

Die Rolle der PML-Kernkörperchen bei der Regulation der MHC Klasse II-Expression

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium

vorgelegt dem
Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Diplom-Biochemiker Tobias Ulbricht
geboren am 20.03.1980 in Saalfeld (Thüringen)

- 1. Gutachter:** PD Dr. Peter Hemmerich
Fritz-Lipmann-Institut, Molekularbiologie
BeutenbergstraÙ 11, D-075 Jena
- 2. Gutachter:** Prof. Dr. Frank Groß
Fritz-Lipmann-Institut, Biochemie
BeutenbergstraÙ 11, D-075 Jena
- 3. Gutachter:** Prof. Dr. Hans Will
Heinrich-Pette-Institut, Allgemeine Virologie
MartinistraÙ 52, D-20251 Hamburg

Eingereicht: 31. März 2010

Disputation: 13. August 2010

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	2
1.1 Der Zellkern	2
1.1.1 Chromosomenterritorien und Chromatinschleifen	4
1.1.2 Kernkörperchen	6
1.1.3 Foci.....	7
1.2 PML-Kernkörperchen.....	8
1.2.1 PML-Isoformen.....	8
1.2.2 Mögliche Funktionen von PML-Kernkörperchen	10
1.2.3 Rolle von PML-Kernkörperchen bei der Transkriptionsregulation .	13
1.2.4 Assoziation von PML-Kernkörperchen mit bestimmten Genomabschnitten	13
1.3 Der Haupthistokompatibilitäts-Komplex (MHC)	15
1.3.1 Struktur des MHC-Genclusters	15
1.3.2 Regulation von MHC Klasse II-Genen	17
1.4 Ziel der Arbeit.....	19
2 Material & Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Chemikalien & Verbrauchsmaterialien	20
2.1.2 Geräte	22
2.1.3 Programme	23
2.1.4 Antikörper	23
2.1.5 Zelllinien	24
2.1.6 Plasmide	24
2.1.7 siRNAs	24
2.1.8 Primer für die semiquantitative PCR	25
2.2 Methoden	26
2.2.1 Zellkultur	26
2.2.2 Plasmid-Transfektion	26
2.2.3 siRNA-Transfektion	27
2.2.4 Zellyse	27
2.2.5 Diskontinuierliche SDS-PAGE	28
2.2.6 <i>Westernblot</i> (Proteintransfer & Immundetektion)	29

2.2.7 Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)	30
2.2.8 Mikroskopie	30
2.2.9 FRAP (<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>)	31
2.2.10 RICS (<i>raster image correlation spectroscopy</i>)	32
2.2.11 RNA-Isolierung	33
2.2.12 RT-PCR (<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)	34
2.2.13 Semiquantitative PCR (<i>polymerase chain reaction</i>)	34
2.2.13 DNA-PAGE	35
3 Ergebnisse	36
3.1 IFN γ erhöht spezifisch die Assoziationsrate zwischen PML-Kernkörperchen und dem MHC Klasse II-Gencluster	36
3.2 Einige MHC Klasse II-Transkriptionsfaktoren binden an PML <i>bodies</i>	37
3.3 PML-Depletion bewirkt eine erniedrigte IFN γ -induzierte Synthese einiger MHC Klasse II-mRNAs	42
3.4 PML-Depletion verringert die IFN γ -induzierte MHC-II-Molekülexpression	44
3.5 PML-Depletion inhibiert die IFN γ -induzierte Expression von CIITA	46
3.6 CIITA interagiert mit PML-Isoform II an PML-Kernkörperchen	48
3.7 Bestimmung der Mobilität von GFP- CIITA im Zellkern mittels RICS	53
4 Diskussion	56
4.1 Transkriptionsregulation am PML-Kernkörperchen	56
4.2 IFN γ erhöht spezifisch die Assoziationsrate zwischen PML-Kernkörperchen und dem MHC Klasse II-Gencluster	57
4.3 Die MHC Klasse II-Transkriptionsfaktoren CIITA, RFXap, RFXb und NFYA binden an PML <i>bodies</i>	60
4.4 PML-Proteindepletion verringert die Menge an IFN γ -induziertem CIITA ...	61
4.5 Die Herunterregulierung der PML-Proteinmenge führt zu einer veränderten MHC Klasse II-Expression	62
4.1 Ausblick	64
5 Literaturverzeichnis	66
6 Abkürzungsverzeichnis	80
Anhang	83
Selbstständigkeitserklärung	
Lebenslauf & Veröffentlichungen	
Danksagung	

Zusammenfassung

Die Regulation der Lokalisation von Genen im Zellkern ist ein wichtiges Transkriptions-Kontrollelement in Eukaryoten. Für Wirbeltierzellen konnte gezeigt werden, dass bestimmte Gene oder größere Genabschnitte an Kernkörperchen assoziieren, wodurch möglicherweise deren Transkriptionsaktivität reguliert werden kann. Promyelozytische Leukämie (PML)-Kernkörperchen sind makromolekulare Multiproteinkomplexe in Wirbeltierzellkernen, deren Funktion noch nicht aufgeklärt ist. Es ist bekannt, dass diese Kernkörperchen nicht-zufällig mit dem Gen-reichen *major histocompatibility* (MHC) Gencluster auf Chromosom 6 assoziiert sind. Diese Genregion enthält eine Vielzahl von Genen für die angeborene und adaptive Immunantwort. Die Frage, ob PML-Proteine bzw. PML-Kernkörperchen an der Regulation dieser Gene beteiligt ist, blieb bislang unbeantwortet.

Aufbauend auf der Beobachtung, dass die Assoziationsrate zwischen PML Kernkörperchen und dem MHC Klasse II-Genlocus spezifisch durch Interferon Gamma ($\text{IFN}\gamma$) erhöht wird, zeigt die vorliegende Arbeit, dass $\text{IFN}\gamma$ ebenfalls zu einer Rekrutierung von Faktoren, die die Transkription von MHC II-Genen kontrollieren, an PML-Kernkörperchen führt. Vier der 8 bekannten MHC Klasse II-Transkriptionsfaktoren (CIITA, RFXap, RFXb und NFYA) binden an PML-Kernkörperchen. Das Protein MHC Klasse II-Transaktivator (CIITA), der transkriptionelle Hauptregulator der MHC-II-Gene, wird spezifisch durch die PML-Proteinisoform II an PML-Kernkörperchen rekrutiert. $\text{IFN}\gamma$ verlängert die PML II-vermittelte Anbindung von CIITA an PML-Kernkörperchen, die Verweildauer beträgt mehrere Minuten. Die Herunterregulierung der PML-Proteinmenge führt (i) zu einer Verringerung der Transkriptionsrate einiger, aber nicht aller MHC II-Gene, (ii) zu einer Inhibition der MHC II-Proteinexpression auf der Oberfläche von Fibroblasten und (iii) zu einer verringerten $\text{IFN}\gamma$ -induzierten Proteinexpression von CIITA.

Diese Beobachtungen zeigen, dass PML bzw. PML-Kernkörperchen eine Funktion als Koaktivator bei der $\text{IFN}\gamma$ -induzierten MHC II Expression ausüben. Der zugrundeliegende Mechanismus basiert vermutlich auf einer physischen Assoziation von PML-Kernkörperchen mit dem MHC II-Genlocus und der Regulation der CIITA-Proteinmenge.

1 Einleitung

1.1 Der Zellkern

Der eukaryotische Zellkern ist verantwortlich für die Speicherung, den Erhalt, die Vererbung und die Expression der genetischen Information, die er in Form von Chromosomen enthält (Diekmann & Hemmerich, 2005). Diesen Aufgaben liegen die biochemischen Aktivitäten Chromatin-Kompaktierung/Dekompaktierung, DNA-Replikation, Chromosomen-Segregation, DNA-Reparatur und RNA-Transkription zugrunde (Lanctôt *et al.*, 2007). Der Hauptteil dieser Funktionen wird von makromolekularen Komplexen bewerkstelligt, die mit hoher Genauigkeit und in einer Umgebung des 'molekularen Gedränges' (*molecular crowding*) am Chromatin agieren müssen (Richter *et al.*, 2008). Daher kommt der fehlerfreien Assemblierung solcher Komplexe eine besondere Bedeutung zu (von Mikecz & Hemmerich, 2005). Das Verständnis von Zellkernfunktionen geht Hand in Hand mit dem Verständnis der Zellkernarchitektur und dem dynamischen Zusammenspiel seiner Komponenten (Cook, 2001).

Neben den Chromosomen und den biochemisch aktiven Komplexen befinden sich im Chromatin-Zwischenraum von Wirbeltierzellkernen eine Reihe von subnukleären Domänen, Strukturen oder Kernkörperchen (Abb. 1.1). Nukleoli, die perinukleoläre Domäne, *Speckles*, *Paraspeckles*, *Cajal-Kernkörperchen*, aber auch kleinere Domänen, wie Transkriptions-, Replikations- und Reparatur-Foci entstehen durch die dynamische Assemblierung spezifischer Kernproteine und Nukleinsäuren auf der Basis der Selbstorganisation (Abb. 1.1; Misteli, 2007; Hager *et al.*, 2009; Matera *et al.*, 2009).

In Interphase-Zellen liegen Chromosomen in Form von Chromosomenterritorien vor, welche ein bestimmtes Volumen im Zellkern einnehmen (Abb. 1.1; Heard & Bickmore, 2007). Mit DNA-bindenden Farbstoffen können Heterochromatin und Euchromatin mikroskopisch sichtbar gemacht werden (Yasmineh & Yunis, 1974). Konstitutives Heterochromatin findet sich hauptsächlich im Zentromerbereich, in der Peripherie von Nukleoli und unterhalb der Kernlamina (Abb. 1.1).

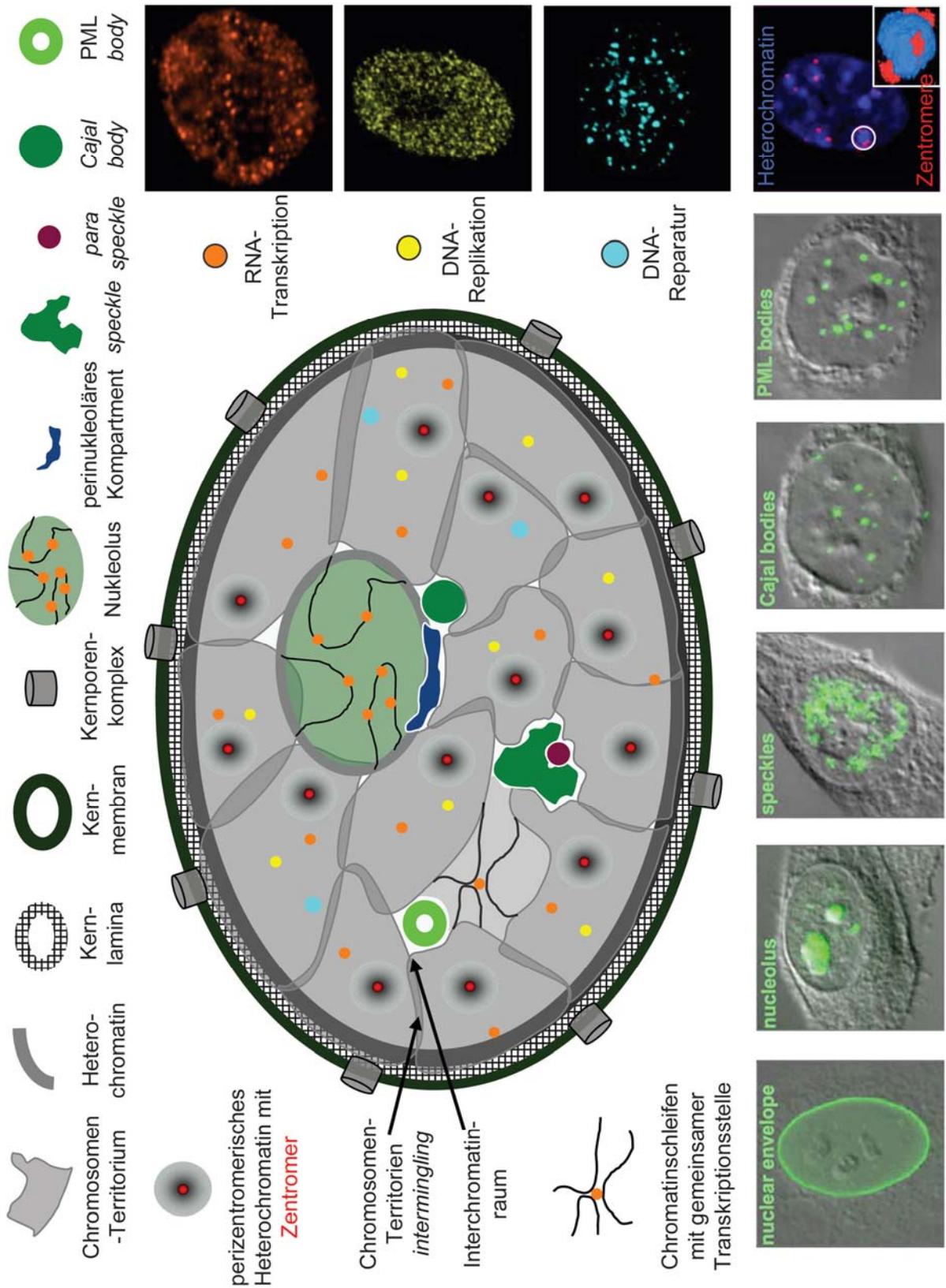


Abb. 1.1: Architektur des Wirbeltierzellkerns (Legende siehe nächste Seite)

Abb. 1.1: Architektur des Wirbeltierzellkerns.

In Zellkernen von Wirbeltieren ist das Chromatin in Form von Chromosomen-Territorien (CTs) organisiert. CTs können an ihren Grenzbereichen überlappen (*intermingling*) oder den sogenannten Interchromatinraum ausbilden (weiß) (Branco & Pombo, 2006; Cremer *et al.*, 2000). Das konstitutive Heterochromatin tritt hauptsächlich als perizentromerisches Chromatin über den Kern verteilt, in der Kernperipherie und um die Nukleoli auf. Der Zellkern ist von der Kernmembran (dunkelgrün) umgeben, die eine Vielzahl von Kernporenkomplexen aufweist und an der sich nach innen die netzartige Kernlamina anschließt. Chromatinschleifen mit assoziierten Transkriptionsfabriken können aus den CTs heraus in den Nukleolus oder ins Nukleoplasma hineinragen. Transkription (orange), Replikation (gelb) und DNA-Reparaturprozesse (hellblau) erscheinen meist als kleine Domänen mit einem Durchmesser von weniger als 100 nm. Vielgestaltige Kernkörperchen, wie *speckles*, *paraspeckles*, der perinukleolare Bereich, *Cajal bodies* oder PML-Körperchen können durch konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden (untere Bildleiste). Abbildung in veränderter Form aus Lenser *et al.*, (2010).

Obwohl im Wirbeltierzellkern Aktin, nukleäres Myosin und Tubulin nachgewiesen wurden (Dion *et al.*, 2010), besitzt dieser kein Stützgerüst ähnlich dem Zytoskelett im Zytoplasma und auch keine nukleäre Matrix mit Stützfunktion (Pederson, 2000). Daher wird spekuliert, dass die dreidimensionale Struktur des Zellkerns in erster Linie durch die vorhandenen Strukturen und den damit verbundenen Funktionen etabliert wird (Nunez *et al.*, 2009; Cook, 2010). Allenfalls die Zellkernhülle, bestehend aus der mit Kernporen durchsetzten Zellkern-Doppelmembran und der darunter liegenden Kernlamina kann Stützfunktionen wahrnehmen, indem an ihr beispielsweise Heterochromatin oder aktive Gene verankert werden (Starr, 2009).

1.1.1 Chromosomenterritorien und Chromatinschleifen

Interphase Chromosomen besetzen diskrete, teilweise überlappende Territorien (Branco & Pombo, 2006). Die Position von Chromosomen im Zellkern ist nicht immer zufällig (Cremer & Cremer, 2001). Eine gesicherte Korrelation besteht darin, dass Gen-arme Chromosomen präferentiell in der Zellkernperipherie lokalisieren, während Gen-reiche Chromosomen eher in der Zellkernmitte angeordnet sind (Croft *et al.*, 1999). Die räumlich-zeitliche Anordnung der Gene innerhalb des Zellkerns ist ebenfalls nicht zufällig und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression. Beispielsweise kann der Ort eines Gens innerhalb des Chromosomenterritoriums (CT) Einfluss auf dessen Expressionsstärke und der Spleißaktivität der synthetisierten mRNA haben (Heard & Bickmore, 2007). Außerdem wurde berichtet, dass Chromosomen nicht-zufällige Nachbarn haben

können, was sich in einer gehäuften chromosomalen Translokationsrate und Interaktionen ganz bestimmter genomischer Regionen auswirkt (Roix *et al.*, 2003).

Chromosomale Interaktionen können die Aktivierung oder Repression von Genen im dreidimensionalen Kontext der Zellkernarchitektur beeinflussen (Göndör & Ohlsson, 2009). Dabei bringen Chromatinschleifen distale Chromatinelemente in physischen Kontakt. Ein prominentes Beispiel dafür ist die DNA, die für ribosomale RNA kodiert. Diese genomischen Abschnitte dekondensieren als Schleifen im Nukleolus, um effizient transkribiert zu werden (Abb. 1.1; Bártová *et al.*, 2009). Solche Interaktionen können durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) oder *chromosome conformation capture* (3C)-Methoden sichtbar gemacht bzw. identifiziert werden, wenn zwei oder mehr Chromatinregionen von dem Selben oder von verschiedenen Chromosomen zusammenkommen (Sexton *et al.*, 2007). Die zusammengeführten Elemente können dabei bis zu 10^6 Kilobasen (Kb) auseinander liegen (Dostie *et al.*, 2006).

Bei physischen Kontakten zwischen verschiedenen CTs spricht man von Chromatinbrücken (Göndör & Ohlsson, 2009). Die mechanistische Voraussetzung für diesen Vorgang ist möglicherweise eine β -Aktin-getriebene Ausstülpung einer genomischen Region aus einem CT in ein anderes (Hu *et al.*, 2008). Ausdruck solcher Interaktionen ist die simultane Expression von Genen verschiedener Chromosomen an ein und demselben Transkriptionsfokus (Abb. 1.1: *chromatin loops with shared transcription site*; Osborne *et al.*, 2004) und die Assoziation spezifischer Gene mit bestimmten Kernkörperchen (Zhao *et al.*, 2009). Die aus solchen Untersuchungen gewonnenen Anhaltspunkte deuten tatsächlich auf dynamische Assoziationen zwischen verschiedenen Kerndomänen und Genorten hin, die auf zelluläre Signale reagieren und zur transkriptionellen Kontrolle spezifischer Gene beitragen können (Sexton *et al.*, 2007; Babu *et al.*, 2008; Kumaran *et al.*, 2008; Takizawa *et al.*, 2008; Sutherland & Bickmore, 2009; Matera *et al.*, 2009).

Weitere Unterstützung für diese Hypothese ergab sich bei der Analyse des *major histocompatibility complex* (MHC)-Gencluster auf Chromosom 6 (s. 1.3) (Volpi *et al.*, 2001). Dieser Genomabschnitt unterliegt einer rapiden und massiven Konformationsänderung in humanen Fibroblasten nach Interferon-Behandlung.

Dabei bildet sich innerhalb von 10 min eine singuläre Chromatin-Schleife aus, die den gesamten MHC-Gencluster enthält. Die Schleife wird komplett dekondensiert, hyperacetyliert und ist in der Folge transkriptionell hoch aktiv (Müller *et al.*, 2004; Branco & Pombo, 2006; Christova *et al.*, 2007). Die Schleifenbildung beruht auf einem noch nicht aufgeklärten Mechanismus, an dem das Protein STAT1 beteiligt ist (Christova *et al.*, 2007).

1.1.2 Kernkörperchen

Die prominentesten Kernkörperchen sind der Nukleolus, die *Speckles*, die *Cajal* Kernkörperchen und die promyelozytische Leukämie (PML)-Kernkörperchen (Abb. 1.1). Weitere Kernkörperchen umfassen *PcG bodies*, *Gemini bodies* (*Gems*), die OPT-Domäne, *Cleavage bodies* und die SAM68-Kernkörperchen (Spector, 2001). Diese subnukleären Strukturen stellen membranlose, makromolekulare Komplexe dar, in denen (mit Ausnahme der PML-Kernkörperchen) jeweils funktionsähnliche Proteine dynamisch assemblieren (Handwerger & Gall, 2006). Funktionsbedingt akkumulieren beispielsweise gehäuft Komponenten der Ribosomenbiogenese im Nukleolus (Raska *et al.*, 2006).

Die biochemische Funktion der anderen subnukleären Kernkörperchen ist hingegen weniger klar oder unbekannt. *Speckles*, die auch interchromatin-granuläre Cluster (ICG) genannt werden, enthalten vornehmlich prä-mRNA-Spleißfaktoren. Da mRNA-Spleißen nicht, wie zunächst vermutet, in *Speckles* stattfindet, denkt man, dass diese als Speicher-, Assemblierungs- und/oder Recycling-Ort für essentielle Spleißosom-Komponenten dienen (Lamond & Spector, 2003). Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass besonders stark transkribierte Gene oft an der Peripherie von *Speckles* gefunden werden (Brown *et al.*, 2008). *Cajal* Kernkörperchen werden in der Immunfluoreszenz-Färbung als punktförmige Strukturen sichtbar (Abb. 1.1). Sie sind wahrscheinlich der Ort für die Biogenese und Reifung von *small ribonucleoprotein particles* (snRNPs) (Gall, 2000; Matera, 2009).

Während die intensive Untersuchung individueller Kernstrukturen Einblicke in ihren Aufbau gewährte, versucht man in jüngster Zeit das funktionelle Zusammenspiel zwischen den Zellkernstrukturen, insbesondere zwischen Chromatin und

Kernkörperchen zu ergründen (Ching *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2009;). Die aus diesen Untersuchungen gewonnenen Anhaltspunkte deuten tatsächlich auf dynamische Assoziationen zwischen verschiedenen Kerndomänen und Genorten, die auf zelluläre Signale reagieren und zur transkriptionellen Kontrolle spezifischer Gene beitragen können (Sexton *et al.*, 2007; Babu *et al.*, 2008; Kumaran *et al.*, 2008; Takizawa *et al.*, 2008; Sutherland & Bickmore, 2009; Matera *et al.*, 2009). Beispielsweise assoziieren Cajal-Kernkörperchen spezifisch mit Histon- und snRNA-Genen. Diese Assoziation erfolgt nur mit transkriptionell aktiven Genen und ein Aktin-getriebener Prozess führt die Gene an die Kernkörperchen heran (Frey & Matera, 2001; Dundr *et al.*, 2007). Ein weiteres prominentes Beispiel sind die an der Ribosomenbiogenese beteiligten Nukleoli. Deren Ausprägung basiert in der Interphase unter anderem auf der Zusammenlagerung mehrerer NORs (*nucleolus organizer regions*) verschiedener Chromosomen. Bei den NORs handelt es sich um in *tandem repeats* angeordnete ribosomale Gene, die im Menschen auf fünf Chromosompaaren verteilt sind (Raska *et al.*, 2006).

1.1.3 Foci

Im Wirbeltierzellkern erfolgen DNA-Replikation, RNA-Transkription/Prozessierung und DNA-Reparatur in punktförmigen Strukturen, *foci*, mit einem Durchmesser von i.d.R. weniger als 100 nm (Abb. 1.1). In Bezug auf Transkription und Replikation werden diese fokalen Stellen mitunter als 'Fabriken' bezeichnet, weil in ihnen alle Proteine und Enzyme akkumulieren, die für die jeweiligen biochemischen Reaktionen benötigt werden (Cook, 1999). Aufgrund von biochemischen, biophysikalischen und theoretischen Untersuchungen wurde kürzlich ein Modell vorgeschlagen, in dem Transkriptions*foci* eine zentrale Rolle in der Organisation des aktiven Genoms einnehmen (Cook, 2010). DNA-Replikation erfolgt ebenso in spezialisierten, fokalen Stellen, an denen alle Faktoren, die direkt oder indirekt an der Replikation teilnehmen, dynamisch assemblieren (Leonhart *et al.*, 2000). Das gleiche gilt für DNA-Reparaturstellen (Lukas *et al.*, 2005). Die Assemblierung dieser Komplexe am Chromatin beruht auf Selbstorganisation der beteiligten Proteine (Misteli, 2007).

1.2 PML-Kernkörperchen

PML-Kernkörperchen, auch bekannt als POD (PML *oncogenic domain*), ND10 (*nuclear domain 10*) oder Kremer-Kernkörperchen sind subnukleäre Strukturen, die zum ersten Mal vor über 50 Jahren mittels Elektronenmikroskopie beschrieben wurden (de Thé *et al.*, 1960). In Kernen von Zellkultur-Wirbeltierzellen finden sich durchschnittlich 5 bis 30 PML-Kernkörperchen mit einer Größe von ~0,2 bis 1 µm (Ascoli & Maul, 1991). Später entdeckte man diese Kernkörperchen in den Kernen fast aller menschlichen Gewebe (Gambacorta *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 1998). Neben einigen konstitutiven Komponenten, wie z.B. PML, Sp100, SUMO-1 und Daxx, sind mittlerweile eine Vielzahl weiterer Proteine bekannt, die je nach Zelltyp, Zellzyklusphase und äußeren Einflüssen (transient) mit den PML-Kernkörperchen interagieren. PML-Kernkörperchen sind funktionell heterogene und dynamische Strukturen (Abb. 1.3; Sternsdorf *et al.*, 1997; Dellaire & Bazett-Jones, 2004; Bernardi & Pandolfi, 2007). Ihre Bedeutung offenbarte sich zunächst bei der Untersuchung von Promyelozyten aus Patienten, die an akuter promyelozytischer Leukämie (APL) litten. Die dabei auftretende Chromosomentranslokation t(15:17) führt zur Fusion der Gene für PML und den Retinsäurerezeptor Alpha (RAR α) (de Thé *et al.*, 1990). Aufgrund bestehender Evidenz wird angenommen, dass die Zerstörung der PML-Kernkörperchen durch die Expression der Fusionsproteine an der Leukämogenese bei APL beteiligt ist (Brown *et al.*, 2009). Das PML-Protein ist nicht nur die Namensgebende sondern auch die Hauptstrukturkomponente, denn ohne PML bilden sich keine PML-Kernkörperchen (Ishov *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 2000).

1.2.1 PML-Isoformen

Das *PML*-Gen besteht aus 9 Exons aus denen in menschlichen Zellen durch alternatives Spleißen mindestens 12 verschiedene Transkripte und deren Proteine hervorgehen. Im Zellkern wurden sechs Isoformen (PML I - VI) identifiziert, die den gleichen N-Terminus besitzen. Er umfasst 552 Aminosäuren und wird durch Exon 1 bis 6 kodiert. Die alternativ gespleißten Exons 7 bis 9 bedingen die unterschiedlichen C-Termini der Isoformen (Abb. 1.2; Fagioli *et al.*, 1992; Jensen *et al.*, 2001). Zwischen Mensch und Maus sind lediglich die Isoform-spezifischen Sequenzen von PML I & V hoch konserviert (Condemine *et al.*, 2006).

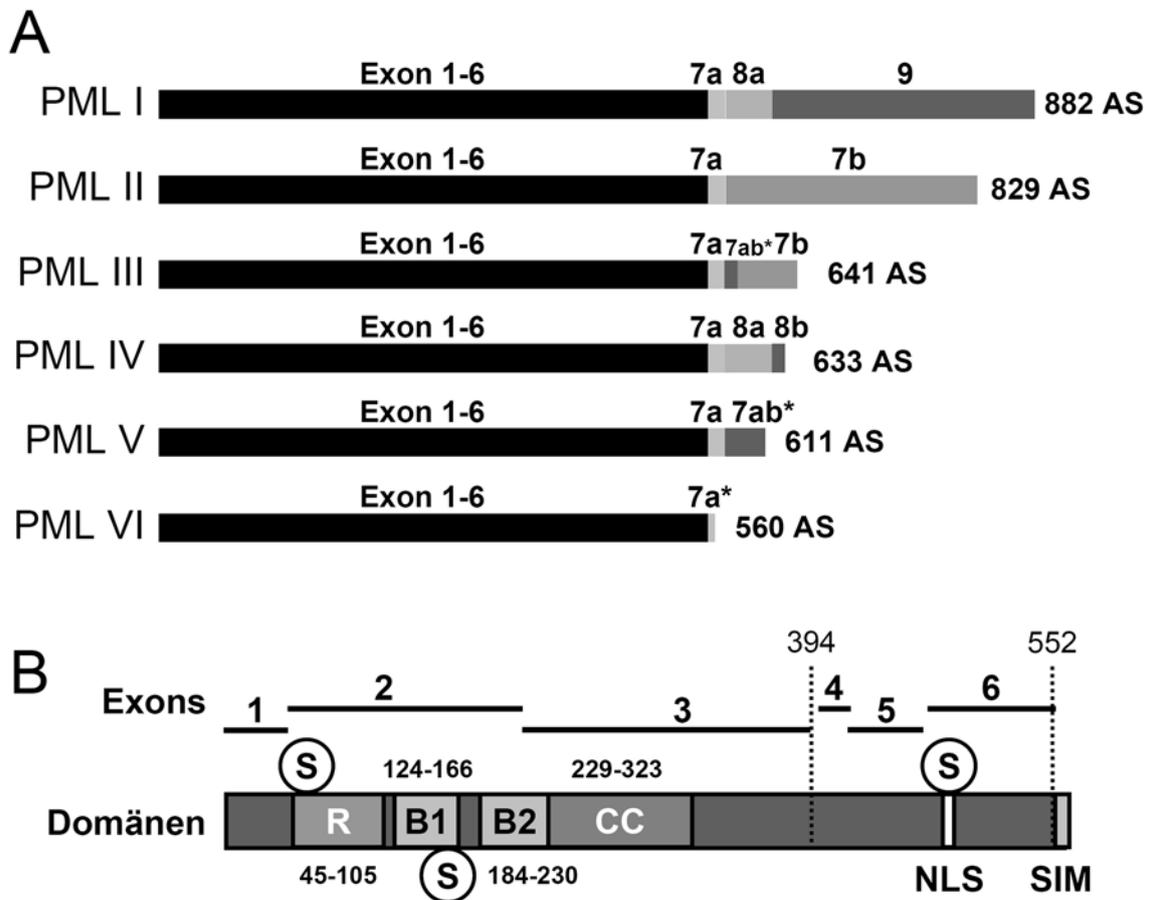


Abb. 1.2: PML-Isoformen des Zellkerns.

(A) Schematische Darstellung der bekannten nukleären PML-Isoformen (PML I - VI). Allen 6 Isoformen gemein ist der N-Terminus, kodiert durch Exon 1 bis 6, während sich die durch alternatives Spleißen von Exon 7 bis 9 erzeugten C-Termini unterscheiden. (B) Schematische Darstellung der Exon-Organisation des PML-Gens, der entsprechenden Proteindomänen, einiger bekannter post-translationaler Modifikationen und der chromosomalen Bruchstellen bei APL (gepunktete Linien). *, beibehaltene Intronsequenz; APL, akute Promyelozytische Leukämie; AS, Aminosäuren; B, B-Box; CC, coiled-coil Domäne; NLS, Kernlokalisierungssignal; R, RING-Finger (*really interesting new gene*); S, SUMOylierungsstelle an K65, K160 und K490; SIM, SUMO-Interaktionsmotiv (V₅₅₆VVI₅₅₉).

Der N-Terminus des PML-Proteins beinhaltet eine RING-Domäne (*really interesting new gene*), zwei B-Boxen und eine *coiled-coil* Domäne, die zusammen das RBCC-Motiv bilden und PML als Mitglied der TRIM-Proteinfamilie (*tripartite motif*) ausweisen (Jensen *et al.*, 2001). Das RBCC-Motiv, die drei SUMOylierungsstellen sowie das SUMO-Interaktionsmotiv (SIM), welches, kodiert durch Exon 7a, bis auf PML VI alle nukleären Isoformen besitzen, sind für die Ausbildung der PML-Kernkörperchen notwendig und hinreichend (Abb.1.2.; Fagioli *et al.*, 1998; Reymond *et al.*, 2001, Shen *et al.*, 2006). Die Assoziation vieler Komponenten mit den PML-

Kernkörperchen wird durch ein Proteininteraktionsnetzwerk bewerkstelligt, welches auf der kovalenten SUMO-Modifikation und dem SIM basiert (Shen *et al.*, 2006). Über individuelle Funktionen der einzelnen PML-Isoformen wird erst seit kurzem intensiver geforscht. In menschlichen Zellen werden alle sechs Isoformen exprimiert, von denen die PML-Isoformen I und II den größten Anteil ausmachen (Condemine *et al.*, 2006). Es wird vermutet, dass die unterschiedlichen C-Termini Oberflächen für Isoform-spezifische Protein-Interaktionen darstellen.

PML-Isoform IV vermittelt beispielsweise die Bindung von p53 an Kernkörperchen unter zellulären Stressbedingung (Fogal *et al.*, 2000; Pearson *et al.*, 2000 und 2001). Dieselbe Isoform ist auch als einzige in der Lage, bei Überexpression in primären humanen Fibroblasten Seneszenz zu induzieren (Bischof *et al.*, 2002). Eine Exonuklease III-ähnliche Domäne, für die aber bis jetzt keine biochemische Aktivität nachgewiesen werden konnte, befindet sich im evolutionär konservierten C-Terminus von PML I (Condemine *et al.*, 2007). Die gleiche Studie zeigt, dass PML I und PML IV, nicht aber die anderen Isoformen, bei Stress-induzierter Seneszenz in Nukleoli rekrutiert werden können. Die E6-Proteine von humanen Papilloma-Viren können spezifisch an die PML-Isoformen I, II und IV binden, wobei PML IV durch *high risk* E6 (HPV-18) dem proteasomalen Abbau zugeführt wird (Guccione *et al.*, 2004). Das Protein E4-Orf3 des Adenovirus interagiert spezifisch mit PML II *in vitro* und *in vivo*, nicht aber mit den anderen PML Isoformen (Hoppe *et al.*, 2006). Diese Interaktion führt zum proteasomalen Abbau von PML und damit zur Auflösung der Kernkörperchen. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass für die E4-Orf3/PML II-Interaktion 40 Aminosäuren im C-terminalen Bereich von PML II verantwortlich sind (Leppard *et al.*, 2009).

In Lebendzell-Experimenten wurde beobachtet, dass PML-Isoform V als GFP-Fusionsprotein mit 48 min eine relativ lange Verweildauer an Kernkörperchen besitzt (Weidtkamp-Peters *et al.*, 2008). Daher wird vermutet, dass die strukturelle Stabilität von PML-Kernkörperchen über den festen Einbau von PML V-Molekülen erfolgt (Brand *et al.*, 2010). Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass im Laufe der Evolution verschiedene PML-Isoformen gebildet wurden, die zwar alle physisch in Kernkörperchen akkumulieren können, gleichzeitig aber auch individuelle Funktionen im Zellkern übernommen haben (Weidtkamp-Peters *et al.*, 2008).

1.2.2 Mögliche Funktionen von PML- Kernkörperchen

Die biochemische Funktion von PML-Kernkörperchen ist unbekannt. Jedoch wird darüber spekuliert, ob PML als SUMO E3-Ligase für sich und andere Proteine fungieren könnte. Dafür spricht, dass PML und viele der mit den PML-Kernkörperchen assoziierten Proteine SUMOyliert werden und dass PML, wie auch andere SUMO E3-Ligasen, eine RING-Domäne besitzt, die für dessen effiziente SUMOylierung notwendig ist (Shen *et al.*, 2006; Saitoh *et al.*, 2006; Bernardi & Pandolfi, 2007). PML-Kernkörperchen stellen möglicherweise dynamische Organisationszentren im Kern dar, die an der koordinierten Regulation verschiedener Zellfunktionen, wie der DNA-Schadensantwort, der Apoptose, der Alterung und der antiviralen Immunantwort, beteiligt sind (Abb. 1.3; Hofmann & Will, 2003; Everett, 2006; Bernardi & Pandolfi, 2007).

Die Vielzahl der verschiedenen Funktionen dürfte auf den dynamischen und regulierten Umsatz sowie die Modifikation spezifischer Kernproteine, die an den oben genannten Prozessen beteiligt sind, an den PML-Kernkörperchen zurückzuführen sein (Boisvert *et al.*, 2001; Wiesmeijer *et al.*, 2002; Weidtkamp-Peters *et al.*, 2008; Brand *et al.*, 2010). Da Proteasomkomponenten in oder an PML-Kernkörperchen akkumulieren, könnten sie am örtlichen Proteinumsatz im Zellkern beteiligt sein (Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2001; Lafarga *et al.*, 2002; Wójcik & DeMartino, 2003; Scharf *et al.*, 2007; St-Germain *et al.*, 2008). Damit in Einklang steht die Beobachtung, dass in lebenden Zellen eine „fokussierte“ Proteasomenaktivität mit einem Teil der PML-Kernkörperchen assoziiert ist (Rockel *et al.*, 2005) und dass die SUMO-abhängige E3 Ubiquitin-Ligase durch poly-SUMOyliertes PML an PML-Kernkörperchen rekrutiert wird (Häkli *et al.*, 2005; Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2008; Tatham *et al.*, 2008).

Die Überexpression von PML, speziell von PML IV, verursacht Zellzyklusarrest, Proliferationsstopp und/oder Seneszenz (Salomoni & Pandolfi, 2002; Bourdeau *et al.*, 2009). Die Expression von PML und anderer PML-Kernkörperchen-Komponenten wie Sp100 wird *in vivo* und *in vitro* durch Interferone (IFN) induziert (Sternsdorf *et al.*, 1997; Regad & Chelbi-Alix, 2001). Außerdem interagieren mehrere virale Proteine mit PML-Kernkörperchen, was mitunter ihre Zerstörung zur Folge hat. Daher glaubt man, dass PML bzw. die Kernkörperchen an der IFN-vermittelten antiviralen Antwort

und Entzündungsprozessen beteiligt sind (Terris *et al.*, 1995; Lavau *et al.*, 1995; Chelbix-Alix *et al.*, 1998; Regad & Chelbi-Alix, 2001; Tavalai & Stamminger, 2008; Bowling & Adamson, 2005; Everett & Chelbi-Alix, 2007).

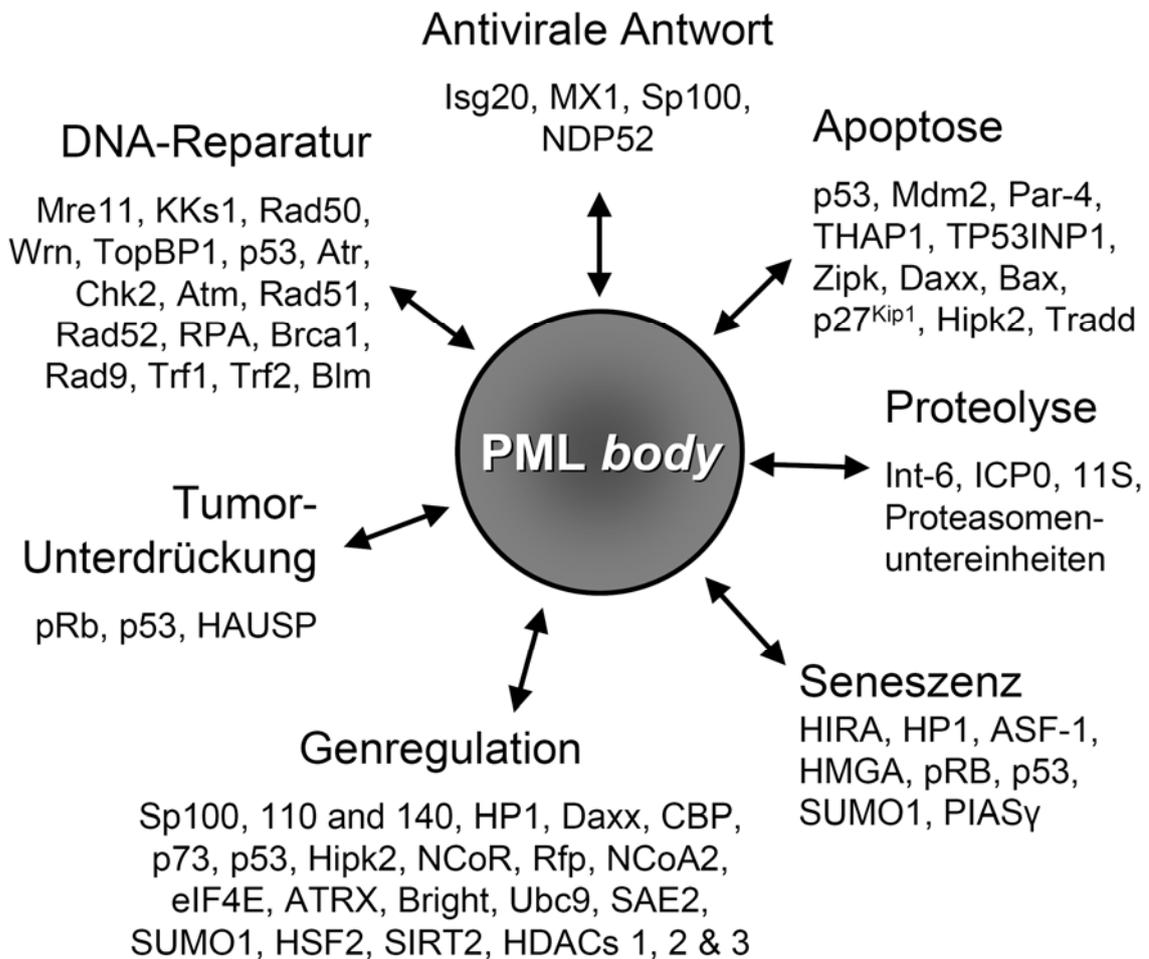


Abb. 1.3: PML-Kernkörperchen-bindende Proteine und deren Gruppierung in Funktionsfamilien.

Bisher sind ca. 80 Proteine bekannt, die mit den PML-Kernkörperchen konstitutiv oder je nach Zelltyp, Zellzyklusstatus oder exogenen Einflüssen (z.B. Streß) interagieren. Über diese Faktoren, die an den PML *bodies* titriert, posttranslational modifiziert und/oder kompartimentalisiert werden, beeinflussen die Kernkörperchen eine Vielzahl von Kernprozessen, wie DNA-Reparatur, Apoptose, Proteolyse, Seneszenz, antivirale Antwort und Genregulation (modifiziert nach Dellaire & Bazett-Jones, 2004).

1.2.3 Rolle von PML-Kernkörperchen bei der Transkriptionsregulation

Es gibt verschiedene Hinweise für den Einfluss von PML und PML-Kernkörperchen auf die Transkriptionsregulation. Der erste Anhaltspunkt ergab sich aus der Beobachtung, dass DNA-Viren ihr Genom in einem *'immediate transcript environment'*, d. h. in unmittelbarer Nähe von PML-Kernkörperchen transkribieren (Ishov *et al.*, 1997). Nach einem kürzlich erstellten PML-(Kernkörperchen-) Interaktom sind 166 verschiedene Proteine bekannt, die mit PML physisch oder funktionell interagieren können (van Damme *et al.*, 2010). Die Hälfte dieser Proteine ist direkt oder indirekt in der Transkriptionskontrolle involviert. Transkriptionsfaktoren wie CBP/p300, Daxx und p53 lokalisieren vorübergehend an den PML-Kernkörperchen, wo sie modifiziert und/oder kompartmentalisiert werden (Zhong *et al.*, 2000). Es wurde auch gezeigt, dass PML Isoform IV als Transkriptionsregulator agieren kann, wenn es künstlich an Promotoren rekrutiert wird (Vallian *et al.*, 1997; Doucas *et al.*, 1999). Wird Promotor-enthaltende DNA künstlich an PML-Kernkörperchen rekrutiert, kann deren Aktivität direkt transkriptionell beeinflusst werden (Block *et al.*, 2006; Bishop *et al.*, 2006). Schließlich findet man Orte naszenter mRNA-Synthese und transkriptionell hoch aktive Gene in der Peripherie von PML-Kernkörperchen (Grande *et al.*, 1996; Boisvert *et al.* 2000; von Mikecz *et al.*, 2000; Kiesslich *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2006).

1.2.4 Assoziation von PML-Kernkörperchen mit bestimmten Genomabschnitten

Die Gruppe um Denise Sheer hat profunde Analysen zur Assoziation von PML-Kernkörperchen und genomischen Regionen in menschlichen Fibroblasten durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass in 42% der untersuchten MRC5-Fibroblasten der Gen-reiche *major histocompatibility complex* (MHC)-Genort auf Chromosom 6 mit PML-Kernkörperchen assoziiert vorliegt (Shiels *et al.*, 2001). In weitergehenden Analysen konnte die Gruppe zeigen, dass vornehmlich transkriptionell hochaktive Genomabschnitte in physischer Nähe zu PML-Kernkörperchen lokalisieren (Wang *et al.*, 2004). Die Verringerung der PML-Proteinmenge mittels siRNA-Technik führte in diesen Studien zu keiner signifikanten Veränderung der Transkriptionsrate der assoziierten Gene. Allerdings lag die Verringerung der PML-Menge auch nur bei 40%

der Kontrollmenge ([Wang et al., 2004](#)), was möglicherweise nicht ausreichte, um einen PML-Depletionseffekt zu detektieren.

Während der programmierten *in vitro* Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen (ESC) über neuronale Vorläuferzellen (NPC) in post-mitotische Neurone (PMN) sind PML-Kernkörperchen nur dann stabil mit dem *Oct3/4*-Gen assoziiert, wenn diese Gene auch transkribiert werden. Das Abschalten dieser Gene in PMNs ist direkt mit ihrer physischen Dissoziation von den Kernkörperchen korreliert ([Aoto et al., 2006](#)). Die Autoren schlossen daraus, dass an PML-Kernkörperchen ein dynamisches Gleichgewicht von Transkriptionsfaktoren für die regulierte Expression der *Oct3/4*-Gene etabliert wird ([Aoto et al., 2006](#)). Eine hohe Assoziationsrate wurde auch zwischen PML-Kernkörperchen und dem *p53*-Gen in Jurkat-Zellen beobachtet. Diese Studie ging aber nicht der Frage nach, ob diese Interaktion biologische Relevanz hat ([Sun et al., 2003](#)).

Die nicht zufällige Assoziation mit Genomabschnitten hat zu einem Modell geführt, in dem PML-Kernkörperchen als Verankerungspunkte für spezifische Chromatin-Regionen dienen und damit eine Funktion ähnlich der von *matrix attachment regions* (MARs) ausüben ([Ching et al., 2005](#)). Dieses Modell erhielt weitere Unterstützung als gezeigt wurde, dass der MHC Klasse I-*locus* an PML-Kernkörperchen in distinkte Chromatin-Schleifen gelegt ist, deren Verankerung an Kernkörperchen durch eine Interaktion des MAR-Proteins SATB1 mit PML erfolgt. In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass sich die Verringerung der PML-Proteinmenge direkt auf die Transkriptionsrate von MHC Klasse I-Genen auswirkt ([Kumar et al., 2007](#)). Damit war zum ersten Mal der Beweis erbracht, dass PML bzw. PML-Kernkörperchen transkriptions-regulatorische Funktionen an endogenen Genen ausüben kann.

1.3 Der Haupthistokompatibilitäts-Komplex (MHC)

1.3.1 Struktur des MHC-Genclusters

Der Haupthistokompatibilitäts-Komplex (*major histocompatibility complex*, MHC)-Gencluster umfasst 224 Gene, die auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (6p21.3) über einen Bereich von 3,6 MBp angeordnet sind und von denen wahrscheinlich 128 exprimiert werden. Er ist damit einer der Gen-reichsten Regionen des Genoms ([Abb. 1.4](#); [Volpi et al., 2000](#); [The MHC sequencing consortium, 1999](#)). Ein Großteil (ca. 40 %) dieser exprimierten Gene ist an Prozessen der adaptiven und angeborenen Immunantwort beteiligt. Den vier Regionen, in die der MHC-Cluster meist unterteilt wird, können verschiedene Gengruppen zugeordnet werden. So findet man in der Klasse III-Region Gene, die für Komponenten des Komplementsystems und für Cytokine kodieren. Gene der Klasse I-Region exprimieren ubiquitär Glykoproteine (HLA-A, HLA-B, HLA-C), die die Präsentation endogen erzeugter Peptidfragmente gegenüber CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen vermitteln. Ein Prozess der für die Erkennung von transformierten und infizierten Zellen und für die T-Zell-Reifung (positive und negative Selektion) von Nöten ist. Die Gene von LMP-2/7, die am proteasomalen Abbau der zytosolischen Antigene zu Peptidfragmenten beteiligt sind, und TAP-1/2, die die Fragmente transportieren, liegen innerhalb der MHC Klasse II-Region ([Volpi et al., 2000](#); [The MHC sequencing consortium, 1999](#); [Antoniou & Powis, 2007](#)). Sie zählen dennoch nicht zu den MHC Klasse II-Molekülen, die konstitutiv nur von spezialisierten Antigenpräsentierenden Zellen (APCs, Makrophagen, Dendritische Zellen, Epithelzellen des Thymus, B- und T-Zellen) und von zentraler Bedeutung für die adaptive Immunantwort sind. Die vorrangige Aufgabe der heterodimeren MHC Klasse II-Glykoproteine ist die Präsentation von Peptiden extrazellulärer Pathogene auf der Zelloberfläche von APCs gegenüber CD4-positiven T-Helfer-Zellen ([Cresswell, 1994](#); [Krawcyk & Reith, 2006](#)).

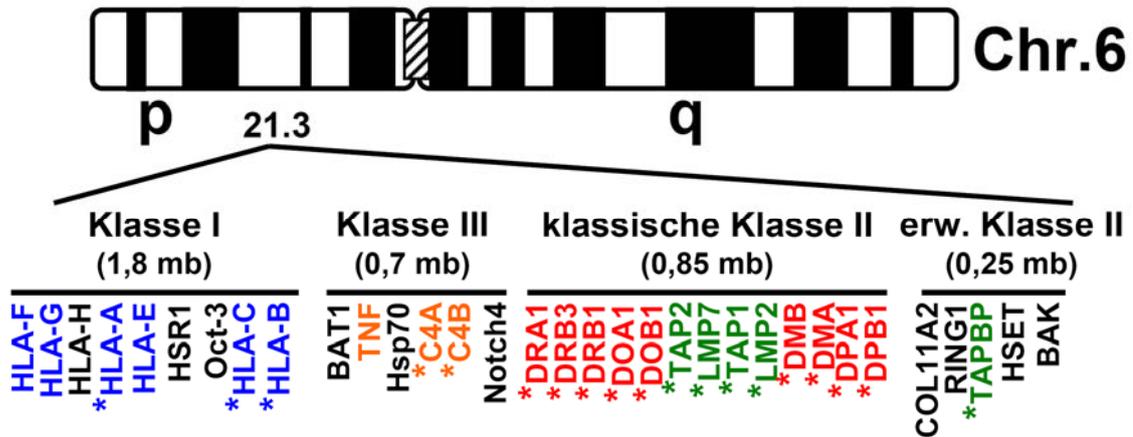


Abb. 1.4: Der MHC-Gencluster auf 6p21.3.

Schematische Darstellung des Genclusters und seiner 3 bzw. 4 Klassen. Innerhalb des Clusters finden sich eine Vielzahl von Genen der Immunantwort: MHC Klasse I Gene (blau); MHC Klasse II (HLA-, rot); Komponenten der Antigen-Prozessierung und des Antigen-Transport (grün); Komponenten des Komplementsystems & Cytokine (orange). Gene die durch $\text{IFN}\gamma$ stimuliert oder induziert werden, sind durch * gekennzeichnet. Chr., Chromosom; erw., erweitert; HLA, humanes Leukozyten-Antigen.

Damit der Organismus flexibel eine große Zahl äußerst wandlungsfähiger Erreger erkennen und bekämpfen kann, ist die Immunabwehr auf genetischer Ebene mit einer hohen Variabilität ausgestattet. Der MHC ist polygen, das heißt, es existieren für jede Klasse von MHC Molekülen mehrere Gene. Dadurch hat jedes Individuum eine Gruppe von MHC-Molekülen mit unterschiedlichen Peptidbindungsspezifitäten. Die MHC-Gene sind außerdem hoch polymorph, was bedeutet, dass für jedes Gen innerhalb einer Population mehrere Allele existieren (Murphy *et al.*, 2007).

Eine Vielzahl der MHC-Gene werden durch Interferon Gamma ($\text{IFN}\gamma$) reguliert, das von aktivierten Zellen des TH1-Typs sowie CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen gebildet wird. Es ermöglicht T-Zellen beispielsweise bei bakteriellen Infektionen die Produktion von MHC-Molekülen und Proteinen, die an der Prozessierung und Präsentation intravesikulärer Antigene beteiligt sind, hoch zu regulieren (Giacomini *et al.*, 1988; Früh & Yang, 1999). Interferone werden in Typ I-Interferone ($\text{IFN}\alpha$ und β) und in Typ II-Interferon ($\text{IFN}\gamma$) eingeteilt. Die Interferone der Klasse I und II aktivieren Natürliche Killerzellen. Interferone der Klasse I stimulieren hauptsächlich die Expression von MHC-Klasse I-Genen, wohingegen Interferon- γ die der MHC-Gene insgesamt stimuliert. Die Interferone werden unter anderem von

virusbefallenen Zellen gebildet und induzieren eine erhöhte Virusresistenz benachbarter Zellen. Bei Virusinfektionen ist PML ein Partner dieser IFN-vermittelten Virusresistenz (Doucas *et al.*, 1996, Chelbi-Alix *et al.*, 1998). Interferone beider Klassen bewirken eine Erhöhung der Zahl und der Größe der PML-Kernkörperchen. Dabei wirken sie positiv auf die Expression der Komponenten PML, Sp100 und ISG 20 der PML-Kernkörperchen (Sternsdorf *et al.*, 1997).

1.3.2 Regulation von MHC Klasse II-Genen

MHC II-Moleküle werden konstitutiv nur auf der Oberfläche von spezialisierten Antigenpräsentierenden Zellen (APCs), wie B-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Epithelzellen des Thymus und Makrophagen exprimiert. Sie binden und präsentieren dem Immunsystem vor allem exogene, aber auch endogene Peptidfragmente (Germain, 1994; Nedijc *et al.*, 2009). Die meisten anderen Zelltypen exprimieren keine MHC II-Gene, können aber durch $\text{IFN}\gamma$ dazu stimuliert werden (Collins *et al.*, 1984; Mach *et al.*, 1996; Krawczyk & Reith, 2006). Die MHC II-Expression wird primär durch die Transkriptionsregulation an den konservierten Klasse II-Genpromotoren kontrolliert (Abb. 1.5).

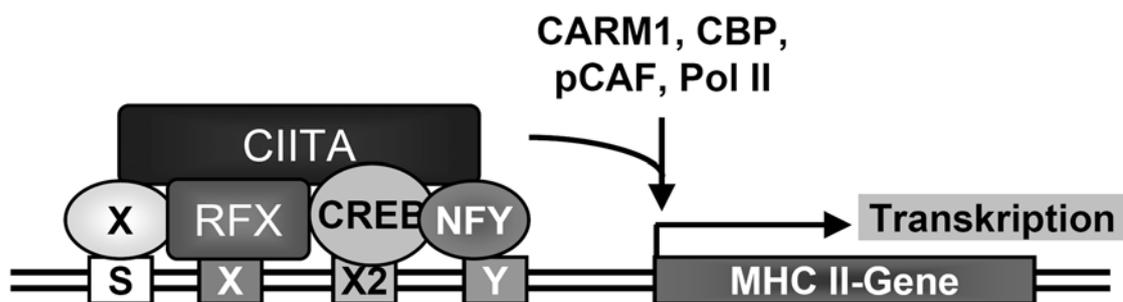


Abb. 1.5: Regulation der MHC Klasse II-Transkription.

Schema der Regulation der Transkription am MHC Klasse II-Promotor. CIITA, MHC Klasse II-Transaktivator; CARM1, Coaktivator-assoziierte Argenin-Methyltransferase; CBP, CREB-Bindeprotein; CREB, cAMP response element binding protein; NFY, nukleärer Transkriptionsfaktor Y (Komplex aus NFYa, b & c); pCAF, p300/CBP assoziierter Faktor (Acetylase); Pol II, RNA-Polymerase II; RFX, Regulationsfaktor X (Komplex aus RFX5, RFXap & RFXb); RFXap, RFX assoziiertes Protein; S, X, X2 & Y, „S-Y-Modul“, wichtigstes und konserviertes regulatorisches Element in der Promoterregion aller klassischen und nicht-klassischen MHC Klasse II-Gene.

Der Transkriptionsregulationsfaktor-Komplex (RFX), der nukleäre Faktor Y-Komplex (NFY), jeweils aus drei Untereinheiten bestehend, und das *cAMP response element binding protein* (CREB) werden konstitutiv und ubiquitär exprimiert. Als DNA-bindende Faktoren interagieren sie direkt mit dem regulatorischen S-Y-Modul des MHC Klasse II-Promoters ([Abb. 1.5](#); [Reith & Bach, 2001](#); [Boss & Jensen, 2003](#)).

Zur Transkriptions-Initiation wird der MHC Klasse II-Transaktivator (CIITA), ein stark regulierter Transkriptionsaktivator benötigt ([Steimle et al., 1994](#)). Dieses regulatorische Prinzip ist allen klassischen (HLA-DR, -DP, -DQ) und nicht-klassischen (HLA-DM, -DO, invariante Kette Ii) MHC Klasse II-Genen gemein ([Krawczyk & Reith, 2006](#)). CIITA bindet nicht direkt an DNA sondern an den Promoter-gebundenen RFX-CREB-NFY-Komplex auf der DNA, wo er das sogenannte *enhanceosome* stabilisiert und sowohl Komponenten der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie als auch Chromatinmodellierer rekrutiert ([Abb.1.5](#)). Sowohl Mutationen innerhalb des CIITA als auch in den drei Komponenten des RFX-Komplexes verhindern die Aktivierung der MHC Klasse II-Gentranskription und führen zu einer ausgeprägten Immundefizienz, dem *bare lymphocyte syndrome* (BLS) Typ II. Im Gegensatz zu den RFX-Komponenten ist das CIITA jedoch streng reguliert und wird daher auch als *Master Regulator* der MHC-II-Expression angesehen. Das *CIITA*-Gen wird durch drei Promotoren reguliert, die je nach Zelltyp oder aufgrund spezifischer Stimuli aktiv sind. Die Promotoren pI & pIII vermitteln die Expression des CIITA in APCs. In nicht antigenpräsentierenden Zellen kann die CIITA-Expression durch IFN γ über den Jak-STAT-Signaltransduktionsweg am Promotor pIV induziert werden und führt zur Ausprägung der 1106 Aminosäure langen und 121 kDa schweren CIITA-Isoform ([Masternak et al., 2000](#); [Beresford und Boss, 2001](#); [LeibundGut-Landmann et al., 2004](#)).

1.4 Ziel der Arbeit

In menschlichen Zellen assoziieren PML-Kernkörperchen nicht-zufällig mit dem Genreichen *major histocompatibility complex* (MHC) Gencluster auf Chromosom 6. Aus einleitenden Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Hemmerich war bekannt, dass die Assoziationsrate zwischen PML-Kernkörperchen und dem MHC-Klasse II-Genlokus durch $\text{IFN}\gamma$ erhöht wird. Um die funktionelle Beziehung zwischen PML-Kernkörperchen und der Transkription räumlich assoziierten Chromatins näher zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Frage gestellt, ob PML bzw. PML-Kernkörperchen als Koregulatoren der MHC II-Expression agieren können.

Dazu sollte festgestellt werden, ob Transkriptionsfaktoren, die die mRNA-Expression von MHC Klasse II-Genen regulieren, an PML-Kernkörperchen lokalisieren und dort mit PML-Kernkörperchen-Komponenten wechselwirken. Des Weiteren sollte durch Unterdrückung der PML-Proteinexpression untersucht werden, ob diese Proteine einen direkten Einfluss auf die Effizienz der Interferon-induzierten MHC-II-Expression haben. Weil die Transkription von MHC-II-Genen in erster Linie von der Aktivität des MHC Klasse II-Transaktivators CIITA abhängt, sollte auch die Frage beantwortet werden, ob gegebenenfalls dessen Proteinmenge durch PML reguliert werden kann.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien & Verbrauchsmaterialien

Aceton	CARL ROTH, Karlsruhe
Acrylamid-Lösung (30 %)	CARL ROTH, Karlsruhe
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
Bisacrylamid-Lösung (2 %)	CARL ROTH, Karlsruhe
Borsäure (H ₃ BO ₃)	CARL ROTH, Karlsruhe
bp-Leiter SM0261	FERMENTAS, St. Leon-Rot
cDNA-Synthese-Set „Transcriptor High Fidelity“	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
Deckgläschen (Ø 12 mm; 631G0713)	VWR INTERNATIONAL, Dresden
Deckgläschen (Ø 15 mm; 631G1341)	VWR INTERNATIONAL, Dresden
Deckgläser (Ø 42 mm, Stärke 0,17 mm)	HELMUT SAUR, Reutlingen
DEPC-behandeltes Wasser „UltraPure“	INVITROGEN, Karlsruhe (750024)
DMEM (<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>)	PAA LABORATORIES, Cölbe (E15-806)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
DNA-Farbstoff TO-PRO®-3	INVITROGEN, Karlsruhe
DNA-Ladepuffer B7021S (6x)	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt/Main
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
Einbettmedium „ProLong-Gold antifade“	INVITROGEN, Karlsruhe (P36931)
Einfrierröhrchen (1,8 ml; NUNC; 368632)	FISHER SCIENTIFIC, Nidderau
Ethanol	CARL ROTH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
Filme „Biomax Light-1“	EASTMAN KODAK, Rochester, USA
Filterpapier (GB005, Whatmann)	SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel
FKS (fötale Kälberserum, Kategorie „EU“)	PAA LABORATORIES, Cölbe (A15-104)
Flaschenaufsatzfilter (<i>bottle top</i> ; Sartolab)	VWR INTERNATIONAL, Dresden
Formaldehyd-Lösung, 37 % (Formalin)	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
Gewebekulturflaschen (TC25; 690175)	GREINER BIO-ONE, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen (TC75; 658175)	GREINER BIO-ONE, Frickenhausen
IFN γ (Interferon Gamma)	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim

Magermilchpulver	CARL ROTH, Karlsruhe
Methanol	CARL ROTH, Karlsruhe
Multi-Lochplatten (6, 12 & 24; FALCON)	BECTON DICKINSON, Heidelberg
Nitrozellulosemembran „Protran“	SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel
Objektträger „SuperFrost“ (H867.1)	CARL ROTH, Karlsruhe
Paraformaldehyd	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
Pasteurpipetten (Glas; 4522.1)	CARL ROTH, Karlsruhe
Pasteurpipetten (Plastik; 612R1681)	VWR INTERNATIONAL, Dresden
PBS (<i>phosphate buffered saline</i> ; 10x)	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
PCR-Set „202L“	JENA BIOSCIENCE, Jena
Proteinleiter SM0671 & SM1811	FERMENTAS, St. Leon-Rot
Reaktionsröhrchen (15 & 50 ml; FALCON)	BECTON DICKINSON, Heidelberg
RNA-Aufreinigungs-Set „RNeasy“ (74104)	QIAGEN, Hilden
RNase-Dekontaminationslösung „RNaseZAP®“	AMBION LIMITED, Huntingdon, GB
RNase-freie DNase I (79254)	QIAGEN, Hilden
RNase-freie Pipettenspitzen	STARLAB, Ahrensburg
RNase-freie Reaktionsgefäße (0,5 ml)	EPPENDORF, Hamburg (0030123301)
SDS (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)	CARL ROTH, Karlsruhe
serologische Pipetten (5, 10 & 25 ml; FALCON)	BECTON DICKINSON, Heidelberg
TEMED (N,N,N,N,-Tetramethylethylendiamin)	MERCK, Darmstadt
Transfektionsreagenz „FuGene HD“	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
Transfektionsreagenz „HiPerFect“	QIAGEN, Hilden
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	CARL ROTH, Karlsruhe
TritonX-100	SERVA, Heidelberg
Trypsin-EDTA	PAA LABORATORIES, Cölbe (L11-004)
Westernblot-Detektionslösung 1 und 2	AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg
Zellhomogenisator „QIAshredder“ (79654)	QIAGEN, Hilden

Nicht aufgelistete Chemikalien wurden von den Firmen MERCK (Darmstadt), CARL ROTH (Karlsruhe) und SIGMA-ALDRICH (Deisenhofen) in der Qualität „zur Analyse“ bezogen.

2.1.2 Geräte

Blotapparatur FastBlot B33	BIOMETRA, Göttingen
Brutschrank RCO3000TVBB	REVCO, Asherville, USA
DNA-PAGE-Kammer (20 cm x 15 cm)	Institutswerkstatt
Dunkelhaube DH30/32	BIOSTEP, Jahnsdorf
Entwicklermaschine Curix 60	AGFA, Leverkusen
Filmkassetten	WOLF, Heidelberg
Heizblock Eppendorf Thermomixer 5436	EPPENDORF, Hamburg
Heizblock Techne DRI-BLOCK DB2A	BIBBY SCIENTIFIC LIMITED, Stone, UK
Magnetrührer MR 2000	HEIDOLPH INSTRUMENTS, Schwabach
Mikroskop LSM510 Meta	CARL ZEISS MICROIMAGING, Jena
Mikroskop LSM710	CARL ZEISS MICROIMAGING, Jena
Mikroskop Olympus IX70	OLYMPUS EUROPA, Hamburg
Neubauer-Zählkammer (0640010)	PAUL MARIENFELD, Lauda-Königshofen
PAGE-Kammer „Mini 2D Cell“	BIORAD, Krefeld
Photometer „NanoDrop“	PEQLAB BIOTECHNOLOGIE, Erlangen
Pipettensatz GILSON	ABIMED, Langenfeld
Pipettierhilfe „Pipetboy“	INTEGRA BIOSCIENCES, Fernwald
Reinstwasseranlage „Milli-Q Plus 185“	MILLIPORE, Eschborn
Scanner „Perfection 4990 Photo“	EPSON
Schüttler „Duomax 1030“	HEIDOLPH INSTRUMENTS, Schwabach
Sterilwerkbank „HeraSafe“	HERAEUS, USA
Stromversorgungsgerät LKB/ECPS 3000/150	PHARMACIA, München
Transilluminator „BIOVIEW“ (UST-20M-8E)	BIOSTEP, Jahnsdorf
Vortexer „Reax 2000“	HEIDOLPH, Kehlheim
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge „Labofuge 400R“ (Rotor 8179)	HERAEUS, USA
Zentrifuge „Eppendorf 5415R“ (Rotor 82656)	EPPENDORF, Hamburg
Thermocycler „PTC-200“	BIORAD, Krefeld
Thermocycler „Personal Cycler“	BIOMETRA, Göttingen

2.1.3 Programme

Adobe Photoshop CS2	ADOBE, USA
Geldokumentationssoftware „ARGUS X1“	BIOSTEP, Jahnsdorf
LSM510 integrated RC 4.0 SP1	CARL ZEISS MICROIMAGING, Jena
MetaMorph Version 6.1r.4	UNIVERSAL IMAGING CORP., USA
Office 2003 (Excel, PowerPoint, Word)	MICROSOFT, USA
Origin 7.0	ADDITIVE, USA
ZEN 2009	CARL ZEISS MICROIMAGING, Jena

2.1.4 Antikörper

primäre

	Beschreibung
Kaninchen α CIITA	STEIMLE LAB (11/2005); Peptid 25-1130; WB 1:500
Kaninchen α PML	PEPTIDE SPECIALTY LABORATORIES (10/2005); Tier 1329/55 #3; Peptid 460-497; WB 1:500, IIF 1:500
Kaninchen α Sp100	PEPTIDE SPECIALTY LABORATORIES (10/2005); Tier 1329/05 #1; Peptid 209-227; WB 1:500, IIF 1:500
Kaninchen α Sp100	HANS WILL (Hamburg); „GH3“; WB 1:800; IIF 1:800
Maus α GFP	SANTA CRUZ; monoklonal; WB 1:100
Maus α HLA-Dr	BD PHARMINGEN (11/2006); „G46-6“; IIF 1:300
Maus α HLA-DrDpDq	BD PHARMINGEN (11/2006); „TÜ39“; monoklonal; IIF 1:300
Maus α PML	SANTA CRUZ; „PG-M3“; monoklonal; IIF 1:50
Maus α α -Tubulin	SIGMA; „T-9026“; monoklonal ; WB 1 :10 ⁰⁰⁰ ; IIF 1 :10 ⁰⁰⁰

sekundäre

Alexa488 α Maus	MOLECULARE PROBES; aus Ziege; IIF 1:400
Cy2 α Kaninchen	DIANOVA; aus Ziege; IIF 1:400
Cy3 α Kaninchen	JACKSON IMMUNO RESEARCH LABORATORIES; aus Ziege; Cat. 111-165-047 Lot 68850; IIF 1:400
Cy3 α Maus	JACKSON IMMUNO RESEARCH LABORATORIES; aus Ziege; Cat. 115-225-166 Lot 73746; IIF 1:400
HRP α Kaninchen-IgG	JACKSON IMMUNO RESEARCH LABORATORIES; aus Ziege; Cat. 111-035-006 Lot 33928; WB 1:4000
HRP α Maus-IgG	JACKSON IMMUNO RESEARCH LABORATORIES; aus Ziege; Cat. 115-035-072 Lot 32885; WB 1:4000

Antikörper wurden für Westernblot in 5 % Magermilch/PBS-T und für IIF in PBS verdünnt. HRP (*horse reddich peroxidase*), Meerrettich-Peroxidase konjugierte Antikörper.

2.1.5 Zelllinien

HEp-2	ATCC# CCL-23; humane, adherente Epithel-Zelllinie
PHF	primäre, humane, adherente Vorhautfibroblasten-Zelllinie; stabil transfiziert mit Kontroll-shRNA (HFF shCo) bzw. PML-spezifischer shRNA (HFF shPML2); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Stamminger aus Erlangen (Tavalai et al., 2006)
MRC-5	ATCC# CCL 171; primäre, humane, adherente, männliche Lungenfibroblasten-Zelllinie

2.1.6 Plasmide

pEGFP	BD BIOSCIENCES
pEGFP-CIITA	Schnappauf et al., 2004
pEGFP-NFY-A/B/C	Detlef Doenecke, Uni Göttingen
pEGFP-PML-I/II/III/IV/V/VI	Weidtkamp-Peters et al., 2008
pEGFP-RFX-5/AP/B	Jeremy Boss, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA , USA
pEGFP-SATB1	Josef Gotzmann, Universitätsklinik Wien, Österreich
pEGFP-C1-Sp100	Weidtkamp-Peters et al., 2008
pmRFP-PML-I/II/III/IV/V/VI	Weidtkamp-Peters et al., 2008

2.1.7 siRNAs

(si)CIITA	DHARMACON GENOME SMARTpool M-011083 (MHC2TA)
(si)Kontrolle	DHARMACON GENOME SMARTpool D-001220-01 (<i>RISC free</i>)
(si)PML	DHARMACON GENOME SMARTpool M-015307 (NM_002675)
(si)Sp100	DHARMACON GENOME SMARTpool M-0006547 (NM_003113)

2.1.8 Primer für semiquantitative PCR

Primer	Sequenz	Zyklen	Produkt [bp]
housekeeping			
fGAPDH_822	gtcagtggtggacctgacct	26	166
rGAPDH_987	aaaggtggaggagtgggtgt		
MHC Klasse I-Gene			
fHLA-F_851	aggaacagacccaggacaca	31	229
rHLA-F_1080	accacagctccaaggacaac		
fHLA-G_706	ggctgaacaaaggagagccta	35	148
rHLA-G_853	caggtggcctcatagtcaaag		
fLMP7_1227	cagctattctggaggcgttg	31	240
rLMP7_1466	gctgagcccgtactctctctt		
fTAP1_1146	caggagacggagttttcca	31	155
rTAP1_1300	cagagcatgatccccaagag		
MHC Klasse II-Gene			
fHLA-DMB_459	ctctcacagcacctcaacca	32	197
rHLA-DMB_655	tagaagccccacacatagca		
fHLA-DOA_360	atctggacatcctggtggag	33	224
rHLA-DOA_583	atggtcaggctgggaataga		
fHLA-DPB1_718	attctgcccggagtaagaca	32	197
rHLA-DPB1_914	ggagccagatgctaacgaaa		
fHLA-DRA_523	tccgcaagttccactatctc	33	150
rHLA-DRA_672	acaccacgttctctgtagtc		
weitere Gene			
fPML_1408	agagagtgaaggcccagggt	32	159
rPML_1566	tctgggctgctggtgtattg		

Die Primer wurden unter Verwendung des Online-Programmes „Primer3 Input 0.4.0“ (<http://frodo.wi.mit.edu/>) und der „NCBI-Datenbank“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) erstellt, mit Hilfe von „Primer-Blast“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) überprüft und bei MWG BIOTECH (Ebersberg) bestellt. Bei der Zusammenstellung der Primerpaare wurde eine Hybridisierungstemperatur von ~60 °C und eine Fragmentgröße von 130 bis 250 bp festgelegt. Ferner wurde darauf geachtet, dass der *forward* (f) und der *reverse* (r) Primer auf Exon-Exon-Grenzen oder in verschiedenen Exons hybridisieren, um eine versehentliche Amplifizierung genomischer DNA zu vermeiden.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung der oben aufgeführten, adherent wachsenden Zelllinien erfolgte in mit 10 % inaktiviertem, fötalem Kälberserum (FKS, PAA) versetzten *Dulbeccos Modified Eagle Medium* (DMEM, PAA) in Zellkulturflaschen mit Filter-Schraubverschluss (TC75, GREINER) in einem CO₂-Inkubator (RCO3000TVBB, REVCO) bei 37 °C und 9,5 % (v/v) CO₂. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zelllinien 1:2 bis 1:6 in einer Sterilwerkbank (HeraSafe, HERAEUS) subkultiviert. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS (pH 7,4) gespült und die Zellen für ca. 5 min bei 37 °C mit Trypsin-EDTA (1:250, PAA) inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wurde das Trypsin durch Zugabe von FKS-haltigem Medium inaktiviert, die Zellsuspension in ein 15ml-Reaktionsröhrchen (FALCON) überführt und für 2 min bei ca. 300 g zentrifugiert (Zentrifuge 3K12, Ausschwingrotor Nr. 11133, SIGMA). Abschließend wurde das resuspendierte Zellpellet in frisches Medium eingesät.

Zur Induktion der CIITA- bzw. MHC-II-Expression in Zellen nichthämatopoetischen Ursprungs wurden diese 1 - 2 d mit 10 - 500 U/ml IFN_γ (ROCHE DIAGNOSTICS) behandelt.

Für indirekte Immunfluoreszenzen wurden die Zellen auf Deckgläschen (∅ 12 mm und 15 mm, VWR) in 6-Lochplatten (FALCON) kultiviert. Deckgläser mit 42 mm Durchmesser und 0,17 mm Stärke (HELMUT SAUR) kamen bei Lebendzellmessungen zum Einsatz. Die zunächst unsterilen Deckgläschen werden vor ihrem Einsatz in der Zellkultur entweder mit Ethanol kurz abgeflammt oder für je ca. 2 h in 70 und 100%igem Ethanol gewaschen, autoklaviert & getrocknet.

2.2.2 Plasmid-Transfektion

Die Transfektion der Zellen erfolgte in der Regel mit FuGene HD (ROCHE DIAGNOSTIC) nach Anleitung des Herstellers. Um eine möglichst hohe Transfektionseffizienz zu erzielen, wurde zunächst das Kulturmedium durch serumfreies Medium (SFM) ersetzt. Für eine Fläche von 10 - 25 cm² mit 50 - 70 % Zelldichte wurden 100 µl SFM, 3 µl FuGene HD & ca. 1 µg Plasmid-DNA in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß sanft gemischt, für ca. 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und

anschließend auf die Zellen gegeben. Nach 1 - 2 d Proteinexpression wurden die Zellen lysiert, fixiert oder als Lebendzellpräparat verwendet.

2.2.3 siRNA-Transfektion

Die eingesetzten siRNAs gegen PML, Sp100 und CIITA (siPML, siSp100 bzw. siCIITA) und die Kontroll-siRNA (siKontrolle) wurden von DHARMACON bezogen. Die mit siRNA verbundenen Arbeiten wurden mit Handschuhen und weitestgehend in der Sterilwerkbank (HeraSafe, HERAEUS) durchgeführt. Es wurden RNase-freie Spitzen (STARLAB) und Reaktionsgefäße verwendet. Oberflächen und Geräte wurden vor Versuchsbeginn mit UV-Licht bestrahlt und/oder mit RNaseZap® (AMBION) abgewischt.

Die lyophilisierten siRNAs (5 nmol) wurden zunächst je in 250 µl siRNA-Puffer (DHARMACON) gelöst [20 µM], aliquotiert & bei -20 °C gelagert. Zur Optimierung der siRNA-vermittelten Expressionsreduktion erfolgte eine Titration der siRNA und des Transfektionsmittels „HiPerFect“ (QIAGEN).

Für einen Ansatz wurden 100 µl SFM, 12 µl HiPerFect & 3 µl siRNA [20µM] gemischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf die am Vortag in eine 6-Lochplatte ausgesäten HEP-2-Zellen getropft. Nach ca. 3 d war die Repression des jeweiligen Proteins annähernd vollständig. Bei unzureichender Expressionsunterdrückung wurde die Transfektion wiederholt und die Zellen nach weiteren 2 - 3 Tagen analysiert.

2.2.4 Zellyse

Wie bei der Subkultivierung (2.2.1) wurde zunächst das alte Medium abgesaut, der Zellrasen kurz mit PBS (pH 7,4) gespült und die Zellen für ca. 5 min mit Trypsin/EDTA (1:250, PAA) inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurde das Trypsin/EDTA durch Zugabe von serumhaltigem Medium inhibiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren sedimentiert, 1 bis 2 mal mit kaltem PBS gewaschen, mittels Neubauer-Zählkammer (PAUL MARIENFELD) quantifiziert, in 2 Teilen PBS und 1 Teil 4xLaemmli-Puffer (60 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2 % SDS; 25 % Glycerin; 0,1 % Bromphenolblau; 35 mM DTT) resuspendiert (ca. 10^5 Zellen/µl) und für 10 min im Heizblock (BIBBY SCIENTIFIC LIMITED) auf ca. 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die

Zelllysate sofort der diskontinuierlichen SDS-PAGE (**2.2.5**) unterworfen oder bei -80 °C gelagert.

2.2.5 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine im Zelllysate entsprechend ihres Molekulargewichts erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach U. K. Laemmli. Verwendet wurde die PAGE-Kammer „Mini 2D Cell“ von BIORAD (Krefeld).

Zunächst wurde das Trenngel (**Tab. 2.1**) gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach dessen Polymerisierung wurde das Wasser entfernt, das Sammelgel (**Tab. 2.1**) gegossen und mit einem 4er, 5er, 10er oder 15er Probenkamm versehen. Im Anschluss an die vollständige Polymerisation des Geles wurde der Kamm vorsichtig entfernt, das Gel in die Gelkammer eingespannt, mit SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 35 mM SDS) versehen und mit den denaturierten Zelllysateproben (aus ca. 2×10^5 bis 2×10^6 Zellen pro Vertiefung) beladen. Als Molekulargewichtsstandards dienten die Proteinleitern SM0671 & SM1811 (FERMENTAS). Die Auftrennung erfolgte bei 50 bis 150 V innerhalb von 1 bis 3 h.

Tab. 2.1: Zusammensetzung der verschiedenen Polyacrylamidgele

	Trenngel (7 ml / Gel) [ml]			Sammelgel (2 ml / Gel)
	10 %	12,5 %	15 %	
30 % Acrylamidlg.	2,35	2,9	3,5	0,34
2 % Bisacrylamidlg.	0,47	0,35	0,3	0,14
ddH ₂ O	1,54	1,09	0,76	1,27
1 M Tris pH 8,7	2,63	2,63	2,63	0,25*
20 % SDS	0,035	0,035	0,035	0,01
TEMED	0,006	0,006	0,006	0,005
10 % APS	0,024	0,024	0,024	0,01

*1 M Tris pH 6,9

2.2.6 *Westernblot* (Proteintransfer & Immundetektion)

Die durch diskontinuierliche SDS-PAGE aufgetrennten Zelllysateproteine wurden für deren Immundetektion mittels ElektrobloTTing auf eine Nitrozellulosemembran („Protran“, SCHLEICHER & SCHUELL) transferiert und immobilisiert. Der Proteintransfer erfolgte halbtrocken mit der Blotapparatur „FastBlot B33“ (BIOMETRA). Hierzu wurden 6 Filterpapiere (SCHLEICHER & SCHUELL) & eine Nitrozellulosemembran (SCHLEICHER & SCHUELL) auf die Größe des Proteingele zugeschnitten, mit Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol) getränkt, möglichst luftblasenfrei zwischen die Elektroden gestapelt (Anode, 3 Filterpapiere, Membran, Proteingel, 3 Filterpapiere, Kathode) und mit ca. 1,5 Kg beschwert. Das ElektrobloTTing erfolgte mit 1 mA/cm² für 1 h. Abschließend wurde die Membran mit Ponceau-Lösung gefärbt, getrocknet und bis zur weiteren Verwendung kühl & trocken gelagert.

Für die Immundetektion wurde die Membran je nach Bedarf in Längs- oder Querstreifen geschnitten, beschriftet und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für ca. 1 h mit 5 % (w/v) Magermilch/PBS-T (PBS + 0,1 % (v/v) Tween20) geblockt. Die Inkubation der Membranstreifen mit den jeweiligen Antikörpern erfolgte für 0,5 bis 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer (Petrischale, feuchtes Filterpapier, Parafilm). Sowohl nach der Inkubation mit dem Proteinspezifischen primären als auch nach der anschließenden Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper wurden die Streifen 3x 10 min auf einem Schüttler in PBS-T gewaschen.

Abschließend wurde die Membran für ca. 1 min mit frisch gemischten Detektionsreagenz 1 & 2 (1:1; AMERSHAM BIOSCIENCES) inkubiert und luftblasenfrei zwischen zwei Folien in eine Filmkassette (WOLF) platziert. In der Dunkelkammer wurde ein Film („Biomx Light-1“, EASTMAN KODAK) aufgelegt, die Belichtungszeit je nach Signalstärke variiert und der Film in einer Entwicklermaschine („Curix 60“, AGFA) entwickelt, fixiert & getrocknet.

Die Quantifizierung und Darstellung der Bandenintensitäten erfolgte mit Hilfe von MetaMorph Version 6.1r.4 (UNIVERSAL IMAGING CORP.), Excel 2003 (MICROSOFT) und Origin 7.0 (ADDITIVE).

2.2.7 Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)

Alle Arbeitsschritte erfolgten, sofern nicht anders aufgeführt, bei Raumtemperatur. Für die IIF wurden die auf Deckgläschen (\varnothing 12 mm & \varnothing 15 mm, VWR) gewachsenen Zellen mit einer Dichte von ca. 50 - 70 % zunächst dreimal mit PBS (pH 7,4) gespült, fixiert (10 min mit 4 % Formaldehyd/PBS), erneut dreimal mit PBS gespült, permeabilisiert (3 min mit 0,25 % TritonX-100/PBS) und wieder dreimal mit PBS gespült.

Im Anschluss an die Fixierung & Permeabilisierung der Zellen erfolgte die Überführung der Deckgläschen in eine feuchte Kammer (Petrischale, nasses Filterpapier, Parafilm). Dort wurden diese für 0,5 - 1 h mit Protein-spezifischen primären Antikörpern (2.1.4) inkubiert, mit PBS gewaschen (3x 5 min), für weitere 30 - 60 min mit Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpern (2.1.4) inkubiert und noch einmal mit PBS gewaschen (3x 5 min). Abschließend wurden die Zellen auf den Deckgläschen auf Objektträgern („SuperFrost“, ROTH) in „ProLong-Gold antifade“ (INVITROGEN) mit DAPI (4,6-Daimidino-2-phenylindol) eingebettet. Innerhalb von ca. 24 - 48 h polymerisierte das Einbettmedium aus und das Objekt konnte danach für mehrere Monate bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Gegebenenfalls erfolgte vor dem Einbetten zusätzlich zum DAPI eine Färbung der DNA mit TO-PRO®-3 (1:500 für 10 min, INVITROGEN).

2.2.8 Mikroskopie

Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten mit einem konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop LSM510 Meta oder LSM710 der Firma ZEISS (Jena) unter Verwendung eines 63x Plan-Apochromat-DIC-Ölimmersionsobjektives (n. A. = 1,4). Der *pinhole*-Durchmesser in den verschiedenen Kanäle betrug 1 AU (*airy unit*). Um ein „Durchbluten“ der parallel verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und / oder -proteine zu vermeiden, wurden diese nicht gleichzeitig, sondern nacheinander angeregt und detektiert (*Multi Tracking*-Modus). Die unten aufgeführte Übersicht gibt die standardisierten Einstellungen für das LSM510 Meta wieder. Am LSM710 erlaubte der eingekoppelte UV-Laser die Detektion der DNA über das dem Einbettmedium (ProLong-Gold *antifade*, INVITROGEN) zugesetzte DAPI. Bei vergleichenden

Fluoreszenzanalysen wurde darauf geachtet, dass die Einstellungen bei allen Proben gleich waren und die Signalintensitäten stets unterhalb der Sättigungsgrenze lagen.

Fluoreszenzmolekül	Laser / Wellenlänge / Transmission	Filter
Cy2 / A488 / GFP	Argon / 488 nm / 2 %	BP 505-530
Cy3 / RFP	HeNe1 / 543 nm / 10 %	BP 560-615
TO-PRO®-3 / Cy5	HeNe2 / 633 nm / 2 %	LP 650

BP, Bandpass; HeNe, Helium-Neon-Laser; LP, Langpass

2.2.9 FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*)

Die FRAP-Messungen wurden am LSM710 (ZEISS) unter Verwendung eines 63x Plan-Apochromat-DIC-Ölimmersionobjektives (n. A. = 1,4) durchgeführt. Aufgrund der beobachteten schnellen Austauschraten des Proteins erfolgten die Messungen zeitlich hochaufgelöst und, um ein Ausbleichen zu vermeiden, bei schwachen Laserintensitäten (jeweils ~ 0,2 %). Die Bildgröße wurde auf 256x256 Pixel begrenzt. Es wurden lediglich die Signalintensitäten für GFP-CIITA (Anregung: 488 nm; Filter: 499-552) und der jeweiligen RFP-gekoppelten PML-Isoform (Anregung: 561 nm; Filter: 592-689) verfolgt. Die *scan*-Geschwindigkeit wurde auf Maximum und der *scan*-Modus auf „plane“ gestellt (Verweildauer pro Pixel ca. 1 µs). Das Experiment wurde so angelegt, dass nach den ersten 5 Aufnahmen jeweils zwei kleine, kreisförmige Bereiche (∅ ca. 1 µm) innerhalb des Nukleoplasmas, der eine mit und der andere ohne PML-Kernkörperchen, mit 100 % Laserintensität (488 nm) und 20 Iterationen gebleicht wurden. Es wurden Zeitserien von 150 Bildern mit einem Intervall von 160 ms generiert. Die quantitative Auswertung der FRAP-Messungen erfolgte unter Berücksichtigung des Fluoreszenzintensitätsverlustes während der Zeitserie wie folgt:

$$RFI = \frac{\left(\frac{Ib_t}{Ir_t} \right)}{\left(\frac{Ib_0}{Ir_0} \right)}$$

mit RFI = relative Fluoreszenzintensität; Ib_t = integrierte Fluoreszenzintensität im gebleichten Bereich zum Zeitpunkt t; Ir_t = integrierte Fluoreszenzintensität im Referenzbereich, dem gesamten Zellkern, zum Zeitpunkt t; Ib_0 = integrierte

Fluoreszenzintensität im zu bleichenden Bereich vor dem Bleichen ($t = 0$); I_{r_0} = integrierte Fluoreszenzintensität im Referenzbereich zum Zeitpunkt $t = 0$. Werden die RFIs gegen die Zeit aufgetragen, erhält man die FRAP-Kurven. Für die Kurvenanpassung mit einer nicht-linearen Regression wurden die Daten in das Programm Origin Pro 7.0 überführt. Die Kurven wurden mit einem 1- oder 2-Komponenten-exponentiellen-Assoziationsmodell angepasst,

$$Y = \sum_{a=1}^{1,2,3} Y_{\max_a} * \left(1 - e^{(-K_a * X)}\right),$$

wobei Y_{\max_a} die halbmaximale Geschwindigkeit und K_a die Geschwindigkeitskonstante ist. Die bestmögliche Kurvenanpassung nach R^2 -Werten und Signifikanz p wurde genommen wie beschrieben in [Schmiedeberg et al. \(2004\)](#).

2.2.10 RICS (*raster image correlation spectroscopy*)

Die Rasterbild-Abtast-Korrelationsspektroskopie (RICS, *raster image correlation spectroscopy*) beruht auf einer Korrelationsberechnung für die Wahrscheinlichkeit, mit der ein diffundierendes Teilchen in benachbarten Pixeln eines Bildes auftaucht, das im Punktabtastverfahren des Laserscanning-Mikroskops aufgenommen wurde ([Digman et al., 2005](#); [Lenser et al., 2010](#)). Das Verfahren dient u. a. der Ermittlung der Diffusionsgeschwindigkeit von fluoreszierenden Molekülen und kann sowohl in Lösung als auch in lebenden Zellen angewendet werden ([Digman et al., 2005](#)). Diese Technik ist in dem hier verwendeten CLSM710 (ZEISS) vollautomatisch integriert. RICS wurde gemäß den Herstellerangaben mit dem CLSM710 unter Verwendung eines 40iger C-Apochromat-Wasser-Objektives (ZEISS) (n. A. = 1,2) durchgeführt. Die Aufnahmen erfolgten mit einer Auflösung von 512 x 512 Pixeln und einer Pixelgröße von 0.03 μm . Die Aufnahmegeschwindigkeit wurde so gewählt, dass der Laser eine Verweildauer von 6,4 μs /Pixel besaß. Die Lebzellbedingungen waren mit denen der FRAP-Analysen identisch. Es wurden pro Bildserie 20 Bilder aufgenommen. Fluoreszenzfluktuationen, die durch sich langsam bewegende Objekte oder durch die Eigenbewegung der Zelle entstehen, konnten durch die Auswerte-Software ZEN 2009 (ZEISS) ermittelt und eliminiert werden. Die dem Verfahren zugrunde liegende Durchschnitts-Raumkorrelationsfunktion wurde mit Hilfe

der Software erstellt und an ein mathematisches Modell, das die freie Diffusion von Teilchen in 3 Dimensionen beschreibt ([Digman et al., 2005](#)), angepasst. Die Diffusionskarten wurden ebenfalls mit ZEN 2009 erstellt. Dazu wurden um 32 Pixel überlappende Subbereiche der Bildserie in einer Größe von 64 x 64 Pixeln in allen Richtungen erstellt und wie oben an das Diffusionsmodell angepasst, um Regions-spezifische Diffusionskoeffizienten zu ermitteln. Eine detaillierte Beschreibung der RICS-Technik und ihre Anwendung liefert [Lenser et al. \(2010\)](#).

2.2.11 RNA-Isolierung

Die Aufreinigung der RNA aus humanen Zellen erfolgte mit Hilfe des Aufreinigungs-Sets „RNeasy“ (QIAGEN) und nach Angaben des Herstellers. Alle Arbeiten wurden mit Handschuhen und unter Verwendung von RNase-freien Reaktionsgefäßen (QIAGEN), Pipettenspitzen (STARLAB) und Lösungen durchgeführt.

Die geernteten Zellen wurden mit PBS (pH 7,4) gewaschen, gezählt und in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt. $0,5 \times 10^6$ bis 3×10^6 Zellen wurden in 350 µl Lysepuffer (RLT-Puffer) resuspendiert, auf QIAshredder-Säulchen (QIAGEN) überführt, durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 13000 rpm, (Zentrifuge EPPENDORF) homogenisiert und mit 350 µl 70 %igen Ethanol (absolut, ROTH) versetzt. Nach Überführung der 700 µl Lysat auf RNeasy-Säulchen wurde für ca. 15 s bei ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm) zentrifugiert. Die nun an der Säule gebundene RNA wurde mit 350 µl Waschpuffer (RW1) gespült (15 s bei ≥ 8000 g) und für 15 min bei Raumtemperatur mit 80 µl DNase I-Mix (QIAGEN) inkubiert. Im Anschluss an den DNA-Verdau folgten 3 weitere Waschschrirte: 350 µl RW1-Puffer (15 s bei ≥ 8000 g), 500 µl RPE-Puffer (15 s bei ≥ 8000 g) und 500 µl RPE-Puffer (2 min bei ≥ 8000 g). Um potentielle Pufferreste zu entfernen: 1 min bei 13000 rpm. Abschließend wurde die RNA mit ca. 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert (1 min bei ≥ 8000 g), aliquotiert, photometrisch mittels „NanoDrop“ (PEQLAB BIOTECHNOLOGIE) vermessen und bei -80 °C gelagert.

2.2.12 RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*)

Das Umschreiben der RNA in komplementäre DNA erfolgte mit Hilfe des cDNA-Synthese-Sets „Transcriptor High Fidelity“ (ROCHE DIAGNOSTICS) nach dem Protokoll des Herstellers. Alle Arbeiten wurden mit Handschuhen und unter Verwendung von RNase-freien Reaktionsgefäßen (Sve bck, EPPENDORF), Pipettenspitzen (STARLAB) und Lösungen durchgeführt.

Zunächst wurden 5,4 µl RNase-freies Wasser mit 1 µl Oligo(dT)18-Primern [50 pmol/µl] und 5 µl RNA [0,1 µg/µl] in einem 0,5ml-Reaktionsgefäß gemischt, für 10 min bei 65 °C in einem Thermocycler (BIOMETRA) inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Danach wurden 4 µl 5x Reaktionspuffer, 0,5 µl RNase-Inhibitor [40 U/µl], 2 µl dNTP-Mix [je 10 nM], 1 µl DTT [0,1 M] und 1,1 µl „Transcriptor High Fidelity“ reverse Transkriptase [20 U/µl] zugegeben, vorsichtig gemischt und für 30 min bei 50 °C im Thermocycler inkubiert. Nach der Inaktivierung, die innerhalb von 5 min bei 85 °C erfolgte, wurde der Ansatz wieder auf Eis überführt, mit 180 µl Wasser (1:10) verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.2.13 Semiquantitative PCR (*polymerase chain reaction*)

Informationen zu den verwendeten Primern finden sich unter Abschnitt 2.1.8.

Die 25µl-Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 13,65 µl UltraPure-H₂O (INVITROGEN); 2,5 µl 10x Puffer* (mit MgCl₂); 0,15 MgCl₂* [25 mM]; 0,2 µl Taq-Polymerase* [5 U/µl] (*JENA BIOSCIENCE „PCR-202L“); 0,5 µl dNTPs [je 10 mM] (FERMENTAS); 0,5 µl DMSO [100 %] (SIGMA); 2,5 µl cDNA [1:10 bis 1:20] (2.2.12) und 5 µl Primer (f+r) [je 1 µM]. PCR-Programm: 1. initiale Denaturierung (94,2 °C, 90 s), 2. Denaturierung (94,2 °C, 25 s), 3. Hybridisierung (60 °C, 30 s), 4. Elongation (72 °C, 30 s), 5. finale Elongation (72 °C, 270 s), 6. Kühlung (10 °C), die Zyklenzahl für die Schritte 2 bis 4 ist Primerpaar-spezifisch und wurde in Vorversuchen bestimmt.

Um die Vergleichbarkeit der Ansätze zu gewährleisten, wurde zunächst ein Mastermix ohne Matrize und Primer hergestellt, danach aliquotiert, mit den verschiedenen cDNAs versetzt, erneut aliquotiert, mit den jeweiligen Primern versehen und schließlich in den Thermocyclern (BIORAD & BIOMETRA) inkubiert.

2.2.13 DNA-PAGE

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurden 10 µl Reaktionsansatz mit 2 µl DNA-Ladepuffer (B7021S, 6x, NEW ENGLAND BIOLABS) versetzt, auf ein 8%iges Polyacrylamidgel (18 cm x 10 cm x 1 mm; 16,8 ml Millipore-H₂O; 8,5 ml Acrylamid [30 %] (CARL ROTH); 4,4 ml Bisacrylamid [2 %] (CARL ROTH); 3,3 ml 10x TBE (0,89 M Tris; 0,89 M Borsäure; 0,02 M EDTA); 20 µl TEMED (MERCK); 140 µl APS [10 %] (SIGMA-ALDRICH)) geladen und elektrophoretisch in Gegenwart der bp-Leiter SM0261 (FERMENTAS) aufgetrennt.

Die Quantifizierung und Darstellung der Bandenintensitäten erfolgte mit Hilfe von MetaMorph Version 6.1r.4 (UNIVERSAL IMAGING CORP.), Excel 2003 (MICROSOFT) und Origin 7.0 (ADDITIVE).

3 Ergebnisse

3.1 IFN γ erhöht spezifisch die Assoziationsrate zwischen PML-Kernkörperchen und dem MHC Klasse II-Gencluster

2001 zeigten Shiels und Kollegen eine spezifische Assoziation zwischen der MHC-Genregion und PML-Kernkörperchen in MRC-5-Zellen (Shiels *et al.*, 2001). Almut Horch (geb. Kießlich) konnte mit Hilfe einer MHC-Klasse II-spezifischen FISH-Sonde diese Beobachtung bestätigen und auf HEp-2-Zellen und primäre humane Fibroblasten (PHF) ausweiten (Kießlich, 2004). In dieser vorangegangenen Arbeit wurde zudem eine deutliche Erhöhung der Assoziationsrate nach transkriptioneller Aktivierung der MHC-Region durch IFN γ -Behandlung beobachtet (Abb. 3.1).

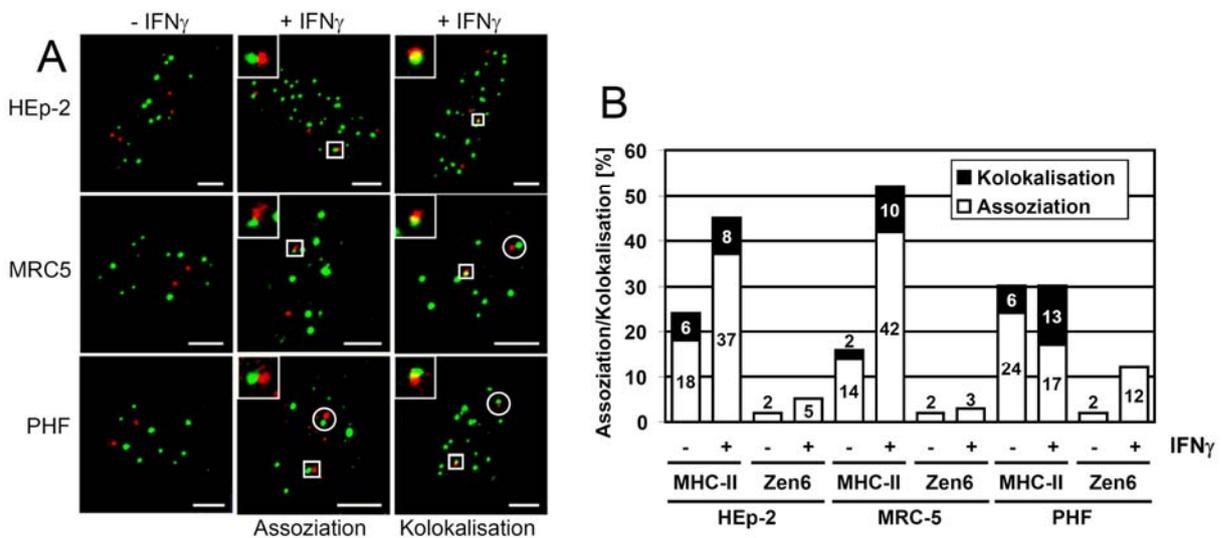


Abb. 3.1: IFN γ -induzierte Assoziation zwischen PML-Kernkörperchen und dem MHC-II-Gencluster.

(A) Z-Stack-Projektion von unbehandelten (- IFN γ) und IFN γ -behandelten (+ IFN γ , 24 h 500 U/ml) HEp-2-Zellen, MRC-5-Zellen und primären humanen Fibroblasten (PHF). Die MHC-II-Genregionen (rot) wurden mittels DNA-FISH und die PML *bodies* (grün) mittels IIF markiert. Innerhalb einer Ebene einander berührende Signale wurden als Assoziation (Mitte) und einander überlagernde Signale (gelb) als Kolokalisation (rechts) definiert. In der Mehrzahl der primären Fibroblasten (~80 %) mit einer Interaktion befand sich auch das zweite MHC-II-Signal nahe eines PML *bodies* (weiße Kreise). Balken: 5 μ m. (B) Quantifizierung der Interaktion zwischen dem MHC Klasse II-Gencluster (MHC-II) bzw. dem Zentromer Chromosoms 6 (Zen6) und den PML-Kernkörperchen in jeweils 200 unbehandelten (-) & IFN γ -behandelten (+) HEp-2-Zellen, MRC-5-Zellen und PHF (siehe (A)). Darstellung der Zellen, die wenigstens eine Assoziation oder Kolokalisation aufwiesen, in %. Abbildung modifiziert aus Kießlich, 2004.

Es sei darauf hingewiesen, dass [Abb. 3.1](#) sowohl Daten aus der Arbeit von Frau Horch (geb. Kießlich) als auch Daten, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhoben worden sind, enthält. Die Zuordnung erfolgt im Weiteren durch entsprechenden Hinweis. Sowohl in HEP-2- als auch in MRC-5-Zellen bewirkte die IFN γ -Behandlung eine deutliche Zunahme der Assoziationen und Kolokalisationen. In den PHFs blieb die hohe Interaktionsrate von ~30 % bestehen, jedoch verdoppelte sich die Anzahl der gefundenen Kolokalisationen ([Abb. 3.1](#)). Für die Quantifizierung wurde das MHC II-Signal mit dem geringsten Abstand zu einem PML-Kernkörperchen berücksichtigt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich ermittelt, dass sich in >80 % der MRC-5- und primären Fibroblasten mit einer Assoziation/Kolokalisation der Signale auch der zweite MHC II-Cluster in unmittelbarer Nähe eines PML-Kernkörperchens befand ([Abb. 3.1 A](#), weiße Kreise). Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Interaktionsrate der Zentromerregion von Chromosom 6 (Zen 6) in etwa der theoretischen zufälligen Assoziationswahrscheinlichkeit entsprach. Auch zeigten *Cajal Bodies* im Gegensatz zu PML-Kernkörperchen lediglich zufällige Assoziationen mit dem MHC Klasse II-Gencluster (nicht gezeigte Daten). Die IFN γ -Behandlung primärer Fibroblasten und HEP-2-Zellen führte also spezifisch zu einer deutlichen räumlichen Annäherung zwischen der MHC-II-Genregion und PML-Kernkörperchen.

3.2 Einige MHC Klasse II-Transkriptionsfaktoren binden an PML *bodies*

Die PML-Kernkörperchen/*MHC-II*-Assoziation könnte durch Faktoren vermittelt werden, die an beide Strukturen gleichzeitig binden. Um das zu überprüfen, wurde die Lokalisation von MHC-II-Transkriptionsfaktoren im Zellkern untersucht. Wie erwartet ([Camacho-Carvajal et al., 2004](#)) verteilte sich GFP-gekoppeltes CIITA in allen HEP-2-Zellen sowohl im Zyto- als auch im Nukleoplasma ([Abb. 3.2 A](#)). Nach IFN γ -Behandlung (24 h, 10 U/ μ l) kam es in einigen aber nicht allen Zellen zu punktförmigen Anreicherungen ([Abb. 3.2 A](#)), die durch Antikörperfärbung als PML-Kernkörperchen identifiziert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Die zusätzliche Koexpression der verschiedenen RFP-gekoppelten PML-Isoformen verstärkte zudem die Akkumulation von GFP-CIITA an PML-Kernkörperchen ([Abb. 3.2 B](#)). Die Akkumulation von GFP-CIITA war insbesondere bei Koexpression von RFP-PML II ausgeprägt ([Abb. 3.2](#)). Diese Beobachtung deutete auf eine direkte oder indirekte

Interaktion zwischen CIITA und PML-Isoform II hin. Unfusioniertes GFP reicherte sich bei RFP-PML-Überexpression nicht in PML-Kernkörperchen an (nicht gezeigte Daten).

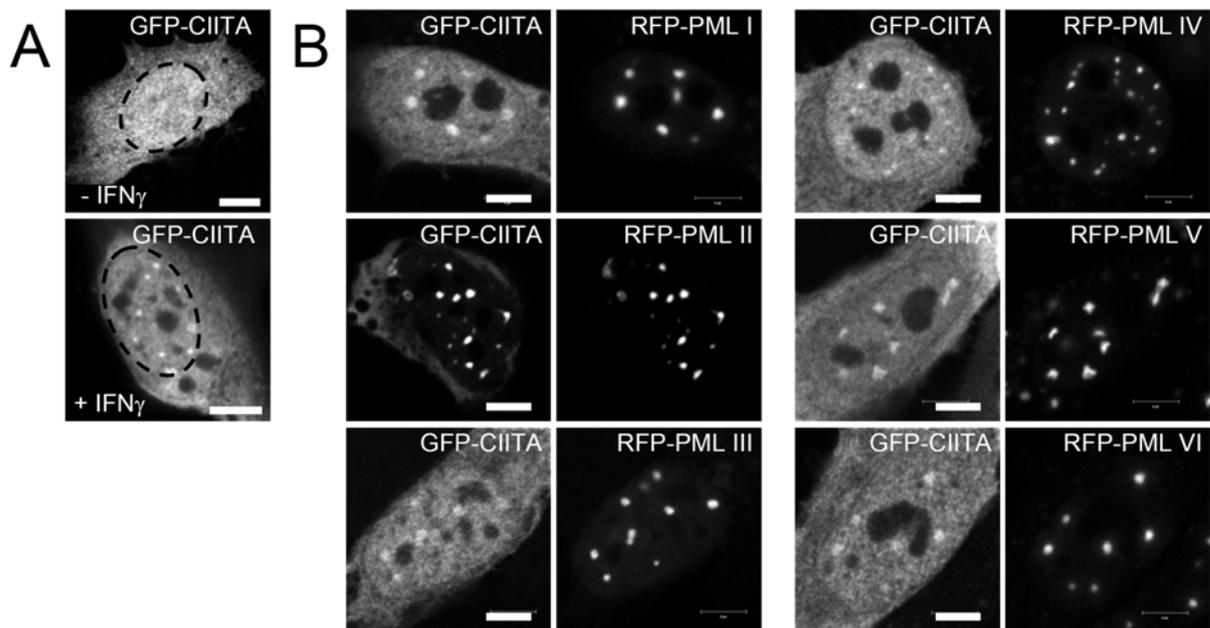


Abb. 3.2: PML rekrutiert CIITA an die Kernkörperchen.

Auf Deckgläschen kultivierte HEp-2-Zellen wurden entweder nur mit GFP-CIITA (A) oder zusätzlich mit einer der sechs RFP-PML-Isoformen (B) transfiziert. Außerdem wurden die Zellen, abgesehen von „- IFN γ “ (A), einer IFN γ -Behandlung (10 U/ μ l, 24 h) unterzogen. Nach der Fixierung erfolgte die Analyse der Zellen mittels konfokaler LSM. Die Position des Zellkerns ist in (A) durch eine schwarze, gestrichelte Linie hervorgehoben. Balken: 5 μ m.

Danach wurde die Lokalisation der Komponenten des RFX- (Regulationsfaktor X: RFX5, RFXap, RFXb) und des NFY-Komplexes (nukleärer Transkriptionsfaktor Y: NFYa, NFYb, NFYc), die ebenfalls an der Expression der MHC II-Gene beteiligt sind, untersucht. Aus Ermangelung an geeigneten Antikörpern (Jeremy Boss, persönliche Mitteilung) kamen auch hierbei GFP-gekoppelte Fusionsproteine zum Einsatz. Die PML-Kernkörperchen wurden durch Antikörperfärbung von endogenem PML-Protein kenntlich gemacht (Abb. 3.3). Die Untersuchung der HEp-2-Zellen auf mögliche Anreicherungen der Transkriptionsfaktoren erfolgte nach unterschiedlicher Inkubationszeit mit IFN γ .

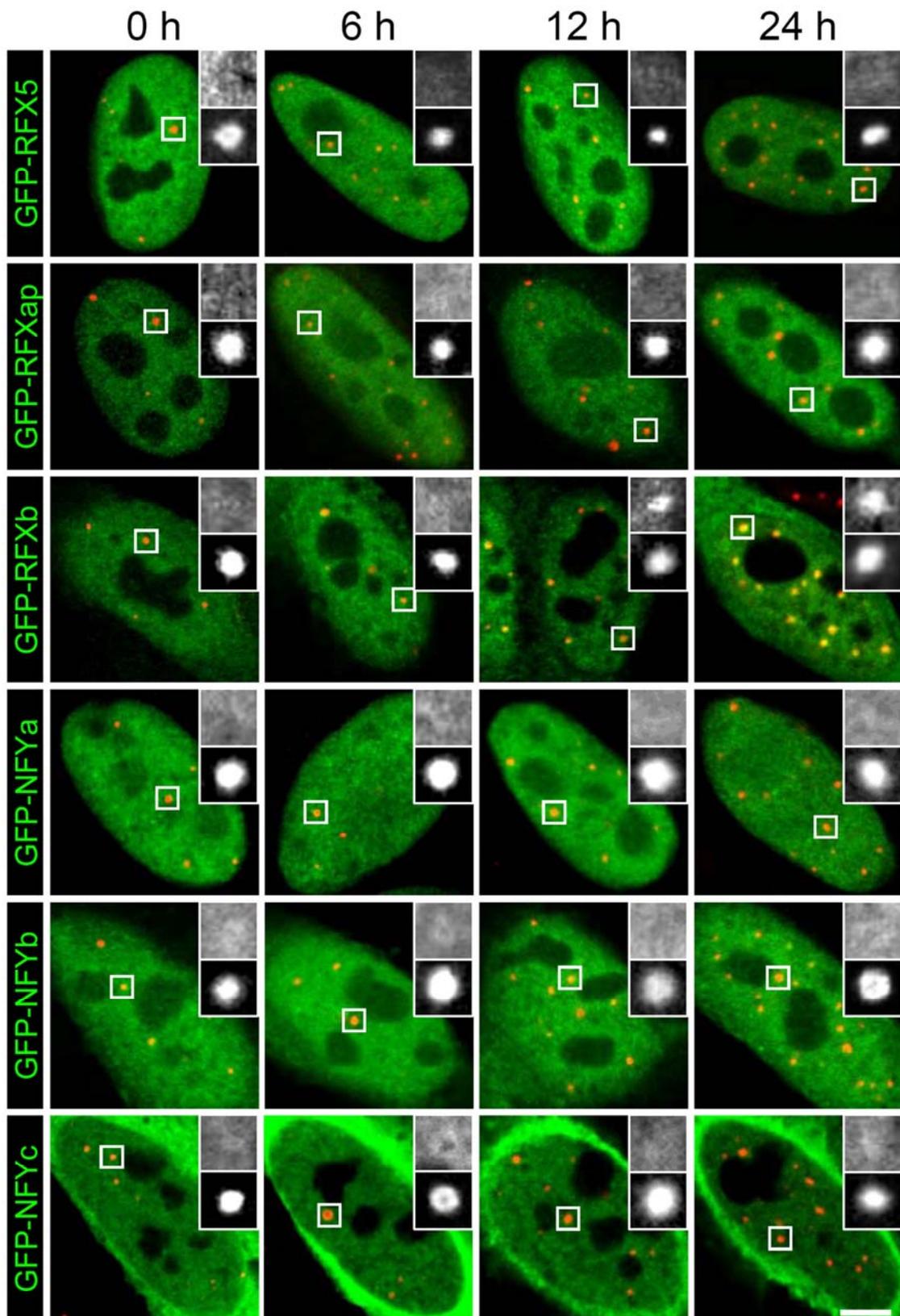


Abb. 3.3: RFXb akkumuliert an PML-Kernkörperchen nach IFN γ -Behandlung.

HEp-2-Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert, mit Expressionsplasmiden für die angegebenen GFP-Fusionsproteine (grün) transfiziert und für 0, 6, 12 bzw. 24 h mit IFN γ (500 U/ml) inkubiert. Die Darstellung der PML *bodies* (rot) erfolgte mittels IIF. Die Abbildung zeigt konfokale LSM-Aufnahmen. Die Bildeinschübe sind jeweils eine monochrome Vergrößerung des GFP- (oben) bzw. PML-Signals (unten) der weiß eingerahmten Region. Balken: 5 μ m.

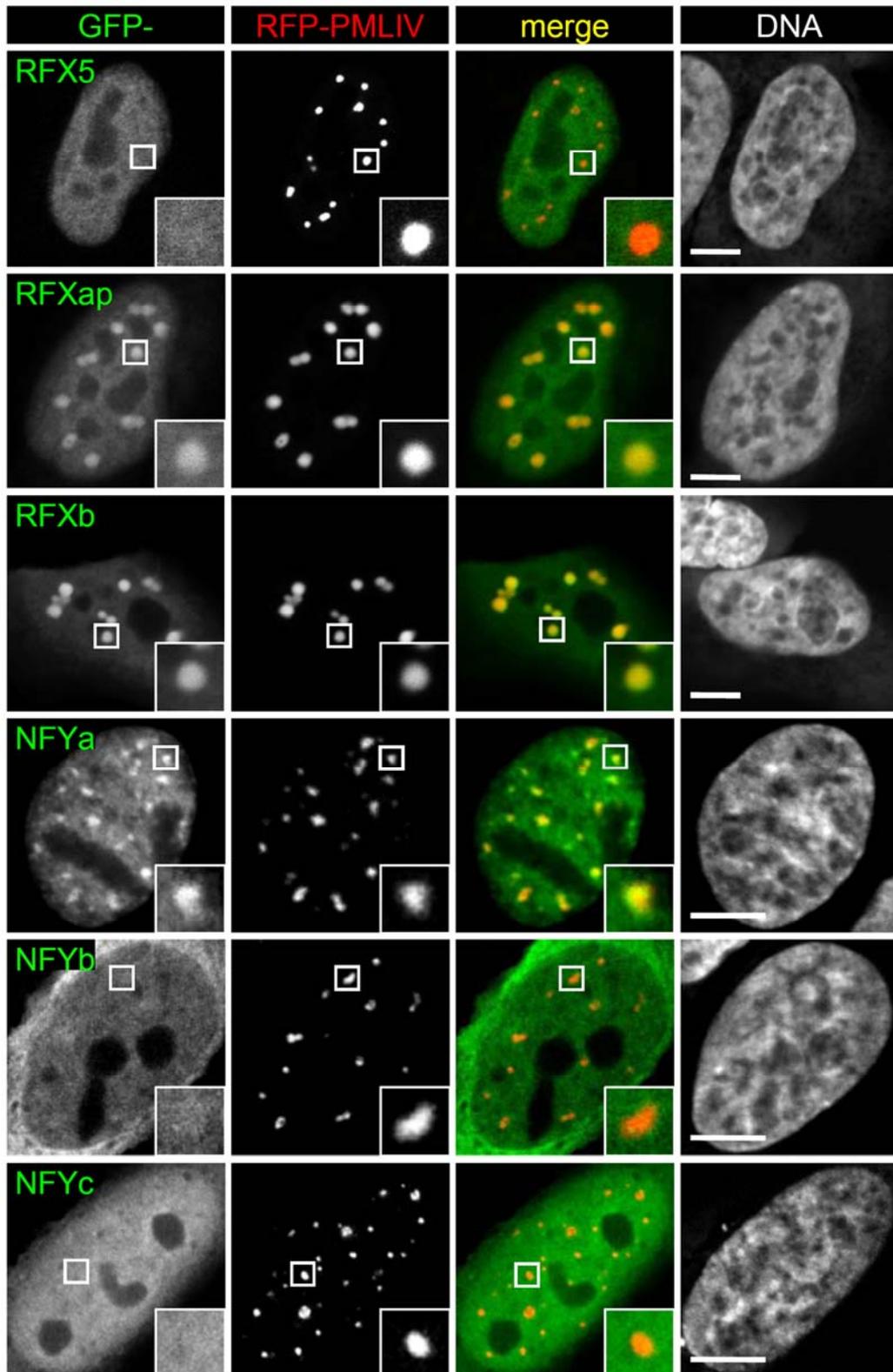


Abb. 3.4: RFXap, RFXb & NFYa werden zu den PML-Kernkörperchen rekrutiert.

Auf Deckgläschen kultivierte HEP-2-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die die Expression der angegebenen GFP- und RFP-Fusionsproteine vermitteln. Die Bilder zeigen konfokale LSM-Aufnahmen von fixierten Zellen. Die Bildeinschübe sind Vergrößerungen der weiß eingerahmten Regionen. Balken: 5 μ m.

Dabei konnte für GFP-RFXb nach 12 bis 24 h IFN γ -Behandlung eine Akkumulation an den PML-Kernkörperchen detektiert werden (Abb. 3.3). Die Koexpression von RFP-PML IV mit den verschiedenen Transkriptionsfaktoren resultierte ebenfalls in der Anreicherung von GFP-RFXb an den Kernkörperchen. Auch akkumulierten unter diesen Bedingungen GFP-RFXap und GFP-NFYa an den PML *bodies* (Abb. 3.4). Die gleichen Ergebnisse wurden bei der Koexpression der Transkriptionsfaktoren mit den anderen fünf RFP-PML-Isoformen erzielt (Daten nicht gezeigt). Dies legt nahe, dass neben CIITA auch RFXb, RFXap und NFYa mit PML-Kernkörperchen interagieren.

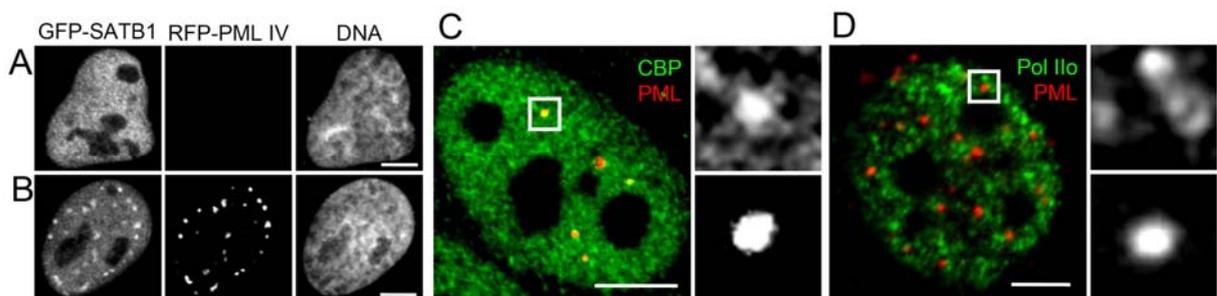


Abb. 3.5: Verteilung von GFP-SATB1, CBP und RNA-Polymerase II im Nukleus.

(A & B) Auf Deckgläschen kultivierte HEp-2-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden transfiziert, die für (A) GFP-SATB1 bzw. für (B) GFP-SATB1 und RFP-PML IV kodieren. Die Bilder zeigen konfokale LSM-Aufnahmen von fixierten Zellen. Eine Kolokalisation des GFP-SATB1 mit den PML bodies zeigte sich nur in Zellen, die RFP-PML exprimierten (B). (C & D) IFN γ -behandelte HEp-2-Zellen wurden fixiert und mittels IIF hinsichtlich der Verteilung von PML (rot) und (C) CREB-Bindeprotein (CBP, grün) bzw. (D) aktiver RNA-Polymerase II (Pol IIo, grün) untersucht. Die Bilder zeigen konfokale LSM-Aufnahmen. Die Vergrößerung rechts der Aufnahmen zeigen das jeweilige monochrome Antikörpersignal des weiß markierten Bereichs. Balken: 5 μ m.

Zur Bewertung der beobachteten Rekrutierung von CIITA an PML-Kernkörperchen wurde die Lokalisation des *matrix attachment region* (MAR)-bindenden Proteins SATB1 analysiert. SATB1 wird bei Koexpression von PML Isoform I an PML Kernkörperchen rekrutiert, wo es mehrere MARs des MHC Klasse I-Genclusters bindet und so als Verankerungspunkt für die Schleifenbildung dieser Genregion fungiert (Kumar *et al.*, 2007). Während GFP-SATB1 in HEp-2-Zellkernen ausschließlich diffus verteilt war, wurde es durch Koexpression von RFP-PML IV in Kernkörperchen rekrutiert (Abb. 3.5). Folglich zeigen CIITA und SATB1 in den hier durchgeführten Kolokalisations-Analysen ähnliche Verteilungsmuster im Zellkern. Als Kontrolle wurde die Lokalisation des CBP (*cAMP responses element binding protein binding protein*, eine PML-Kernkörperchenkomponente) und der Elongations-

kompetenten RNA-Polymerase II (keine PML-Kernkörperchenkomponente) untersucht. Diese Analyse bestätigte die Literaturdaten zur Lokalisation dieser Faktoren (von Mikecz *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2006). Die Kollokalisationsanalysen sind in **Tabelle 3.1** zusammengefasst.

Faktor	Markierung	Kolokalisation mit endogenem PML	Kolokalisation mit exogenem PML
CIITA	GFP	+	+
RFXap	GFP	-	+
RFXb	GFP	+	+
RFX5	GFP	-	-
NFYa	GFP	-	+
NFYb	GFP	-	-
NFYc	GFP	-	-
SATB1	GFP	-	+
CBP	Antikörper	+	+
RNA-Pol Ilo	Antikörper	-	-

Tab. 3.1: Zusammenfassung der Kollokalisationsstudien.

Die hier aufgeführten Transkriptionsfaktoren wurden hinsichtlich ihrer Kollokalisation mit PML-Kernkörperchen in HEp-2-Zellen mittels konfokaler LSM untersucht. RNA-Pol Ilo, aktive Form der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II.

3.3 PML-Depletion bewirkt eine erniedrigte IFN γ -induzierte Synthese einiger MHC Klasse II-mRNAs

Um den möglichen Einfluss von PML auf die Transkription von MHC Klasse II-Genen zu untersuchen, wurden semi-quantitative RT-PCR-Analysen durchgeführt. Die Expression des für die MHC-II-Transkription essentiellen CIITA konnte in HEp-2-Zellen bereits mit 10 U/ml IFN γ induziert werden (**Abb. 3.6 A**) und erreichte ihr Maximum nach ca. 24 h (**Abb. 3.6 B**). In den weiterführenden Experimenten wurden daher, wenn nicht anders erwähnt, die Zellen zur Induktion der MHC-II-Expression entsprechend für ca. 24 h mit 10 U/ml IFN γ behandelt. Zur Kontrolle wurden zunächst MHC Klasse II-mRNAs in CIITA-depletierten HEp-2-Zellen analysiert. Dies zeigte bestätigend, dass nur MHC Klasse II-Transkripte durch die siRNA-vermittelte CIITA-Reduktion eine deutliche Verringerung erfuhren (**Abb. 3.6 C**; Steimle *et al.*, 1994).

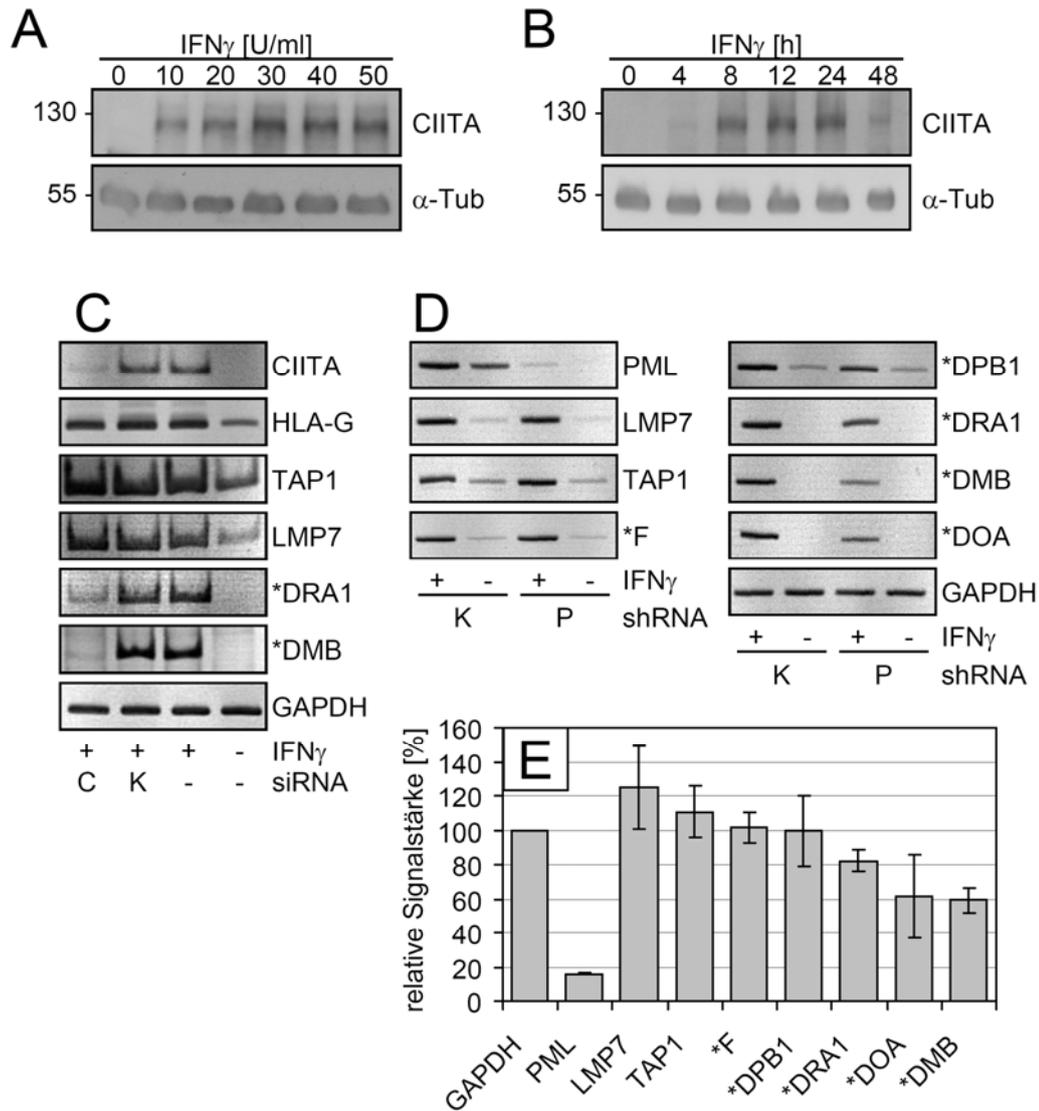


Abb. 3.6: Die Verminderung des PML reduziert das Level einiger MHC Klasse II-mRNAs.

(A, B) IFN γ induziert die CIITA-Expression. Westernblot von HEP-2-Zellen, die (A) für ca. 24 h mit verschiedenen Mengen an IFN γ bzw. (B) unterschiedlich lange mit 100 U/ μ l IFN γ behandelt wurden. (C) Die Verringerung des CIITA unterdrückt die IFN γ -induzierte MHC Klasse II-Transkription. Semi-quantitative RT-PCR-Analyse von HEP-2-Zellen, die, wie angegeben, mit IFN γ (24 h, 500 U/ml) und siRNA (C, CIITA; K, Kontrolle) behandelt worden waren. (D) Semi-quantitative RT-PCR-Analyse von PHF, die, wie gekennzeichnet, stabil mit shRNA (K, Kontrolle; P, PML) transfiziert und mit IFN γ (24 h, 10 U/ml) behandelt waren. (E) Quantifizierung aus 4 (für LMP7 3) unabhängigen RT-PCR-Experimenten. Signalintensitäten der PML-depletierten Proben (+IFN γ) in Relation zum Kontroll-knock-down (+IFN γ) und gegen GAPDH (IFN γ -insensitives *housekeeping*-Gen) abgeglichen. *, HLA-Gene; C, CIITA; K, Kontrolle; P, PML.

Andere $\text{INF}\gamma$ -induzierte Gene innerhalb der MHC Klasse II-Region (TAP1, LMP7) und der benachbarten MHC Klasse I-Region (HLA-G) zeigten sich indes unbeeinflusst (Abb. 3.6 C). Ein ähnliches, jedoch nicht so stark ausgeprägtes Ergebnis ergab sich bei der RT-PCR-Analyse PML-depletierter primärer, humaner Fibroblasten (Abb. 3.6 D). Die Quantifizierung von vier unabhängig durchgeführten PCR-Experimenten ergab eine signifikante Verringerung der MHC Klasse II-Transkripte (HLA-DRA1, -DOA & -DMB) in $\text{INF}\gamma$ -behandelten PML-shRNA-transfizierten Fibroblasten im Vergleich zu Kontroll-shRNA-transfizierten Zellen (Abb. 3.6 E). TAP1, LMP7 und HLA-F, wie bereits von Kumar *et al.* (2007) für Jurkat-Zellen beschrieben, erfuhren durch die verringerte PML-Proteinmenge dagegen keine transkriptionelle Inhibierung (Abb. 3.6 E). Die mRNA-Expression von HLA-DPB1 war durch die PML-Proteindepletion nicht beeinträchtigt (Abb. 3.6 E). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Depletion von PML-Proteinen zu einer signifikanten Verringerung einiger, aber nicht aller $\text{INF}\gamma$ -induzierten MHC-II-Gene führt.

3.4 PML-Depletion verringert die $\text{INF}\gamma$ -induzierte MHC-Klasse II-Molekülexpression

Ferner wurde der Einfluss einer Verringerung der PML-Proteinmenge auf die MHC-II-Molekülexpression untersucht. Aus Ermangelung an geeigneten Antikörpern für Westernblot-Analysen (nicht gezeigte Daten) wurden Immunfluoreszenz-Studien durchgeführt. Primäre humane Fibroblasten, stabil transfiziert mit Kontroll- oder PML-shRNA, wurden für 12, 24, 36 und 48 h mit $\text{INF}\gamma$ versetzt und mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen HLA-DR, -DP und -DQ bzw. gegen HLA-DR alleine hinsichtlich ihrer MHC II-Expression untersucht (Abb. 3.7). Nach 24 h $\text{INF}\gamma$ -Behandlung erwiesen sich ca. 20 % und nach 48 h mehr als 80 % der Kontroll-Fibroblasten als HLA-DrDpDq-positiv (Abb. 3.7 A). Der Einsatz PML-spezifischer Antikörper belegte zudem den $\text{INF}\gamma$ -induzierten Anstieg der Anzahl und Größe der PML-Kernkörperchen (Abb. 3.7 A). Im Vergleich dazu wiesen PML-shRNA-exprimierende Fibroblasten eine deutlich verringerte Signalintensität und Anzahl HLA-DrDpDq-positiver Zellen auf (Abb. 3.7 B).

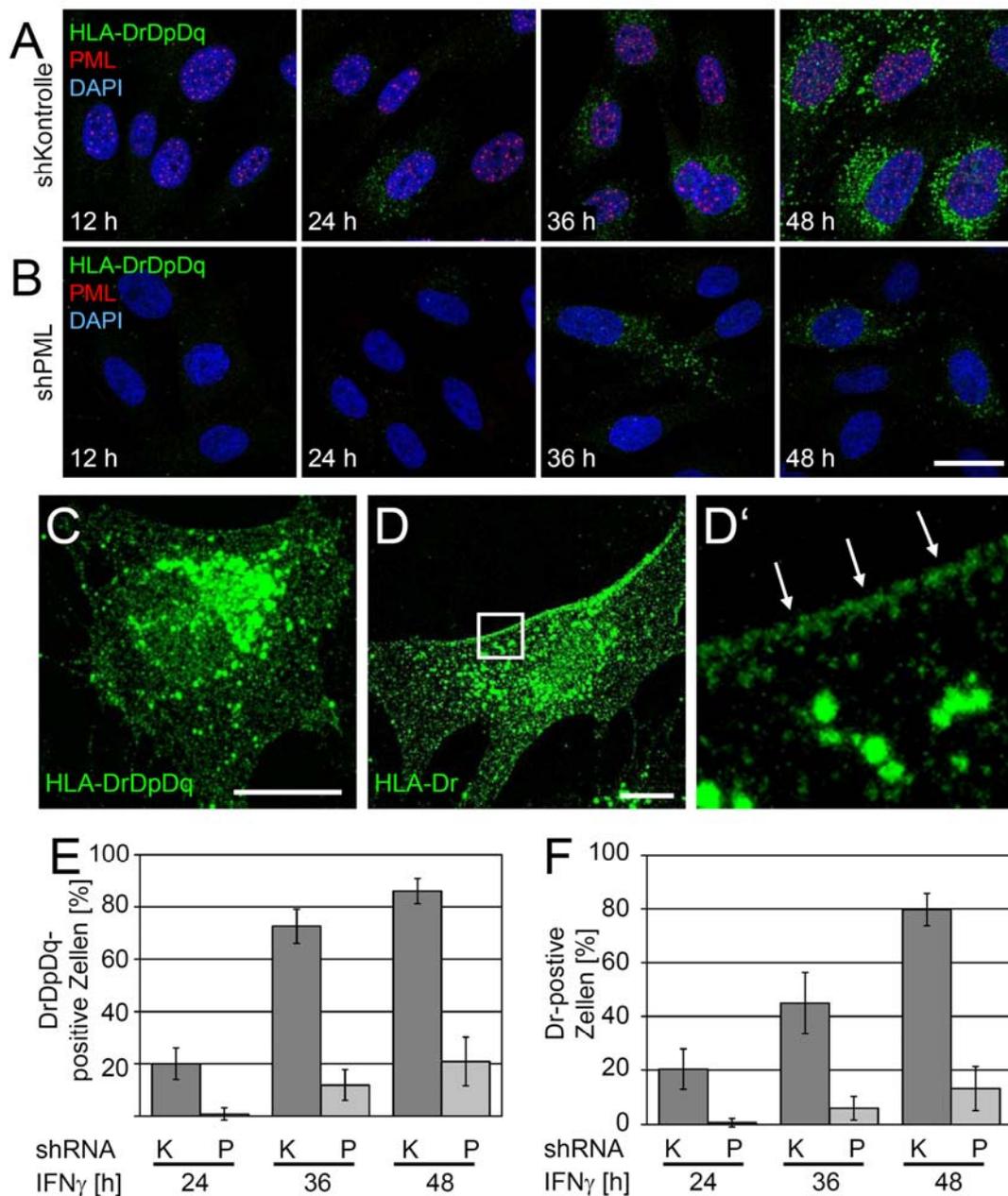


Abb. 3.7: PML-Reduktion verringert die IFN γ -induzierte MHC Klasse II-Expression.

(A, B) Primäre, humane Fibroblasten, stabil transfiziert mit Vektoren für Kontroll- (A) bzw. PML-shRNA (B), wurden in Gegenwart von IFN γ auf Deckgläsern kultiviert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung unterzogen: HLA-DrDpDq (grün), PML (rot), DNA (DAPI, blau). Die Aufnahmen wurden mittels konfokaler LSM erzeugt. (C, D) 3D-Projektion einzelner immunmarkierter PHF nach 48 h IFN γ -Behandlung, (C) HLA-DrDpDq & (D) HLA-Dr. (D') Die Vergrößerung des in (D) eingerahmten Bereiches zeigt die Expression des HLA-Dr an der Zelloberfläche (weiße Pfeile). Balken: 20 μ m. (E, F) Quantifizierung HLA-DrDpDq- (E) und HLA-Dr-positiver Zellen (F) aus Experimenten, wie unter (A, B) beschriebenen. Pro IFN γ -Behandlungsdauer und Zelltyp wurden ca. 400 Zellen ausgezählt. K, Kontroll-shRNA; P, PML-shRNA.

Die Verwendung des HLA-DR-spezifischen Antikörpers ergab ein ähnliches Bild und Verteilungsmuster (nicht gezeigt). In stark exprimierenden Kontroll-Fibroblasten konnte nach 48 h IFN γ -Behandlung neben der vesikulären, zytoplasmatischen auch eine MHC Klasse II-Molekülexpression auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Abb. 3.7, C, D und D'). Dies deutet auf eine mögliche Rolle in der Antigenpräsentation hin, wie sie für humane Hautfibroblasten bereits beschrieben wurde (Geppert & Lipsky, 1985; Umetsu *et al.*, 1986). Die shRNA-vermittelte PML-Depletion führte zur Verringerung der MHC Klasse II-Proteinexpression auf ca. 25 % des Niveaus der Kontroll-Fibroblasten (Abb. 3.7 E und F).

3.5 PML-Depletion inhibiert die IFN γ -induzierte Expression von CIITA

CIITA ist der Hauptregulator der MHC Klasse II-Transkription (Boss, 1997). Da bekannt ist, dass Transkriptionsfaktoren wie p53 an den PML-Kernkörperchen stabilisiert werden können (Person & Pelicci, 2001), wurde die CIITA-Proteinmenge in An- bzw. Abwesenheit von PML untersucht. In IFN γ -behandelten HEp-2-Zellen war die PML-Proteinmenge durch spezifische siRNA auf 13 ± 6 % des Kontrollniveaus abgesenkt, einhergehend mit einer Verringerung der IFN γ -induzierten CIITA-Proteinmenge auf 59 ± 12 % (Abb. 3.8 A und B).

In primären humanen Fibroblasten, die stabil PML-spezifische shRNA exprimieren, zeigte sich eine Reduktion des IFN γ -stimulierten PML auf $3,4 \pm 0,9$ % und des CIITA auf 41 ± 15 % der Proteinmenge in Kontrollzellen (Abb. 3.8 D und E). Die Menge an Sp100-Protein war in PML-depletierten Fibroblasten um 25 ± 19 % gesenkt, in Übereinstimmung mit Literaturdaten (Abb. 3.8 D und E; Jiang *et al.*, 2007; Everett *et al.*, 2006). Eine siRNA-vermittelte Verringerung der Sp100-Proteinmenge in HEp-2-Zellen hatte jedoch keinen Einfluss auf die CIITA-Proteinmenge (Abb. 3.8 C).

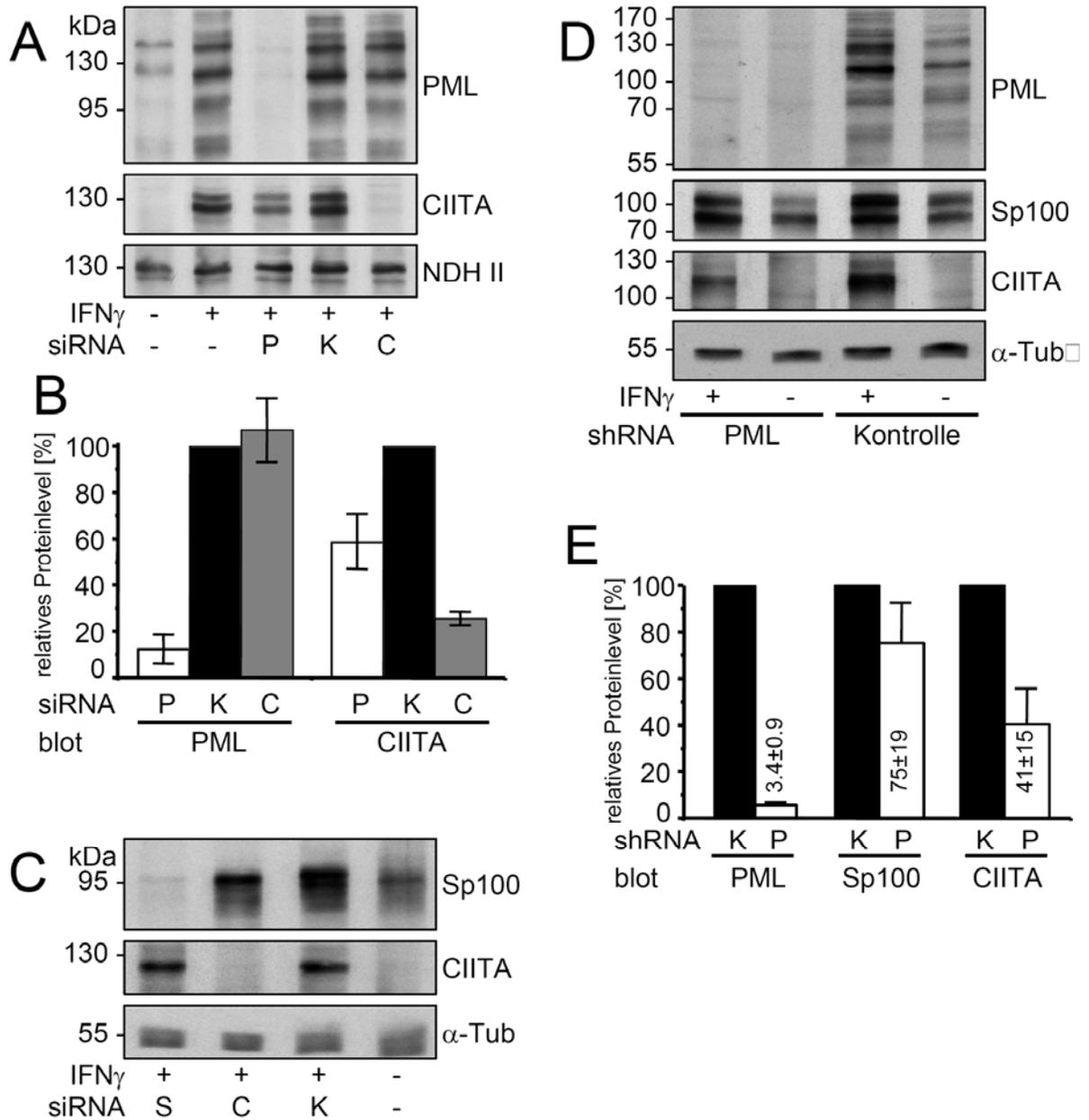


Abb. 3.8: PML-Depletion inhibiert die IFN γ -induzierte CIITA-Expression.

(A) Mit siRNA behandelte HEP-2-Zellen wurden nach 24 h Inkubationszeit mit (+) oder ohne (-) IFN γ (500 U/ml) mittels Westernblot hinsichtlich PML, CIITA & NDH II (Ladekontrolle) analysiert. (B) Quantifizierung der Signalstärken dreier unter (A) beschriebener Immunoblots. (C) Der Sp100-*knock-down* hat keinen Einfluss auf das CIITA-Proteinlevel. HEP-2-Zellen wurden, wie angegeben, mit siRNA und IFN γ (500 U/ml, 24 h) behandelt und im Westernblot auf Sp100, CIITA & α -Tubulin (Ladekontrolle) untersucht. (D) Inhibition der IFN γ -induzierten CIITA-Expression nach PML-*knock-down*. Primäre, humane Fibroblasten, die mit Kontroll- oder PML-spezifischer shRNA transfiziert waren, wurden mit IFN γ behandelt und hinsichtlich der Proteinexpression von PML, Sp100, CIITA und α -Tubulin analysiert. (E) Quantifizierung der Westernblots (D) aus vier unabhängigen Experimenten. C, CIITA; K, Kontrolle; P, PML; S, Sp100.

3.6 CIITA interagiert mit PML-Isoform II an PML-Kernkörperchen

Zur Untersuchung der Dynamik und möglicher Interaktionen von CIITA mit PML wurden *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP)-Experimente durchgeführt. Die Analyse erfolgte in IFN γ -behandelten und unbehandelten HEP-2-Zellen, die GFP-CIITA und eine der sechs RFP-fusionierten PML-Isoformen koexprimierten (Abb. 3.9). Die Fluoreszenz der Fusionsproteine wurde im Zellkern in kleinen, kreisförmigen Bereichen im Nukleoplasma und an PML-Kernkörperchen geblichen. Der Austausch der geblichenen GFP-CIITA-Proteine in beiden Bereichen mit den ungeblichenen der Umgebung erfolgte rasch (Abb. 3.9 A). Bereits 5 s nach dem Bleichpuls waren 80 - 90 % und innerhalb von 20 s annähernd 100 % der ursprünglichen Fluoreszenzintensität zurückgekehrt (Abb. 3.9 B). Diese Dynamik ist charakteristisch für Transkriptionsfaktoren, basierend auf schnellen Austauschkinetiken am Chromatin (Hager *et al.*, 2009).

Die FRAP-Erholkurven von GFP-CIITA an den PML-Kernkörperchen unterschieden sich nur geringfügig von denen im Nukleoplasma. Auch die Behandlung mit IFN γ hatte keinen deutlichen Einfluss. Lediglich in RFP-PML II-koexprimierenden Zellen traten deutliche Unterschiede auf. Im Gegensatz zu den anderen 5 Isoformen war der Austausch von GFP-CIITA an PML-Kernkörperchen bei PML II-Koexpression deutlich verringert (Abb. 3.9 B). Um diesen Unterschied zu quantifizieren, wurden die FRAP-Kurven an Exponentialfunktionen angepasst, wobei von einer oder von zwei unterschiedlich mobilen GFP-CIITA-Populationen ausgegangen wurde. Während die Anpassung mit dem 1-Komponenten-Modell immer misslang, war sie mit dem 2-Komponenten-Modell immer erfolgreich (Abb. 3.9 C und nicht gezeigte Daten). Die Aufteilung in eine schnelle und eine langsame Fraktion und die Zeit bis zur Rückkehr der Hälfte der ursprünglichen Fluoreszenzintensität ($t_{50\%}$) wurden mit der angepassten Exponentialfunktion des 2-Komponenten-Modells berechnet (Tab. 3.2).

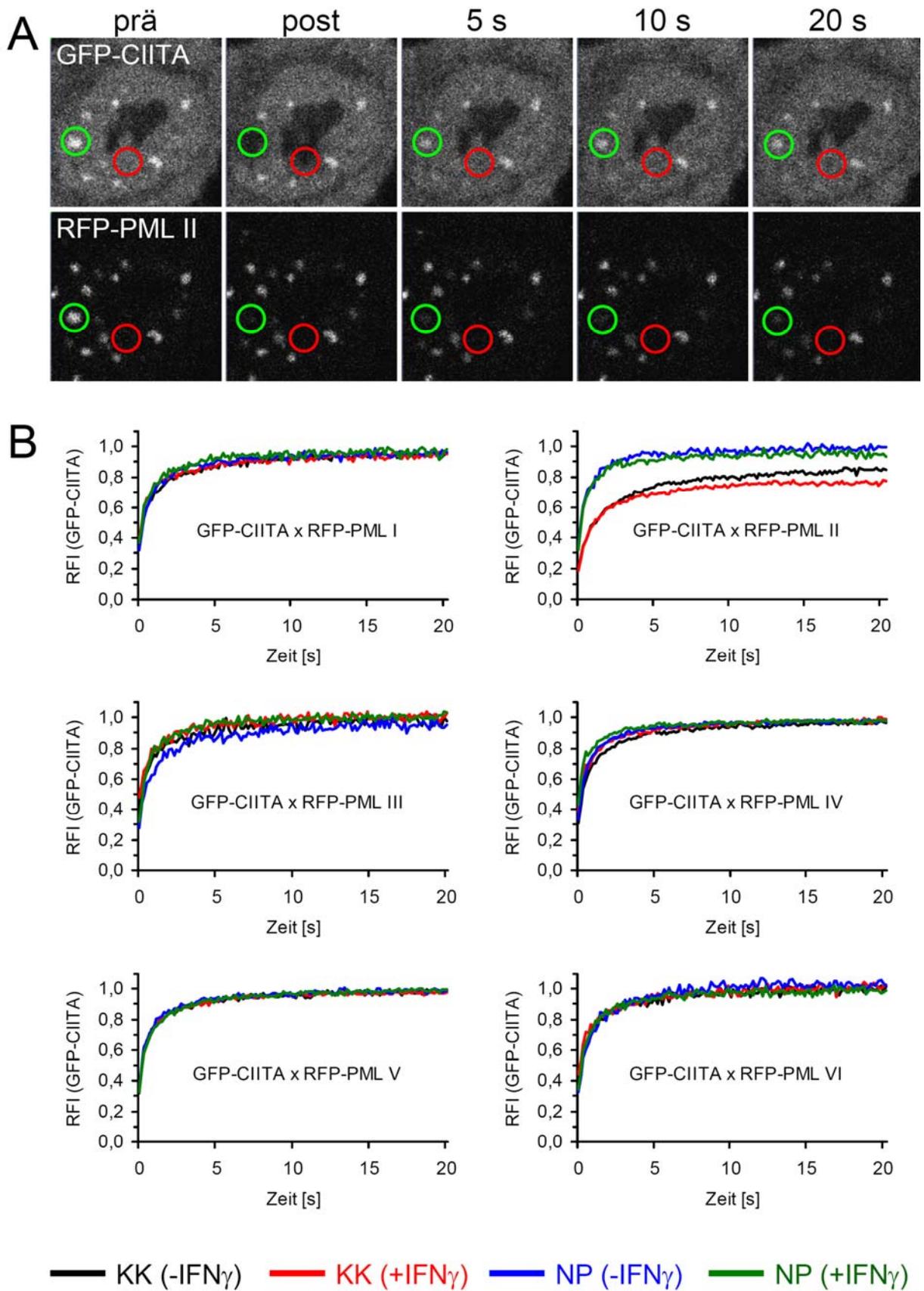


Abb. 3.9: CIITA interagiert mit PML II an den PML-Kernkörperchen.

Vollständige Legende siehe nächste Seite.

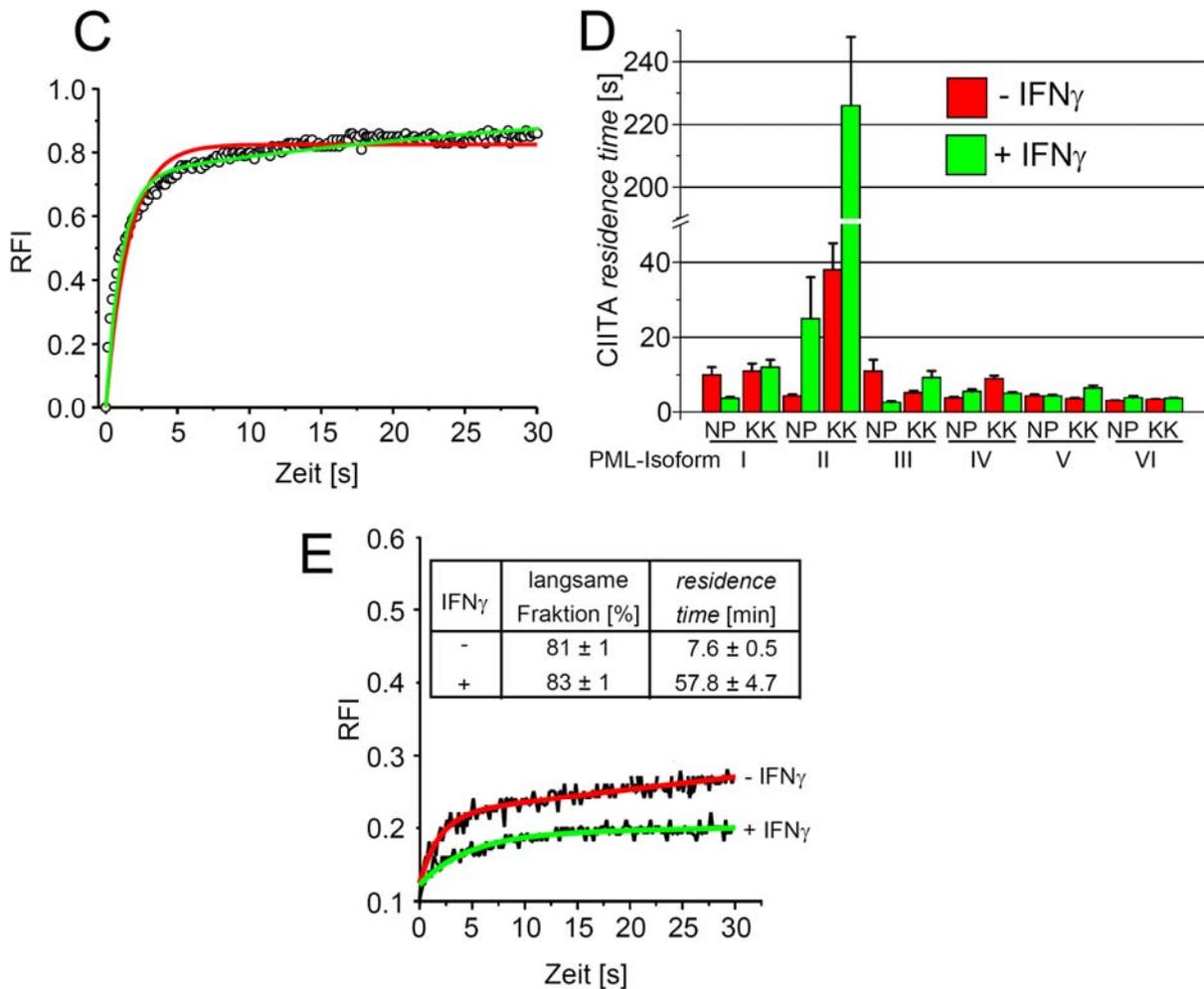


Abb. 3.9: CIITA interagiert mit PML II an den PML-Kernkörperchen.

Die FRAP-Analyse erfolgte in unbehandelten und IFN γ -behandelten (10 U/ml, 24h) HEp-2-Zellen, die GFP-CIITA und eine der 6 RFP-fusionierten PML-Isoformen exprimierten. (A) Beide Fluorophore wurden innerhalb kleiner Regionen im Nukleoplasma ohne (roter Kreis, NP) und mit PML-Kernkörperchen (grüner Kreis; KK) geblichen. In Abständen von 160 ms wurde die Wiederkehr der Fluoreszenz in diesen Regionen über einen Zeitraum von ca. 25 s verfolgt. (B) Graphische Darstellung der Fluoreszenz-Erholung für GFP-CIITA aus jeweils ≥ 10 der oben beschriebenen Experimente. Die Standardabweichung beträgt jeweils 10-20 % (Daten nicht gezeigt). (C) Anpassen (fitten) der FRAP-Kurven von GFP-CIITA mit Exponentialfunktionen. Eine 1-Komponenten- (rot) bzw. 2-Komponenten- (grün) Exponentialfunktion wurde an die gemessene FRAP-Kurve von GFP-CIITA bei Koexpression von RFP-PML II angepasst. Das 2-Komponenten-Modell liefert eine gute Anpassung an die Meßwerte. (D) Die Verweilzeiten der langsamen Fraktion des GFP-CIITA an den PML-Kernkörperchen (KK) und im Nukleoplasma (NP) in Gegenwart einer der RFP-fusionierten PML-Isoformen in HEp-2-Zellen mit (grüner Balken) oder ohne IFN γ -Behandlung (roter Balken), siehe auch [Tab. 2](#). (E) IFN γ -induziertes Zurückhalten von RFP-PML II an den Kernkörperchen. FRAP-Analyse von RFP-PML II an PML-Kernkörperchen mit oder ohne IFN γ -Behandlung. Die Tabelle zeigt die relative Menge und die Verweilzeit der langsamen Fraktion von RFP-PML II. Deren Bestimmung erfolgte über die Anpassung der Exponentialfunktion anhand eines 2-Komponenten-Modells.

Das Vorhandensein zweier Fraktionen unterschiedlicher Mobilität stimmt mit Dynamikuntersuchungen anderer Transkriptionsfaktoren im Chromatin überein. Die bei FRAP-Experimenten beobachtete anfänglich schnelle Erholung der Fluoreszenzintensität ist dabei auf frei diffundierende Moleküle zurückzuführen, während die späte Phase der FRAP-Kurve durch Chromatin-Interaktionskinetiken dominiert wird (Beaudouin *et al.*, 2006; Sprague *et al.*, 2006).

Anhand des exponentiellen Terms der angepassten Funktion wurde die mittlere Verweilzeit (*residence time*) der langsameren (wechselwirkenden) Population des GFP-CIITA ermittelt. Dieser Ansatz ergab für GFP-CIITA in Gegenwart der RFP-gekoppelten PML-Isoformen I, III, IV, V oder VI Verweilzeiten von wenigen Sekunden, sowohl im Nukleoplasma, als auch an Kernkörperchen, und unabhängig von einer IFN γ -Behandlung (Abb. 3.9 D). Die Koexpression von RFP-PML II resultierte dagegen in einer Verweilzeit des GFP-CIITA von 38 ± 7 s an PML-Kernkörperchen und erhöhte sich durch die IFN γ -Behandlung auf 226 ± 22 s (Abb. 3.9 D). Dieses Ergebnis deutet auf eine direkte oder indirekte Interaktion von CIITA mit PML II an den Kernkörperchen hin, die durch IFN γ -Behandlung der Zellen nochmals deutlich verstärkt wird.

In lebenden Zellen tauschen alle PML-Isoformen relative langsam an Kernkörperchen aus, die Verweildauer von GFP-PML II beträgt in U-2 OS-Zellen 6,2 min (Weidtkamp-Peters *et al.*, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit sollte festgestellt werden, ob IFN γ auch einen Einfluss auf die Verweildauer von PML II an Kernkörperchen hat. Dazu wurden die FRAP-Daten von GFP-PML II in HEP-2-Zellen mit bzw. ohne IFN γ -Behandlung mit einer 2-Komponenten-Exponentialfunktion angepasst (Abb. 3.9 E). Aus der angepassten Funktion wurde der Anteil der langsam austauschenden Fraktion und dessen Verweildauer an den PML-Kernkörperchen bestimmt. Diese Analyse zeigte, dass ca. 80 % der GFP-PMLII-Moleküle eine Verweildauer von $7,6 \pm 0,5$ min besitzen, in guter Übereinstimmung mit den Daten in U-2 OS-Zellen (Weidtkamp-Peters *et al.*, 2008). In IFN γ -behandelten Zellen dagegen beträgt die Verweildauer von GFP-PML II an den Kernkörperchen $57,8 \pm 4,7$ min (Abb. 3.9 E). Zusammengefasst zeigen diese Beobachtungen, dass die Interaktion zwischen RFP-PML II und GFP-CIITA an Kernkörperchen auf einem stabilen RFP-

PML II-Netzwerk beruht, an das GFP-CIITA mit einer mittleren Verweildauer von 3.8 ± 0.4 min binden kann.

		GFP-CIITA schnelle Fraktion				GFP-CIITA langsame Fraktion					
		Menge [%]		$t_{50\%}$ [s]		Menge [%]		$t_{50\%}$ [s]		<i>residence time</i> [s]	
RFP-		-IFN γ	+IFN γ	-IFN γ	+IFN γ	-IFN γ	+IFN γ	-IFN γ	+IFN γ	-IFN γ	+IFN γ
PML I	NP	81 \pm 1	74 \pm 2	0,32 \pm 0,02	0,19 \pm 0,01	19 \pm 1	26 \pm 2	6,9 \pm 1,4	2,6 \pm 0,2	10 \pm 2	3,8 \pm 0,3
	KK	77 \pm 1	78 \pm 1	0,40 \pm 0,02	0,23 \pm 0,01	23 \pm 1	22 \pm 1	7,6 \pm 1,4	8,3 \pm 1,4	11 \pm 2	12 \pm 2
PML II	NP	80 \pm 1	89 \pm 2	0,30 \pm 0,02	0,35 \pm 0,01	20 \pm 1	11 \pm 1	3,0 \pm 0,3	17 \pm 8	4,4 \pm 0,4	25 \pm 11
	KK	72 \pm 3	58 \pm 2	0,76 \pm 0,01	0,97 \pm 0,07	28 \pm 1	42 \pm 2	26 \pm 5	157 \pm 15	38 \pm 7	226 \pm 22
PML III	NP	77 \pm 1	70 \pm 2	0,36 \pm 0,01	0,23 \pm 0,01	23 \pm 1	30 \pm 2	7,6 \pm 2,0	1,8 \pm 0,4	11 \pm 3	2,6 \pm 0,2
	KK	74 \pm 1	79 \pm 3	0,24 \pm 0,01	0,22 \pm 0,01	26 \pm 1	21 \pm 1	3,7 \pm 0,3	6,4 \pm 1,2	5,3 \pm 0,5	9,3 \pm 1,8
PML IV	NP	77 \pm 2	85 \pm 1	0,23 \pm 0,02	0,17 \pm 0,01	23 \pm 1	15 \pm 1	2,7 \pm 0,2	3,9 \pm 0,4	3,9 \pm 0,3	5,6 \pm 0,6
	KK	79 \pm 1	77 \pm 1	0,31 \pm 0,02	0,19 \pm 0,01	21 \pm 1	23 \pm 1	6,2 \pm 0,6	3,5 \pm 0,2	9,0 \pm 0,8	5,1 \pm 0,3
PML V	NP	78 \pm 1	73 \pm 1	0,23 \pm 0,02	0,23 \pm 0,01	22 \pm 1	27 \pm 1	3,0 \pm 0,3	3,0 \pm 0,2	4,4 \pm 0,4	4,4 \pm 0,3
	KK	75 \pm 1	80 \pm 1	0,20 \pm 0,02	0,26 \pm 0,01	25 \pm 2	20 \pm 1	2,6 \pm 0,2	4,5 \pm 0,5	3,7 \pm 0,3	6,5 \pm 0,7
PML VI	NP	62 \pm 2	74 \pm 2	0,21 \pm 0,03	0,24 \pm 0,01	38 \pm 2	26 \pm 2	2,1 \pm 0,1	2,8 \pm 0,3	3,1 \pm 0,2	4,0 \pm 0,4
	KK	67 \pm 2	69 \pm 1	0,18 \pm 0,02	0,16 \pm 0,01	33 \pm 2	31 \pm 1	2,4 \pm 0,1	2,6 \pm 0,1	3,4 \pm 0,2	3,8 \pm 0,2

Tab. 3. 2: Dynamik von GFP-CIITA in lebenden Zellen

FRAP-Experimente mit IFN γ -behandelten oder unbehandelten HEp-2-Zellen, die GFP-CIITA und eine der sechs PML-Isoformen als RFP-Fusionsprotein exprimieren. Das GFP-Signal wurde in kleinen kreisförmigen Regionen innerhalb des Nukleoplasmas ohne (NP) oder mit einem PML-Kernkörperchen (KK) geblichen und die Wiederkehr der Fluoreszenz über die Zeit gemessen. Die erhaltenen FRAP-Kurven wurden an 2-Komponenten-Exponentialfunktionen angepasst. Aus diesen wurde die relative Menge und die Zeit für die Rückkehr der Hälfte der ursprünglichen Fluoreszenz ($t_{50\%}$) der zwei unterschiedlich mobilen Populationen des GFP-CIITA ermittelt. Die Bestimmung der Verweilzeit der langsamen Fraktion von GFP-CIITA erfolgte anhand der angepassten Exponentialfunktionen wie beschrieben ([Schmiedeberg et al., 2004](#); [Hemmerich et al., 2008](#)).

3.7 Bestimmung der Mobilität von GFP-CIITA im Zellkern mittels RICS

Die *raster image correlation spectroscopy* (RICS)-Technik wurde angewendet, um die Molekülbewegung von CIITA in Subregionen des Zellkerns besser aufzulösen. RICS ist eine mathematische Berechnung von Molekülbewegungen. Diese Berechnung beruht auf einer räumlich/zeitlichen Autokorrelation der Fluoreszenzfluktuation pro Pixel in konfokalmikroskopischen Lebendzell-Bildaufnahmen (Digman *et al.*, 2005). Die gemessene Autokorrelationsfunktion der Molekülbewegung wird dann mit einem mathematischen Diffusionsmodell angepasst, um die Diffusionskoeffizienten in Subregionen der Konfokalaufnahmen zu bestimmen. Die Details zu dieser Technik wurden an einer anderen Stelle beschrieben (Lenser *et al.*, 2010).

Als Kontrolle wurde zunächst der Diffusionskoeffizient von freiem GFP im Zellkern bestimmt (Abb. 3.10 A). Dieser schwankte zwischen $7 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ und $30 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, in Übereinstimmung mit Literaturdaten (Pack *et al.*, 2006). Subnukleäre Stellen mit niedrigen Diffusionskoeffizienten von GFP ($D < 10 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) entsprachen Nukleoli (nicht gezeigt), ein Hinweis auf verlangsamte Diffusion durch molekulares Gedränge in diesem extrem moleküldichten Kernkörperchen (Bancaud *et al.*, 2009). Der Diffusionskoeffizient von GFP-CIITA im Zellkern lag zwischen $1 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ und $3 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (Abb. 3.10 C), also ca. 10-mal niedriger als der Wert für freies GFP. Diese Reduktion in D kann nicht durch große Komplexe erklärt werden, in die CIITA eingebaut wird, da Moleküle mit solch niedrigen Diffusionskoeffizienten im Giga-Dalton-Größenbereich liegen würden. Solch große Komplexe wurden im konfokalmikroskopischen Bild jedoch nicht sichtbar gemacht (z.B. Abb. 3.10 C1). Daher resultiert die verlangsamte Diffusion von GFP-CIITA gegenüber freiem GFP vermutlich auf transienter Interaktion von CIITA mit Chromatin und die Bildung kleiner Proteinkomplexe, in Übereinstimmung mit dem Diffusionsverhalten bisher analysierter Chromatin-bindender Proteine im Zellkern (Phair *et al.*, 2004; Beaudouin *et al.*, 2006, Sprague *et al.*, 2006). An und in PML-Kernkörperchen lag der Diffusionskoeffizient von GFP-CIITA niedriger als $1 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ bzw. $0,2 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, wenn die Zellen RFP-PML IV bzw. RFP-PML II koexprimierten (Abb. 3.10 B und C).

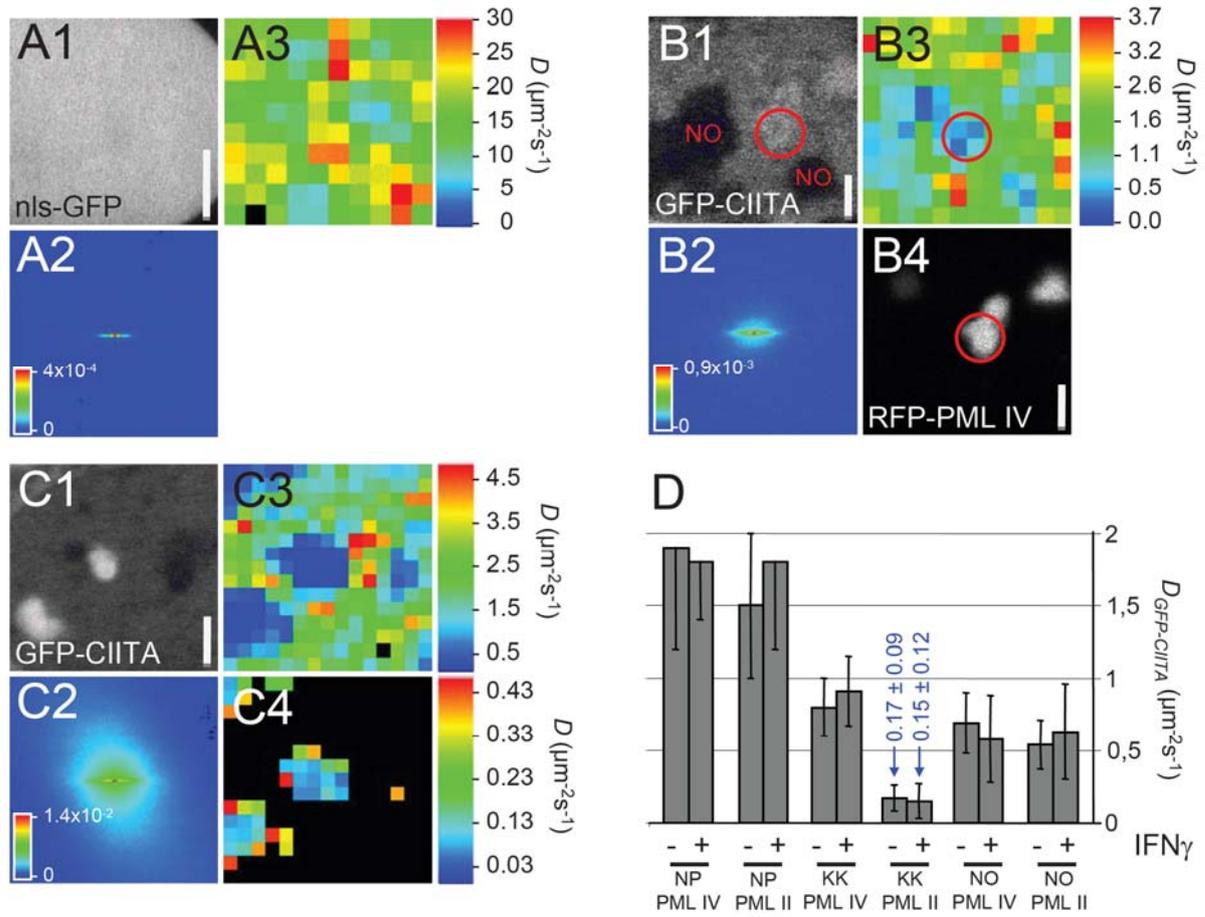


Abb. 3.10: Räumlich aufgelöste Bestimmung der Mobilität von GFP-CIITA im Zellkern mittels RICS

(A1) zeigt ein konfokalmikroskopisches Bild aus einer Zeitserie von freiem GFP (nls-GFP) im Zellkern einer HEp-2-Zelle. Zur Bildakquise wurde eine Auflösung von 512×512 Pixeln mit einer Pixelgröße von $0,03 \mu\text{m}$ und einer Aufnahmegeschwindigkeit von $6,4 \mu\text{s}/\text{Pixel}$ gewählt. (A2) Mit Hilfe der RICS-Software (ZEN 2009, ZEISS) wird ein zweidimensionales Autokorrelationsspektrum der Fluoreszenzfluktuationen in der Zeit-Bildserie erstellt. (A3) In überlappenden, 64×64 Pixel großen Unterbereichen der Zeit-Bildserie kann dann der Diffusionskoeffizient D durch Anpassen mit einem mathematischen Diffusionsmodell in Subregionen ermittelt und als Diffusionskarte dargestellt werden. Der Farbbalken indiziert die gemessenen Diffusionskoeffizienten. (B1-4) Die gleiche Analyse wie für (A) beschrieben in Zellen, die GFP-CIITA und RFP-PML IV koexprimieren. (C) Die gleiche Analyse wie für (A) beschrieben in Zellen, die GFP-CIITA und RFP-PML II koexprimieren. Die Diffusionskarte ist hier dargestellt für einen Bereich der Diffusionskoeffizienten zwischen 0 und $5 \mu^2\text{ms}^{-1}$ (C3) oder zwischen 0 and $0,5 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (C4). Schwarze Bereiche kennzeichnen Regionen, die außerhalb des eingestellten D -Bereiches liegen oder in denen die Qualität der Anpassung mit dem Diffusionsmodell zu gering war. (D) Quantifizierung der RICS-Analysen. Der Diffusionskoeffizient von GFP-CIITA wurde mit dem RICS-Verfahren in Zellen ermittelt, die RFP-PML IV (PML IV) oder RFP-PML II (PML II) koexprimierten. D wurde im Nukleoplasma (NP), Kernkörperchen (KK) und in den Nukleoli (NO) mit und ohne Interferon-Behandlung bestimmt. Die Säulen zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen von Messungen auf mindestens 5 Zellen. Balken: $2 \mu\text{m}$.

Diese Beobachtungen bestätigten die Rekrutierungs- und FRAP-Analysen (Abb. 3.2 bzw. 3.9), die andeuteten, dass PML II mit CIITA direkt oder indirekt an PML-Kernkörperchen interagiert. Eine Quantifizierung der RICS-Daten ist in Abb. 3.10 D gezeigt.

Um auszuschließen, dass die niedrigen Diffusionskoeffizienten durch die sehr langsame Eigenbewegung der PML-Kernkörperchen verursacht werden, wurden RICS-Analysen innerhalb des PML-Kernkörperchens durchgeführt (Abb. 3.11). Diese Analyse zeigte einen ähnlich niedrigen Diffusionskoeffizienten für GFP-CIITA innerhalb des PML-Kernkörperchens bei RFP-PML II-Koexpression (Abb. 3.11 C). Zudem liegt dieser Wert 3 Größenordnungen über dem Diffusionskoeffizienten des PML-Kernkörperchens ($D = 1,2 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) (Görisch *et al.*, 2005). Zusammengefasst bestätigen die RICS-Analysen die Schlussfolgerung, dass die PML-Proteinisoform II mit CIITA an PML-Kernkörperchen interagiert.

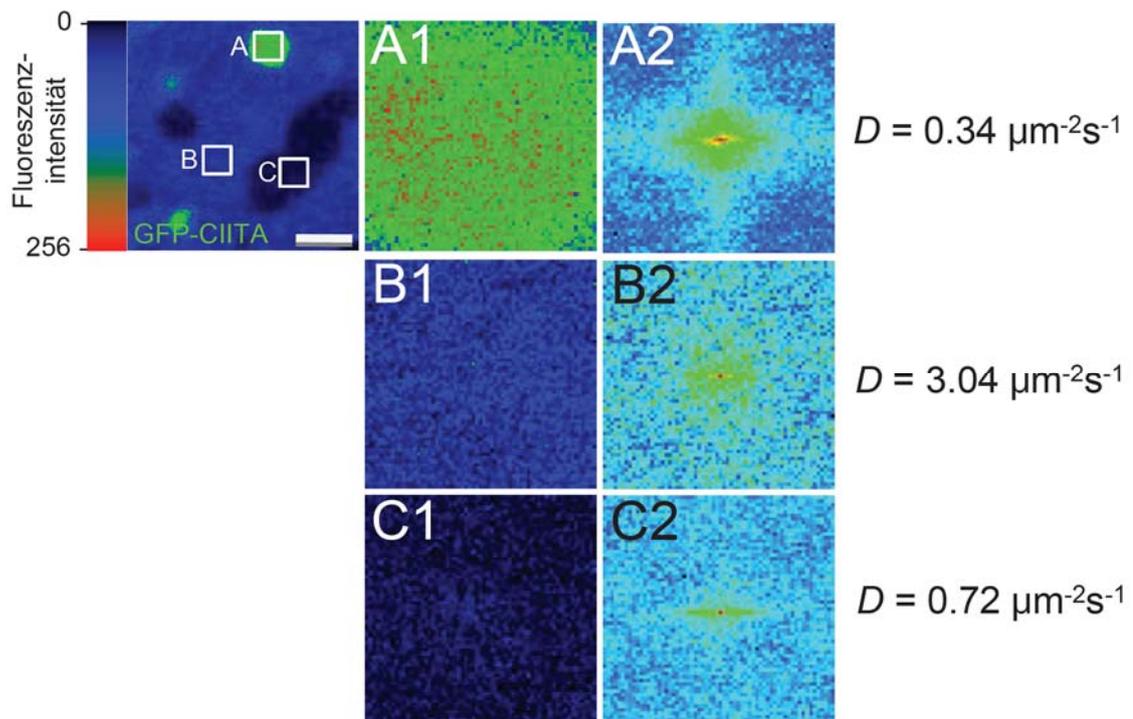


Abb. 3.11: Dynamik von GFP-CIITA in Kernkörperchen.

GFP-CIITA und RFP-PML II (nicht gezeigt) wurden in HEp-2-Zellen koexprimiert. Eine RICS-Analyse wurde durchgeführt wie in der Legende zu Abb. 3.10 beschrieben. Aus dieser Bildserie wurden 64×64 Pixel große Subregionen im PML-Kernkörperchen (A1), im Nukleoplasma (B1) und im Nukleolus (C1) isoliert. Von diesen Subregionen wurden die Korrelationsspektren (A2, B2, bzw. C2) und der Diffusionskoeffizient D bestimmt. Balken: $2 \mu\text{m}$.

4 Diskussion

Positive und negative Transkriptionsregulation geht häufig mit einer Genort-Relokalisation im Zellkern einher. Es gilt als gesichert, dass die dreidimensionale Organisation des Chromatins im Zellkern zur Regulation der Genexpression beiträgt (Sexton *et al.*, 2007; Lanctot *et al.*, 2007; Takizawa *et al.*, 2008; Kumaran *et al.*, 2008). In einem dreidimensionalen Modell der Transkriptions-Kontrolle koordinieren intra- und interchromosomale Assoziationen über kurze und lange Distanzen die Genexpression (Göndör & Ohlsson, 2009). In Übereinstimmung mit diesem Modell wurde beobachtet, dass aktive Gene von verschiedenen Chromosomen gleichzeitig an gemeinsamen Transkriptionsfoci transkribiert werden (Osborne *et al.*, 2004). Außerdem assoziieren einige Gene spezifisch mit der Peripherie subnukleärer Domänen wie den Speckles (Xing *et al.*, 1995), den Cajal-Kernkörperchen (Frey & Matera, 1995; Smith *et al.*, 1995) und den PML-Kernkörperchen (Shiels *et al.*, 2001). Diese Beobachtungen führten zu einem Modell, in dem subnukleäre Domänen in die Expressionskontrolle der assoziierten Gene involviert sind (Xing *et al.*, 1995, Frey und Matera, 1995; Ishov *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2004; Schul *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2007).

4.1 Transkriptionsregulation am PML-Kernkörperchen

Den ersten Hinweis für einen möglichen Einfluss von PML-Kernkörperchen auf die Transkription räumlich assoziierter Gene erbrachten Experimente mit DNA-Viren. Dabei wurde festgestellt, dass die mRNA-Synthese des humanen Cytomegalievirus (HCMV) im unmittelbaren „Transkriptions“-Umfeld in der Peripherie von PML-Kernkörperchen erfolgt (Ishov *et al.*, 1997; Maul, 1998). Die Frage, ob das Umfeld von PML-Kernkörperchen die Transkription auch regulatorisch beeinflusst, wurde erstmals durch die Anbindung von Reporterplasmiden an PML-Kernkörperchen untersucht (Block *et al.*, 2006). Diese Analysen zeigten, dass je nach Promotor die unmittelbare Nähe zu einem PML-Kernkörperchen die transkriptionelle Aktivierung oder Repression des Reportergens begünstigt (Block *et al.*, 2006). Ein ähnlicher Ansatz zeigte, dass die transkriptionelle Aktivierung von Reportergenen deren Re-

lokalisierung vom zentromerischen Heterochromatin zum Euchromatin und die Rekrutierung von PML-Kernkörperchen induziert. Hierbei hatte die Assoziation mit PML-Kernkörperchen aber keinen direkten Einfluss auf die transkriptionelle Regulation des Reportergens (Bishop *et al.*, 2006).

In differenzierenden, murinen, embryonalen Stammzellen (mESC) konnte mittels Immuno-FISH eine enge Assoziation von PML-Kernkörperchen mit dem aktiven Oct3/4-Gen gezeigt werden. Während der *in vitro*-Differenzierung der mESC über neuronale Vorläuferzellen zu post-mitotischen Neuronen kommt es zur Einstellung der Transkription des Oct3/4-Gens einhergehend mit dem Verlust der PML-Kernkörperchen Interaktion (Aoto *et al.*, 2006). Das Oct3/4-Gen war nur dann transkriptionell aktiv, wenn es mit PML-Kernkörperchen assoziiert war (Aoto *et al.*, 2006). Auch für Jurkat-Zellen wurde eine hohe Assoziationsrate (50 %) zwischen PML-Kernkörperchen und dem *p53*-Gen gefunden. Die biologische Relevanz dieser Interaktion wurde jedoch nicht untersucht (Sun *et al.*, 2003).

Das Modell der Chromatinanlagerung an PML-Kernkörperchen stimmt mit elektronenspektroskopischen Analysen überein, die zeigen, dass die Oberfläche von Kernkörperchen in direktem Kontrakt mit 10nm- und 30nm-Chromatinfasern stehen (Eskiw *et al.*, 2004). Es wurde auch beobachtet, dass die Peripherie von PML-Kernkörperchen mit aktiven Transkriptionsstellen assoziiert ist (Grande *et al.*, 1996; von Mikecz *et al.*, 2000; Boisvert *et al.*, 2000; Kiesslich *et al.*, 2004; Fuchsova *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2006).

4.2 IFN γ erhöht spezifisch die Assoziationsrate zwischen PML-Kernkörperchen und dem MHC Klasse II-Gencluster

Der MHC-Gencluster auf dem kleinen Arm des Chromosoms 6 ist eine der Genreichsten und transkriptionell aktivsten Abschnitte im menschlichen Genom. Die hohe Assoziationsrate des MHC-Clusters mit PML-Kernkörperchen (Shiels *et al.*, 2001) ist vermutlich damit zu erklären, dass diese Kernstrukturen in ihrer Peripherie eine Transkriptions-permissive Umgebung besitzen, die eine effiziente Genexpression erlaubt (Wang *et al.*, 2004). In Vorarbeiten wurde festgestellt, dass IFN γ die Assoziation zwischen PML-Kernkörperchen und dem MHC-II-Genlocus erhöht

(Kießlich, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde die Spezifität dieser Assoziation gezeigt (Abb. 3.1). Da die Mehrzahl der Gene des MHC-II-Genclusters IFN γ -induzierbar ist, steht die Erhöhung der Transkriptionsaktivität in diesem Genomabschnitt wahrscheinlich im direkten Zusammenhang mit seiner erhöhten Assoziation an PML-Kernkörperchen. Die PML-Kernkörperchen/MHC-II-Gencluster-Assoziation ist nicht auf eine genomische Unterregion beschränkt, da FISH-Sonden, die den gesamten Locus abdecken mit PML-Kernkörperchen kolokalisieren (Shiels *et al.*, 2001). In >80 % der IFN γ -behandelten, primären, humanen Fibroblasten, die eine enge Assoziation zwischen einem PML-Kernkörperchen und einem *MHC-II*-Allel aufweisen, befindet sich auch das zweite Allel in unmittelbarer Nähe eines Kernkörperchen (Abb. 3.1 und nicht gezeigte Daten). Da die *MHC-II*-Gene beider Chromosomen gleichzeitig exprimiert werden (Majumder *et al.*, 2009), kann davon ausgegangen werden, dass im Großteil der IFN γ -behandelten Zellen PML-Kernkörperchen mit aktiven *MHC-II*-Genen assoziiert sind.

In menschlichen Interphase-Zellen assoziieren Histon- und snRNA-Gene spezifisch mit *Cajal*-Körperchen (Matera, 2009). Es ist aber nicht bekannt, ob p80 *Coilin*, der Hauptbestandteil von *Cajal*-Körperchen, direkt an der transkriptionellen Regulation assoziierter Gene beteiligt ist. Durch Fluoreszenz-Markierung von *Cajal*-Kernkörperchen und *U2 snRNA*-Genen in lebenden Zellen konnte gezeigt werden, dass die Gene durch aktin-vermittelte, gerichtete Bewegungen zu den relativ stabil positionierten *Cajal*-Körperchen rekrutiert werden (Dundr *et al.*, 2007). Auch der MHC- II-Gencluster unterliegt schnellen und massiven Konformationsänderungen in IFN γ -behandelten Fibroblasten. Dabei tritt der Gencluster auf einer Chromatinschleife innerhalb von 10 min aus dem Chromosom 6-Territorium heraus und wird danach vollständig dekondensiert (Volpi *et al.*, 2000; Christova *et al.*, 2007; Branco und Pombo, 2006; Müller *et al.*, 2004). Ob jedoch PML-Kernkörperchen durch Translokation zum MHC-Genlocus oder der MHC-Genlocus zu den Kernkörperchen rekrutiert oder PML Kernkörperchen *de novo* am MHC-Genlocus gebildet werden, muss in weiteren Analysen aufgeklärt werden.

Die Beobachtungen über spezifische Assoziationen mit bestimmten Bereichen des Genoms führte zu einem Modell, in dem PML-Kernkörperchen als Ankerpunkt für bestimmte Regionen des Chromatins agieren, analog den postulierten *matrix*

attachment regions (MARs) (Ching *et al.*, 1998). Dieses Modell wurde durch die Untersuchung der strukturellen Organisation der MHC Klasse I-Region erhärtet. Die dabei gefundene Struktur aus Chromatinschleifen basiert auf der physikalischen und funktionalen Interaktion zwischen PML und dem MAR-Bindeprotein SATB1. Diese Arbeit zeigte, dass ein SATB1/PML-Netzwerk an PML-Kernkörperchen die assoziierte MHC-I-Genregion transkriptionell beeinflussen kann (Kumar *et al.*, 2007). Änderungen in der Zusammensetzung der PML-Kernkörperchen durch Depletion individueller PML-Isoformen führten zu Veränderungen in der Schleifenstruktur und im MHC-I-Expressionsmuster. Interessanterweise wirkte die physische Annäherung an PML-Kernkörperchen eher transkriptionell reprimierend, da Gene auf der Schleife aktiv und Gene am Kernkörperchen eher inaktiv waren (Kumar *et al.*, 2007). Der CIITA/PML II-Komplex an PML-Kernkörperchen könnte für die MHC II-Region eine ähnliche Funktion wahrnehmen wie der SATB1/PML-Komplex für die MHC I-Region (Abb. 4.1).

Ein direkter Zusammenhang zwischen der Transkription und der Chromatinstruktur von MHC-II-Genen wurde kürzlich mit dem CTCF-CIITA-RFX-Komplex beschrieben (Majumder *et al.*, 2008). Dieser Komplex vermittelt eine IFN γ -induzierte Interaktion zwischen den Promotoren des *HLA-DRB1*- und *HLA-DQA1*-Gens und dem XL9-*Enhancer*, der zwischen diesen beiden *MHC-II*-Genen lokalisiert ist. CTCF wirkt dabei als MAR-Bindeprotein, das am XL9-*Enhancer* bindet, dadurch 25kb- und 15kb-Schleifenstrukturen ausbildet und so die Promotorregionen des *HLA-DRB1* und des *HLA-DQA1* in räumliche Nähe bringt. Die Autoren spekulieren, dass auf diese Weise beide Gene konzertiert reguliert werden können (Majumder *et al.*, 2008). Es wäre nun interessant zu untersuchen, ob die CTCF-CIITA-Interaktion möglicherweise direkt an den PML-Kernkörperchen stattfindet.

4.3 Die MHC Klasse II-Transkriptionsfaktoren CIITA, RFXap, RFXb und NFYa binden an PML *bodies*

CIITA ist der Hauptregulator der MHC Klasse II-Transkription und bestimmt maßgeblich dessen Expression (Ting & Trowsdale, 2002). Kürzlich wurde gezeigt, dass GFP-PML II mit einer mittleren Verweildauer von mehreren Minuten relativ stabil an PML-Kernkörperchen gebunden ist (Weidtkamp-Peters *et al.*, 2008; Brand *et al.*, 2010). Die vorliegende Arbeit zeigt, (i) dass die Verweildauer von PML II an Kernkörperchen durch IFN γ von einigen Minuten auf fast 1 h verlängert wird, (ii) dass CIITA an PML-Kernkörperchen bindet und (iii), dass PML-Isoform II nach Interferon-Behandlung CIITA für mehrere Minuten an PML-Kernkörperchen im Komplex halten kann (Abb. 3.9). Die PML II-vermittelte Immobilisierung von CIITA an die PML-Kernkörperchen wurde durch RICS-Messungen bestätigt (Abb. 3.10 und 3.11). Ein stabiler PMLII/CIITA-Komplex könnte als strukturelle Grundlage für das MHC-II-*Enhanceosome* und eine effiziente MHC-II-Transkription dienen (Abb. 4.1 a). Selbst wenn aktive MHC II-Gene nicht physisch mit PML-Kernkörperchen in Kontakt stehen, könnte die Aktivität von CIITA durch dessen regulierten Austausch zwischen Kernkörperchen und MHC-II-Promotoren beeinflusst werden (Abb. 4.1 b und c). Außerdem könnten PML-Kernkörperchen die Zusammenlagerung von Vorstufen des *Enhanceosome*-Komplexes begünstigen, da auch RFXap, RFXb und NFYa an die Kernkörperchen binden können (Abb. 3.3 und 3.4). Diese Vorstellung stimmt mit der Beobachtung überein, dass mehrere synergistische Interaktionen im MHC-II-*Enhanceosome* stattfinden (Masternak *et al.*, 2000) und dass häufig Zwischenstufen größerer Chromatin-bindender Komplexe den Einbau weiterer Untereinheiten in einem im Aufbau befindlichen Komplex begünstigen (Misteli, 2007).

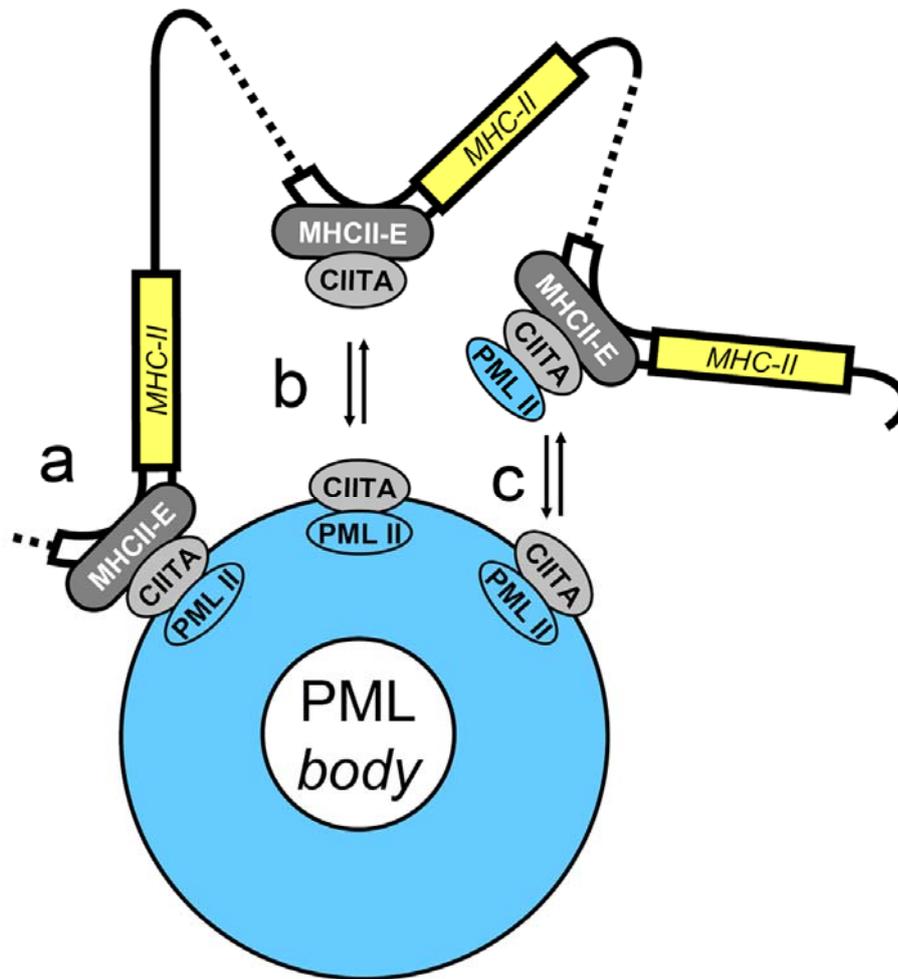


Abb. 4.1: Modell für die transkriptionelle Regulation der *MHC Klasse II*-Gene an den PML-Kernkörperchen.

Die Aktivität der *MHC-II*-Gene (gelb) wird durch das am konservierten Promotor gebundene MHC Klasse II-*enhanceosome* (MHCII-E) und deren Hauptregulator CIITA bestimmt. Die Zusammensetzung des MHC-II-*enhanceosoms* ist in [Abb. 1.5](#) beschrieben. (a) PML-Kernkörperchen könnten als stabiles Gerüst dienen an die das *enhanceosome* durch direkte Interaktion zwischen PML II und CIITA rekrutiert wird. (b) Alternativ könnte die Aktivität des CIITA durch Titration bzw. posttranslationale Modifikation reguliert werden. (c) Auch könnte die CIITA-Aktivität direkt durch PML II am MHC Klasse II-Promoter reguliert werden.

4.4 PML-Proteindepletion verringert die Menge an IFN γ -induziertem CIITA

In der vorliegenden Arbeit führte die siRNA-vermittelte Depletion von PML-Proteinen zu einer Inhibition der IFN γ -induzierten Expression von CIITA. In HEp-2-Zellen, in denen die PML-Proteinmenge um ca. 87% abgesenkt war, wurden noch ca. 60 % der CIITA-Proteinmenge im Vergleich zu Kontrollzellen gemessen ([Abb. 3.8 B](#)). In

Fibroblasten mit nur noch 3,4 % der Kontroll-PML-Proteinmenge lag das CIITA-Proteinniveau bei ca. 41 %. Der Einfluss von PML auf CIITA war spezifisch, da die Depletion von Sp100, der zweiten Strukturkomponente des PML-Kernkörperchen, durch siRNA nicht zu einer Absenkung der CIITA-Proteinmenge führte ([Abb. 3.8 C](#)). Ein stabilisierender Einfluss von PML auf bestimmte Zellkernproteine, wie z. B. p73 oder TopBP1 ist bekannt ([Bernassola et al., 2004](#); [Xu et al., 2003](#)). Insbesondere wird das Tumorsuppressorprotein p53 an PML-Kernkörperchen durch Phosphorylierung und Azetylierung stabilisiert ([Guo et al., 2000](#)). Die Aktivität von CIITA wird ebenfalls durch posttranslationale Modifikationen (PTMs), wie Phosphorylierung, Azetylierung und Ubiquitinierung, reguliert ([Wu et al., 2009](#)). Da PML-Kernkörperchen potentielle Zentren solcher PTM-Aktivitäten sind ([Bernadi et al., 2007](#)), könnte CIITA dort posttranslational modifiziert werden. So könnte die Azetylierung von CIITA durch CBP an den Lysinresten 141 und 144, welche die CIITA-Transaktivierungsaktivität an den MHC-II-Promotoren erhöht ([Spilianaki et al., 2000](#)), an den PML-Kernkörperchen erfolgen. Der Befund, dass die CIITA-Proteinmenge in PML-depletierten Zellen deutlich verringert ist ([Abb. 3.8](#)), deutet auf einen Mechanismus der Proteinstabilitätskontrolle hin. CIITA besitzt nur eine kurze Proteinhalbwertszeit von ca. 30 min, bedingt durch proteasomalen Abbau ([Schnappauf et al., 2004](#)). PTMs und/oder die Wechselwirkung mit PML II an PML-Kernkörperchen könnten dazu beitragen, CIITA auf Proteinebene zu stabilisieren. Aber auch eine Regulation der CIITA-Menge durch PML auf Transkriptionsebene ist denkbar. In präliminären Experimenten wurde in PML-depletierten Zellen eine leichte Reduktion der CIITA-mRNA-Menge um 20 - 25 % beobachtet (Daten nicht gezeigt).

4.5 Die Herunterregulierung der PML-Proteinmenge führt zu einer veränderten MHC II-Expression

[Wang et al. \(2004\)](#) zeigten, dass die Senkung der PML-Proteinmenge mittels siRNA keinen signifikanten Einfluss auf die Transkriptionsrate von Kernkörperchen-assoziierten Genen hatte. In dieser Studie wurden aber nicht die Gene unter der Kontrolle des konservierten MHC Klasse II-Promotors analysiert. Die Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen, dass assoziierte Gene transkriptionell nicht durch PML-Kernkörperchen reguliert werden ([Wang et al., 2004](#)). Allerdings war die Effizienz der PML-Depletion durch siRNA in dieser Arbeit nur sehr gering: 52 % der

Zellen enthielten noch PML-Kernkörperchen und das PML-Proteinniveau wurde lediglich um 60 % verringert (Wang et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit ermöglichte die shRNA-vermittelte Repression in Fibroblasten die Reduktion der PML-Proteinmenge auf $3,4 \pm 0,9$ %, wobei in >95 % der Zellen keine PML-Kernkörperchen detektiert werden konnten (Abb. 3.7, 3.8 und nicht gezeigte Daten). Unter diesen Bedingungen wurde die Transkription der MHC-II-Gene *HLA-DOA* und *HLA-DMB* deutlich, *HLA-DRA1* geringfügig und *HLA-DPB1* gar nicht reprimiert (Abb. 3.6). Dieses Ergebnis war überraschend, da man erwarten kann, dass die Verringerung der CIITA-Proteinmenge nach PML-Depletion aufgrund der konservierten MHC Klasse II-Promotoren (S-Y-Modul) zu einer gleichmäßigen Verringerung der Transkriptionseffizienz aller MHC Klasse II-Gene führt. Das bedeutet, dass CIITA je nach Promotor oder Promotorumgebung mit unterschiedlicher Effizienz als Transaktivator wirkt und/oder dass PML nicht als Koregulator aller Kernkörperchen-assoziiierter MHC-II-Gene in Erscheinung tritt. Unter Umständen werden derartige Unterschiede auch durch distale Regulatorelemente verursacht, deren Interaktion mit dem Promotor bzw. *MHC-II-Enhanceosome* unter anderem durch den bereits erwähnten CTCF-CIITA-RFX-Komplex (Majumder et al., 2008) vermittelt wird.

Während die klassischen MHC-II-Gene also auf mRNA-Ebene durch die PML-Depletion kaum (*HLA-DRA1*) oder gar nicht (*HLA-DPB1*, *HLA-DPA1*) unterdrückt wurden (Abb. 3.6 E und nicht gezeigte Daten), waren sie auf der Proteinebene deutlich reduziert (Abb. 3.7). Daher muss ein posttranskriptioneller Mechanismus für die verringerte HLA-DR-, HLA-DP- und HLA-DQ-Proteinexpression postuliert werden. Die Transkription der nicht-klassischen MHC-II-Gene *HLA-DOA* und *HLA-DMB* war durch PML-Depletion dagegen deutlich unterdrückt (Abb. 3.6 E). Das nicht-klassische MHC-II-Molekül HLA-DM vermittelt bei der „Reifung“ der klassischen MHC-II-Moleküle (HLA-DR, -DP und -DQ) im Endosom den Austausch des proteolytischen Fragmentes der invarianten Kette CLIP (*class II-associated invariant chain peptide*) in der Peptid-Bindetasche gegen ein Peptid pathogenen Ursprungs, das dann auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Für das HLA-DO-Molekül wurde eine für diesen Prozess unterstützende Funktion nachgewiesen (Alfonso & Karlsson, 2000). Es ist daher möglich, dass die verringerte HLA-DR/DP/DQ-Proteinmenge indirekt durch die verminderte HLA-DO/DM-Expression verursacht wird. Wenn die Faltungshelfer oder das Peptid-Editing fehlen, kommt es möglicherweise zur

Destabilisierung und Abbau der für die Zelloberfläche bestimmten MHC-II-Moleküle. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Klasse II-Moleküle, deren Peptidbeladung gestört ist, Protease-sensitiv sind und endosomal abgebaut werden ([Ceman et al., 1998](#); [Arneson et al., 2001](#)). Um diese Hypothese zu testen, müsste die Interferon-induzierte HLA-DR-, -DP- und -DQ-Molekülexpression in Zellen analysiert werden, in denen HLA-DM und / oder -DO durch siRNA-Behandlung depletiert werden. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass bereits eine geringfügige Abnahme der mRNA-Expression von *HLA-DR*, *-DP* und *-DQ* zu Auswirkungen auf Proteinebene führt. Dazu müssten die mRNA-Mengen dieser und weiterer MHC-II-Gene durch quantitative RT-PCR-Analysen bestimmt werden.

4.6 Ausblick

Um die Beteiligung von PML bzw. PML-Kernkörperchen bei der Expressionskontrolle von MHC II-Genen weiter aufzuklären, könnten folgende Analysen durchgeführt werden. Über Chromatin-Immunpräzipitations-Experimente könnte der Frage nachgegangen werden, ob PML II möglicherweise direkt oder CIITA vermittelt am Promoter von MHC-II-Genen binden kann und ob Affinitätsunterschiede zu den Promotoren der klassischen und nicht-klassischen MHC Klasse II-Gene auftreten. Transkriptions-Reporter-Analysen in PML-positiven bzw. -negativen Zellen könnten zeigen, ob PML die Transkriptionsinduktion am MHC-II-Promoter durch IFN γ direkt regulieren kann. Proteinbereiche, die für die Interaktion zwischen CIITA und PML II notwendig sind, könnten durch FRAP-Analysen und Koimmunpräzipitationen entsprechender Deletionsvarianten identifiziert werden. Die Bindung vieler Proteine an PML-Kernkörperchen ist SUMO-vermittelt ([Shen et al., 2006](#)). Daher sollte festgestellt werden, ob CIITA SUMOylierungsstellen und/oder SUMO-Bindemotive besitzt und ob diese die Interaktion mit PML II vermitteln.

Mittels RT-PCR-Analysen könnte festgestellt werden, ob CIITA möglicherweise bereits auf Transkriptionsebene durch PML reguliert wird. Indirekte Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Antigenpräsentation durch Immunzellen von Mäusen, in denen das PML-Gen ausgeschaltet wurde, nicht vermindert ist, obwohl die anti-virale Immunantwort dieser Mäuse beeinträchtigt ist ([Bonilla et al., 2002](#)). Es sollte festgestellt werden, ob die MHC II-Expression in antigenpräsentierenden Zellen oder

Interferon-stimulierter Fibroblasten dieser Mäuse kompromittiert ist. Dabei ist jedoch zu beachten, dass murine Zellen die PML- Isoform II nicht ausprägen. Im humanen Zellsystem sollte in diesem Zusammenhang untersucht werden, ob eine siRNA-vermittelte Reduktion ausschließlich von PML II bereits zu einer Verringerung der CIITA-Proteinmenge führt bzw. ob die Überexpression von PML II in PML-depletierten Zellen die MHC II-Expression wieder herstellen kann.

Schließlich sollte analysiert werden, ob der MHC II-Locus durch Interferon-Behandlung zu PML-Kernkörperchen rekrutiert wird oder umgekehrt, bzw. ob PML-Kernkörperchen *de novo* am MHC-II-Gencluster entstehen können. Dazu würde sich das Lac-Operator-Repressor-Bindesystem anbieten, mit dem in das Genom eingebrachte Fremd-DNA, in diesem Falle einige Kopien der MHC-II-Promoterregion, in lebenden Zellen sichtbar gemacht werden kann ([Belmont & Straight, 1998](#)).

5 Literaturverzeichnis

- Alfonso C and Karlsson L (2000).** Nonclassical MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.*, Vol.18: 113-142
- Arneson, LS, Katz JF, Liu M, and Sant AJ (2001).** Hydrogen bond integrity between MHC class II molecules and bound peptide determines the intracellular fate of MHC class II molecules. *J. Immunol.*, Vol.167(12): 6939-6946
- Antoniou AN and Powis SJ (2007).** Pathogen evasion strategies for the major histocompatibility complex I assembly pathway. *Immunology*, Vol.124: 1-12
- Aoto T, Saitoh N, Ichimura T, Niwa H, and Nakao M (2006).** Nuclear and chromatin reorganization in the *MHC-Oct3/4* locus at developmental phases of embryonic stem cell differentiation. *Developmental Biology*, Vol.298: 354-367
- Ascoli CA and Maul GG (1991).** Identification of a novel nuclear domain. *Journal of Cell Biology*, Vol.112(5): 785-795
- Babu MM, Janga SC, de Santiago I, and Pombo A (2008).** Eukaryotic gene regulation in three dimensions and its impact on genome evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, Vol.18(6): 571-582
- Bancaud A, Huet S, Daigle N, Mozziconacci J, Beaudouin J, and Ellenberg J (2009).** Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin. *EMBO Journal*, Vol.28(24): 3785-3798
- Bártová E, Horáková AH, Uhlířova R, Raska I, Galiová G, Orlaova D, and Kozubek S (2009).** Structure and epigenetics of nucleoli in comparison with non-nucleolar compartments. *J. Histochem. Cytochem.*
- Beaudouin J, Mora-Bermúdez F, Klee T, Daigle N, and Ellenberg J (2006).** Dissecting the contribution of diffusion and interactions to the mobility of nuclear proteins. *Biophys. J.*, Vol.90(6): 1878-1894
- Beck S and Trowsdale J (1999).** Sequence organisation of the class II region of the human MHC. *Immunol. Rev.*, Vol.167: 201-210
- Belmont AS and Straight AF (1998).** In vivo visualization of chromosomes using lac operator-repressor binding. *Trends Cell Biol.*, Vol.8(3): 121-124
- Bernassola F, Salomoni P, Oberst A, Di Como CJ, Pagano M, Melino G, and Pandolfi PP (2004).** Ubiquitin-dependent degradation of p73 is inhibited by PML. *J. Exp. Med.*, Vol.199(11): 1545-1557
- Beresford GW and Boss JM (2001).** CIITA coordinates multiple histone acetylation modifications at the HLA-DRA promoter. *Nat. Immunol.*, Vol.2(7): 652-657

- Bernardi and Panolfi (2007).** Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nature Reviews Molecular Biology*, Vol.8(12): 1006-1016
- Bischof O, Kirsh O, Pearson M, Itahana K, Pelicci PG, and Dejean A (2002).** Deconstructing PML-induced premature senescence. *EMBO Journal*, Vol.21, (13): 3358-3369
- Bishop CL, Ramalho M, Nadkarni N, Kong WM, Higgins CF, and Krauzewicz N (2006).** Role for centromeric heterochromatin and PML nuclear bodies in the cellular response to foreign DNA. *Molecular and Cellular Biology*, Vol.26(7): 2583-2594
- Block GJ, Eskiw CH, Dellaire G, and Bazett-Jones DP (2006).** Transcriptional regulation is affected by subnuclear targeting of reporter plasmids to PML nuclear bodies. *Molecular and Cellular Biology*, Vol.26(23): 8814-8825
- Boehm U, Klamp T, Groot M, and Howard JC (1997).** Cellular responses to interferon- γ . *Annu. Rev. Immunol.*, Vol.15: 749-795
- Boisvert F-M, Hendzel MJ, and Bazett-Jones DP (2000).** Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *Journal of Cell Biology*, Vol.148: 283-292
- Boisvert F-M, Kruhlak MJ, Box AK, Hendzel MH, and Bazett-Jones DP (2001).** The transcription coactivator CBP is a dynamic component of the promyelocytic leukaemia nuclear body. *Journal of Cell Biology*, Vol.152(5): 1099-1106
- Bonilla WV, Pinschewer DD, Klenermann P, Rousson V, Gaboli M, Pandolfi PP, Zinkernagel RM, Salvato MS, and Hengartner H (2002).** Effects of promyelocytic leukemia protein on virus-host balance. *Journal of Virology*, Vol.76(8): 3810-3818
- Boss JM (1997).** PML Regulation of transcription of MHC class II genes. *Curr. Opin. Immunol.*, Vol.9(1): 107-113
- Boss JM and Jensen PE (2003).** Transcriptional regulation of the MHC class II antigen presentation pathway. *Curr. Opin. Immunol.*, Vol.15(1): 105-111
- Bourdeau V, Baudry D, and Ferbeyre G (2009).** PML links aberrant cytokine signalling and oncogenic stress to cellular senescence. *Front. Biosci.*, Vol.14: 475-485
- Bowling BL and Adamson AL (2005).** Functional interactions between the Epstein-Barr virus BZLF1 protein and the promyelocytic leukemia protein. *Virus Research*, Vol.117(2): 244-253
- Branco MR and Pombo A (2006).** Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent association. *PLoS Biology*, Vol.4: e138

- Brand P, Lenser T, and Hemmerich P (2010).** Assembly dynamics of PML nuclear bodies in living cells. *PMC Biophys.*, Vol.3(1): 3
- Brown JM, Green J, das Neves RP, Wallace HA, Smith AJ, Hughes J, Gray N, Taylor S, Wood WG, Higgs DR, Iborra FJ, and Buckle VJ (2008).** Association between active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by chromatin environment. *Journal of Cell Biology*, Vol.182(6): 1083-1097
- Brown NJ, Ramalho M, Pedersen EW, Moravcsik E, Solomon E, and Grimwade D (2009).** PML nuclear bodies in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia: active players or innocent bystanders? *Front. Biosci.*, Vol.14: 1684-1707
- Gall JG (2000).** Cajal bodies: the first 100 years. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, Vol.16: 273-300
- Camacho-Carvajal MM, Klingler S, Schnappauf F, Haka SB, and Steimle V (2004).** Importance of class II transactivator leucine-rich repeats for dominant-negative function and nucleo-cytoplasmic transport. *International Immunology*, Vol.16(1): 66-75
- Ceman S, Wu S, Jardetzky TS, and Sant AJ (1998).** Alteration of a single hydrogen bond between class II molecules and peptide results in rapid degradation of class II molecules after invariant chain removal. *J. Exp. Med.*, Vol.188(11): 2139-2149
- Chang C-H, Fontes JD, Peterlin M, and Flavell RA (1994).** Class II transactivator (CIITA) is sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complex class II genes. *J. Exp. Med.*, Vol.180: 1367-1374
- Chelbi-Alix MK, Quignon F, Pelicano L, Koken MH, and de Thè (1998).** Resistance to virus infection conferred by the interferon-induced promyelocytic leukemia protein. *J. Virol*, Vol.72(2): 1043-1051
- Ching RW, Dellaire G, Eskiw CH, and Bazett-Jones DP (2005).** PML bodies: a meeting place for genomic loci? *Journal of Cell Science*, Vol.118: 847-854
- Cho Y, Lee I, Maul GG, and Yu E (1998).** A novel nuclear substructure, ND10: distribution in normal and neoplastic human tissues. *Int. J. Mol. Med.*, Vol.1(4): 717-724
- Christova R, Jones T, Wu PJ, Bolzer A, Costa-Pereira AP, Watling D, Kerr IM, and Sheer D (2007).** P-STAT1 mediates higher-order chromatin remodelling of the human MHC in response to IFN γ . *Journal of Cell Science*, Vol.120: 3262-3270
- Collins T, Korman AJ, Wake CT, Boss JM, Kappes DJ, Fiers W, Ault KA, Gimbrone MAJ, Strominger JL, and Pober (1984).** Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *PNAS USA*, Vol.81: 4917-4921

- Condemine W, Takahashi Y, Zhu J, Puvion-Dutilleul F, Guegan S, Janin A, and de Thé H (2006).** Characterization of endogenous human promyelocytic leukemia isoforms. *Cancer Res.*, Vol.66: 6192-6198
- Condemine W, Takahashi, Y, Le Bras M, and de Thé H (2007).** A nucleolar targeting signal in PML-I addresses PML to nucleolar caps in stressed or senescent cells. *Journal of Cell Science*, Vol.120(18): 3219-3227
- Cook PR (1999).** The organization of replication and transcription. *Science*, Vol.284(5421): 1790-1795
- Cook P (2001).** Principles of nuclear structure and Function. *John Wiley and Sons, NY USA*
- Cook PR (2010).** A model for all genomes: the role of transcription factories. *J. Mol. Biol.*, Vol.395(1): 1-10
- Cremer T, Kreth G, Koester H, Fink RH, Heintzmann R, Cremer M, Solovei I, Zink D, and Cremer C (2000).** Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crt. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, Vol.10(2): 179-212
- Cremer T and Cremer C (2001).** The Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Reviews Genetics*, Vol.2: 292-301
- Cresswell P (1994).** Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.*, Vol.12: 259-93
- Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, Bickmore WA (1999).** Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *Journal of Cell Biology*, Vol.145(6): 1119-1131
- de Thé H, Riviere M, and Bernhard W (1960).** Examination by electron microscope of the VX2 tumor of the domestic rabbit derived from the Shope papilloma. *Bull. Assoc. Fr Etud. Cancer*, Vol.47: 570-584
- de Thé H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A (1990).** The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature*, Vol.347: 558-561
- Diekmann and Hemmerich, Editors (2005).** Vision of the cell nucleus. *American Scientific Publishers, Los Angeles, CA, USA*, ISBN 1-58883-027-6
- Digman MA, Brown CM, Sengupta P, Wiseman PW, Horwitz AR, Gratton E (2005).** Measuring fast dynamics in solutions and cells with a laser scanning microscope. *Biophys. J.*, Vol.89(2): 1317-1327
- Dion V, Shimada K, and Gasser SM (2010).** Actin-related proteins in the nucleus: life beyond chromatin remodelers. *Current Opinion in Cell Biology*

- Dostie J, Richmond TA, Amaout RA, Selzer RR, Lee WL, Honan TA, Rubio ED, Krumm A, Lamb J, Nusbaum C, Green RD, and Dekker J (2006).** Chromosome conformation capture carbon copy (5C): a massively parallel solution for mapping interactions between genomic elements. *Genome Res.*, Vol.10: 1299-1309
- Doucas V, Ishov AM, Romo A, Juguilon H, Weitzmann MD, Evans RM, and Maul GG (1996).** Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. *Genes Dev.*, Vol.20(2)-196-207
- Doucas V, Tini M, Egan DA, and Evans RM (1999).** Modulation of CREB binding protein function by the promyelocytic (PML) oncoprotein suggests a role for nuclear bodies in hormone signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.96(6): 2627-2632
- Dundr M and Misteli T (2001).** Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem. J.*, Vol.356: 297-310
- Dundr M, Ospina JK, Sung MH, John S, Upender M, Ried T, Hager GL, and Matera AG (2007).** Actin-dependent intranuclear repositioning of an active gene locus *in vivo*. *Journal of Cell Biology*, Vol.179(6): 1095-1103
- Eskiw CH, Dellaire G, and Bazett-Jones DP (2004).** Chromatin contributes to structural integrity of promyelocytic leukemia bodies through a SUMO-1-independent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, Vol.279(10): 9577-9585
- Everett RD (2006).** Interactions between DNA viruses, ND10 and the DNA damage response. *Cell Microbiol.*, Vol.8(3):365-374
- Everett RD, Rechter S, Rapior P, Tavalai N, Stamminger T, Orr A (2006).** PML contributes to a cellular mechanism of repression of herpes simplex virus type 1 infection that is inactivated by ICP0. *J. Virol.*, Vol.80(16): 7995-8005
- Everett RD and Chelbi-Alix MK (2007).** PML and PML nuclear bodies: Implications in antiviral defence. *Biochimie*, Vol.86: 819-830
- Fagioli M, Alcalay M, Pandolfi PP, Venturini L, Mencarelli A, Simeone A, Acampora D, Grignani F, Pelicci PG (1992).** Alternative splicing of PML transcripts predicts coexpression of several carboxy-terminally different protein isoforms. *Oncogene*, Vol.7(6): 1083-1091
- Fagioli M, Alcalay M, Tomassoni L, Ferrucci PF, Mencarelli A, Riganelli D, Grignani F, Pozzan T, Nicoletti I, Grignani F, and Pelicci PG (1998).** Cooperation between the RING + B1-B2 and coiled-coil domains of PML is necessary for its effects on cell survival. *Oncogene*, Vol.16(22): 2905-2913
- Fogal V, Gostissa M, Sandy P, Zacchi P, Sternsdorf T, Jensen K, Pandolfi PP, Will H, Schneider C, and Del Sal, G (2000).** Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO Journal*, Vol.19(22): 6185-6195
- Frey MR and Matera AG (2001).** RNA-mediated interaction of Cajal bodies and U2

- snRNA genes. *Journal of Cell Biology*, Vol.154(3): 499-509
- Früh K and Yang Y (1999)**. Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma. *Curr. Opin. Immunol.*, Vol.11(1): 76-81
- Fuchsová B, Novák P, Kafková J, and Hozák P (2002)**. Nuclear DNA helicase II is recruited to IFN- α -activated transcription sites at PML nuclear bodies. *Journal of Cell Biology*, Vol.158(3): 463-473
- Gall JG (2000)**. Cajal bodies: the first 100 years. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, Vol.16: 273-300
- Gambacorta M, Flenghi L, Faioli M, Pileri S, Leoncini L, Bigerna B, Pacini R, Tanci LN, Pasqualucci L, Ascani S, Mencarelli A, Liso A, Pelicci PG, and Falini B (1996)**. Heterogeneous nuclear expression of the promyelocytic leukaemia (PML) protein in normal and neoplastic human tissues. *Am. J. Pathol.*, Vol.149(6): 2023-2035
- Geppert TD and Lipsky PE (1985)**. Antigen presentation by interferon-gamma-treated endothelial cells and fibroblasts: differential ability to function as antigen-presenting cells despite comparable Ia expression. *J. Immunol.*, Vol.135(6): 3750-3762
- Germain RN (1994)**. Cajal MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*, Vol.76(2): 287-299
- Giacomini P, Fisher PB, Duigou GJ, Gambari R, and Natali PG (1988)**. Regulation of class II MHC gene expression by interferons: insights into the mechanism of action of interferon. *Anticancer Research*, Vol.8(6): 1153-1161
- Göndör A and Ohlson R (2009)**. Chromosome crosstalk in three dimensions. *Nature*, Vol.461(7261): 217-228
- Görisch SM, Wachsmuth M, Ittrich C, Bacher CP, Rippe K, and Lichter P (2004)**. Nuclear body movement is determined by chromatin accessibility and dynamics. *PNAS*, Vol.101(36): 13221-13226
- Grande MA, van der Kraan I, van Steensel B, Schul W, de Thé H, van der Voort HTM, de Jong L, and van Driel R (1996)**. PML-containing nuclear bodies: their spatial distribution in relation to other nuclear components. *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol.63: 280-291
- Grötzinger T, Jensen K, and Will H (1996)**. The interferon (IFN)-stimulated gene *Sp100* promoter contains an IFN- γ activation site and an imperfect IFN-stimulated response element which mediate type I IFN inducibility. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.271(41): 25253-25260
- Guccione E, Lethbridge KJ, Killick N, Leppard KN, and Banks L. (2004)**. HPV E6 proteins interact with specific PML isoforms and allow distinctions to be made between different POD structures. *Oncogene*, Vol.23: 4662-4672

- Guo A, Salomoni P, Luo J, Shih A, Zhong S, Gu W, and Pandolfi PP (2000).** The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat. Cell Biol.*, Vol.2(10): 730-736
- Hager GL, McNally JG, and Misteli T (2009).** Transcription dynamics. *Mol. Cell.*, Vol.35(6): 741-753
- Handwerger KE and Gall JG (2006).** Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Trends in Cell Biology*, Vol.16(1): 19-26
- Häkli M, Karvonen U, Jänne OA, Palvimo JJ (2005).** SUMO-1 promotes association of SNURF (RNF4) with PML nuclear bodies. *Exp. Cell Res.*, Vol.304(1): 224-233
- Heard E and Bickmore W (2007).** The The ins and outs of gene regulation and chromosome territory organisation. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol.19(3): 311-316
- Hemmerich P, Weidtkamp-Peters S, Hoischen C, Schiedeberg L, Erliandri I, and Diekmann S (2008).** Dynamics of inner kinetochore assembly and maintenance in living cells. *Journal of Cell Biology*, Vol.180(6): 1101-14
- Heuser M, van der Kuip H, Falini B, Peschel C, Huber C, and Fischer T (1998).** Induction of the pro-myelocytic leukaemia gene by type I and type II interferons. *Mediators of Inflammation*, Vol.7: 319-325
- Hofmann TG and Will H (2003).** Body language: the function of PML nuclear bodies in apoptosis regulation. *Cell Death Differ.*, Vol.10(12): 1290-1299
- Hoppe A, Beech SJ, Dimmock J, and Leppard KN (2006).** Interaction of the adenovirus type 5 E4 Orf3 protein with promyelocytic leukemia protein isoform II is required for ND10 disruption. *J. Virol.*, Vol.80(6): 3042-3049
- Hu Q, Kwon YS, Nunez E, Cardamone MD, Hutt KR, Ohgi KA, Garcia-Bassets I, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG, and Fu XD (2008).** Enhancing nuclear receptor-induced transcription requires nuclear motor and LSD1-dependent gene networking in interchromatin granules. *PNAS*, Vol.105(49): 19199-19204
- Ishov AM, Stenberg RM, and Maul GG (1997).** Human cytomegalovirus immediate early interaction with host nuclear structures: definition of an immediate transcript environment. *Journal of Cell Biology*, Vol.138(1): 5-16
- Ishov AM, Sotnikov AG, Negorev D, Vladimirova OV, Neff N, Kamitani T, Yeh ETH, Strauss III. JF, and Maul GG (1999).** PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein Daxx to this structure when modified by SUMO-1. *Journal of Cell Biology*, Vol.147(2): 221-233
- Jensen K, Shiels C, and Freemont PS (2001).** PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene*, Vol.20: 7223-7233
- Jiang W-Y, Zhong Z-H, Henson JD, and Reddel RR (2007).** Identification of

candidate alternative lengthening of telomeres genes by methionine restriction and RNA interference. *Oncogene*: 1-13

Kießlich A, von Mikecz A, and Hemmerich P (2002). Cell cycle-dependent association of PML bodies with sites of active transcription in nuclei of mammalian cells. *Journal of Structural Biology*, Vol.140: 167-179

Kießlich A (2004). Struktur- und Funktionsbeziehungen im Zellkern: PML-Kernkörperchen und Transkription. *Cuvillier Verlag Göttingen*, Dissertation, ISBN 3-86537-215-5

Krawczyk M and Reith W (2006). Regulation of MHC class II expression, a unique regulatory system identified by the study of a primary immunodeficiency disease. *Tissue Antigens*, Vol.67: 183-197

Kumaran RI, Thakar R, and Spector DL (2008). Chromatin dynamics and gene positioning. *Cell*, Vol.132(6): 929-934

Kumar PP, Bischof O, Purbey KP, Notani D, Urlaub H, Dejean A, and Galande S (2007). Functional interaction between PML and SATB1 regulates chromatin-loop architecture and transcription of the MHC class I locus. *Nature Cell Biology*, Vol.9(1): 45-56

Lafarga M, Berciano MT, Pena E, Mayo I, Castano JG, Bohmann D, Rodrigues JP, Tavanez JP, and Carmo-Fonseca M (2002). Clastosome: a subtype of nuclear body enriched in 19S and 20S proteasomes, ubiquitin, and protein substrates of proteasome. *Mol. Biol. Cell*, Vol.13(8): 2771-2782

Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Puvion F, Kokekn M, Honoré N, Doubeikosvsky A, Duprez E, Pandolfi PP, Puvion E, Freemont P, and de Thé H (2001). Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As₂O₃-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J. Exp. Med.*, Vol.193(12): 1361-1371

Lallemand-Breitenbach V, Jeanne M, Benhenda S, Nasr R, Lei M, Peres L, Zhou J, Zhu J, Raught B, and de Thé (2008). Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat. Cell Biol.*, Vol.10(5): 547-555

Lamond AI and Spector DL (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Vol.4(8): 605-612

Lanctôt C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, and Cremer T (2007). Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nature Reviews Genetics*, Vol.8: 104-115

Lavau C, Marchio A, Fagioli M, Jansen J, Falini B, Lebon P, Grosveld F, Pandolfi PP, Pelicci PG, and Dejean A (1995). The acute promyelocytic leukaemia-associated *PML* gene is induced by interferon. *Oncogene*, Vol.11(5): 871-876

- LeibundGut-Landmann S, Waldburger J-M, Krawczyk M, Otten LA, Suter T, Fontana A, Acha-Orbea H, and Reith W (2004).** Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *Eur. J. Immunol.*, Vol.34: 1513-1525
- Lenser T, Weisshart K, Ulbricht T, Karolin K, and Hemmerich P (2010).** Fluorescence fluctuation microscopy to reveal 3D-architecture and function in the cell nucleus. *Methods in Cell Biology*, submitted
- Leonhardt H, Sportbert A, and Cardoso MC (2000).** Targeting regulatory factors to intranuclear replication sites. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, Vol.10(2): 127-133
- Leppard KN, Emmott E, Cortese MS, and Rich T (2009).** Adenovirus type 5 E4 Orf3 protein targets promyelocytic leukaemia (PML) protein nuclear domains for disruption via a sequence in PML isoform II that is predicted as a protein interaction site by bioinformatics analysis. *J. Gen. Virol.*, Vol.90(1): 95-104
- Lukas C, Bartek J, and Lukas J (2005).** Imaging of protein movement induced by chromosomal breakage: tiny 'local' lesions pose great 'global' challenges. *Chromosoma*, Vol.114(3): 146-154
- Majumder P, Gomez JA, Chadwick BP, and Boss JM (2008).** The insulator factor CTCF controls MHC class II gene expression and is required for the formation of long-distance chromatin interactions. *J. Exp. Med.*, Vol.205(4): 785-798
- Mach B, Steimle V, Martinez-Soria E, and Reith W (1996).** Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.*, Vol.14: 301-331
- Masternak K, Muhlethaler-Mottet A, Villard J, Zufferey M, Steimle V, and Reith W (2000).** CIITA is a transcriptional coactivator that is recruited to MHC class II promoters by multiple synergistic interactions with an enhanceosome complex. *Genes Dev.*, Vol.14(9): 1156-1166
- Matera AG, Izaguire-Sierra M, Praveen K, and Rajendra TK (2009).** Nuclear bodies: random aggregates of sticky proteins or crucibles of macromolecular assembly? *Developmental Cell*, Vol.17(5): 639-647
- Maul GG, Yu E, Ishov AM, and Epstein AL (1995).** Nuclear domain 10 (ND10) associated proteins are also present in nuclear bodies and redistribute to hundreds of nuclear sites after stress. *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol.59: 498-513
- Maul GG (1998).** Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *Bioessays*, Vol.20(8): 660-667
- Misteli T (2007).** Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell*, Vol.128: 787-800
- Möller A, Sirma H, Hofman TG, Rueffer S, Klimczak E, Dröge W, Will H, and Schmitz ML (2003).** PML is required for homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2)-mediated p53 phosphorylation and cell cycle arrest but is dispensable

for the formation of HIPK domains. *Cancer Research*, Vol.63: 4310-4314

Murphy KM, Travers P, and Walport M (2007). Immunobiology, editor: Janway J. Garland, Science Textbooks, *Taylor & Francis, Oxford, UK*

Müller WG, Rieder D, Kreth G, Cremer C, Trajanoski Z, and McNally JG (2004). Generic features of tertiary chromatin structure as detected in natural chromosomes. *Mol Cell Biol.*, Vol.24(21): 9359-9370

Nagarajan UM, Bushey A, and Boss JM (2002). Modulation of gene expression by the MHC class II transactivator. *J. Immunol.*, Vol.169(9): 5078-5088

Nedjic J, Aichinger M, Mizushima N, and Klein L (2009). Macroautophagy, endogenous MHC II loading and T cell selection: the benefits of breaking the rules. *Curr. Opin. Immunol.*, Vol.21(1): 92-97

Nunez E, Fu XD, and Rosenfeld MG (2009). Nuclear organization in the 3D space of the nucleus – cause or consequence? *Curr. Opin. Genet. Dev.*, Vol.19(5): 424-436

Osborne CS, Chakalova L, Brown KE, Carter D, Horton A, Debrand E, Goyenechea B, Mitchell JA, Lopes S, Reik W, and Fraser P (2004). Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nature Genetics*, Vol.36(10): 1065-1071

Pack C, Saito K, Tamura M, and Kinjo M (2006). Microenvironment and effect of energy depletion in the nucleus analyzed by mobility of multiple oligomeric EGFPs. *Biophys. J.*, Vol.91(10): 3921-3936

Pearson M, Carbone R, Sebastiani C, Cioce M, Fagioli M, Saito S, Higashimoto Y, Appella E, Minucci S, Pandolfi PP, and Pelicci PG (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature*, Vol.406: 207-210

Pearson M and Pelicci PG (2001). PML interaction with p53 and its role in apoptosis and replicative senescence. *Oncogene*, Vol.20: 7250-7256

Pederson T (2000). Half a century of “the nuclear matrix”. *Mol. Biol. Cell*, Vol.11(3): 799-805

Phair RD, Scaffidi P, Elbi C, Vecerová J, Dey A, Ozato K, Brown DT, Hager G, Bustin M, and Misteli T (2004). Global nature of dynamic protein-chromatin interactions in vivo: three dimensional genome scanning and dynamic interaction networks of chromatin proteins. *Mol. Cell Biol.*, Vol.24(14): 6393-6402

Raska I, Shaw PJ, and Dusan Cmarko (2006). Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol.18: 325-334

Reith W and Mach B (2001). The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression. *Annu. Rev. Immunol.*, Vol.19: 331-373

- Reith W, LeibundGut-Landmann S, and Waldburger J-M (2005).** Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nature Reviews (Immunology)*, Vol.5: 793-806
- Regad T and Chelbi-Alix MK (2001).** Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infection. *Oncogene*, Vol.20: 7274-7286
- Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S, Luzi L, Riganelli D, Zanaria E, Messali S, Cainarca S, Guffanti A, Minucci S, Pelicci PG, and Ballabio A (2001).** The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO Journal*, Vol.20(9): 2140-2151
- Richter K, Nessling M, and Lichter P (2008).** Macromolecular crowding and its potential impact on nuclear function. *Biochem. Biophys. Acta.*, Vol.1783(11): 2100-2107
- Rockel TD, Stuhlmann D, and von Mikecz A (2005).** Proteasomes degrade proteins in focal subdomains of the human cell nucleus. *J. Cell Sci.*, Vol.118(22): 5231-5242
- Roix JJ, McQueen PG, Munson PJ, Parada LA, and Misteli T (2003).** Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nature Genetics*, Vol.34(3): 287-291
- Saitoh N, Uchimura Y, Tachibana T, Sugahara S, Saitoh H, and Nakao Mitsuyoshi (2006).** In situ SUMOylation analysis reveals a modulatory role of RanBP2 in the nuclear rim and PML bodies. *Experimental Cell Research*, Vol.312: 1418-1430
- Salomoni P and Pandolfi PP (2002).** The role of PML in tumor suppression. *Cell*, Vol.108(2): 165-170
- Scharf A, Rockel TD, and von Mikecz A (2007).** Localization of proteasomes and proteasomal proteolysis in the mammalian interphase cell nucleus by systematic application of immunocytochemistry. *Histochem. Cell Biol.*, Vol.127(6): 1049-1055
- Schmiedeberg L, Weishart K, Diekmann S, Meyer zu Hoerste G, and Hemmerich P (2004).** High- and low-mobility populations of HP1 in heterochromatin of mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell*, Vol.15(6): 2819-2833
- Schnappauf F, Hake SB, Camacho-Carvajal MM, Bontron S, Lisowska-Grospierre B, and Steimle V (2003).** N-terminal destruction signals lead to rapid degradation of the major histocompatibility complex class II transactivator CIITA. *Eur. J. Immunol.*, Vol.33: 2337-2347
- Schul W, van Driel R, and de Jong L (1998).** Coiled bodies and U2 snRNA genes adjacent to coiled bodies are enriched in factors required for snRNA transcription. *Mol. Biol. Cell*, Vol.9(5): 1025-1036
- Sexton T, Schober H, Fraser P, and Gasser SM (2007).** Gene regulation through nuclear organization. *Nat. Struct. Mol Biol.*, Vol.14(11): 1049-1055

- Shen TH, Lin H-K, Scaglioni PP, Yung TM, and Pandolfi PP (2006).** The Mechanisms of PML-nuclear body formation. *Molecular Cell*, Vol.24: 331-339
- Shiels C, Islam SA, Vatcheva R, Sasieni P, Sternberg MJE, Freemont PS, Sheer D (2001).** PML bodies associate specifically with the MHC gene cluster in interphase nuclei. *Journal of Cell Science*, Vol.114: 3705-3716
- Smith KP, Carter KC, Johnson CV, and Lawrence JB (1995).** U2 and U1 snRNA gene loci associate with coiled bodies. *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol.59(4): 473-485
- Spector DL (2001).** Nuclear domains. *Journal of Cell Science*, Vol.114: 2891-2893
- Spilianakis C, Papamtheakis J, and Kretsovali A (2000).** Acetylation by PCAF enhances CIITA nuclear accumulation and transactivation of major histocompatibility complex class II genes. *Mol. Cell. Biol.*, Vol.20: 8489-8498
- Sprague BL, Pego RL, Stavreva DA, and McNally JG (2004).** Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys. J.*, Vol.86(6): 342-349
- Sprague BL, Müller F, Pego RL, Bungay PM, Stavreva DA, and McNally JG (2006).** Analysis of binding at a single spatially localized cluster of binding sites by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys. J.*, Vol.91(4): 1169-1191S
- Starr DA (2009).** A nuclear-envelope bridge positions nuclei and moves chromosomes. *Journal of Cell Science*, Vol.122(5): 577-586
- Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, Lisowska-Groszpiere B, Mach B (1994).** Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science*, Vol.265: 106-109
- Sternsdorf T, Grötzinger T, Jensen K, and Will H (1997).** Nuclear dots: actors on many stages. *Immunobiology*, Vol.198(1-3): 307-331
- Sternsdorf T, Jensen, K, and Will, H (1997).** Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *Journal of Cell Biology*, Vol.139(7): 1621-1634
- St-Germain JR, Chen J, and Li Q (2008).** Involvement of PML nuclear bodies in CBP degradation through the ubiquitin-proteasome pathway. *Epigenetics*, Vol.3(6): 342-349
- Sun Y, Durrin LK, and Krontiris TG (2003).** Specific interaction of PML bodies with the TP53 locus in Jurkat interphase nuclei. *Genomics.*, Vol.82(2): 250-252
- Sutherland H and Bickmore WA (2009).** Transcription factories: gene expression in unions? *Nature Reviews Genetics*, Vol.10(7): 457-466
- Takahashi Y, Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, and de Thé H (2004).** PML nuclear

bodies and apoptosis. *Oncogene*, Vol.23: 2819-2824

Takizawa T, Meaburn KJ, and Misteli T (2008). The meaning of gene positioning. *Cell*, Vol.135: 9-13

Tatham MH, Geoffroy MC, Shen L, Plechanovova A, Hattersley N, Jaffray EG, Palvimo JJ, and Hay RT (2008). RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat. Cell Biol.*, Vol.10(5): 538-546

Tavalai N, Papior P, Rechter S, Leis M, and Stamminger T (2006). Evidence for a role of the cellular ND10 Protein PML in mediating intrinsic immunity against human Cytomegalovirus infections. *Journal of Virology*, Vol.80(16): 8006-8018

Tavalai N and Stamminger T (2008). New insights into the role of the subnuclear structure ND10 for viral infection. *Biochim. Biophys. Acta.*, Vol.1783(11): 2207-2221

Terris B, Baldin V, Dubois, S, Degott C, Flejou J-F, Hénin D, and Dejean A (1995). PML nuclear bodies are general targets for inflammation and cell proliferation. *Cancer Research*, Vol.55: 1590-1597

Ting JP and Trowsdale J (2002). Genetic control of MHC class II expression. *Cell*, Vol.109: S21-33

The MHC sequencing consortium (1999). Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*, Vol.401: 921-923

Umetsu DT, Katzen D, Jabara HH, and Geha RS (1986). Antigen presentation by human dermal fibroblasts: activation of resting T lymphocytes. *J. Immunol.*, Vol.136: 440-445

Vallian S, Gäken Ja, Trayner ID, Gingold EB, Kouzarides T, Chang KS, and Farzaneh F (1997). Transcriptional repression by the promyelocytic leukemia protein, PML. *Exp. Cell Res.*, Vol.237(2): 371-382

van Damme E, Laukens K, Dang TH, van Ostade X (2010). A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics. *Int. J. Biol. Sci.*, Vol.6(1): 51-67

Volpi EV, Chevret E, Jones T, Vatcheva R, Williamson J, Beck S, Campbell RD, Goldsworthy M, Powis SH, Ragoussis J, Trowsdale J, and Sheer D (2000). Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *Journal of Cell Science*, Vol.113: 1565-1576

von Mikecz A, Zhang S, Montminy M, Tan EM, and Hemmerich P (2000). CREB-binding protein (CBP)/p300 and RNA polymerase II colocalize in transcriptionally active domains in the nucleus. *Journal of Cell Biology*, Vol.150(1): 265-273

von Mikecz A and Hemmerich P (2005). Subnuclear Pathology. in: Visions of the

Cell Nucleus, editors: Stephan Diekmann and Peter Hemmerich, *American Scientific Publishers, CA, USA*

- Wang J, Shiels C, Sasieni P, Wu PJ, Islam SA, Freemont PS, and Sheer D (2004).** Promyelocytic leukaemia nuclear bodies associate with transcriptionally active genomic regions. *Journal of Cell Biology*, Vol.164(4): 515-526
- Weidtkamp-Peters S, Lenser T, Negorev D, Gerstner N, Hofmann TG, Schwanitz G, Hoischen C, Maul G, Dittrich P, and Hemmerich P (2008).** Dynamics of component exchange at PML nuclear bodies. *Journal of Cell Science*, Vol.121: 2731-2743
- Wiesmeijer K, Molenaar C, Bekeer IMLA, Tanke HJ, and Dirks RW (2002).** Mobile foci of Sp100 do not contain PML: PML bodies are immobile but PML and Sp100 proteins are not. *Journal of Structural Biology*, Vol.140: 180-188
- Wójcik C and DeMartino GN (2003).** Intracellular localization of proteasomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Vol.35(5): 579-589
- Wu X, Kong X, Luchsinger L, Smith BD, and Xu Y (2009).** Regulating the activity of class II transactivator by posttranslational modifications: exploring the possibilities. *Molecular and Cellular Biology*, Vol.29(21): 5639-5644
- Xie SQ and Pombo A (2006).** Distribution of different phosphorylated forms of RNA polymerase II in relation to Cajal and PML bodies in human cells: an ultrastructural study. *Histochem. Cell Biol.*, Vol.125(1-2): 21-31
- Xing Y, Johnson CV, Moen PT Jr., McNeil JA, and Lawrence JB (1995).** Nonrandom gene organization: structural arrangements of specific premRNA transcription and splicing with SC-35 domains. *Journal of Cell Biology*, Vol.131: 1635-1647
- Xu ZX, Timanova-Atanasova A, Zhao RX, and Chang KS (2003).** PML colocalizes with and stabilizes the DNA damage response protein TopBP1. *Mol. Cell Biol.*, Vol.23(12): 4247-4256
- Yasmineh WG and Yunis JJ (1974).** Isolation of mammalian heterochromatin and euchromatin. *Methods Cell Biol.*, Vol.8: 151-177
- Zhao R, Bodnar MS, Spector DL (2009).** Nuclear neighbourhoods and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, Vol.19(2): 172-179
- Zhong S, Müller S, Ronchetti S, Freemont PS, Dejean A, and Pandolfi PP (2000).** Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood*, Vol.95: 2748-2752
- Zhong S, Salomini P, and Pandolfi PP (2000).** The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nature Cell Biology*, Vol.2: E85-E90

6 Abkürzungsverzeichnis

4xLP	SDS-Ladepuffer
6xLDS	<i>loading dye solution</i>
α	anti / Alpha
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	<i>antigen-presenting cell</i>
APL	Akute Promyelozytische Leukämie
APS	Ammoniumperoxodisulfat (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈
AS	Aminosäure
ATCC	<i>american tissue culture collection</i>
BLM	<i>Bloom syndrome</i>
BLS	<i>bare lymphocyte syndrome</i>
bp	Basenpaar
BP	Bandpass
bzw.	beziehungsweise
CIITA	MHC Klasse II-Transaktivator
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CB	<i>cajal body</i>
CBP	CREB-bindendes Protein
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CLIP	<i>class II-associated invariant chain peptide</i>
CREB	<i>cAMP response element</i> -bindendes Protein
CT	Chromosomenterritorium
CTCF	CCCTC-bindender Faktor
Cy3	Indocarbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
Daxx	<i>death domain-associated protein 6</i>
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DIC	Differentieller Interphasenkontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
FBS	fötales Rinderserum
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>

γ	Gamma
GFP	grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
h	<i>hora</i>
HAT	Histonazetyltransferase
HCMV	humanes Cytomegalievirus
HDAC	Histondeazetylase
HEp-2	humane Epithelzelllinie
HIPK2	<i>homeodomain interacting protein kinase</i>
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HLA-Dx	Gen, Protein oder Molekül der MHC Klasse II
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
ICP	<i>infected cell protein</i>
IE	<i>immediate early</i>
IFN γ	Interferon Gamma
Ii	Invariante Kette
IIF	indirekte Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
JAK	Janus Kinase
K	Kontrolle
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
LMP	<i>low molecular mass protein</i>
LP	Langpass
Lsg.	Lösung
LSM	<i>laser scanning microscopy</i>
mESC	murine embryonale Stammzellen
MHC-II	<i>major histocompatibility complex class II</i>
min	Minute
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NB	<i>nuclear body</i>
ND10	<i>nuclear domain 10</i>
NFY	Nukleärer Transkriptionsfaktor
NLS	Kernlokalisationssequenz
p53	Tumorsupressorprotein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasenkettenreaktion
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PML	Promyelozytische Leukämie (Protein)

PML/RAR α	PML-RAR α -Fusionsprotein
Pol II	RNA-Polymerase II
prim.	primär
PTM	posttranslationale Modifizierung
RAR α	Retinsäurerezeptor Alpha
RFI	relative Fluoreszenzintensität
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RFX	Regulatorfaktor X
RFXap	RFX-assoziiertes Protein
RICS	<i>raster image correlation spectroscopy</i>
RING	<i>really interesting new gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
SATB1	<i>special AT-rich sequence binding protein</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> (NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄)
sek.	sekundär
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering</i>
Sp100	<i>speckled</i> 100-kd
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
STAT1	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N,N,-Tetramethylethylendiamin
TRIM	<i>tripartite motif</i>
U	<i>unit</i>
u. a.	unter anderem
WB	<i>Westernblot</i>
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet zu haben.

Jena, den 31.03.2010

Lebenslauf

Name	Tobias Ulbricht
Geboren am	20.03.1990 in Saalfeld/Thüringen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Hochschulausbildung

seit 11/2005 Promotion am Leibniz Institut für Altersforschung, Fritz-Lipmann-Institut e.V., in der Arbeitsgruppe Molekularbiologie

09/2005 Studium der Biochemie an der Friedrich-Schiller-Universität

Zivildienst

08/1998-08/1999 Zivildienst im Kreiskrankenhaus Bernburg (Sachsen-Anhalt)

Schulbildung

06/1998 Abitur am Gymnasium-Carolinum in Bernburg (Sachsen-Anhalt)

Veröffentlichungen

Ulbricht T, Horch A, Tavalai N, von Mikecz A, Xie S, Steimle V, Schmitt E, Stamminger T, Hemmerich P. PML acts as a co-activator of Class II transactivator-dependent MHC class II gene expression." *Manuskript in Vorbereitung*

Lenser T, Weissbart K, Ulbricht T, Karolin K, Hemmerich P. Fluorescence fluctuation microscopy to reveal 3D-architecture and function in the cell nucleus." *Manuskript eingereicht*

Hellwig D, Hoischen C, Ulbricht T, Diekmann S. Acceptor-photobleaching FRET analysis of core kinetochore and NAC proteins in living human cells." *Eur Biophys J*, 2009;38(6):81-9

Murzik U, Hemmerich P, Weidtkamp-Peters S, Ulbricht T, Bussen W, Hentschel J, von Egging F, Melle C. Rad54B targeting to DNA double-strand break repair sites requires complex formation with S100A11." *Mol Biol Cell*, 2008, 19:296-295

Danksagung

Als Erstes möchte ich mich an dieser Stelle bei Prof. Stephan Diekmann und PD Dr. Peter Hemmerich für die Überlassung dieser interessanten und vielschichtigen Forschungsarbeit bedanken. Dabei gilt mein besonderer Dank Peter für die hervorragende Betreuung und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Den Mitgliedern meines PhD-Komitees Prof. Falk Weih und Dr. Christoph Kaether danke ich für ihre Unterstützung und konstruktiven Hinweise.

Der gesamten Molekularbiologie-Abteilung, den jetzigen und ehemaligen Mitgliedern, möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die offenen Ohren und die Hilfsbereitschaft, die mir entgegengebracht wurde, herzlich danken.

Auch den übrigen Mitarbeitern des FLI, den Doktoranden, den Diplomanden, den wissenschaftlichen Mitarbeitern, den Gruppenleitern, der Werkstatt und der Verwaltung danke ich für ihre kompetente und auf Anfrage meist tatkräftige Unterstützung.

Und schließlich ein besonderes Dankeschön an meine Mutter und meinen Bruder für ihren steten Zuspruch & Beistand.