im Vergleich zu dem sehr robusten Konjugationssignal von mTFP-p35wt und SUMO2 konnte nur eine geringe Fluoreszenzlebensdauer verringering mit der mVenus-SUMO2 Δ 7-Mutante und p35wt detektiert werden (Abbildung 3.8. f). Die noch zu beobachteten FRET-Signale, die bei der Verwendung von mTFP-p35-2KR, mTFP-p35-2AA oder mVenus-SUMO2 Δ 7 auftraten, geben einen Hinweis auf eine kleine Komponente an nicht-kovalenten Interaktionen von SUMO2 mit p35. Diese FRET/FLIM Daten zeigen eine Übereinstimmung mit unseren biochemischen Daten und demonstrieren eine robuste kovalente Bindung von p35 mit SUMO2.

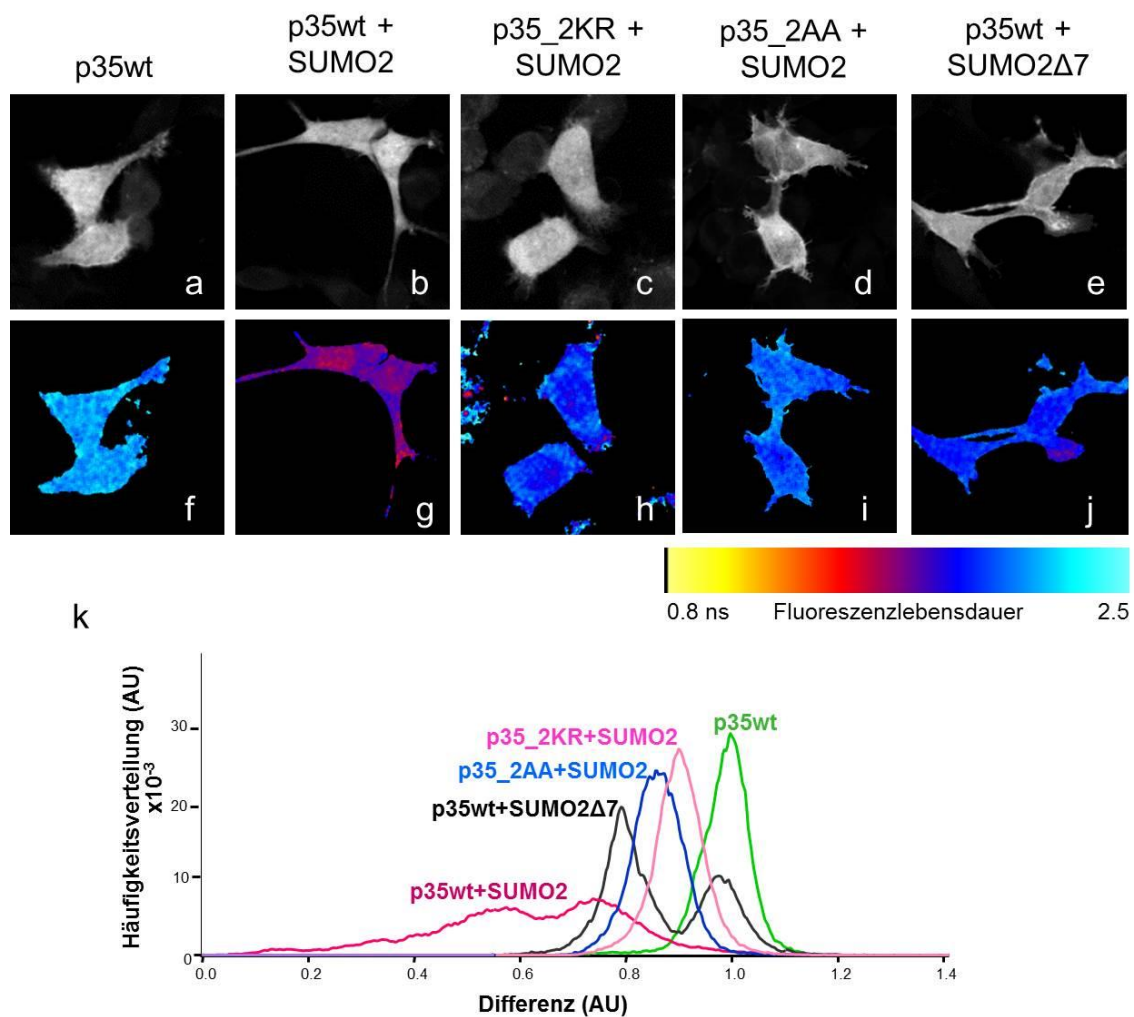


Abbildung 3.8 FRET/FLIM-Analysen der Sumoylierung von p35 in CSM14.1-Zellen.

Die Sumoylierung wurde durch FLIM in neuronalen CSM14.1-Zellen gemessen. [a-e] zeigt die Darstellung der Verteilung des mTFP Donorfluorophors (mTFP Intensivitätsbilder) und [f-j] zeigt die repräsentative Fluoreszenzlebensdauer in Bildern. Der Maßstabfarbbalken zeigt die Farbkodierung der Fluoreszenzlebensdauerwerte. Geringe Lebensdauer, hohe FRET-Effizienz, wurde in warmen Farben dargestellt. In kalten Farben wurde eine hohe Lebensdauer aufgezeigt, entsprechend einer geringen FRET-Effizienz. [a, f] Zeigt die basale Fluoreszenzlebensdauer des mTFP in CSM14.1-Zellen. [b, g] Koexpression von mTFP-p35wt mit mVenus-SUMO2 resultierte in einer stark verkürzten Lebenszeit des Donors und weist auf eine Interaktion von p35 mit SUMO2 hin. Koexpression mit p35wt oder den SUMO-defizienten Mutanten, p35-2KR oder p35-2AA [c, h, d, i] oder die Koexpression von p35wt mit der mVenus-SUMO2Δ7-Mutante [e, j] führen zu einer geringeren Reduktion der Fluoreszenzlebensdauer. [k] Kumulative Histogramm zeigen die identifizierten FRET-Effizienzen als x-fache Differenz (*arbitrary units*-AU).

3.3.3 Untersuchung der Ubiquitinierung von p35 Wildtyp und der SUMO-defizienten p35-Mutante in HEK 293-Zellen

Posttranslationale Proteinmodifikationen wie Methylierung, Glykolysierung, Acetylierung oder Ubiquitinierung erfolgen, wie bei der Sumoylierung, an einem Lysin im Zielprotein [12, 28, 64]. Durch eine Polyubiquitinierung wird das Zielprotein für den proteasomalen Abbau gekennzeichnet und für die Degradation zum Proteasom innerhalb der Zelle transportiert [154].

p35 wird durch den aktiven p35/Cdk5-Komplex an vier verschiedenen Aminosäuren phosphoryliert, infolgedessen wird p35 ubiquitiniert und proteasomal degradiert [102]. Da sowohl die Sumoylierung, als auch die Ubiquitinierung, über Lysine erfolgt, sollte eine mögliche Interferenz zwischen beiden posttranslationalen Modifikationen überprüft werden. Dafür wurde ein His₆-Ubiquitin mit der entsprechenden Mutante (p35-2KR) und dem Wildtyp (wt) von p35 in HEK 293-Zellen koexprimiert und anschließend unter denaturierenden Bedingungen auf Proteinebene das Ubiquitinierungslevel untersucht. p35 zeigt Mono-, Di- und Polyubiquitinierung (Abbildung 3.9.). Dabei konnte keine Veränderung der Ubiquitinierung zwischen dem Wildtyp und der p35-2KR-Mutante detektiert werden. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die untersuchten SUMO-Konjugationsstellen (K246 und K290) in p35 Ziel von der Sumoylierung, jedoch nicht der Ubiquitinierung, sind.

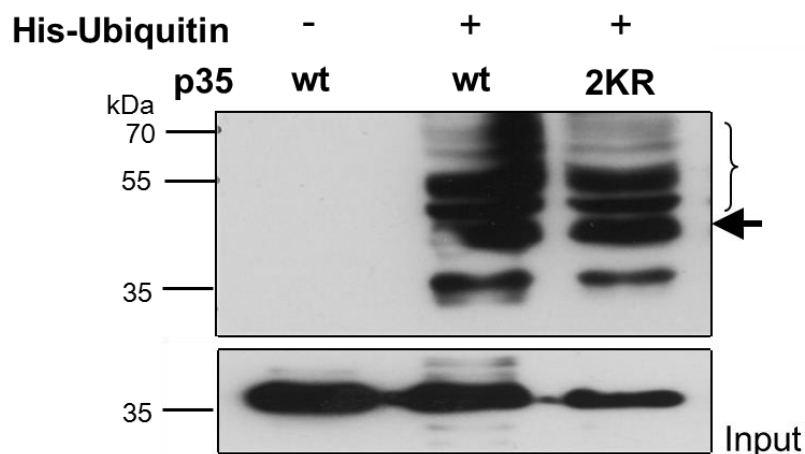


Abbildung 3.9 Überprüfung der Ubiquitinierungslevel von p35wt und der SUMO-defizienten Mutante 2KR.

SUMO konjugiert mit dem Lysinrest eines Zielproteins, welches auch mit anderen posttranslationalen Modifikationsformen interagieren könnte. Daher wurden die Ubiquitinierungslevel des p35 Wildtyp (wt) und der SUMO-defizienten Mutante p35-2KR untersucht. His₆-Ubiquitin kodierendes Plasmid wurde mit p35wt oder p35-2KR in HEK 293-Zellen kotransfiziert und anschließend das Ubiquitinierungslevel auf Proteinebene untersucht. Mono- (Pfeil) und Polyubiquitinierung (Klammer) zeigten keine Unterschiede zwischen p35wt und der SUMO-defizienten Mutante 2KR. Dies bedeutet, dass beide Lysine K246 und K290 nicht als Target für die Ubiquitinierung dienen.

3.4 Biochemische Untersuchungen für die Beeinflussung der Sumoylierung von p35 durch oxidativen Stress

Der SUMO-Zyklus mit seiner enzymatischen Kaskade von E1-, E2- und E3-Enzymen bewirkt die Konjugation von SUMO; die Isopeptidasen (SENP) katalysieren den dekonjugierenden Schritt. Durch oxidativen Stress kann die Sumoylierung beeinflusst werden. Geringe Konzentrationen von Wasserstoffperoxid bewirken die Formation einer Disulfidbindung zwischen den katalytischen Cysteinen des aktivierenden E1-Enzyms (Aos1/Uba2) und dem konjugierenden Enzym Ubc9. Dies führt zur enzymatischen Inaktivierung der beeinflussten Enzyme, wodurch SUMO-Konjugationen reduziert werden, da die intakten Isopeptidasen die Substratproteine weiterhin dekonjugieren. Dadurch erhöht sich der globale freie SUMO-Proteinanteil innerhalb einer Zelle. Im Gegensatz dazu werden durch eine hohe Konzentration von über 10 mM Wasserstoffperoxid die Isopeptidasen (SENP) inhibiert, was zu einem Anstieg der globalen Sumoylierung führt [75].

Um den Einfluss von oxidativen Stress auf das spezifische Protein p35 und SUMO zu analysieren, wurden HEK 293-Zellen mit HA-p35wt und His₆-SUMO2 transfiziert und anschließend für 30 Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) behandelt (Abbildung 3.10.).

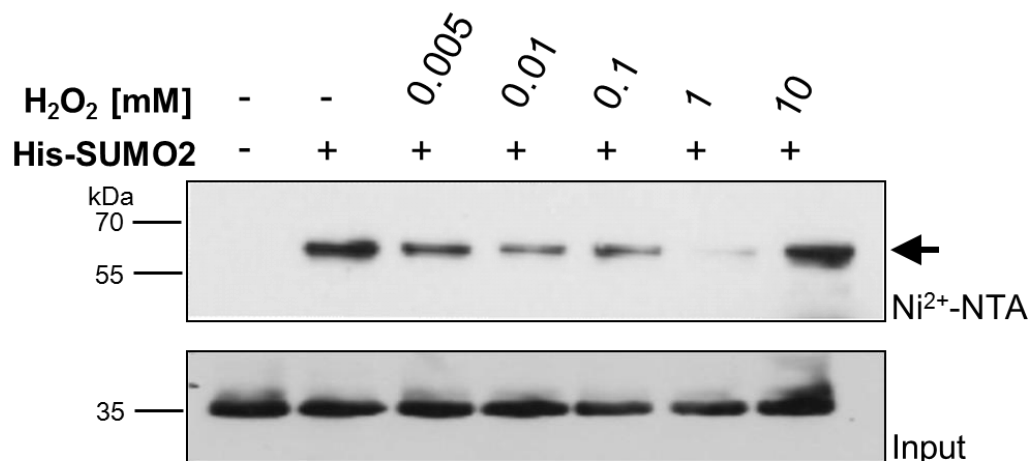


Abbildung 3.10 Eine biphasische Beeinflussung der Sumoylierung von p35 durch oxidativen Stress.

HEK 293-Zellen, die His₆-SUMO2 und HA-p35wt überexprimierten, wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) für 30 Minuten behandelt und nachfolgend lysiert. Anschließend wurde mit der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie die sumoylierte Spezies aufgereinigt und mit dem p35-C19 Antikörper mit der Western Blot-Analyse die Sumoylierungslevel von p35 mit unterschiedlichen H₂O₂-Konzentrationen untersucht. Mit ansteigender Wasserstoffperoxidkonzentration von 0.005 bis 1 mM konnte eine Verringerung der Sumoylierung von p35 beobachtet werden (Pfeil). Hingegen kam es zu einer Erhöhung der p35 Sumoylierung bei einer Konzentration von 10 mM H₂O₂.

Nach anschließender Ni^{2+} -NTA-Chromatographie wurden auf Proteinebene, mittels Western Blot-Analyse und unter Verwendung des spezifischen p35-C19 Antikörpers die Sumoylierungslevel der einzelnen Bedingungen analysiert. Dabei konnte eine Verringerung der Sumoylierung mit ansteigender Wasserstoffperoxidkonzentration, bis hin zu einer völligen Reduzierung der Sumoylierung von p35 bei einer 1 mM Konzentration von H_2O_2 , beobachtet werden. Außerdem wurde mit einer Wasserstoffperoxidkonzentration von 10 mM ein offensichtlich gegenteiliger Effekt in Form einer gesteigerten Sumoylierung von p35 im Vergleich zu der Bedingung mit 1 mM H_2O_2 induziert.

Die biochemischen Daten in HEK 293-Zellen mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie zeigen einen biphasischen Verlauf der SUMO-Konjugation von p35 durch den Einfluss von steigenden Konzentration an oxidativen Stress. Um diese Daten zu untermauern wurden CSM14.1-Zellen mit mTFP-p35wt und mVenus-SUMO2 koexprimiert und für 30 Minuten mit 1 mM H_2O_2 inkubiert. Es konnte erneut eine starke Verringerung der Fluoreszenzlebensdauer von mTFP-p35 und mVenus-SUMO2 aufgezeigt werden, wodurch eine deutliche Nähe beider Fluorophore und ein erhöhtes FRET detektiert werden konnte. Im Vergleich zu der verringerten Fluoreszenzlebensdauer der nicht behandelten Wasserstoffperoxid Zellen mit p35wt und SUMO2, zeigte die Wasserstoffperoxid behandelte Zellkultur eine erhöhte Fluoreszenzlebensdauer und somit eine Verringerung der Sumoylierung von p35. Diese Fluoreszenzlebensdauer der 1 mM H_2O_2 Bedingungen war ebenso hoch wie die basale Fluoreszenzlebensdauer der Kontrollbedingung von mTFP-p35wt (Abbildung 3.11.). Dies unterstützt die bisherigen Daten, die darauf hindeuten, dass die SUMO-Konjugation von p35 unter oxidativen Stress von 1 mM H_2O_2 deutlich reduziert ist.

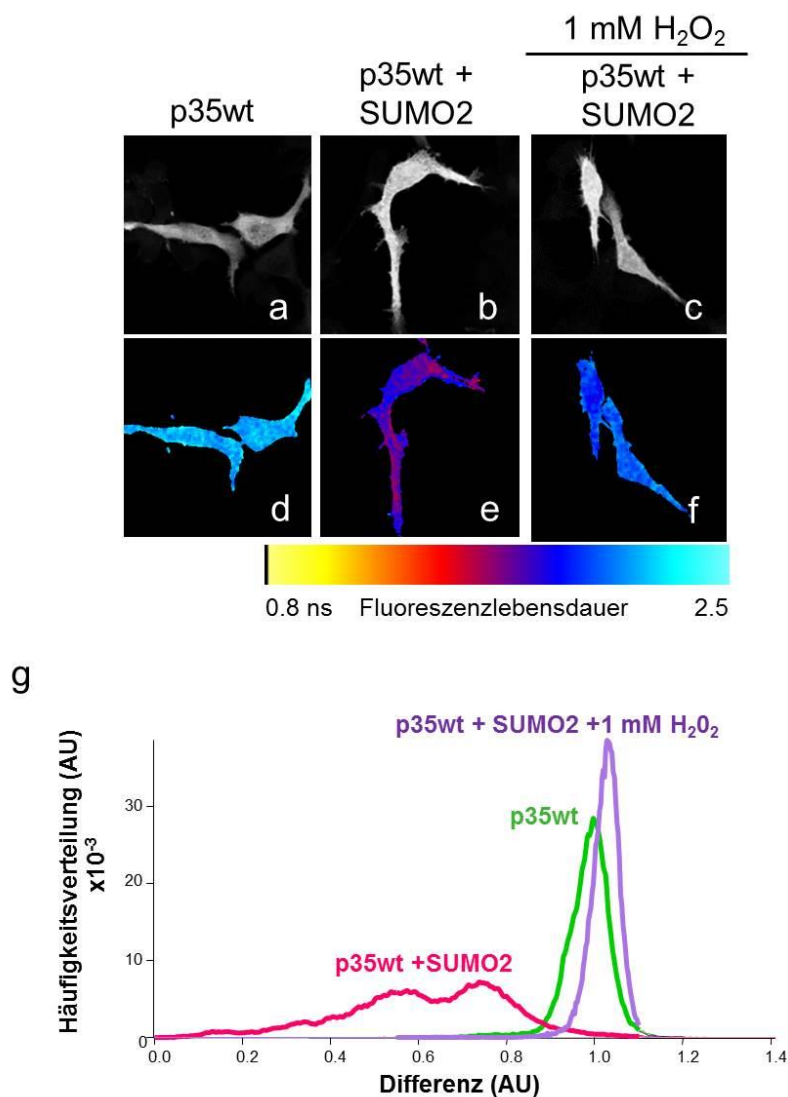


Abbildung 3.11 Der biphasische Effekt auf die Sumoylierung von p35 durch oxidativen Stress wurde mit der FRET/FLIM-Methode analysiert.

In CSM14.1-Zellen wurde mittels FLIM die Sumoylierung von p35 unter oxidativer Stresseinwirkung untersucht. [a-c] Zeigt die mTFP Intensitätsbilder und in [d-f] werden die Fluoreszenzlebensdauer in Bildern dargestellt. Weitere Details siehe 2.2.4.3 und Abbildung 3.8. Mit mTFP-p35wt alleine konnte die basale Fluoreszenzlebensdauer der Donors, mTFP, ermittelt werden [a, d]. [b, e] Zeigte eine geringe Fluoreszenzlebensdauer nach der Koexpression von mTFP-p35wt und mVenus-SUMO2, was eine Interaktion der beiden Proteine vermuten lässt. [c, f] Durch die Behandlung der Zellen mit 1 mM Wasserstoffperoxid (H₂O₂) verlängerte sich die Fluoreszenzlebensdauer von mTFP-p35wt und mVenus-SUMO2 vergleichbar zu der des basalen Signals des Donorfluorophors. Dies gibt einen Hinweis auf die Verringerung der Sumoylierung von p35. [g] Kumulatives Histogramm der FRET-Effizienzen in Anwesenheit oder Abwesenheit von oxidativem Stress.

3.5 Sumoylierung von p35 hat keinen Einfluss auf die Cdk5-Bindung

Die als Monomer vorliegende Cdk5 benötigt die Assoziation mit der regulierenden Untereinheit von p35 für ihre enzymatische Aktivität [103]. Daher ist die Bindung von p35 an Cdk5 essenziell für die dadurch regulierten Prozesse [117]. Wie bereits beschrieben, kann die Sumoylierung Protein/Protein-Interaktionen modulieren [28, 64]. Daher sollte der Einfluss der SUMO-Modifikation von p35 auf die Bindung der Cdk5 untersucht werden.

Für die Charakterisierung der p35/Cdk5-Bindung wurde eine Koimmunpräzipitation (beschrieben unter 2.2.5.7) verwendet. Zu diesem Zweck wurden HEK 293-Zellen mit Cdk5 und verschiedenen HA-p35-Konstrukten überexprimiert. Die Zellen wurden zur Erhaltung der p35/Cdk5-Interaktion und enzymatischen Integrität in RIPA-Puffer lysiert und die Koimmunpräzipitation mit dem p35 Antikörper durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden die bereits in der Literatur beschriebenen Cdk5-bindungsdefizienten Mutanten von p35, p35-L151/152N und p35_D288A/L289A, verwendet [107, 126]. Die Cdk5-Bindung wurde mit diesen Mutanten, dem Wildtyp von p35 und der defizienten SUMO-Mutante p35-2KR untersucht. In unseren Experimenten konnte keine signifikanten Veränderungen der Cdk5-Bindung mit p35wt und p35-2KR ermittelt werden. Demgegenüber konnte mit den Cdk5-bindungsdefizienten Mutanten von p35 (p35-L151/152N und p35_D288A/L289A) eine reduzierte Cdk5 Bindung beobachtet werden (Abbildung 3.12.).

Des Weiteren wurde für dieses Experiment zwei Fusionsproteine von p35 generiert, die mit einem SUMO2-Protein über eine Zwischensequenz (*linker*) mit p35 entweder N-terminal oder C-terminal fusioniert wurden (HA-p35-SUMO2 und HA-SUMO2-p35). Mit Hilfe dieser stabilen irreversiblen p35 stimulierenden Sumoylierungskonstrukte wurde die Bindung an Cdk5 untersucht. Nach der Koimmunpräzipitation wurden die Proben per SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Auf der Proteinebene wurde die Bindung von Cdk5 mit den verschiedenen p35-Fusionskonstrukten durch die Verwendung von p35- und Cdk5-Antikörpern untersucht. Gleichmässige Expression wurde mit den Antikörpern p35 (Abbildung 3.12. oben links) und Cdk5 (Abbildung 3.12. unten links) bestätigt. Die Koimmunpräzipitation mit p35 und anschließender Detektion des Bindungspartners Cdk5 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen p35wt und den Fusionsproteinen (HA-p35-SUMO2 und HA-SUMO2-p35) (Abbildung 3.12. rechts).

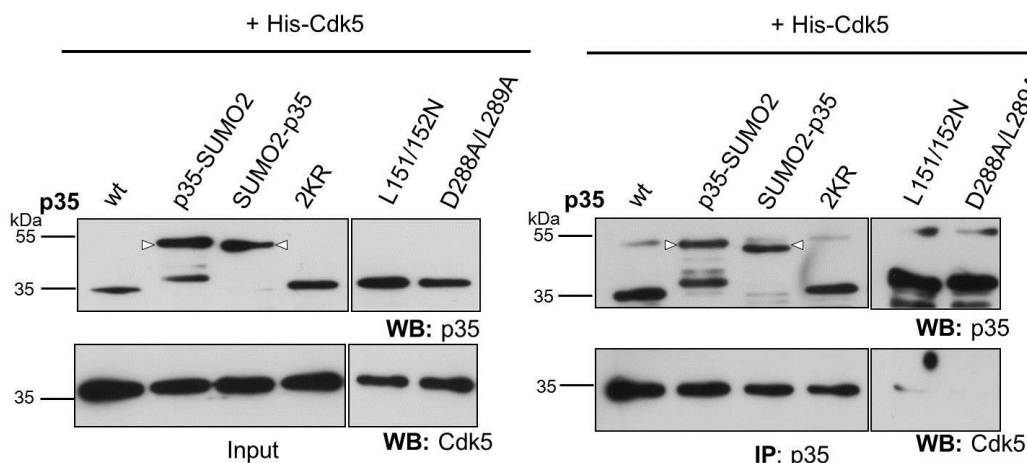


Abbildung 3.12 Die Cdk5-Bindung von p35 ist nicht beeinflusst durch dessen Sumoylierung.

Cdk5 und die verschiedenen p35-Konstrukte wurden in HEK 293-Zellen überexprimiert und mit dem p35-C19 Antikörper koimmunpräzipitiert (IP) (rechte Seite). Die Western Blot-Analyse erfolgt mit p35-C19 und Cdk5-C8 Antikörper. Die Zellysate (input) wurden als Kontrolle durch beide Antikörper analysiert (linke Seite). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Cdk5-Bindung mit p35wt, den SUMO-defizienten Mutante (p35-2KR) oder den Sumoylierung-nachahmenden Fusionsproteinen (p35-SUMO2, SUMO2-p35) nachgewiesen werden. Im Gegensatz zeigten die publizierten Mutanten von p35 (p35 (L151N,L152N) und p35 (D288A,L289A) [107, 126]) keine Cdk5-Bindung in den Koimmunpräzipitaten. Das höhere Molekulargewicht der beiden Fusionsproteine (zwischen den Pfeilköpfen eingeklammert) ist zu beachten.

3.5.1 Analysen der Cdk5-Bindung von sumoyliertem p35 in CSM14.1-Zellen durch FRET/FLIM-Messungen

Durch FRET/FLIM-Analysen sollte das Ergebnis aus der Koimmunopräzipitation überprüft werden. Als Donorfluorophor diente mTFP, das N-terminal an p35wt, p35-2KR oder p35-2AA angeheftet wurde. C-terminal wurde der Akzeptorfluorophor mVenus an Cdk5 gebunden. Der Wildtyp von p35 oder die SUMO-defizienten Mutanten wurden mit Cdk5 in CSM14.1-Zellen kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Es konnte eine signifikante Verringerung der Fluoreszenzlebensdauer des Donorfluorophors (mTFP) durch die unmittelbare Nähe zum Akzeptorfluorophor (mVenus) bei der Koexpression von mTFP-p35wt und Cdk5-mVenus beobachtet werden, was auf eine Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen hinweist. Ebenso konnte durch die Koexpression der SUMO-defizienten Mutanten, p35-2KR oder p35-2AA, mit Cdk5 eine gleichartige Verringerung der Fluoreszenzlebensdauer im Vergleich zum p35-Wildtyp ermittelt werden (Abbildung 3.13.). Mit diesen Ergebnissen wird deutlich, dass die Sumoylierung von p35 keinen Einfluss auf die Interaktion mit Cdk5 hat und bestätigt damit die Ergebnisse der Koimmunpräzipitationsuntersuchungen.

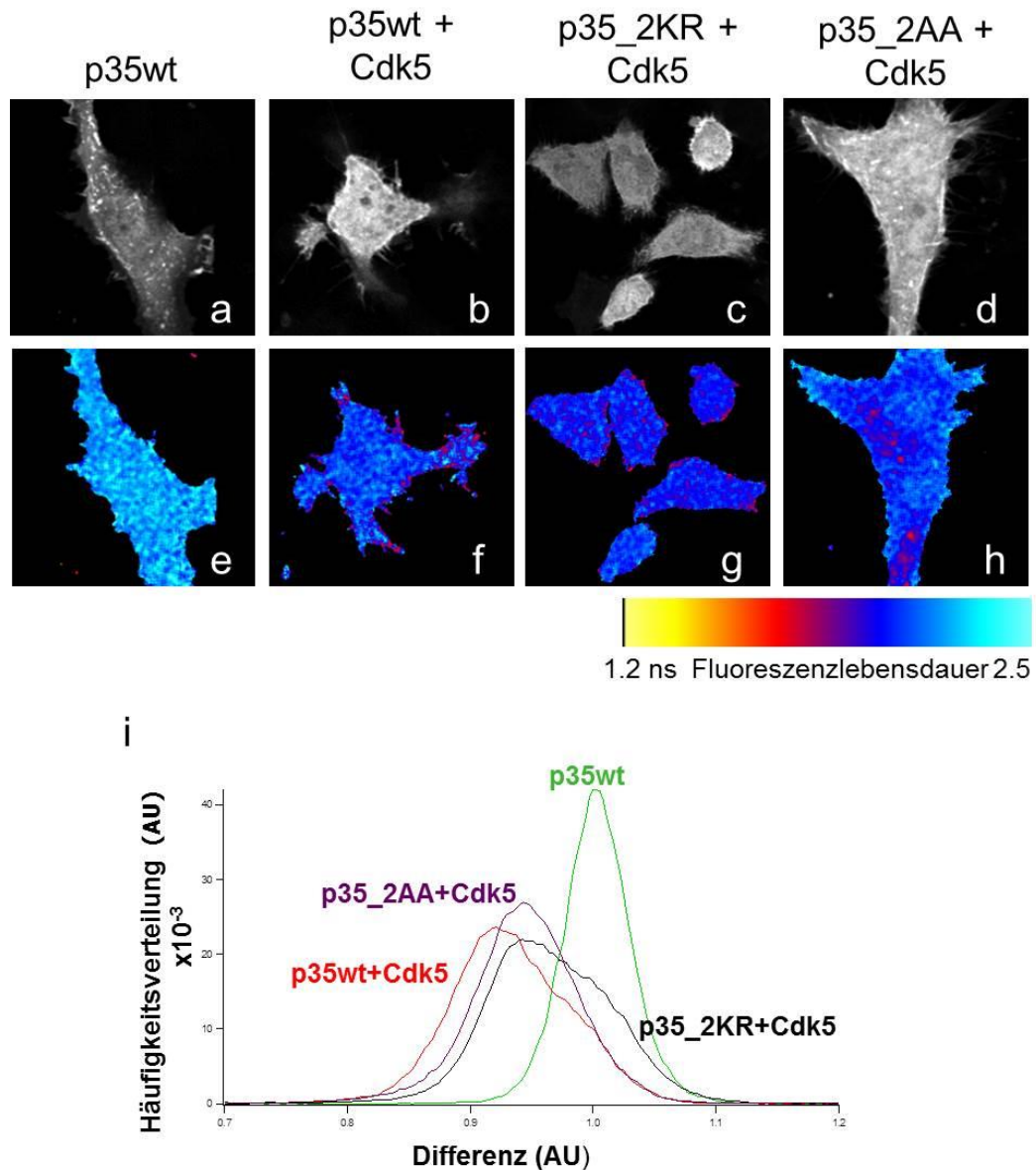


Abbildung 3.13. Cdk5-Bindungsuntersuchungen mit Hilfe der FRET/FLIM-Methode.

[a-d] Zeigt die Intensitätsbilder des mTFP Donorfluorophors und [e-h] zeigte die repräsentative Fluoreszenzlebensdauer in Bildern (unterhalb: Farbstoffmaßstab der Fluoreszenzlebensdauer). [a-e] Basale Fluoreszenzlebensdauer der Donors mTFP. [b, f] Koexpression von mTFP-p35wt und Cdk5-mVenus resultierte in einer Reduktion der Fluoreszenzlebensdauer und damit wurde die Bindung von p35 und Cdk5 dargestellt. [c, g, d, h] Die Koexpression von mTFP-p35-2KR oder mTFP-p35-2AA zeigte einen ähnlichen Fluoreszenzlebensdauerverlauf, wie die in der p35wt- und Cdk5-Bedingung. Dies bedeutet, dass die p35/Cdk5-Bindung unabhängig von der Sumoylierung von p35 erfolgt. [i] Kumulative Histogramm geben die identifizierten FRET Effizienzen als x-fachen Unterschied (*arbitrary units*-AU) wider.

3.6 Die Sumoylierung von p35 verursacht eine erhöhte Cdk5-Aktivität

Cdk5 zeigt ohne die Bindung an seinen Regulator p35 keine enzymatische Aktivität (Abbildung 3.14.B.). Der Bereich um die Aminosäuren 279-291 in p35 zeigte einen Einfluss auf die Aktivität von Cdk5 [106]. Da eine der Sumoylierungsstellen K290, in dieser Region liegt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Sumoylierung von p35 die Aktivität des p35/Cdk5-Komplexes beeinflussen könnte. Daher sollte die Cdk5-Aktivität mit p35wt und den Fusionsproteinen (p35-SUMO2 oder SUMO2-p35), die die konstitutive Sumoylierung von p35 nachahmen, untersucht werden. Dazu wurden die Fusionsproteine in HEK 293-Zellen zusammen mit His-Cdk5 überexprimiert. Anschließend wurden die Cdk5-Komplexe mit den p35-Varianten durch die Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen aufgereinigt, wobei die enzymatische Aktivität des Komplexes aufrechterhalten werden sollte. Im folgenden Kinaseaktivitätsassay (siehe auch 2.2.5.8.) sollte die enzymatische Aktivität der Cdk5 unter ATP-Verbrauch über den Phosphorylierungsgrad eines geeigneten Substrates bestimmt werden. Als Substrat des p35/Cdk5-Komplex wurde Histon H1 verwendet, das durch p35/Cdk5 phosphoryliert wird [103]. Gleiche Proteinmengen von Cdk5 und p35 wurden in allen Proben über die Western Blot-Analyse mit p35-C19 und Cdk5-C8 Antikörpern bestätigt (Abbildung 3.14.A). Nach dem Kinaseaktivitätsassay wurde die eingesetzte Gesamtmenge an Histon H1 zuerst durch den Histon H1 Antikörper und der Anteil an phosphorylierten Histon H1 mit dem phospho-Histon H1 Antikörper im Western Blot analysiert. Dabei konnte mit den Fusionsproteinen p35-SUMO2 und SUMO2-p35 eine nahezu vierfache erhöhte Menge an phosphoryliertem Histon H1 bei gleicher Gesamt-Histon H1-Menge im Vergleich mit der p35wt-Bedingung nachgewiesen werden (Abbildung 3.14.B). Das weist auf eine signifikante Erhöhung der Cdk5-Aktivität aufgrund der p35 Sumoylierung hin.

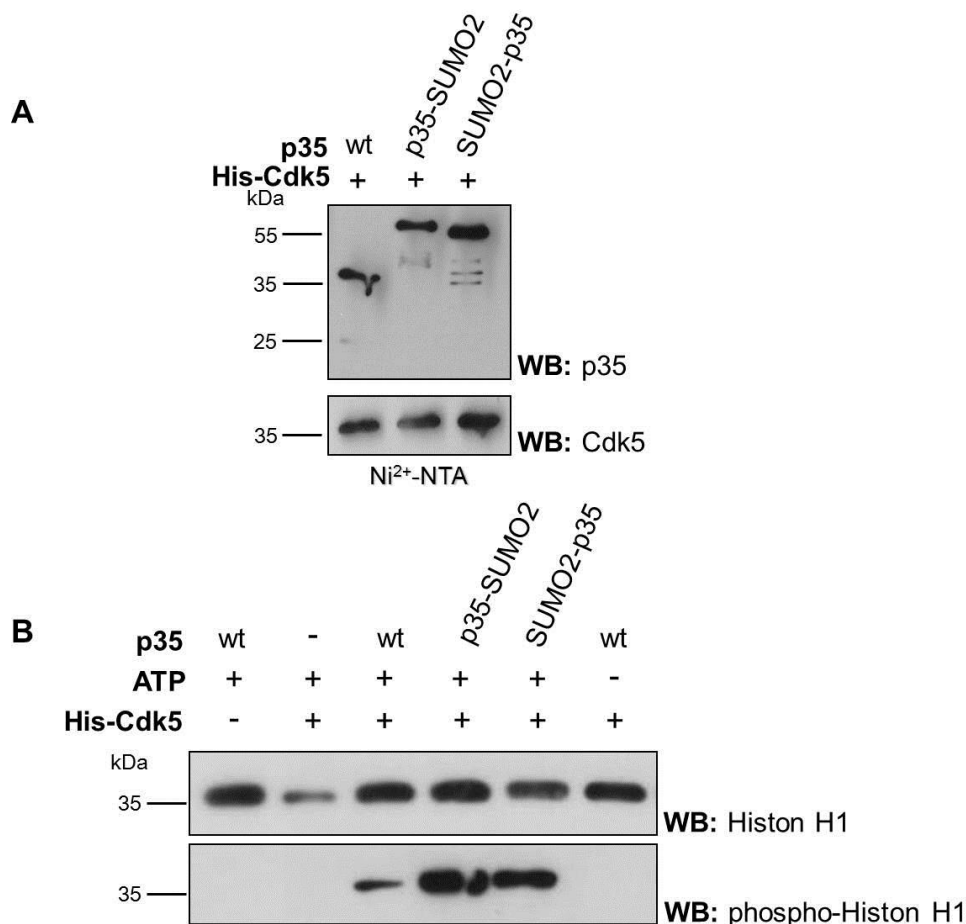


Abbildung 3.14 Die Sumoylierung vom Aktivator p35 resultiert in einer erhöhten Kinaseaktivität von Cdk5.

Die Komplexe von Cdk5 und p35wt oder den beschriebenen Fusionsproteinen wurden durch die Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen aufgereinigt, um die enzymatische Aktivität des Komplexes zu erhalten. Der Kinaseaktivitätsassay wurde mit dem Substrat Histon H1 durchgeführt. (A) Die Zellysate wurden durch p35-C19 und Cdk5-C8 Antikörper auf die gleichmäßige Expression beider Proteine untersucht, um die Umsetzung von Histon H1 allein auf die Kinaseaktivität zurückführen zu können. (B) Durch die Western Blot-Analyse mit dem Histon H1 und dem phospho-Histon H1 Antikörper wurden die Proben analysiert. Im Vergleich zu p35wt wurde eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierungslevel von Histon H1 mit sumoyliertem p35 beobachtet. Einzeltransfektionen von HA-p35wt oder His-Cdk5 (Bande 1 und 2) sowie die Bedingung ohne die Verwendung von ATP (Bande 6) dienten als Kontrollbedingungen für die Reaktion.

3.7 Die Sumoylierung von p35 führt zu einer subzellulären Lokalisationsveränderung von p35

Im vorliegenden Fall wurde der Einfluss der Sumoylierung auf die subzelluläre Lokalisation von p35 in CSM14.1-Zellen untersucht. Dafür wurden HA-p35wt oder das HA-p35-SUMO2 Fusionsprotein und Cdk5-GFP (*green fluorescent protein*) in CSM14.1-Zellen koexprimiert. Anschließend wurden eine Immuncytochemie gegen HA von p35 durchgeführt und die Zellen

mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops fotografiert. Anschließend wurden die Zellen verblindet analysiert (Abbildung 3.15.). Dafür wurden die Zellen in drei Gruppen basierend auf deren vorherrschenden subzellulären Lokalisation kategorisiert. Es wurden folgende Kategorien definiert: nukleär (Nuk), cytoplasmatisch/perinukleär (Cyto) oder gleichmäßige verteilt (gleichmäßig).

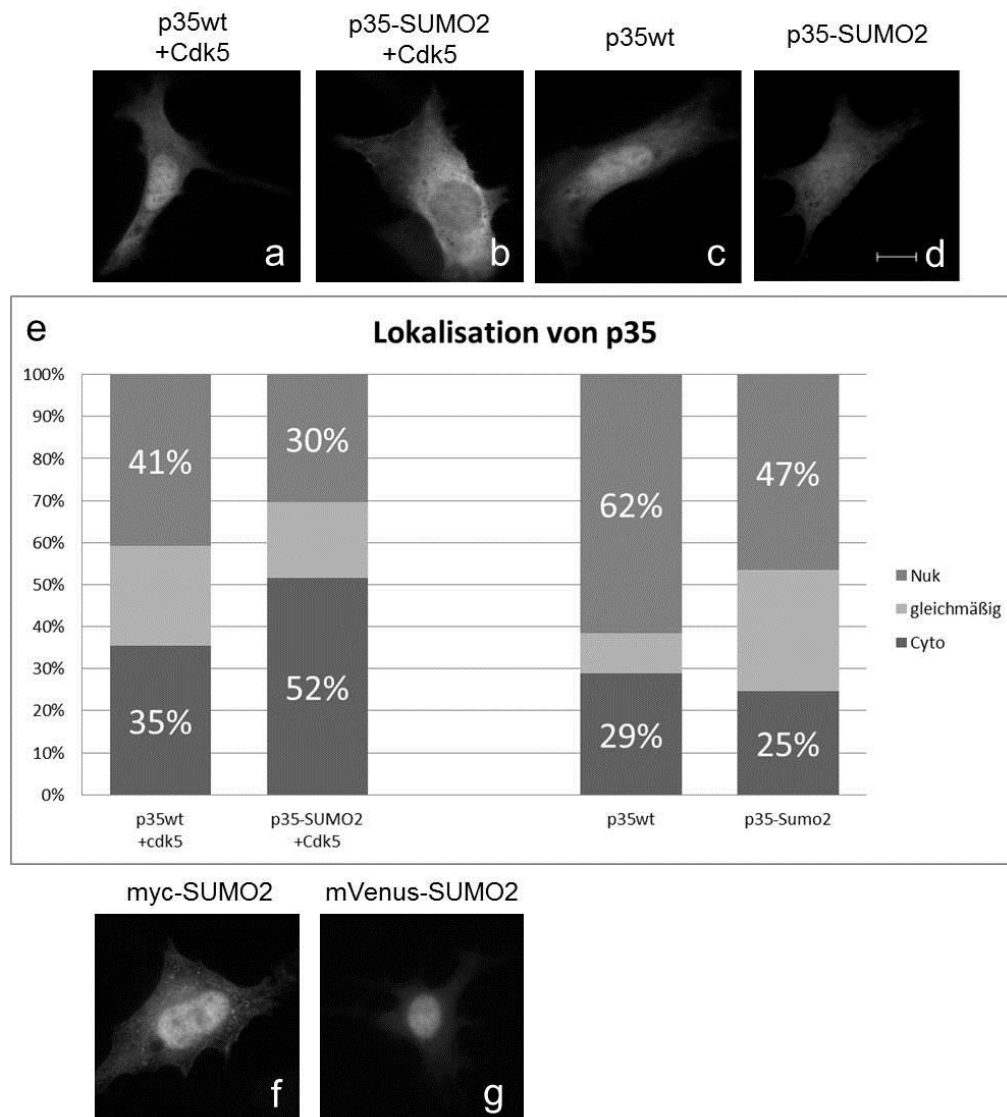


Abbildung 3.15 Sumoylierung des Aktivatorproteins p35 beeinflusst die subzelluläre Lokalisation von p35 in einer Cdk5-abhängigen Art und Weise.

[a-d] Hinsichtlich der unterschiedlichen Lokalisation von HA-p35wt oder HA-p35-SUMO2 und Cdk5-GFP in CSM14.1-Zellen wurde eine quantitative Analyse der subzellulären Lokalisation zwischen Zellkern (Nuk), Cytoplasma/perinukleäre Region (Zyto) und einer gleichmäßigen Verteilung (gleichmäßig) von drei bis sechs unabhängigen Experimenten durchgeführt [e]. Zellen die die Sumoylierungs-nachahmende p35-Mutante und Cdk5-GFP exprimierten, zeigten eine deutliche Veränderung der subzellulären Lokalisation in Richtung der perinukleären Region und dem Cytoplasma [b, e]. [f] Die SUMO2-Isoform und die konjugierte SUMO2-Form [g] zeigten hingegen nur eine verstärkte Lokalisation im Zellkern und eine sehr leichte Lokalisation im Cytoplasma. Eine subzelluläre Umverteilung von p35 innerhalb der Zelle konnte im Vergleich von unsumoylierten p35 und der Sumoylierungs-nachahmenden p35 Mutante detektiert werden [c, d, e].

Der Wildtyp von p35 zeigte eine deutliche Lokalisation im Zellkern (62%) und eine geringe cytoplasmatische Lokalisation (29%) (Abbildung 3.15. c, e). Eine Umverteilung innerhalb der Zelle in eine eher gleichmäßige Lokalisation konnte mit sumoyliertem p35 (p35-SUMO2) im Vergleich zum p35-Wildtyp beobachten werden (Abbildung 3.15 d, e). In diesen beiden Bedingungen ist eine endogene Cdk5-Aktivität vorhanden. Durch die Koexpression von p35wt mit Cdk5 wurde eine nukleäre Lokalisation von 41% einhergehend mit einer geringen Menge an p35 im Cytoplasma (35%) detektiert (Abbildung 3.15. a, e). Eine starke Lokalisationsveränderung von p35 in Richtung der cytoplasmatische und perinukleären Region (52%) konnte mit der Koexpression von Cdk5 und dem sumoylierten p35 (Fusionsprotein p35-SUMO2) beobachtet werden. Dabei konnte nur eine verringerte nukleäre Lokalisation von 30% in dieser Bedingung detektiert werden (Abbildung 3.15 b, e). Diese veränderte Lokalisation von p35 könnte durch die SUMO-induzierte erhöhte Cdk5-Aktivität und/oder durch die Überexpression von Cdk5 verursacht werden.

Als Kontrollen wurden die CSM14.1-Zellen mit myc-SUMO2 (Abbildung 3.15 f) und SUMO fusioniert an ein anderes Protein (mVenus-SUMO2) transfiziert. Beide Bedingungen zeigten eine starke nukleäre Lokalisation und wurden nur gering im Cytoplasma detektiert. Damit konnte gezeigt werden, dass die Umverteilung von sumoylierten p35 hin zu einer stärkeren cytoplasmatischen Lokalisation nicht einfach durch eine starke cytoplasmatische Lokalisation von SUMO bedingt ist (ein Fusionsproteineffekt), sondern spezifisch für p35 ist.

Der deutliche Lokalisationsunterschied von p35wt im Vergleich zum sumoyliertem p35 konnte durch die Überexpression von Cdk5 detektiert werden. Da die p35 Sumoylierung die Aktivität des p35/Cdk5-Komplexes erhöht wurde vermutet, dass die veränderte subzelluläre p35-Lokalisation zusätzlich eine Folge der erhöhten Cdk5-Aktivität sein könnte. Dies wurde durch zusätzliche Bedingungen untersucht. Dafür wurden erstens 24 Stunden nach der Transfektion CSM14.1-Zellen, die mit HA-p35-SUMO2 und Cdk5-GFP transfiziert wurden, mit 20 μ M des Cdk-Inhibitors Roscovitin für 16 Stunden inkubiert. Als zweites wurden die CSM14.1-Zellen mit HA-p35-SUMO2 und einer dominant negativen Cdk5-Mutante kloniert an GFP (DN Cdk5-GFP) transfiziert. Diese Mutante weist keine Cdk5-Aktivität auf. Infolge der in zweifacher Art und Weise inhibierten Cdk5-Aktivität, konnte die Verteilung von p35-SUMO2 durch die Inhibierung der Cdk5-Aktivität untersucht werden (Abbildung 3.16.). Nach der Immuncytochemie gegen HA von p35 wurden die Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops fotografiert und nach der Verteilung von p35 innerhalb der Zellen verblindet in drei Gruppen kategorisiert: nukleär (Nuk), cytoplasmatisch/perinukleär (Cyto) und gleichmäßig (gleichmäßig) lokalisiert.

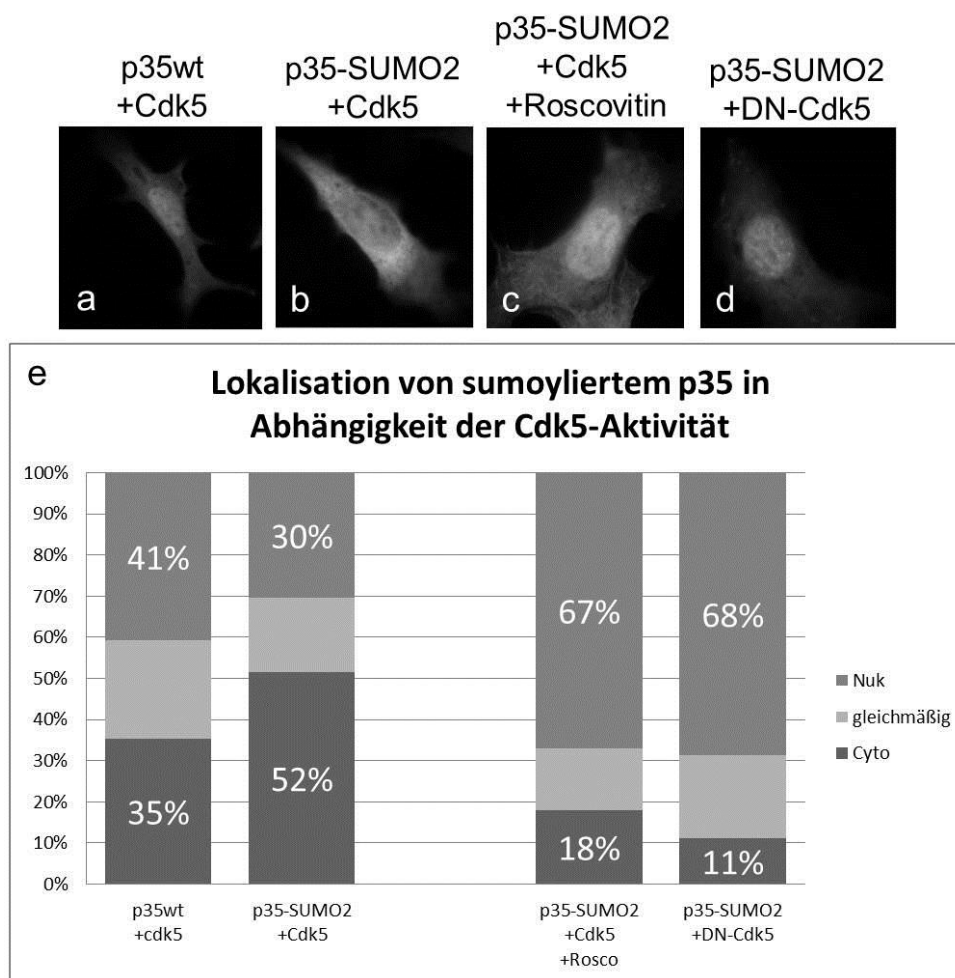


Abbildung 3.16 Die subzelluläre Lokalisation von sumoyliertem p35 wird durch eine Cdk5-abhängigen Art und Weise reguliert.

[a-e] In CSM14.1-Zellen, die den Cdk5-Wildtyp oder die dominant-negative (DN) Cdk5-GFP-Mutante und HA-p35wt oder HA-p35-SUMO2 exprimierten, wurde die subzelluläre Lokalisation von p35 analysiert. Die Zellen mit der Sumoylierungs-nachahmenden p35-Mutanten zeigten eine erhöhte cytoplasmatische und perinukleäre Lokalisation [b, e] mit der Koexpression von Cdk5. [c, e] Die Behandlung mit dem Cdk5-Inhibitor Roscovitin führte zu einer deutlichen Veränderung in der subzellulären Verteilung von p35-SUMO2 hinwärts zu einer stärkeren nukleären Lokalisation. Ein ähnliches Resultat wurde mit der Koexpression von der dominant-negativen Cdk5-Mutante beobachtet. [e] Die quantitative Auswertung der subzellulären Verteilung zwischen Zellkern und Cytoplasma/perinukleären Region wurde in drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Dabei wurde die totale Menge an p35-SUMO2 in allen Kompartimenten auf 100% definiert. Der Maßstabsbalken entspricht einer Größe von 11 μ m.

Die subzelluläre Verteilung von p35-SUMO2 zeigte eine erhöhte cytoplasmatische und perinukleäre Lokalisation (52%) mit der Koexpression von Cdk5. Die Cdk5-Aktivität im Komplex mit sumoyliertem p35 ist erhöht. In früheren Arbeiten konnte eine Regulation der subzellulären Lokalisation des p35/Cdk5-Komplexes durch die Aktivität von Cdk5 und der Phosphorylierung von p35 demonstriert werden [142]. Wenn die Cdk5-Aktivität durch 20 μ M Roscovitin für 16 Stunden vor der Fixierung der Zellen inhibiert wurde, war passend dazu die

cytoplasmatische und perinukleäre Lokalisation von p35-SUMO2 in unseren Versuchen stark reduziert von 52% auf 18%. Begleitend war in dieser Bedingung die nukleäre Lokalisation von p35-SUMO2 stark erhöht (Abbildung 3.16 b, c, e). Mit der dominant-negativen Cdk5-Mutanten (DN-Cdk5-GFP) war die cytoplasmatische Lokalisation von HA-p35-SUMO2 ähnlich reduziert (Abbildung 3.16 b, d, e 11% cytoplasmatische Lokalisation). Die überwiegend nukleäre Lokalisation von Cdk5 schien von der Koexpression und der Behandlung der Zellen unbeeinflusst zu sein. Insgesamt kann festgestellt werden, dass die veränderte subzelluläre Lokalisation von p35 durch die Sumoylierung von p35 höchstwahrscheinlich eine Folge der SUMO-abhängigen erhöhten p35/Cdk5-Aktivität ist. Für die vollständige Klärung der veränderten Lokalisation des sumoylierten p35 in Abhängigkeit der Cdk5 müssen noch weitere Untersuchungen und Experimente folgen.

4 Diskussion

Das aktivierende p35-Protein der Cdk5 ist im Komplex mit Cdk5 in viele verschiedenen zellulären Reaktionen bei der Entwicklung von Zellen und Geweben involviert [97, 117]. p35 lokalisiert die Cdk5-Aktivität auf bestimmte Bereiche innerhalb der Zelle. Durch das N-terminale Myristoylierungssignal wird p35 an die Zellmembran gebunden und die an p35 gebundene Cdk5 mit an die Zellperipherie lokalisiert [102]. Damit spielt p35 eine entscheidende Rolle bei der Substratspezifität und Lokalisation von Cdk5. Auf zellulärer Ebene wird p35 durch verschiedene posttranslationale Modifikationen reguliert. Der oxidative Stress führt zur Spaltung von p35 zu p25 [129]. Die Phosphorylierung von p35 durch den p35/Cdk5-Komplex induziert die Ubiquitinierung und dadurch den proteasomalen Abbau von p35 [102]. Die Regulation von p35 ist für die Funktionalität des p35/Cdk5-Komplexes von sehr entscheidender Bedeutung. Daher sind die Untersuchungen der regulatorischen Mechanismen des p35/Cdk5-Komplexes von hohem Interesse.

4.1 Sumoylierung des p35-Proteins konnte *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden

Die posttranslationale Modifikation von Proteinen durch SUMO hat eine Vielzahl von funktionellen regulatorischen Konsequenzen. Zum einen werden durch die Sumoylierung Bindungsstelle für substratspezifische Proteine im Zielprotein inhibiert. Es können auch neue Bindungsstellen am Substratprotein durch SUMO gebildet oder eine Konformationsänderung im Zielsubstrat hervorgerufen werden [46]. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Sumoylierung von p35 untersucht, dessen Wirkung über eine Protein/Protein-Bindung hervorgerufen wird.

In vorherigen Untersuchungen konnte bereits durch Frau Dr. Petranka Krumova im Rahmen ihrer Dissertation [2009] eine kovalente Bindung von SUMO1 und p35 *in vitro* durch die Verwendung der spezifischen E3-Ligasen (PIAS1, PIAS_{xs}, BP2ΔFG und IR1+M) nachgewiesen werden. Innerhalb des *in vitro* Sumoylierungsassay konnte dagegen keine Konjugation von SUMO2 an p35 mit den verwendeten E3-Ligasen katalysiert werden. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit eine Sumoylierung von p35 mit SUMO2 in Zellkulturen nachgewiesen werden. Da p35 eine starke Bindung mit SUMO2 zeigt, wurden die funktionellen Konsequenzen der SUMO2-Konjugation mit p35 im Rahmen dieser Dissertation untersucht.

In vivo konnte durch die immunhistologischen Untersuchungen eine geringe cytoplasmatische Kolo-kalisation von endogenem p35 und endogenem SUMO1 innerhalb der

Neuronen des Hippocampus und des Cortex detektiert werden. Die Kollokalisierung von SUMO1 und p35 zeigte nur, ob sich die beiden Proteine im selben subzellulären Kompartiment befinden und prinzipiell interagieren können, jedoch kann durch diese Untersuchung keine Interaktion von SUMO1 mit p35 nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit einer bestenfalls geringen cytoplasmatischen Kollokalisierung konnte in primären Neuronenkulturen von E18 Rattenembryonen, und in den Lysaten von P1, P8 und P17 Rattengehirnen mit der Koimmunpräzipitation von p35 mit SUMO1 keine Sumoylierung von p35 detektiert werden. Auch in den transgenen His₆-SUMO2-Mäusen, welche das SUMO2-Transgen nach deren Geburt exprimieren, konnte keine Sumoylierung von p35 nachgewiesen werden. Hierfür sind verschiedene Gründe denkbar. p35, SUMO1 und SUMO2 werden während der Entwicklung des zentralen Nervensystems unterschiedlich stark exprimiert. Für p35 wird ein erhöhtes Expressionslevel zwischen dem E18- und P14-Tag der Rattenentwicklung beschrieben [123]. SUMO1- und SUMO2/3-modifizierte Proteine zeigen bis zum Entwicklungsstadium E12 der Ratte eine erhöhte Expression; SUMO2/3 zeigen einen zweiten Expressionshochpunkt bei der Geburt [92]. Es besteht die Möglichkeit, dass in den Stadien P1, P8 und P17 nur ein geringer Anteil an p35-SUMO-Konjugaten für einen Nachweis der *in vivo* Sumoylierung von p35 vorhanden ist. In den primären Cortexkulturen des Stadiums E18 scheint somit die endogen exprimierte Menge an p35 zu dem betrachteten Zeitpunkt für den Nachweis einer SUMO2-Konjugation von p35 noch zu gering zu sein. In den transgenen His₆-SUMO2-Mäusen wird das SUMO2-Transgen erst nach der Geburt exprimiert. Ab dem 14. postnatalen Tag nimmt die Expression von p35 ab, wohingegen die SUMO2-transgene Proteinexpression langsam ansteigt. Insgesamt könnte die Menge an sumoyliertem p35 *in vivo* zu gering sein, um einen Nachweis mit den verwendeten Methoden und den notwendigen biochemischen Protokollen zu ermöglichen. Zudem wird p35 stark durch die Cdk5 reguliert. Eine erhöhte Menge an phosphoryliertem p35 wurde während der Entwicklung des zentralen Nervensystems im Gegensatz zum adultem Tier detektiert, was einen schnellen proteasomalen Abbau von p35 in den frühen Entwicklungsstadien induziert [139, 155] und die Menge an p35 zusätzlich reduziert [102]. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Untersuchungen mit einem Überexpressionssystem in Zellen gearbeitet.

4.2 Zwei spezifische Lysine werden in p35 kovalent sumoyliert

In den Mutageneseanalysen konnten zwei Lysine als Hauptsumoylierungsstellen von p35 identifiziert werden: K246 und K290. Diese beiden Stellen sind evolutionär konserviert, was auf eine mögliche funktionelle Relevanz hinweist. Die Einzelmutanten von K246R und K290R zeigten in den Versuchen eine ähnliche Verringerung der Sumoylierung. Die Doppelmutante beider Lysine (p35-2KR) zeigte dagegen eine vollständige Reduktion der Sumoylierung von

p35. Die Deletion beider SUMO-Motive durch die Substitution der sauren Aminosäuren in der +2 Position, innerhalb der p35-2AA Mutante, zeigte auch eine vollständige Reduktion der SUMO2-Konjugation von p35, wodurch beide Lysine als Sumoylierungsstellen von p35 bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass SUMO2/3 als Monomer, Polymer oder in Form von mehreren Monomere an ein Substratprotein bindet [19, 24]. Polymere würden eine mehrfache Bandenverschiebung verursachen. Bei p35wt konnte nur eine SUMO2-konjugierte p35-Bande von 55 kDa detektiert werden. Durch den einfachen Shift kann von einer Monosumoylierung ausgegangen werden. Es kann vermutet werden, dass SUMO2 als Monomer alternativ an ein einzelnes Lysin der beiden Stellen von p35 konjugiert wird. Die Lysine K246 und K290 sind somit „alternative“ Sumoylierungsstellen. Zudem liegen beide Lysine in der Proteintertiärstruktur von p35 räumlich dicht beieinander [109], was eine sterische Behinderung zur Folge haben kann und eine mehrfache Sumoylierung von p35 verhindert.

Ein vergleichbare Nachbarschaft von sumoylierten Lysinen konnte ebenso für α -Synuklein gezeigt werden [96]. α -Synuklein besitzt zwei Hauptsumoylierungsstellen um die Lysine K96 und K102, welche in analoger Art und Weise, wie bei p35 beobachtet, nicht simultan sondern alternativ modifiziert werden. Die zu modifizierenden Lysine sind oft in einem unstrukturierten Sequenzbereich des Substratproteins vorhanden oder liegen innerhalb einer zugänglichen Proteinkonformation, wodurch Sumoylierung sterisch ermöglicht wird [33, 156]. Beide Lysine von p35 und α -Synuklein liegen direkt am Ende einer alpha-Helix im jeweiligen Protein, was die Konjugation von SUMO in beiden spezifischen Substratproteinen ermöglicht. Die Position direkt am Ende einer alpha-Helix könnte auch Teil eines strukturellen Sumoylierungsmotivs sein.

In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Sundar Ganesan in Rockville, USA sollte durch die Verwendung der FRET/FLIM-Methode die SUMO-Konjugation von p35 mit einer weiteren unabhängigen und auf neuronalen Zellen basierenden Methode untersucht werden. Ein wichtiger Vorteil der FLIM-Messungen stellt die zusätzliche Information über die subzelluläre-räumliche Verteilung der SUMO2-Konjugation mit p35 in intakten Zellen dar. Durch die FRET/FLIM-Methode konnte eine Interaktion von SUMO2 mit p35 auf neuronaler Zellebene detektiert werden, was die Ni²⁺-NTA-basierenden Chromatographie-Experimente stützt. Die Koexpression von p35wt und SUMO2 verursachte zwei Maxima in der FLIM-Analyse (zwei FRET-Effizienzen), die gegenüber p35wt allein deutlich verschoben sind.

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei der p35-2KR- sowie bei p35-2AA-Mutante nach den biochemischen Analysen um SUMO-defizienten Mutanten handelte, muss es sich bei dem dennoch beobachteten FRET-Signal um eine nicht-kovalente p35/SUMO2-Bindung handeln, welche erst unter nativen Bedingungen der FRET/FLIM-Messungen in intakten CSM14.1-Zellen nachweisbar wurde. In gleicher Weise ist die reduzierte Fluoreszenzlebenszeit bei

Verwendung einer mVenus-markierten nicht-konjugierbaren SUMO-Mutante (SUMO2 Δ 7) zu werten. Verschiedene Gründe können die Ursache sein: 1.) Die Konjugation von SUMO an die beiden unterschiedlichen Lysine in p35 könnte durch zwei FRET-Signale erklärt werden, da das eine FRET-Signal die Sumoylierung an das Lysin K246 und das andere die Sumoylierung an das Lysin K290 repräsentieren. Jedoch erklärt dies nicht das verbliebene FRET-Signal mit der SUMO2 Δ 7-Mutante, welche nicht mehr kovalent an ein Protein binden kann; 2.) Eine kovalente SUMO-Bindung an ein Substratprotein, wie p35, kann unter denaturierenden Bedingungen nachgewiesen werden, da die nicht-kovalenten Interaktionen unter denaturierenden Bedingungen zerstört werden. Jedoch kann diese Interaktion in intakten CSM14.1-Zellen durch weitere FRET-Signale bei den FRET/FLIM-Messungen detektiert werden. Eine nicht-kovalente Interaktion mit SUMO kann an einem so genannten SUMO-Interaktionsmotive (SIM) erfolgen [56]. Diese SIM-Motive sind definiert durch hydrophobe Aminosäuren in einer spezifischen Aminosäure-Reihenfolge (V/I-X-V/I-V/I), wobei das Lysin durch saure Aminosäuren oder Serin-Reste umgeben ist [54-56]. Eine mögliche Interaktion wird mit den Beobachtungen eines verbleibenden FRET-Signals trotz der Expression von den SUMO-defizienten p35-Mutanten (p35-2KR und p35-2AA) und der SUMO2 Δ 7-Mutante unterstützt.

Die SUMO-Isoformen können ebenso über SIM-Motive untereinander, mit den E3-Ligasen sowie mit verschiedenen Substratproteinen interagieren [45, 55, 56]. In den SUMO2/3 Proteinen wird ein SIM-Motiv aus drei Aminosäuren gebildet: Mit dem Glutamin (Q) an der Position 35, Phenylalanin (F) 36 und Isoleucin (I) an der 38. Position von SUMO2/3 [56, 157]. Um die mögliche Interaktion von p35 mit SUMO2 zu untersuchen, könnte in weiterführenden Experimenten eine SUMO2-Mutante verwendet werden, deren Di-Glycin-Motiv und das SIM-Motiv mutiert sind. Unter nativen Bedingungen oder durch erneute FRET/FLIM-Messungen könnte die mögliche SUMO-Interaktion mit p35 durch die eventuell komplette Verhinderung von SUMO-Interaktionen und -Bindung mit p35 festgestellt werden.

Ubiquitin wird, wie SUMO, kovalent an ein Lysin eines Substratproteins verknüpft [12, 28, 64]. Durch diese Modifikation wird das Zielprotein durch eine Polyubiquitinierung für den proteasomalen Abbau gekennzeichnet und für die Degradierung zum Proteasom in der Zelle transportiert [154]. Die Ubiquitinierungsstellen in p35 sind bisher nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass die Mutation der Lysine K246 und K290 nicht zu veränderter Mono-, Di- oder Polyubiquitinierung von p35 führt. Daraus lässt sich schließen, dass Ubiquitin nicht an diese beiden Lysine konjugiert wird und eine verminderte Ubiquitinierung nicht für die mit der p35-2KR-Mutante beobachteten funktionellen Effekte verantwortlich ist.

4.3 Die Sumoylierung von p35 wird durch oxidativen Stress biphasisch beeinflusst.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte ein biphasischer Effekt von oxidativem Stress auf die Sumoylierung des neuronalen Proteins, p35, nachgewiesen werden.

Wasserstoffperoxid entsteht innerhalb von normalen Reaktionsabläufen als Nebenprodukt und wird meist durch Peroxidasen zu Wasser konvertiert [158]. Somit entstehen Schwankungen der Konzentration von Wasserstoffperoxid innerhalb der Zelle, was wiederum verschiedene Zellprozesse beeinflusst. Erhöht sich die Konzentration an oxidativen Stressmolekülen zu einer unphysiologischen Menge, wird die Expression bestimmter Gene induziert [159], wodurch es zu Zellschädigungen oder Apoptose kommt [160, 161]. Oxidativer Stress wird als Ursache für die Entstehung vieler neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Alzheimer, Chorea Huntington oder auch Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) diskutiert [162, 163].

Ein biphasischer Effekt, wie er bereits für die globale Sumoylierung beschrieben worden ist [75], konnte jedoch auch bei der Sumoylierung von p35 beobachtet werden. Durch oxidativen Stress erhöht sich vorwiegend die Menge an freien SUMO2/3-Isoformen [15]. Die Sumoylierung von p35 nimmt mit zunehmender Wasserstoffperoxidkonzentration bis zu einer Konzentration von 1 mM ab. Bei einer stark erhöhten Menge von Wasserstoffperoxid (höher als 10 mM) stieg die Sumoylierung von p35 deutlich an. Dieser Effekt wird vermutlich durch die beginnende Inhibierung der Isopeptidasen bei starkem oxidativen Stress bedingt, wie sie bezüglich der „globalen“ Sumoylierung bereits von Bossis und Melchior (2006) beschrieben wurde. Die Betrachtung des oxidativen Stress in Bezug auf die Sumoylierung von p35 ist von besonderer Bedeutung, da p35 unter diesen Bedingungen in p25 gespalten werden kann. Die Spaltung von p35 zu dem C-terminalen Fragment p25 wird durch μ -Calpain und m-Calpain katalysiert, die durch oxidativen Stress und Calcium-Einstrom aktiviert werden [129, 132]. Das p25-Protein bindet stärker an Cdk5, wodurch eine Dysfunktion des Komplexes innerhalb der Zelle ausgelöst wird. Der Einfluss von p25/Cdk5 wurde bereits für neurodegenerative Erkrankungen, wie der Alzheimer-Erkrankung, beschrieben [97, 117]. In unseren Untersuchungen zum Einfluss des oxidativen Stresses auf die Sumoylierung von p35 konnte keine Spaltung von sumoylierten p35 zu p25 beobachtet werden. In den denaturierenden Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie-Untersuchungen wurde der Calpain-Inhibitor Leupeptin verwendet, der die Spaltung von p35 zu p25 inhibiert. Die Sumoylierung von p35 und die Calpain-abhängige Spaltung von p35 werden durch dieselben oxidativen Stresskonzentrationen konträr reguliert. Die Sumoylierung wird gehemmt, während p35 laut der Literatur vermehrt zu p25 gespalten wird [129]. Ob es einen Zusammenhang zwischen Sumoylierung und Spaltung von p35 zu p25 gibt, erfordert experimentelle Untersuchungen.

4.4 Die Sumoylierung von p35 induziert eine Lokalisationsveränderung von p35 innerhalb der Zelle und bewirkt eine erhöhte Cdk5-Aktivität ohne die Bindung an Cdk5 zu verändern

Die Hauptfunktion von p35 ist die Bindung und Aktivierung der Cdk5. Ein typisches Resultat der Sumoylierung einiger Substratproteine ist eine veränderte Protein/Protein-Bindung [46]. Wir konnten jedoch feststellen, dass die Sumoylierung von p35 die Cdk5-Bindung nicht beeinflusst. Interessanterweise befinden sich die Sumoylierungsstellen von p35 außerhalb der bisher beschriebenen minimalen Bindungsstelle für Cdk5. Dieser minimale Bereich wurde von den Aminosäurepositionen 150 bis 200 durch verschiedene Deletionsmutanten definiert [106]. Eine der zwei Sumoylierungsstellen, die Position K290, liegt innerhalb eines Sequenzbereichs zwischen den Aminosäuren 279 und 291 von p35, welcher für die vollständige Cdk5-Aktivität durch p35 definiert wurde [106]. Diese Vorbefunde passen sehr gut zu der von uns beobachteten Tatsache, dass die Sumoylierung von p35 einen Einfluss auf die Cdk5-Aktivität, jedoch nicht auf die Cdk5-Bindung hat. Die erhöhte Cdk5-Aktivität, induziert durch die Sumoylierung von p35, bewirkt vermutlich eine veränderte Regulation von Substraten oder Reaktionswege durch p35/Cdk5. Die Cdk5 weist durch die Sumoylierung von p35 eine fast vierfache gesteigerte Aktivität auf. Welche Wirkung die SUMO-abhängige p35/Cdk5-Aktivität innerhalb der Zelle jedoch im Einzelnen hat, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt werden. In welchem Kompartiment p35 sumoyliert wird, konnte bisher ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Einige der möglichen zellulären Funktionen, welche durch die p35 Sumoylierung beeinflusst werden, erfordern jedoch eine besonders schnelle und dynamische Regulation, wie zum Beispiel bei der Freisetzung synaptischer Vesikel und anderen synaptischen Funktionen. Dazu konnte aber auch eine von der neuronalen Aktivität abhängige subzelluläre Umverteilung von Komponenten der SUMO-Maschinerie zwischen Neuriten und dem Zellsoma gezeigt werden [92].

Es wurde in der Literatur mehrfach gezeigt, dass die Sumoylierung auch einen Einfluss auf die Lokalisation verschiedener Substratproteine hat. Bei p35 verursacht die Sumoylierung mit der Koexpression von Cdk5 eine indirekte Lokalisationsveränderung vom Zellkern zu einer erhöhten cytoplasmatische/perinukleären Lokalisation. Eine Umverteilung von p35 konnte im Vergleich von p35-Wildtyp und p35-SUMO2 mit der endogen exprimierten Cdk5 ebenfalls beobachtet werden. SUMO alleine ist deutlich stärker im Zellkern lokalisiert und zeigt eine leichte cytoplasmatische Verteilung. Die Fusion mit einem Substratprotein mVenus zeigte keine Veränderung der subzellulären Lokalisation von mVenus. Dies ist ein Hinweis, dass die Umverteilung von p35 vom Zellkern in das Cytoplasma ein p35-spezifischer Effekt ist.

Die Sumoylierung wurde bislang erst für ein weiteres Cdk-aktivierendes Protein beschrieben: Durch die SUMO1-Konjugation an Lysin 33 von dem Zyklin D1 konnte eine erhöhte nukleäre Lokalisation von Zyklin D1 detektiert werden. Zyklin D1 reguliert die Cdk4 und Cdk6, welche in die DNA-Replikation und dem Zellzyklus involviert sind [63]. Zyklin D1 ist, wie p35, ein instabiles Protein. Die Phosphorylierung von Zyklin D1 an der spezifischen Threonin 286 Position durch die GSK-3 β -Kinase (*glycogen synthase kinase-3 β*) induziert die Ubiquitinierung von Zyklin D1 wodurch es aus dem Zellkern für den proteasomalen Abbau transportiert wird [164].

Die Gruppe um Asada zeigte eine Regulation der subzellulären Lokalisation von p35 durch die Cdk5-Aktivität [142]. Im Gegensatz zu p25/Cdk5, welches auch eine erhöhte Kinaseaktivität aufweist, kann p35 noch an der Serin 8 Position phosphoryliert werden, was zu der Ubiquitinierung und zum Abbau durch das Proteasom führt [102, 122]. Eine erhöhte Cdk5-Aktivität im Komplex mit dem sumoylierten p35 könnte, wie die Aktivität von GSK-3 β , für die Verteilung zwischen Zellkern und Cytoplasma von p35-SUMO2 einen entscheidenden Einfluss haben. Spekulativ könnte die erhöhte nukleäre Cdk5-Aktivität im Komplex mit p35-SUMO2 in einer verstärkten Phosphorylierung an dem Serin-Rest 8 resultieren. Es konnte in Embryonen von Wildtyp-Ratten eine stärkere Phosphorylierung von p35 an Serin 8 im Gegensatz zu adulten Tieren detektiert werden [140]. Dies könnte eine negative Rückkopplungsreaktion darstellen, der die Zelle vor einer verstärkten nukleären Cdk5-Aktivität schützt. Um diese Hypothese zu stützen müsste eine Serin(8)Alanin-Mutante von p35-Wildtyp und p35-SUMO2 generiert werden, um den direkten Einfluss der durch die p35-Sumoylierung erhöhten Cdk5-Aktivität auf die Lokalisationsverteilung von p35 zu untersuchen.

In Zusammenhang mit dem bisherigen Wissen zu den physiologischen und pathophysiologischen Funktionen von p35 liegt nahe, dass die Sumoylierung und die daraus resultierende Veränderung in der Lokalisation von p35 und der Cdk5-Aktivität einen Einfluss auf eine Vielzahl von biologischen Reaktionen hat. Das hochdynamische Gleichgewicht an sumoyliertem und unsumoyliertem p35 könnte ein effektiver Regulationsmechanismus für den p35/Cdk5-Komplex innerhalb der Zelle sein.

Zusammenfassung

Bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems und für spezifische neuronale Funktionen, wie Neuritenauswuchs sowie synaptische Funktionen und Plastizität, nimmt die Zyklin-abhängige Kinase 5 (Cdk5) eine zentrale Rolle ein. Für deren enzymatische Aktivität ist die Bindung des spezifischen neuronalen Zyklin-analogen Aktivators p35 erforderlich. Die Umverteilung von p35 innerhalb einer Zelle sowie die Deregulation der Cdk5-Aktivität kann zum neuronalen Zelltod in verschiedenen Modellen von neurodegenerativen Erkrankungen führen.

SUMO (*small ubiquitin related modifier*) kann die Protein/Protein-Interaktion vieler Substratproteine beeinflussen. Da die Proteinsequenz von p35 auch ein Konsensusmotiv für die Sumoylierung beinhaltet, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Hypothese untersucht, ob die Sumoylierung von p35 für die Regulation des enzymatischen p35/Cdk5-Komplexes relevant ist. Es konnte biochemisch sowie durch FRET/FLIM-basierende Untersuchungen eine kovalente Bindung von SUMO2 an p35 in Zellen nachgewiesen werden. Zudem konnten die SUMO-Akzeptorlysine in p35, K246 und K290, identifiziert werden. Verschiedene Konzentrationen an oxidativem Stress führen zu unterschiedlichen p35 Sumoylierungs-Niveaus. Eine veränderte p35-Sumoylierung könnte daher eine direkte Verbindung zwischen oxidativem Stress sowie einer veränderten Aktivität von Cdk5 und neurodegenerativen Erkrankungen darstellen.

Die Sumoylierung von p35 hat keinen Einfluss auf die Bindung mit Cdk5, jedoch wird durch die Sumoylierung von p35 die Aktivität des p35/Cdk5-Komplexes erhöht. Dies verursacht eine nukleocytoplasmatische Translokation von p35 innerhalb einer Zelle.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit p35 als ein SUMO-konjugierendes Protein identifiziert werden. Die Sumoylierung von p35 kann für die Modulierung der Lokalisation und der Aktivität des p35/Cdk5-Komplexes in physiologischen Situationen und bei neurodegenerativen Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielen. Durch die Sumoylierung von p35 konnte ein neuartiger Aktivitäts-abhängiger Weg, durch den die Sumoylierung die subzelluläre Lokalisation von Proteinen steuert, identifiziert werden.

Anhang

Das TAR DNA-bindende Protein 43 (TDP-43) ist ein weiteres Substrat für die Sumoylierung

In einem Zweitprojekt wurde die Sumoylierung eines weiteren Substratproteins untersucht, dass hier kurz dargestellt werden soll:

TDP-43 (*TAR DNA-binding protein 43* (auch TARDBR)) ist ein 414 Aminosäure großes Protein mit zwei RNA-Erkennungsmotiven (*RNA-recognition motif 1 and 2* (RRM1 und RRM2)), einer C-terminalen Glycin-reichen Domäne, einem zweiteiligen nukleären Lokalisationssignal (*nuclear localisation signal* (NLS)) und einem nukleären Exportsignal (*nuclear export signal* (NES)). Es reguliert RNA-Prozessierung auf verschiedene Art und Weise. Die RRM1-Domäne von TDP-43 ist kritisch für die Bindung von Einzelstrang RNAs [165, 166]. TDP-43 bindet mit der RRM1-Domäne einen großen Anteil an Transkripten, interagiert über Introns, 3' nicht translatierte Regionen (UTRs) und nicht kodierte RNAs [166, 167]. Das Spleißen einer Vielzahl von Transkripten wird durch TDP-43 vermittelt. Zudem hat TDP-43 einen Einfluss auf den mRNA-Umsatz, wie z.B. der Zyklin-abhängigen Kinase 6 [168]. Die Lokalisation von TDP-43 innerhalb von RNA-Granula in neurologischen Prozessen deutet darauf hin, dass TDP-43 auch in den RNA-Transport involviert ist. Eine Umverteilung von TDP-43 aus dem Nukleus ins Cytoplasma wird durch verschiedene Stresssensoren hervorgerufen. Dadurch kann TDP-43 in Stressgranula lokalisiert werden, wo es vermutlich eine Rolle in Transport und Stabilität von RNA hat [169, 170]. TDP-43 reguliert auch die microRNA-Biogenese und interagiert besonders mit einzelsträngiger DNA. Die Bindung von TDP-43 an bestimmte DNA-Sequenzen resultiert in die Inhibierung der Transkription auf eine unbekannt Art und Weise [170].

TDP-43 wurde in pathologischen Proteinaggregaten in den meisten sporadischen und familiären Formen der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) und der frontale-temporalen Lobär-Degeneration (FTLD, bekannt als FTLD-TDP) identifiziert [171]. Nahezu alle beschriebenen ALS-assoziiierenden Mutationen sind dominant negative sinnverändernde Mutationen (*missense mutation*) innerhalb der C-terminalen Glycin-reichen Domäne von TDP-43. Es liegt nahe, dass die veränderten Funktionen dieser Domäne für die Induzierung von neurodegenerativen Erkrankungen ausreichend sind [172-175]. Die TDP-43-Proteinpathologie wurde in einer Reihe von weiteren neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimer-Erkrankung, anderer Taupathologien oder der Lewy-Körperchen (*Lewy body*) Erkrankung, die durch α -Synuklein-Einschlüsse charakterisiert ist, dokumentiert. In FTLD-TDP und ALS, sowie in einem geringeren Umfang in anderen neurodegenerativen Erkrankungen in welchen TDP-43-

Pathologie gefunden wurden, sind die häufigsten spezifischen Erkrankungserscheinungen: abnormale Ubiquitinierung und Phosphorylierung von TDP-43, die Anwesenheit von Sarkosyl-unlöslichen TDP-43 Einschlüssen, sowie die Anwesenheit von gespalteten 20-25 kDa C-terminalen Fragmenten (CTFs; besonders im zerebralen Cortex) von TDP-43, die veränderte Lokalisation von TDP-43 und der Verlust der normalen nukleären TDP-43-Expression [176, 177]. Die fundamentale Frage, ob die TDP-43-Dysfunktionen Neurodegeneration durch toxischen Funktionszugewinn oder Verlust der physiologischen Funktion von TDP-43 vermittelt, ist bisher unbeantwortet.

Die Funktion von TDP-43 wird durch posttranslationale Modifikationen reguliert. Es konnte für TDP-43 eine krankheits-spezifische Phosphorylierung (Phosphorylierungsstellen: Ser 379, Ser 403+ Ser 404 und Ser 409 und Ser 410 [178]) und eine abnormale Ubiquitinierung von TDP-43 (Ubiquitierungsstellen: K102, K114, K145 und K181 [179]) nachgewiesen werden. Eine weitere posttranslationale Modifikation ist die Sumoylierung. In unserer Arbeitsgruppe konnte in HEK 293-Zellen gezeigt werden, dass TDP-43 auch sumoyliert ist. Es konnte eine Konjugation mit SUMO2, jedoch keine Modifizierung von SUMO1 mit TDP-43 detektiert werden. Hinweise auf eine SUMO2/3-Modifizierung von TDP-43 konnte schon in massenspektrometrischen Untersuchungen gezeigt werden [180]. Da Stresssensoren die Bildung von TDP-43-enthaltenen Stressgranula hervorrufen, sollte auch der Einfluss von oxidativem Stress auf die Sumoylierung von TDP-43 untersucht werden. Oxidativer Stress reguliert biphasisch den globalen Sumoylierungszyklus, jedoch werden nicht alle Substratproteine von SUMO auf die gleiche Art und Weise reguliert [75]. Die Sumoylierung von TDP-43 wurde nach Behandlung der Zellkultur für 30 Minuten mit unterschiedlichen Wasserstoffperoxidkonzentrationen (5 μ M, 20 μ M, 200 μ M, 1 mM und 10 mM) untersucht. Dabei konnte keine Beeinflussung der Konjugation von SUMO2 mit TDP-43 durch oxidativen Stress beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die Sumoylierung von TDP-43 unter Stressbedingungen stabil ist.

Insgesamt sind 20 Lysine innerhalb von TDP-43 vorhanden, welche als mögliche Sumoylierungsstellen dienen. Um die spezifischen Sumoylierungsstellen für weitere funktionelle Untersuchungen zu identifizieren, wurden vorerst zwei TDP-43-Mutanten generiert. In der einen Mutante wurden die 10 C-terminalen TDP-43-Lysine und in der anderen Mutante die 10 N-terminalen Lysine in TDP-43 zu Arginin substituiert. Es wurde eine Verringerung der Sumoylierung von TDP-43 mit der C-terminalen Lysin-Arginin-Mutante von TDP-43 beobachtet. In dieser Mutante waren alle Lysine in der Glycin-reichen Domäne, der NES-Region sowie im RRM2-Motiv mutiert. Da mit dieser Strategie letztlich die Sumoylierungsstellen von TDP-43 nicht genau eingegrenzt werden konnten, wurden mit Hilfe des SUMOplotTM-Computerprogramms (Abgent) die möglichen Sumoylierungsstellen von

TDP-43 ermittelt. Es konnten zwei Stellen, K136 (VKKD-Motiv) und K140 (LKTG-Motiv), mit den zwei höchsten Wahrscheinlichkeiten für die Sumoylierung von TDP-43 aufgezeigt werden. In biochemischen Analysen konnte mit entsprechenden Einzelmutanten von TDP-43 (K136 und K140) sowie in Form einer Doppelmutante kein reduziertes Sumoylierungsniveau im Vergleich zu TDP-43wt in HEK 293-Zellen beobachtet werden. Eine Verringerung der Sumoylierung konnte jedoch mittels einer 5-fachen Lysin-Arginin-Mutante (K84R, K136R, K137R, K140R und K145R, wobei K137 und K145 die nächst möglichen modifizierbaren Lysine sind, die neben den Lysinen mit der höchsten Sumoylierungswahrscheinlichkeit liegen) beobachtet werden. Diese Mutante zeigte in den CSM14.1-Zellen eine verstärkte perinukleäre und cytoplasmatische Lokalisation mit endogenem und koexprimierten SUMO2. Das Lysin K84 liegt innerhalb der NLS-Region von TDP-43 und könnte daher zu der veränderten Lokalisation beitragen. Der Wildtyp von TDP-43 zeigte sowohl mit endogenem sowie koexprimierte SUMO2 eine deutliche nukleäre Lokalisation. Um den genauen Einfluss der Sumoylierung auf die Lokalisation von TDP-43 in Zellen zu ermitteln, müssten weitere Untersuchungen folgen.

Es wurde bereits gezeigt, dass TDP-43 in dem Bereich um K263 proteolytisch durch Caspase 3 gespalten wird, wodurch ein C-terminales Fragment (CTF) entsteht. Diese CTFs beinhalten kein zweiteiliges NLS, wodurch TDP-43-CTFs in das Cytoplasma translokalisiert werden. Die CTFs sind in der Formierung von cytoplasmatischen Aggregaten involviert [170]. Die N-terminalen Bereiche (TDP-S6) zeigen andererseits eine Koloakalisation mit SUMO2/3 in nukleären Einschlüssen [180]. Es muss zusätzlich experimentell der Zusammenhang von proteolytischer Spaltung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und den bekannten krankheits-spezifischen Mutanten in TDP-43 geklärt werden.

Welchen Effekt die Sumoylierung von TDP-43 auf die neurologischen Erkrankungen oder in den physiologischen Funktionen von TDP-43 hat, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt werden. Dafür müssen vorerst die Sumoylierungsstellen von TDP-43 identifiziert werden. Anschließend können die funktionellen Komponenten von sumoylierten TDP-43 innerhalb einer Zelle untersucht werden. Die bisher gefundenen Stellen scheinen in die Lokalisation von TDP-43 involviert zu sein.

Literaturverzeichnis

1. Johnson, L.N. and D. Barford, *The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1993. **22**: p. 199-232.
2. Manning, G., et al., *Evolution of protein kinase signaling from yeast to man*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(10): p. 514-20.
3. Walsh, L., et al., *Genetic modification and variations in solvent increase the sensitivity of the yeast RAD54-GFP genotoxicity assay*. Mutagenesis, 2005. **20**(5): p. 317-27.
4. Hochstrasser, M., *Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(8): p. E153-7.
5. Kerscher, O., R. Felberbaum, and M. Hochstrasser, *Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 159-80.
6. Lois, L.M., C.D. Lima, and N.H. Chua, *Small ubiquitin-like modifier modulates abscisic acid signaling in Arabidopsis*. Plant Cell, 2003. **15**(6): p. 1347-59.
7. Tatham, M.H., et al., *Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9*. J Biol Chem, 2001. **276**(38): p. 35368-74.
8. 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.
9. Bohren, K.M., et al., *A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27233-8.
10. Lapenta, V., et al., *SMT3A, a human homologue of the S. cerevisiae SMT3 gene, maps to chromosome 21qter and defines a novel gene family*. Genomics, 1997. **40**(2): p. 362-6.
11. Melchior, F., *SUMO--nonclassical ubiquitin*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 591-626.
12. Johnson, E.S., *Protein modification by SUMO*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 355-82.
13. Bayer, P., et al., *Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1*. J Mol Biol, 1998. **280**(2): p. 275-86.
14. Dohmen, R.J., *SUMO protein modification*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1695**(1-3): p. 113-31.
15. Saitoh, H. and J. Hinchey, *Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3*. J Biol Chem, 2000. **275**(9): p. 6252-8.
16. Hardeland, U., et al., *Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover*. EMBO J, 2002. **21**(6): p. 1456-64.
17. Hofmann, H., S. Floss, and T. Stamminger, *Covalent modification of the transactivator protein IE2-p86 of human cytomegalovirus by conjugation to the ubiquitin-homologous proteins SUMO-1 and hSMT3b*. J Virol, 2000. **74**(6): p. 2510-24.
18. 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.
19. Johnson, E.S. and G. Blobel, *Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins*. J Cell Biol, 1999. **147**(5): p. 981-94.
20. Mahajan, R., L. Gerace, and F. Melchior, *Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association*. J Cell Biol, 1998. **140**(2): p. 259-70.
21. Matic, I., et al., *Phosphorylation of SUMO-1 occurs in vivo and is conserved through evolution*. J Proteome Res, 2008. **7**(9): p. 4050-7.
22. Hsiao, H.H., et al., *"ChopNSpice," a mass spectrometric approach that allows identification of endogenous small ubiquitin-like modifier-conjugated peptides*. Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(12): p. 2664-75.
23. Ulrich, H.D., *The fast-growing business of SUMO chains*. Mol Cell, 2008. **32**(3): p. 301-5.

24. Vertegaal, A.C., *SUMO chains: polymeric signals*. Biochem Soc Trans. **38**(Pt 1): p. 46-9.
25. Melchior, F., M. Schergaut, and A. Pichler, *SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(11): p. 612-8.
26. Martin, S., et al., *Emerging extranuclear roles of protein SUMOylation in neuronal function and dysfunction*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(12): p. 948-59.
27. Geiss-Friedlander, R. and F. Melchior, *Concepts in sumoylation: a decade on*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(12): p. 947-56.
28. Hay, R.T., *SUMO: a history of modification*. Mol Cell, 2005. **18**(1): p. 1-12.
29. Desterro, J.M., et al., *Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1*. J Biol Chem, 1999. **274**(15): p. 10618-24.
30. Lee, G.W., et al., *Modification of Ran GTPase-activating protein by the small ubiquitin-related modifier SUMO-1 requires Ubc9, an E2-type ubiquitin-conjugating enzyme homologue*. J Biol Chem, 1998. **273**(11): p. 6503-7.
31. Rodriguez, M.S., C. Dargemont, and R.T. Hay, *SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting*. J Biol Chem, 2001. **276**(16): p. 12654-9.
32. Sampson, D.A., M. Wang, and M.J. Matunis, *The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21664-9.
33. Macauley, M.S., et al., *Beads-on-a-string, characterization of ETS-1 sumoylated within its flexible N-terminal sequence*. J Biol Chem, 2006. **281**(7): p. 4164-72.
34. Bernier-Villamor, V., et al., *Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1*. Cell, 2002. **108**(3): p. 345-56.
35. Knipscheer, P., et al., *Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination*. Mol Cell, 2008. **31**(3): p. 371-82.
36. Hochstrasser, M., *SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein*. Cell, 2001. **107**(1): p. 5-8.
37. Pichler, A., et al., *The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity*. Cell, 2002. **108**(1): p. 109-20.
38. Kagey, M.H., T.A. Melhuish, and D. Wotton, *The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3*. Cell, 2003. **113**(1): p. 127-37.
39. Reverter, D. and C.D. Lima, *Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex*. Nature, 2005. **435**(7042): p. 687-92.
40. Tatham, M.H., et al., *Unique binding interactions among Ubc9, SUMO and RanBP2 reveal a mechanism for SUMO paralog selection*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(1): p. 67-74.
41. Zhao, X. and G. Blobel, *A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(13): p. 4777-82.
42. Cheng, C.H., et al., *SUMO modifications control assembly of synaptonemal complex and polycomplex in meiosis of Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev, 2006. **20**(15): p. 2067-81.
43. Johnson, E.S. and A.A. Gupta, *An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins*. Cell, 2001. **106**(6): p. 735-44.
44. Jackson, P.K., *A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases*. Genes & development, 2001. **15**(23): p. 3053-8.
45. Yang, S.H. and A.D. Sharrocks, *The SUMO E3 ligase activity of Pc2 is coordinated through a SUMO interaction motif*. Mol Cell Biol. **30**(9): p. 2193-205.
46. Wilkinson, K.A. and J.M. Henley, *Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation*. Biochem J. **428**(2): p. 133-45.
47. Wilkinson, K.A., Y. Nakamura, and J.M. Henley, *Targets and consequences of protein SUMOylation in neurons*. Brain Res Rev. **64**(1): p. 195-212.

48. 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.
49. Di Bacco, A., et al., *The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(12): p. 4489-98.
50. Gong, L. and E.T. Yeh, *Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3*. J Biol Chem, 2006. **281**(23): p. 15869-77.
51. Shin, E.J., et al., *DeSUMOylating isopeptidase: a second class of SUMO protease*. EMBO Rep, 2012. **13**(4): p. 339-46.
52. Pichler, A., et al., *SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(3): p. 264-9.
53. Rajan, S., et al., *Sumoylation silences the plasma membrane leak K⁺ channel K2P1*. Cell, 2005. **121**(1): p. 37-47.
54. Minty, A., et al., *Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif*. J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 36316-23.
55. Song, J., et al., *Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(40): p. 14373-8.
56. Hecker, C.M., et al., *Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs*. J Biol Chem, 2006. **281**(23): p. 16117-27.
57. Meulmeester, E., et al., *Mechanism and consequences for paralog-specific sumoylation of ubiquitin-specific protease 25*. Mol Cell, 2008. **30**(5): p. 610-9.
58. Palvimo, J.J., *PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 6): p. 1405-8.
59. Ross, S., et al., *SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization*. Mol Cell, 2002. **10**(4): p. 831-42.
60. Sapetschnig, A., et al., *Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1*. EMBO J, 2002. **21**(19): p. 5206-15.
61. Martin, S., et al., *SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission*. Nature, 2007. **447**(7142): p. 321-5.
62. Lee, B. and M.T. Muller, *SUMOylation enhances DNA methyltransferase 1 activity*. Biochem J, 2009. **421**(3): p. 449-61.
63. Wang, X.D., et al., *SUMO-modified nuclear cyclin D1 bypasses Ras-induced senescence*. Cell Death Differ, 2011. **18**(2): p. 304-14.
64. Gill, G., *SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?* Genes Dev, 2004. **18**(17): p. 2046-59.
65. Dasso, M., *Emerging roles of the SUMO pathway in mitosis*. Cell Div, 2008. **3**: p. 5.
66. Meulmeester, E. and F. Melchior, *Cell biology: SUMO*. Nature, 2008. **452**(7188): p. 709-11.
67. Wilken, N., et al., *Localization of the Ran-GTP binding protein RanBP2 at the cytoplasmic side of the nuclear pore complex*. Eur J Cell Biol, 1995. **68**(3): p. 211-9.
68. 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.
69. 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.
70. Kadare, G., et al., *PIAS1-mediated sumoylation of focal adhesion kinase activates its autophosphorylation*. J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 47434-40.
71. Chang, E., et al., *MK2 SUMOylation regulates actin filament remodeling and subsequent migration in endothelial cells by inhibiting MK2 kinase and HSP27 phosphorylation*. Blood. **117**(8): p. 2527-37.
72. Dadke, S., et al., *Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B by sumoylation*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(1): p. 80-5.
73. Benson, M.D., et al., *SUMO modification regulates inactivation of the voltage-gated potassium channel Kv1.5*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(6): p. 1805-10.

74. Truong, K., T.D. Lee, and Y. Chen, *Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of E1 Cys domain inhibits E1 Cys domain enzymatic activity*. J Biol Chem. **287**(19): p. 15154-63.
75. Bossis, G. and F. Melchior, *Regulation of SUMOylation by reversible oxidation of SUMO conjugating enzymes*. Mol Cell, 2006. **21**(3): p. 349-57.
76. 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.
77. Gong, L., et al., *Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease*. J Biol Chem, 2000. **275**(5): p. 3355-9.
78. Li, S.J. and M. Hochstrasser, *The Ulp1 SUMO isopeptidase: distinct domains required for viability, nuclear envelope localization, and substrate specificity*. J Cell Biol, 2003. **160**(7): p. 1069-81.
79. Mukhopadhyay, D. and M. Dasso, *Modification in reverse: the SUMO proteases*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(6): p. 286-95.
80. Kim, K.I., et al., *A new SUMO-1-specific protease, SUSP1, that is highly expressed in reproductive organs*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(19): p. 14102-6.
81. Desterro, J.M., M.S. Rodriguez, and R.T. Hay, *SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation*. Mol Cell, 1998. **2**(2): p. 233-9.
82. Lallemand-Breitenbach, V., et al., *Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(5): p. 547-55.
83. Tatham, M.H., et al., *RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(5): p. 538-46.
84. Hayakawa, F. and M.L. Privalsky, *Phosphorylation of PML by mitogen-activated protein kinases plays a key role in arsenic trioxide-mediated apoptosis*. Cancer Cell, 2004. **5**(4): p. 389-401.
85. 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.
86. 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.
87. Shalizi, A., et al., *PIASx is a MEF2 SUMO E3 ligase that promotes postsynaptic dendritic morphogenesis*. J Neurosci, 2007. **27**(37): p. 10037-46.
88. Tempe, D., M. Piechaczyk, and G. Bossis, *SUMO under stress*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 5): p. 874-8.
89. Melchior, F. and L. Hengst, *SUMO-1 and p53*. Cell cycle, 2002. **1**(4): p. 245-9.
90. Stehmeier, P. and S. Muller, *Phospho-regulated SUMO interaction modules connect the SUMO system to CK2 signaling*. Molecular cell, 2009. **33**(3): p. 400-9.
91. Watanabe, M., et al., *Developmental regulation of Ubc9 in the rat nervous system*. Acta biochimica Polonica, 2008. **55**(4): p. 681-6.
92. Loriol, C., et al., *Developmental regulation and spatiotemporal redistribution of the sumoylation machinery in the rat central nervous system*. PLoS One. **7**(3): p. e33757.
93. Steffan, J.S., et al., *SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology*. Science, 2004. **304**(5667): p. 100-4.
94. Selkoe, D.J., *Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease*. Nature, 1999. **399**(6738 Suppl): p. A23-31.
95. Dorval, V. and P.E. Fraser, *Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and alpha-synuclein*. J Biol Chem, 2006. **281**(15): p. 9919-24.
96. Krumova, P., et al., *Sumoylation inhibits alpha-synuclein aggregation and toxicity*. J Cell Biol, 2011. **194**(1): p. 49-60.
97. Dhavan, R. and L.H. Tsai, *A decade of CDK5*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(10): p. 749-59.
98. Morgan, D.O., *Principles of CDK regulation*. Nature, 1995. **374**(6518): p. 131-4.
99. Smith, D.S., P.L. Greer, and L.H. Tsai, *Cdk5 on the brain*. Cell Growth Differ, 2001. **12**(6): p. 277-83.

100. Malumbres, M., *Revisiting the "Cdk-centric" view of the mammalian cell cycle*. Cell Cycle, 2005. **4**(2): p. 206-10.
101. De Azevedo, W.F., et al., *Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine*. Eur J Biochem, 1997. **243**(1-2): p. 518-26.
102. Patrick, G.N., et al., *p35, the neuronal-specific activator of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway*. J Biol Chem, 1998. **273**(37): p. 24057-64.
103. Tsai, L.H., et al., *p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5*. Nature, 1994. **371**(6496): p. 419-23.
104. Tang, D., et al., *An isoform of the neuronal cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activator*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26897-903.
105. Humbert, S., R. Dhavan, and L. Tsai, *p39 activates cdk5 in neurons, and is associated with the actin cytoskeleton*. J Cell Sci, 2000. **113 (Pt 6)**: p. 975-83.
106. Poon, R.Y., J. Lew, and T. Hunter, *Identification of functional domains in the neuronal Cdk5 activator protein*. J Biol Chem, 1997. **272**(9): p. 5703-8.
107. Tang, D., et al., *Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activation domain of neuronal Cdk5 activator. Evidence of the existence of cyclin fold in neuronal Cdk5a activator*. J Biol Chem, 1997. **272**(19): p. 12318-27.
108. Maccioni, R.B., et al., *The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology*. Eur J Biochem, 2001. **268**(6): p. 1518-27.
109. Tarricone, C., et al., *Structure and regulation of the CDK5-p25(ncx5a) complex*. Mol Cell, 2001. **8**(3): p. 657-69.
110. Fu, A.K., et al., *Cdk5 is involved in neuregulin-induced AChR expression at the neuromuscular junction*. Nat Neurosci, 2001. **4**(4): p. 374-81.
111. Chae, T., et al., *Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality*. Neuron, 1997. **18**(1): p. 29-42.
112. Nikolic, M., et al., *The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation*. Genes Dev, 1996. **10**(7): p. 816-25.
113. Tan, T.C., et al., *Cdk5 is essential for synaptic vesicle endocytosis*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(8): p. 701-10.
114. Zukerberg, L.R., et al., *Cables links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth*. Neuron, 2000. **26**(3): p. 633-46.
115. Kim, S.H. and T.A. Ryan, *CDK5 serves as a major control point in neurotransmitter release*. Neuron. **67**(5): p. 797-809.
116. Crews, L., et al., *Modulation of aberrant CDK5 signaling rescues impaired neurogenesis in models of Alzheimer's disease*. Cell Death Dis. **2**: p. e120.
117. Su, S.C. and L.H. Tsai, *Cyclin-dependent kinases in brain development and disease*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2011. **27**: p. 465-91.
118. Xin, X., et al., *Cdk5 and Trio modulate endocrine cell exocytosis*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 20): p. 4739-48.
119. Hou, Z., et al., *Microtubule association of the neuronal p35 activator of Cdk5*. J Biol Chem, 2007. **282**(26): p. 18666-70.
120. He, L., et al., *The neuronal p35 activator of Cdk5 is a novel F-actin binding and bundling protein*. Cell Mol Life Sci. **68**(9): p. 1633-43.
121. He, L., Z. Hou, and R.Z. Qi, *Calmodulin binding and Cdk5 phosphorylation of p35 regulate its effect on microtubules*. J Biol Chem, 2008. **283**(19): p. 13252-60.
122. Choe, E.A., et al., *Neuronal morphogenesis is regulated by the interplay between cyclin-dependent kinase 5 and the ubiquitin ligase mind bomb 1*. J Neurosci, 2007. **27**(35): p. 9503-12.
123. Wu, D.C., et al., *The expression of Cdk5, p35, p39, and Cdk5 kinase activity in developing, adult, and aged rat brains*. Neurochem Res, 2000. **25**(7): p. 923-9.

124. Delalle, I., et al., *Temporal and spatial patterns of expression of p35, a regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5, in the nervous system of the mouse*. J Neurocytol, 1997. **26**(5): p. 283-96.
125. Tomizawa, K., et al., *Localization and developmental changes in the neuron-specific cyclin-dependent kinase 5 activator (p35nck5a) in the rat brain*. Neuroscience, 1996. **74**(2): p. 519-29.
126. Fu, X., et al., *Identification of nuclear import mechanisms for the neuronal Cdk5 activator*. J Biol Chem, 2006. **281**(51): p. 39014-21.
127. Zhang, J., H. Li, and K. Herrup, *Cdk5 nuclear localization is p27-dependent in nerve cells: implications for cell cycle suppression and caspase-3 activation*. J Biol Chem, 2010. **285**(18): p. 14052-61.
128. Saito, T., et al., *Okadaic acid-stimulated degradation of p35, an activator of CDK5, by proteasome in cultured neurons*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **252**(3): p. 775-8.
129. Lee, M.S., et al., *Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain*. Nature, 2000. **405**(6784): p. 360-4.
130. Kusakawa, G., et al., *Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25*. J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 17166-72.
131. Patzke, H. and L.H. Tsai, *Calpain-mediated cleavage of the cyclin-dependent kinase-5 activator p39 to p29*. J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 8054-60.
132. Patrick, G.N., et al., *Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 615-22.
133. Nguyen, M.D., R.C. Lariviere, and J.P. Julien, *Deregulation of Cdk5 in a mouse model of ALS: toxicity alleviated by perikaryal neurofilament inclusions*. Neuron, 2001. **30**(1): p. 135-47.
134. Osuga, H., et al., *Cyclin-dependent kinases as a therapeutic target for stroke*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(18): p. 10254-9.
135. Smith, P.D., et al., *Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13650-5.
136. Weishaupt, J.H., et al., *Inhibition of CDK5 is protective in necrotic and apoptotic paradigms of neuronal cell death and prevents mitochondrial dysfunction*. Mol Cell Neurosci, 2003. **24**(2): p. 489-502.
137. Amin, N.D., W. Albers, and H.C. Pant, *Cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) activation requires interaction with three domains of p35*. J Neurosci Res, 2002. **67**(3): p. 354-62.
138. Chang, K.H., et al., *Nuclear envelope dispersion triggered by deregulated Cdk5 precedes neuronal death*. Mol Biol Cell. **22**(9): p. 1452-62.
139. Kamei, H., et al., *Suppression of calpain-dependent cleavage of the CDK5 activator p35 to p25 by site-specific phosphorylation*. J Biol Chem, 2007. **282**(3): p. 1687-94.
140. Hosokawa, T., et al., *Quantitative measurement of in vivo phosphorylation states of Cdk5 activator p35 by Phos-tag SDS-PAGE*. Mol Cell Proteomics. **9**(6): p. 1133-43.
141. Hayashi, N. and K. Titani, *N-myristoylated proteins, key components in intracellular signal transduction systems enabling rapid and flexible cell responses*. Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences, 2010. **86**(5): p. 494-508.
142. Asada, A., T. Saito, and S. Hisanaga, *Phosphorylation of p35 and p39 by Cdk5 determines the subcellular location of the holokinase in a phosphorylation-site-specific manner*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 14): p. 3421-9.
143. Haas, S.J. and A. Wree, *Dopaminergic differentiation of the Nurr1-expressing immortalized mesencephalic cell line CSM14.1 in vitro*. Journal of anatomy, 2002. **201**(1): p. 61-9.
144. Graham, G.J. and E.G. Wright, *Haemopoietic stem cells: their heterogeneity and regulation*. International journal of experimental pathology, 1997. **78**(4): p. 197-218.
145. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.

146. Jaffray, E.G. and R.T. Hay, *Detection of modification by ubiquitin-like proteins*. Methods, 2006. **38**(1): p. 35-8.
147. Day, R.N., C.F. Booker, and A. Periasamy, *Characterization of an improved donor fluorescent protein for Forster resonance energy transfer microscopy*. J Biomed Opt, 2008. **13**(3): p. 031203.
148. Gershoni, J.M. and G.E. Palade, *Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter*. Anal Biochem, 1982. **124**(2): p. 396-405.
149. Gershoni, J.M. and G.E. Palade, *Protein blotting: principles and applications*. Anal Biochem, 1983. **131**(1): p. 1-15.
150. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
151. Wessel, D. and U.I. Flugge, *A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids*. Analytical biochemistry, 1984. **138**(1): p. 141-3.
152. Kugler, S., et al., *Neuron-specific expression of therapeutic proteins: evaluation of different cellular promoters in recombinant adenoviral vectors*. Mol Cell Neurosci, 2001. **17**(1): p. 78-96.
153. Nagai, T., et al., *A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(1): p. 87-90.
154. Glickman, M.H. and A. Ciechanover, *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction*. Physiol Rev, 2002. **82**(2): p. 373-428.
155. Saito, T., et al., *Developmental regulation of the proteolysis of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator by phosphorylation*. J Neurosci, 2003. **23**(4): p. 1189-97.
156. Kim, E.T., et al., *Enhanced SUMOylation of proteins containing a SUMO-interacting motif by SUMO-Ubc9 fusion*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **388**(1): p. 41-5.
157. Sun, H., J.D. Levenson, and T. Hunter, *Conserved function of RNF4 family proteins in eukaryotes: targeting a ubiquitin ligase to SUMOylated proteins*. The EMBO journal, 2007. **26**(18): p. 4102-12.
158. Vlasits, J., et al., *Hydrogen peroxide oxidation by catalase-peroxidase follows a non-scrambling mechanism*. FEBS Lett, 2007. **581**(2): p. 320-4.
159. Klaunig, J.E., L.M. Kamendulis, and B.A. Hocevar, *Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis*. Toxicol Pathol. **38**(1): p. 96-109.
160. Buttke, T.M. and P.A. Sandstrom, *Oxidative stress as a mediator of apoptosis*. Immunol Today, 1994. **15**(1): p. 7-10.
161. Clutton, S., *The importance of oxidative stress in apoptosis*. Br Med Bull, 1997. **53**(3): p. 662-8.
162. Andersen, J.K., *Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?* Nature medicine, 2004. **10** Suppl: p. S18-25.
163. Melo, A., et al., *Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2011. **2011**: p. 467180.
164. Diehl, J.A., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization*. Genes & development, 1998. **12**(22): p. 3499-511.
165. Buratti, E. and F.E. Baralle, *Characterization and functional implications of the RNA binding properties of nuclear factor TDP-43, a novel splicing regulator of CFTR exon 9*. J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36337-43.
166. Polymenidou, M., et al., *Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43*. Nat Neurosci. **14**(4): p. 459-68.
167. Tollervey, J.R., et al., *Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43*. Nat Neurosci. **14**(4): p. 452-8.
168. Ayala, Y.M., T. Misteli, and F.E. Baralle, *TDP-43 regulates retinoblastoma protein phosphorylation through the repression of cyclin-dependent kinase 6 expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(10): p. 3785-9.

169. Freibaum, B.D., et al., *Global analysis of TDP-43 interacting proteins reveals strong association with RNA splicing and translation machinery*. J Proteome Res. **9**(2): p. 1104-20.
170. Lee, K., et al., *Overexpression of TDP-43 causes partially p53-dependent G2/M arrest and p53-independent cell death in HeLa cells*. Neurosci Lett. **506**(2): p. 271-6.
171. Neumann, M., et al., *Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis*. Science, 2006. **314**(5796): p. 130-3.
172. Pesiridis, G.S., V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski, *Mutations in TDP-43 link glycine-rich domain functions to amyotrophic lateral sclerosis*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(R2): p. R156-62.
173. Gitcho, M.A., et al., *TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease*. Ann Neurol, 2008. **63**(4): p. 535-8.
174. Sreedharan, J., et al., *TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis*. Science, 2008. **319**(5870): p. 1668-72.
175. Van Deerlin, V.M., et al., *TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis*. Lancet Neurol, 2008. **7**(5): p. 409-16.
176. Mackenzie, I.R., R. Rademakers, and M. Neumann, *TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia*. Lancet Neurol. **9**(10): p. 995-1007.
177. Geser, F., V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski, *Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration: a spectrum of TDP-43 proteinopathies*. Neuropathology. **30**(2): p. 103-12.
178. Hasegawa, M., et al., *[TDP-43 proteinopathies, toward understanding of the molecular pathogenesis]*. Rinsho Shinkeigaku, 2009. **49**(11): p. 783-5.
179. Dammer, E.B., et al., *Coaggregation of RNA-binding proteins in a model of TDP-43 proteinopathy with selective RGG motif methylation and a role for RRM1 ubiquitination*. PLoS One. **7**(6): p. e38658.
180. Seyfried, N.T., et al., *Multiplex SILAC analysis of a cellular TDP-43 proteinopathy model reveals protein inclusions associated with SUMOylation and diverse polyubiquitin chains*. Mol Cell Proteomics. **9**(4): p. 705-18.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Anja Büchner
Geburtsdatum: 19.06.1982 in Weimar
Familienstand: Ledig

Hochschulstudium

09/2009 – 04/2013

Biologie

Georg-August-Universität in Göttingen
Abschluss: **Doktor rer nat**

09/2009 – 03/2013

Dissertation in der Universitätsmedizin in der
Abteilung Neurologie

Thema der Dissertation:

„Charakterisierung der Sumoylierung von p35, dem
Aktivator der Zyklin-abhängigen Kinase 5 (Cdk5), und
der daraus resultierenden funktionellen Konsequenz“

10/2001 – 10/2007

Biologie

Georg-August-Universität in Göttingen
Abschluss: **Diplom-Biologin** (Note: gut)

11/2005 – 12/2006

Diplomarbeit am Göttinger Institut für Humangenetik

Thema der Examensarbeit:

„Studien zur Interaktion, Expression und Funktion von
Leupaxin in Mammakarzinomzellen des Menschen“,
ausgezeichnet mit dem Institutspreis 2006 des
Institutes für Humangenetik der Universität Göttingen

11/2005

Mündliche Diplomprüfung

Hauptfach: Botanik

Nebenfächer: Humangenetik und Biophysik

Studienbegleitende Tätigkeiten

Konferenzen

- 14-18/07/2012 **8th Forum of European Neuroscience (FENS)**
Barcelona, Spanien
Poster Präsentation
- 23/11/2011 “**ScieTalk NRW 2011-Cutting-Edge Technologies in Molecular Life Sciences**” Konferenz
Münster, Deutschland
Poster Präsentation
- 12-16/11/2011 **41st Society for Neuroscience (SfN) 2011 Konferenz**
Washington, USA
Vortrags Präsentation
- 22-23/09/2011 **10 Years ENI-G Symposium**
Göttingen, Deutschland
Poster Präsentation
- 28-29/07/2011 **NeuroDOWO** Tagung-22. Neurologischer Doktoranden Workshop Bonn
Bonn, Deutschland
Poster Präsentation

zusätzliche Nebenfächer

- 10/2004 – 08/2005 Nebenfachausbildung für die organische Chemie an der Georg-August-Universität in Göttingen in Form von Praktikum und Vorlesungen
- 10/2003 – 08/2004 mikrobiologische Nebenfachausbildung an der Georg-August-Universität in Göttingen in Form von Praktikum und Vorlesungen

Praktika

- 03/2007 – 09/2007 Forschungsinstitut für Tief- und Rohrleitungsbau Weimar e.V.,
Fachbereich Bionik und nachwachsende Rohstoffe
- 03/2004 Physikalisches Institut der Universität Göttingen
Röntgenphysikalisches Praktikum

Berufliche Tätigkeiten

- 11/2008 – 09/2009 Universitätsmedizin Göttingen, Abteilung Neurologie
wissenschaftliche Hilfskraft im Projekt „Untersuchung der Auswirkung von Zykin-abhängigen Kinasen in humanen Gliomazellen“
- 11/2007 – 12/2007 Forschungsinstitut für Tief- und Rohrleitungsbau Weimar e.V.,
Fachbereich Bionik
Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Projekt „Verwendung nachwachsender Rohstoffe zum Einsatz für neuartige Baustoffe“

Publikationen

Büchner A., Krumova P., Ganesan S., Bähr M., Eckermann K., Weishaupt J.H. (2013)

Sumoylation regulates localisation of the neuronal Cdk5 activator p35 by modulation of p35/Cdk5 complex activity

(eingereicht)

Büchner A., Bähr M., Weishaupt J.H., Eckermann K. (2013)

Sumoylation regulates localisation of TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)

(in Arbeit)

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. M. Bähr für die Möglichkeit der Durchführung einer Dissertation in seiner Arbeitsgruppe in der Klinik für Neurologie der Universitätsmedizin bedanken. Zudem danke ich Ihm für die Referatübernahme, der guten Zusammenarbeit und der Betreuung während der Dissertation.

Bei Frau Prof. Dr. S. Hoyer-Fender bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats, sowie Ihrer guten und hilfreichen Teilnahme an den Betreuungsausschüssen im Laufe der Dissertation.

Weiterhin gilt mein Dank meinem Betreuer und Anleiter Prof Dr. J. H. Weishaupt für die Vergabe dieses interessanten Themas, für die Korrektur der Arbeit sowie für die Betreuung.

Ein besonders großer Dank gilt Frau Dr. Katrin Eckermann für die Betreuung und die Anleitung nach der Übernahme der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. J. H. Weishaupt. Jedoch mehr bedanke ich mich bei Ihr für Ihre ständige Ansprechbarkeit, Hilfsbereitschaft und Geduld bei all meinen Fragen und Problemen während des gesamten Zeitraums. Durch ihre Ratschläge und ihre Hilfestellungen während der Arbeit hat Sie mich immer wieder ermutigt.

Ebenfalls möchte ich mich für eine hervorragende und intensive Kooperation mit und bei Herrn Dr. Sundar Ganesan bedanken.

Ein großer Dank geht auch an Frau Dr. Petranka Krumova für die Vorarbeiten, Ihre liebe Einweisung in das Thema und die immer anhaltenden Hilfestellungen und Ratschläge.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. M. Triard bedanken für die zur Verfügung gestellten transgenen His₆-SUMO2 Mäuse sowie bei Frau Dr. G. Bunt für die verwendeten mTFP- und mVenus-Vektoren.

Außerdem möchte ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre in den Laboren des Waldweg 33 bedanken. Besonders bei Christine Poser, Claudia Fokken, Sabine Ceramella, Barbara Müller, für die verschiedenen Hilfestellungen im S1-Labor.

Mein Dank gilt natürlich auch besonders Kim Saal und den lieben Menschen im S2-Labor.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Freunden Dana, Sonny, Sebastian, Steffi und Isabell für ihre Freundschaft. Sowie geht ein großer Dank an Torben für seine gute und schnelle Durchsicht der Arbeit und seine lieben Worte.

Ein weiterer Dank geht an Alina für Ihre schnelle Korrektur, sowie den hilfreichen entspannenden Abenden und für ihre Freundschaft.

Danke für die Hilfe, die aufmunternden Worte, die unzähligen Unterstützungen und die Durchsicht dieser Arbeit möchte ich an meine Schwester und meinen Schwager sagen. Eure Nachtschichten während der Korrektur werde ich nie wieder gut machen können.

Ein ganz lieber Dank geht an meine Mama, die mich erträgt und mich in jeder Lebenslage unterstützt.

Mein größter Dank geht an Marco, für sein Ohr, seinen ruhigen Geist und seinen Humor. Tausend Dank, dass du so bist wie du bist!