

Max-Planck-Institut für Biochemie
Selbständige Nachwuchsgruppe Protein-Modifikation und Kerntransport

Struktur-/Funktionsanalyse und Ubiquitinierung des Ubiquitin-ähnlichen Modifizierers SUMO1

Marion Petra Schergaut

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Wolfgang Baumeister
2. Univ.-Prof. Dr. Alfons Gierl

Die Dissertation wurde am 02.12.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 02.03.2004 angenommen.

Meinen Eltern,
meiner „Frau Annette“ und meinem „Greschoor“

Hinter jeder Ecke lauern ein paar Richtungen.

(Stanislaw Jerzy Lec)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	SUMO1 – ein Protein als post-translationale Modifikation.....	3
2.2	Ubiquitinierung.....	5
2.2.1	Konjugierende Enzymkaskade und Dekonjugation.....	5
2.2.2	Ubiquitinierungssignal und Ubiquitin-Bindungsstelle.....	7
2.2.3	Physiologische Funktionen der Ubiquitinierung.....	8
2.3	SUMOylierung.....	9
2.3.1	SUMO1 inmitten Ubiquitin-ähnlicher Proteine und Ubiquitin.....	9
2.3.2	SUMO's konjugierende Enzymkaskade und Dekonjugation.....	12
2.3.3	SUMOylierungssignal und SUMO-Bindungsstelle.....	20
2.3.4	Funktionen der SUMOylierung.....	21
2.4	Aufgabenstellung.....	23
3	Material und Methoden	24
3.1	Material.....	24
3.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	24
3.1.1.1	Radiochemikalien.....	24
3.1.1.2	Materialien zur Filtration und Dialyse.....	25
3.1.1.3	Chromatographische Matrices, fertig gepackte Chromatographiesäulen.....	25
3.1.1.4	Molekulargewichts- und Längenstandards.....	25
3.1.1.5	Komplexe Reagenzien und Reaktions-Sets („Kits“.....	26
3.1.1.6	Verbrauchsmaterial.....	27
3.1.2	Puffer und Lösungen.....	27
3.1.3	Medien und Medienzusätze für die Zellkultur.....	30
3.1.3.1	Medienbestandteile und Medienzusätze.....	30
3.1.3.2	Medien-Zusammensetzung.....	30
3.1.4	Medien für die Bakterienkultur.....	31
3.1.5	Antikörper.....	31
3.1.6	Rekombinante Proteine.....	32
3.1.7	DNS-Oligonukleotide.....	33
3.1.8	Plasmide.....	36
3.1.9	Bakterienstämme.....	37
3.1.10	Eukaryontische Zell-Linien.....	37

3.2	Molekularbiologische Methoden	38
3.2.1	Isolierung von Plasmid-DNS	38
3.2.2	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	38
3.2.3	Hydrolytische Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen	39
3.2.4	Dephosphorylierung von DNS-Enden	39
3.2.5	Ligation von DNS-Fragmenten	40
3.2.6	Agarose-Gel-Elektrophorese	40
3.2.7	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gelen	41
3.2.8	Gerichtete <i>in vitro</i> Mutagenese	41
3.2.9	Nichtradioaktive DNS-Sequenzierung	42
3.2.10	Herstellung chemisch-kompetenter Bakterienzellen	43
3.2.11	Transformation chemisch-kompetenter Bakterienzellen	43
3.2.12	Isolierung der Gesamt-RNS aus Gewebekulturzellen	44
3.2.13	Northern-Blot: RNS-Transfer auf eine Nylon-Membran	44
3.2.14	Herstellung [³² P]-markierter cDNS-Sonden für die Northern-Blot-Analyse	45
3.2.15	Spezifischer Nachweis membrangebundener RNS mit [³² P]-cDNS-Sonden	46
3.3	Zellbiologische Methoden	47
3.3.1	Kultivierung von Gewebekulturzellen	47
3.3.2	Einfrieren und Auftauen von Gewebekulturzellen	47
3.3.3	Transiente Transfektion von Säugerzellen	48
3.3.4	Behandlung von Säugerzellen mit Proteasom-Inhibitoren	49
3.4	Biochemische Methoden	51
3.4.1	Standard-Methoden	51
3.4.1.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	51
3.4.1.2	Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)	51
3.4.1.3	Coomassie-Färbung von Protein-Gelen	51
3.4.2	Expression rekombinanter Proteine in Bakterien	52
3.4.3	Aufreinigung des rekombinanten SUMO	52
3.4.4	Aufreinigung des rekombinanten RanBP2ΔFG (AS 2553-2838)	53
3.4.5	RanGAP1-Modifikation mit SUMO1 <i>in vitro</i>	53
3.4.6	DeSUMOylierung von RanGAP1*SUMO1 <i>in vitro</i>	54
3.4.7	Interaktion von RanGAP1*SUMO1 mit rekombinantem RanBP2ΔFG <i>in vitro</i>	55
	Demodifikation mit Ulp1 <i>in vitro</i>	56
3.4.8	Immunologische und immunbiochemische Methoden	56
3.4.8.1	Immunoblot-Analyse: Proteintransfer auf Membranen (Western-Blot) und Inkubation mit spezifischen Antikörpern	56
3.4.8.2	Herstellung von Antiseren und Affinitätsaufreinigung von Antikörpern	58
3.4.8.3	Immunozytologie und Immunfluoreszenz-Mikroskopie (IF)	59
3.4.9	Präparation von Gesamt-Zell-Lysat	60
3.4.10	<i>In vitro</i> DeSUMOylierung Proteasom-Inhibitor-behandelter 293T-Zellen	60
3.4.11	Nachweis der Ubiquitinierung von SUMO <i>in vivo</i>	61
3.4.11.1	Ulp1-Behandlung der an Ni-NTA-Agarose gebundenen His-Ubiquitin-Proteine <i>in vitro</i>	62

3.4.12	<i>In vitro</i> SUMOylierung von RanGAP1 als Konkurrenz von SUMO1-Wildtyp mit SUMO1-Mutanten in der FRET-Analyse.....	63
4	Ergebnisse	65
4.1	Herstellung von Reagenzien.....	65
4.1.1	Expression und Reinigung nicht-markierter SUMO1-Proteine.....	65
4.1.2	Herstellung und Charakterisierung des polyklonalen SUMO1-spezifischen Antikörpers.....	67
4.1.3	Expression und Reinigung von RanBP2 Δ FG.....	69
4.2	Biochemische und zellbiologische Analyse von N- und C-terminalen SUMO1-Mutanten.....	70
4.2.1	Etablierung von Mutanten für bakterielle und zelluläre Expression.....	70
4.2.2	<i>In vitro</i> SUMOylierung.....	71
	<u><i>In vitro</i> SUMOylierung von RanGAP1</u>	72
	<u><i>In vitro</i> SUMOylierung mit HeLa-Zell-Lysat (Substrate) und endogenen E3-Ligasen</u>	73
	<u><i>In vitro</i> SUMOylierung von RanGAP1 als Konkurrenz von SUMO1-Wildtyp mit SUMO1-Mutanten in der FRET-Analyse</u>	74
4.2.3	<i>In vitro</i> DeSUMOylierung.....	78
	<u><i>In vitro</i> DeSUMOylierung von RanGAP1*SUMO1</u>	78
	<u><i>In vitro</i> DeSUMOylierung mit HeLa-Zell-Lysat als Substratquelle</u>	79
4.2.4	RanGAP1*SUMO1-Interaktion mit RanBP2 Δ FG.....	80
	<u><i>In vitro</i> DeSUMOylierung von RanGAP1*SUMO1 im Komplex mit RanBP2ΔFG</u>	82
	<u><i>In vivo</i> Lokalisation von RanGAP1*SUMO1</u>	83
4.2.5	<i>In vivo</i> Lokalisation der SUMO1-Mutanten im Vergleich zu SUMO1-Wildtyp.....	84
	<u><i>In vivo</i> Lokalisation der N-terminalen Deletionsmutanten</u>	84
	<u><i>In vivo</i> Lokalisation der Mutante SUMO1-T-ubi</u>	85
4.2.6	Analyse der SUMO1-Modifikationsmuster <i>in vivo</i>	86
4.3	Zellbiologische Analyse einer großen Anzahl weiterer SUMO1-Mutanten.....	89
4.3.1	Die diversen Aspekte der SUMO1-Mutagenese.....	89
4.3.2	Analyse der SUMO1-Modifikationsmuster <i>in vivo</i>	91
4.3.3	Analyse der SUMO1-Lokalisation <i>in vivo</i>	97
4.4	SUMO1-Ubiquitinierung.....	99
4.4.1	Wird freies SUMO1 auf Protein-Ebene reguliert?.....	99
	<u>RNS- und Protein-Menge nicht-konjugierbarer SUMO1-Konstrukte</u>	99
	<u>Verändertes endogenes SUMOylierungsmuster unter Proteasom-Inhibitor-Einfluss</u>	100
	<u>SUMO1 ist kein Substrat der proteasomalen Degradation</u>	103
	<u>Bestimmung der Halbwertszeit von SUMO1</u>	104

4.4.2	Interferieren SUMOylierung und Ubiquitinierung?.....	106
	<u>SUMO1 wird ubiquitiniert</u>	106
	<u>Konjugiertes SUMO1 trägt Poly-Ubiquitin-Ketten</u>	107
4.4.3	Mechanismus der SUMO1-Ubiquitinierung.....	113
	<u>Kann freies SUMO1 poly-ubiquitiniert werden?</u>	114
	<u>Kann freies Ubiquitin SUMOyliert werden?</u>	115
	<u>Ist die N-terminale Sequenz von SUMO1 in dessen Ubiquitinierung involviert?</u>	116
5	Diskussion	117
5.1	Struktur-/Funktionsanalyse von SUMO1.....	117
5.1.1	SUMO1-Mutagenese.....	117
	<u>Drastisch reduzierte SUMOylierung der C-terminalen Tripel-Mutante T-ubi</u>	118
	<u>SUMO1-Mutanten der nicht-kovalenten Bindungsstelle von Ubc9</u>	120
	<u>Spezifische RanGAP1-SUMOylierung der Mutanten F36L/K39E und K39E/K46A</u>	121
5.1.2	Funktionsanalyse des SUMO1-N-Terminus.....	122
	<u>SUMOylierung verläuft N-Terminus-unabhängig</u>	123
	<u>Effekte der N-terminalen Deletionsmutante SUMO1ΔN10</u>	124
	<u>Besitzt die unstrukturierte Sequenz des SUMO1-N-Terminus die Funktion einer regulatorischen Domäne?</u>	125
5.2	Die Ubiquitinierung von SUMO1.....	126
5.2.1	SUMOylierung und Ubiquitinierung modifizieren manche Substrate „kooperativ“.....	126
5.2.2	Potentielle Substrate der SUMO1-Ubiquitinierung.....	127
5.2.3	Kettenvarianten der SUMO1-Ubiquitinierung.....	129
5.2.4	Optionen der Ubiquitinierungsstelle in SUMO1.....	130
5.2.5	Möglichkeiten des Mechanismus der SUMO1-Ubiquitinierung.....	131
5.2.6	Erkennung von SUMO1 als Substrat der Ubiquitinierung.....	133
5.2.7	Post-translationale Modifikation Ubiquitin-ähnlicher Proteine?.....	134
6	Literatur	136

Abkürzungen

A	Ampere
Ac	Acetat
Abb.	Abbildung
AP	Aprotinin
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	engl.: <i>bovine serum albumin</i>
cDNS	komplementär-DNS
CIAP	engl.: <i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
Ci	Curie
cpm	engl.: <i>counts per minute</i>
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
Da	Dalton
ddNTP	2', 3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	engl.: <i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	engl.: <i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPLC	engl.: <i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung (im Kontext von Zentrifugation)
g	Gramm
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IF	Immunfluoreszenz-Mikroskopie
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalaktopyranosid
k	Kilo
KAc	Kaliumacetat
l	Liter
LP	Leupeptin/Pepstatin
m	Milli
M	Molar (mol/l)
min	Minute(n)
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
μ	Micro
n	Nano
NC	Nitrocellulose

NCS	engl.: <i>newborn calf serum</i>
OD	optische Dichte
ORF	engl.: <i>open reading frame</i>
p	Piko
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	p-Isooctylphenylpolyoxyethylen
Tween-20	Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaureat
U	engl.: <i>unit</i> (im Zusammenhang mit Enzymaktivität)
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	engl.: <i>volume per volume</i>
WB	Western-Blot
w/v	engl.: <i>weight per volume</i>

Einbuchstabencode für Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

Abkürzungen von Genen und ihren Produkten

CFP	engl.: <i>cyan fluorescent protein</i>
GFP	engl.: <i>green fluorescent protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin

1 Zusammenfassung

SUMO1 (small ubiquitin-related modifier 1) gehört der Gruppe Ubiquitin-verwandter Proteine an, die wie Ubiquitin post-translational mit zahlreichen zellulären Proteinen kovalent verknüpft werden können. Der Mechanismus der SUMOylierung verläuft zur Ubiquitinierung analog. Die ATP-abhängige Modifikation wird von den SUMO-spezifischen Enzymen Aos1/Uba2 (aktivierendes E1-Enzym), Ubc9 (konjugierendes E2-Enzym) und verschiedenen E3-Ligasen katalysiert. Die Aktivität spezifischer SUMO-Proteasen macht die SUMOylierung zu einem reversiblen Prozess. Deren Substrat-abhängige Funktion basiert vor allem auf der Regulation von Protein-Interaktionen. Trotz der geringen Identität (18%) zu Ubiquitin besitzt SUMO1 - wie alle Ubiquitin-ähnlichen Proteine - das Ubiquitin-Faltungsmotiv ($\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$). Unterschiede zu Ubiquitin sind die Oberflächenladung und die N-terminale Sequenz. Diese unstrukturierte kurze Domäne in SUMO1 ist das Strukturmerkmal der SUMO-Protein-Familie.

Primäre Fragestellung dieser Arbeit war die Funktion des SUMO1-N-Terminus. Biochemische und zellbiologische Studien mit N-terminalen Deletionsmutanten haben gezeigt, dass der N-Terminus weder an der Modifikation noch an der Demodifikation essentiell beteiligt ist. Auch in der SUMO1-abhängigen Interaktion des SUMO1-Substrats RanGAP1 *in vitro* sowie in der Lokalisation von SUMO1 und SUMO1-Konjugaten *in vivo* konnte kein Einfluss der N-terminalen Sequenz festgestellt werden. Dies führt zu der Vermutung, dass die Funktion dieser evolutionär konservierten Struktur nicht in den Basis-Funktionen der SUMOylierung, sondern vielmehr in regulatorischen Mechanismen zu suchen ist.

Schwerpunkt einer parallel durchgeführten systematischen Mutationsanalyse waren Oberflächen-exponierte Aminosäure-Reste in SUMO1. Die verschiedenen Mutanten wurden als HA-Epitop-markierte SUMO1-Konstrukte hergestellt, und mittels transienter Transfektion auf ihre Konjugationsfähigkeit getestet. Defizite in der Konjugation konnten für mehrere Mutanten festgestellt werden. Hervorzuheben ist eine Tripel-Mutation im C-Terminus, deren stark reduzierte Konjugationseigenschaft zudem biochemisch

bestätigt werden konnte, sowie zwei Doppel-Mutanten, die möglicherweise für die Interaktion mit E3-Ligasen defizient sind.

Aus den Befunden der beiden Schwerpunkte dieser Arbeit erschließt sich die interessante Frage eines Zusammenhangs zwischen Ubiquitinierung und SUMO1. Mit den im letzten Teil dieser Arbeit beschriebenen Experimenten konnte eine Poly-Ubiquitinierung von freiem SUMO1 und konjugiertem SUMO1 nachgewiesen werden. Interessanterweise führt diese nicht zu proteasomaler Degradation von SUMO1. Daraus lässt sich ein Modell erstellen, in welchem SUMOylierung eines spezifischen Proteins zu anschließender Poly-Ubiquitinierung und Degradation des Proteins führen könnte. SUMO1 wird in diesem Modell - wie für Ubiquitin bekannt - vom Substrat abgespalten und der Zelle für erneute Modifikation zur Verfügung gestellt. Dieser Befund steht in starkem Gegensatz zu der bisher postulierten Funktion von SUMO1 als Antagonist der Ubiquitin-abhängigen Degradation. Zu klären bleibt, ob beide Funktionen für bestimmte Substrate unabhängig voneinander genutzt werden und wie die Unterscheidung zwischen beiden Mechanismen reguliert wird.

2 Einleitung

2.1 SUMO1 - ein Protein als post-translationale Modifikation

Eine große Zahl eukaryontischer Proteine wird post-translational modifiziert. Die Modifikationen sind vielfältig und verändern die Proteine in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften, ihrer Konformation und Stabilität. Durch diese Veränderungen werden die Proteine in ihrer Aktivität, Lokalisation oder Quantität reguliert (Tab. 2.1).

Tabelle 2.1: Auswahl häufiger post-translationaler Modifikationen.

post-translationale Modifikation	Funktionen
Acetylierung	Proteinstabilität, Schutz des N-Terminus, Protein-DNS-Interaktionen (Histone)
Acylierung (Fettsäure-Modifikation) Farnesyl, Myristoyl, usw.	zelluläre Lokalisation, zielgerichtete Signaltransduktion, Membran-Anheften, Protein-Protein-Interaktionen
Deaminierung	möglicher Regulator von Protein-Ligand- und Protein-Protein-Interaktionen
Disulfidbindung	intra- und intermolekulare Kreuzverbindungen, Proteinstabilität
Glykosylierung N- / O-verknüpft	ausgeschleuste Proteine, Zell-Zell-Erkennung, Signaltransduktion O-GlcNAc regulatorische Funktionen
GPI Anker	Glykosylphosphatidylinositol (GPI) Anker Membran-Anheften von Enzymen und Rezeptoren, hauptsächlich an die äußere Oberfläche der Plasma-Membran
Hydroxy-Prolin	Proteinstabilität und Protein-Ligand-Interaktion
Methylierung	Regulation der Gen-Expression
Nitrierung des Tyrosins	Oxidative Schädigung während einer Entzündung
Phosphorylierung pTyr, pSer, pThr	Enzymaktivität, molekulare Interaktion, Signaltransduktion
Pyro-Glutamin	Proteinstabilität, Blockierung des N-Terminus
Sulfatierung (sTyr)	Protein-Protein- und Rezeptor-Ligand-Interaktionen
Ubiquitinierung	Signal für Proteinabbau

Entnommen: (Mann und Jensen, 2003)

Im Gegensatz zu anderen post-translationalen Modifikationen handelt es sich bei der Ubiquitinierung um ein Protein als Modifikation (Ubiquitin, 9 kDa). Ubiquitin wird unter

Beteiligung einer Enzymkaskade über eine kovalente Isopeptidbindung mit dem Substrat verknüpft. Ein Protein bietet im Hinblick auf zelluläre Regulationsprozesse, insbesondere in höheren Organismen, gegenüber anderen Modifikationen den Vorteil einer größeren und differenzierteren Oberfläche für Interaktionen. Ubiquitin ist jedoch nicht das einzige Protein, welches als post-translationale Modifikation fungiert. Unter den sogenannten Ubiquitin-ähnlichen Proteinen, die Strukturhomologie zu Ubiquitin aufweisen, wurden einige Proteine entdeckt, die über einen ähnlichen Mechanismus kovalent an ihre Substrate gebunden werden. Dies sind beispielsweise Aut7, Nedd8/Rub1, ISG-15 und die SUMO-Proteine.

SUMO1 (*small ubiquitin-related modifier 1*) wurde als Modifikation des RanGAP1 (*Ran-GTPase-activating-protein 1*) identifiziert (Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1996). Die Proteinbezeichnung steht für dessen wesentliche Merkmale: 10 kDa Molekulargewicht („*small*“), Sequenz- und Strukturhomologie zu Ubiquitin („*ubiquitin-related*“) und die Funktion der post-translationalen Modifikation („*modifier*“). Resultierend aus zeitgleichen Entdeckungen dieses Proteins ist SUMO1 in der Literatur auch unter folgenden Bezeichnungen zu finden: GMP1 (*GAP-modifying protein 1*) (Matunis et al., 1996), PIC1 (*PML interacting protein 1*) (Boddy et al., 1996), Sentrin (Okura et al., 1996), Smt3c (Chen et al., 1998; Lapenta et al., 1997), hSmt3 (Mannen et al., 1996) und Ubl1 (*ubiquitin-like protein 1*) (Shen et al., 1996). SUMOylierung und DeSUMOylierung erfolgen mechanistisch analog zu Ubiquitinierung und Deubiquitinierung, doch überlappen deren Funktionen - soweit bekannt - nur teilweise. Klassischerweise wird der Ubiquitinierung die Rolle der Protein-Markierung für die proteasomale Degradation zugeschrieben (Hershko und Ciechanover, 1998a; Laney und Hochstrasser, 1999; Varshavsky, 1997). Eine vergleichbare Funktion wurde für die SUMOylierung bislang nicht nachgewiesen. Stattdessen reicht deren Funktionsspektrum von der Regulation auf Transkriptionsebene (Verger et al., 2003), über die DNS-Replikation und -Reparatur (Hoegge et al., 2002; Kawabe et al., 2000; Mao et al., 2000a; Mao et al., 2000b), die Chromosomen-Segregation (Bachant et al., 2002; Hari et al., 2001), über die Zell-Zyklus-Kontrolle (Sobko et al., 2002), bis zur Regulation des aktiven Proteintransports zwischen Zytoplasma und Zellkern (Mahajan et al., 1997; Mahajan et al., 1998; Matunis et al., 1996; Matunis et al., 1998; Saitoh et al., 1997;

Stade et al., 2002). Diese breite Spannweite lässt sich durchaus mit der Vielseitigkeit der mittlerweile für die Ubiquitinierung definierten Funktionen vergleichen. Daraus folgt, dass SUMO1, genau wie Ubiquitin, als Regulationsschalter intrazellulärer Vorgänge dienen kann.

2.2 Ubiquitinierung

2.2.1 Konjugierende Enzymkaskade und Dekonjugation

Ubiquitin wird als Fusionsprotein (Ubiquitin-Ubiquitin; ribosomales Protein-Ubiquitin) synthetisiert. Nach hydrolytischer Spaltung durch Ubiquitin-spezifische C-terminale Hydrolasen (*ubiquitin carboxy-terminal hydrolases*, UCH) liegt es als Protein mit 76 Aminosäuren (AS) vor, dessen C-Terminus mit zwei Glycin-Resten („GG-Motiv“) endet. Dieses GG-Motiv ist für die spätere Konjugation des Ubiquitins essentiell.

Die konjugierende Enzymkaskade setzt sich aus einem aktivierenden (E1-Enzym), einem konjugierenden (E2-Enzym) und einem verknüpfenden Schritt (E3-Enzym) zusammen (Abb. 2.1). Für den aktivierenden Schritt in der Ubiquitinierung ist als einziges E1-Enzym das in verschiedenen Organismen hochkonserviert vorliegende Uba1 bekannt (Haas und Rose, 1982; Haas et al., 1982). Uba1 katalysiert unter ATP-Hydrolyse zunächst die Bildung eines Ubiquitinadenylats. Im Anschluss daran wird, bei gleichzeitiger Freisetzung des AMP, das Ubiquitin auf die Thiolgruppe des konservierten Cystein-Rests im aktiven Zentrum des Uba1 übertragen. Dabei entsteht zwischen dem Cystein (Uba1) und G76 (Ubiquitin) eine energiereiche Thioesterbindung. Das so aktivierte Ubiquitin wird durch Transesterifizierung vom E1-Enzym auf eines der vielen E2-Enzyme der Ubiquitinierung (*ubiquitin conjugating enzyme*, UBC) übertragen (Hershko, 1983). Charakteristisches Merkmal der E2-Enzyme ist die Ubiquitin-konjugierende Domäne (UBC-Domäne), in der das aktive Zentrum mit dem Akzeptor-Cystein lokalisiert ist. Die E2-Enzyme bilden eine große, hochkonservierte Protein-

Familie (Hochstrasser, 1996; Matuschewski et al., 1996). In *S. cerevisiae* konnten 11 verschiedene E2-Enzyme identifiziert werden, die spezifisch an den zahlreichen Funktionen der Ubiquitinierung beteiligt sind (Pickart, 2001). Die E2-Enzyme übertragen das Ubiquitin direkt oder mit Hilfe einer Ubiquitin-E3-Ligase (E3-Enzym) auf ein Substrat. Die Konjugation endet mit der Ausbildung einer Isopeptidbindung zwischen dem G76 und der ϵ -Aminogruppe eines Lysins im Substrat (Weissman, 2001).

An der Regulation der Ubiquitinierung nimmt das E3-Enzym erheblichen Anteil. Die bislang bekannten Ubiquitin-E3-Ligasen gehören zu zwei Protein-Familien: den HECT-E3-Ligasen (*homologous to E6-AP carboxy terminus*, HECT) oder den RING-Finger-E3-Ligasen (*really interesting new gene*, RING). Die E3-Ligasen mit HECT-Domäne besitzen eine ca. 350 AS große Domäne mit konserviertem Cystein-Rest (Huibregtse et al., 1995), der mit Ubiquitin einen Thioester bildet, bevor das Ubiquitin mit dem Akzeptor-Lysin im Substrat verknüpft wird. Die E3-Ligasen mit RING-Finger-Struktur bilden keinen Thioester mit Ubiquitin, sind jedoch für die Interaktion zwischen Substrat und E2-Ubiquitin-Intermediat essentiell (Deshaies, 1999; Lorick et al., 1999). Die RING-Domäne umfasst ca. 70 AS mit mehreren Cystein- und Histidin-Resten, deren Abstand die Bindung von zwei Zink-Ionen ermöglicht und so zu einer charakteristischen globulären Konformation führt (Borden, 2000). Einige der RING-Finger-E3-Ligasen bestehen aus mehreren Untereinheiten. Beispiele sind der APC-Komplex (*anaphase-promoting-complex*, APC) und der SCF-Komplex (*Skp1-Cullin-E-box protein*, SCF) (Pickart, 2001).

Ein bereits ubiquitiniertes Protein kann an weiteren eigenen Lysin-Resten mono-ubiquitiniert oder über Lysin-Reste im Ubiquitin (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) poly-ubiquitiniert werden. Die regulierenden Signale, die zwischen Mono- und Poly-Ubiquitinierung unterscheiden, sind noch weitgehend unbekannt. Unter anderem werden Schutzmechanismen vermutet (Adapter-Proteine, Ubiquitin-Bindungsdomänen im modifizierten Protein), die das Mono-Ubiquitin vor weiterer Enzym-Interaktion schützen (Kang et al., 2003).

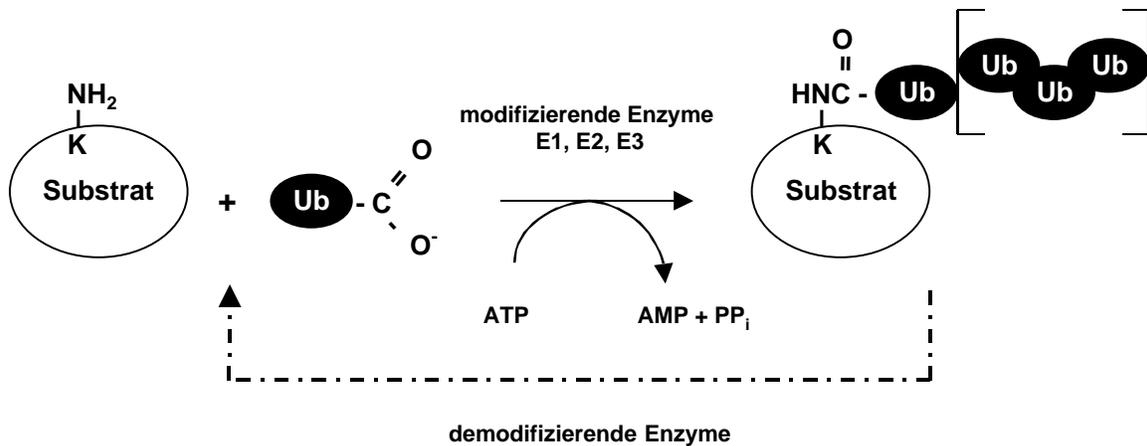


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Ubiquitinierung.

Ubiquitinierung führt zur Ausbildung einer Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen G76 des Ubiquitins und der ε-Aminogruppe eines Lysins im Substrat. Katalysiert wird die Modifikation von einem aktivierenden (**E1**), einem konjugierenden (**E2**) und einem verbindenden Enzym (**E3**), die Demodifikation von spezifischen Cystein-Proteasen (**demodifizierende Enzyme**).

(**Ub**: Mono-Ubiquitin; []: die Klammern stehen für eine variable Anzahl konjugierter Ubiquitin-Einheiten)

Die Demodifikation der mono- und poly-ubiquitinierten Proteine wird, wie die Ubiquitin-Prozessierung, von deubiquitinierenden Enzymen katalysiert. In der Hefe sind 19 Ubiquitin-Proteasen bekannt, in Säugerzellen wesentlich mehr. Diese werden in zwei Klassen spezifischer Cystein-Proteasen unterteilt. Die Klasse der C-terminalen Hydrolasen (*ubiquitin carboxy-terminal hydrolases*, UCH) prozessieren das als Fusionsprotein exprimierte Ubiquitin. Die Ubiquitin-spezifischen Proteasen (*ubiquitin-specific proteases*, UBP) spalten die Isopeptidbindungen der Poly-Ubiquitin-Ketten und ubiquitinierten Substrate (Wilkinson, 2000).

2.1.2 Ubiquitinierungssignal und Ubiquitin-Bindungsstelle

Voraussetzung für die Ubiquitinierung eines Proteins ist dessen Ubiquitinierungssignal. Damit eine Ubiquitin-E3-Ligase spezifisch binden kann, muss das auf einem Sequenz- und/oder Strukturmotiv basierende Signal im Protein zugänglich vorliegen. Daraus folgt, dass die E3-Ligasen in der Ubiquitinierung die Träger der Substrat-Spezifität sind

(Laney und Hochstrasser, 1999; Pickart, 2001). Häufig ist das Ubiquitinierungssignal eine Abfolge weniger Aminosäuren in der Primärsequenz des Substrats (Pickart, 2001). Eines der ersten Ubiquitinierungssignale wurde in mitotischen Cyclinen und Substraten des APC-Komplexes entdeckt und als „*destruction box*“ bezeichnet (Deshaies, 1999; Glotzer et al., 1991; Koepp et al., 1999; Page und Hieter, 1999). In Bindungsstudien wurde bewiesen, dass sowohl die Aminosäuren der Primär-Sequenz (Glotzer et al., 1991; Yamano et al., 1998) als auch die Konformation der Signalsequenz die Affinität zwischen Substrat und E3-Ligase beeinflusst (Laney und Hochstrasser, 1999). Der Konformationseinfluss konnte anhand der Strukturdaten verschiedener Ubiquitinierungssignale bestätigt werden („*destruction box*“ (Jiang und Basavappa, 1999; Yamanaka et al., 2000), LLVRGRTLTVV (Lawson et al., 1999), hydrophobe Oberfläche (Johnson et al., 1998; Laney und Hochstrasser, 1999)). Ubiquitinierungssignale, die eine Veränderung der Konformation des Proteins herbeiführen sind z.B. die Phosphorylierung, die Bindung eines Adapter-Proteins oder die Veränderungen durch Fragmentierung, Oxidation oder Alterung (Hershko und Ciechanover, 1998b; Laney und Hochstrasser, 1999; Strous und Govers, 1999).

Im Gegensatz zu den definierten Sequenz- und Strukturmotiven des Ubiquitinierungssignals scheint für die Ubiquitin-Bindungsstelle (Akzeptor-Lysin) normalerweise keine Konsensus-Sequenz zu existieren. Studien mit Lysin-zu-Arginin-Mutanten bereits bekannter Akzeptor-Lysine zeigten bei verschiedenen Substraten bzgl. ihrer Ubiquitinierung keinen Unterschied zum Wildtyp-Verhalten (Pickart, 2001).

2.1.3 Physiologische Funktionen der Ubiquitinierung

Die Markierung von Proteinen zur Degradation durch das 26S-Proteasom wird als klassische Funktion der Ubiquitinierung betrachtet (Chau et al., 1989; Hershko und Ciechanover, 1998b; Hochstrasser, 1996). Das erforderliche Erkennungsmerkmal ist die Poly-Ubiquitinierung mit K48-verknüpften Ubiquitin-Untereinheiten. Der hochspezifisch regulierte Ubiquitinierungsmechanismus ermöglicht die Übersetzung diverser

Degradationssignale (Ubiquitinierungssignale) unterschiedlichster Substrate in ein einziges sekundäres Signal - die Poly-Ubiquitin-Kette. Regulatorische Funktionen der Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Degradation sind z.B. die Progression des Zell-Zyklus (Koepp et al., 1999), die Induktion der inflammatorischen Antwort (Ghosh et al., 1998) oder die Antigen-Präsentation (Rock und Goldberg, 1999).

Neben dem sekundären Signal der K48-verknüpften Poly-Ubiquitin-Ketten sind auch K63-Verknüpfungen bekannt. Diese Protein-Markierung ist in nicht-proteolytischen Prozessen involviert: DNS-Reparatur (Hofmann und Pickart, 1999; Spence et al., 1995), Funktion der Ribosomen (Spence et al., 2000), Vererbung mitochondrialer DNS (Fisk und Yaffe, 1999), Stress-Antwort (Arnason und Ellison, 1994) Endozytose (Galan und Haguenaer-Tsapis, 1997).

Obwohl in den Anfängen der Ubiquitin-Forschung bereits die Mono-Ubiquitinierung der Substrate H2A und H2B beschrieben wurde, sind deren Funktionen erst in den letzten Jahren entdeckt worden. Mono-ubiquitinierte Proteine sind entweder an nicht-proteolytischen Regulationsmechanismen (Protein-Sortierung; intranukleärer Transport; Gen-Expression; Prozessierung) beteiligt oder werden der Endozytose mit anschließender Proteolyse (Hefe: in der Vakuole, Eukaryont: im Lysosom) zugeführt (Hicke, 1999).

2.3 SUMOylierung

2.3.1 SUMO1 inmitten Ubiquitin-ähnlicher Proteine und Ubiquitin

Die Ubiquitin-ähnlichen Proteine, deren meisten Vertreter erst in den letzten zehn Jahren identifiziert wurden, werden in zwei Klassen unterteilt: Proteine mit Ubiquitin-Domäne (*ubiquitin-domain proteins*, UDP) und Ubiquitin-ähnliche Modifizierer (*ubiquitin-like modifiers*, UBL) (Hochstrasser, 2000; Jentsch und Pyrowolakis, 2000; Müller et al., 2001). Die Proteine mit Ubiquitin-Domäne weisen zwar eine mit Ubiquitin verwandte Domäne auf, können aber mit anderen Proteinen nicht kovalent verknüpft

werden (z.B. Parkin, RAD23, DSK2). Die Ubiquitin-ähnlichen Modifizierer werden hingegen in Analogie zu Ubiquitin kovalent mit Substraten verbunden. Zu dieser Klasse gehören Aut7, ISG-15, Nedd8/Rub1 und die SUMO-Proteine (Abb. 2.2).

N-Terminus		C-Terminus
Ubiquitin, Nedd8		
Hum ubi [UBIQ_HUMAN]		MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPPQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRLEGG
Hum Nedd8 [BAA04889.1]		MLIKVKTITGKEIEIDIEPTDKVERIKERVEEKEGIPPPQQRLIYSGKQMNDEKTAADYKILGGSVLHLVLRLEGG GGLRQ
SUMO1		
Hum SUMO1 [SM33_HUMAN]	MSDQ EAKF STEDLGDKKEGE	YIKLVIGQDSSEIHFKVKMTTHLKKLKESYQQRQGVPMNSLRFLFEGQRIADNHTPKELGMEEDVIEVYQEQTGG HSTV
Xen SUMO1 [CAB09807]	MSDQ EAKF SSEDLGDKKGGG	YIKLVIGQDSSEIHFKVKMTTHLKKLKESYRQRQGVPMNSLRFLFEGQRIADNHTPKELGMEEDVIEVYQEQTGG HSTF
Zeb SUMO1 [AI545352]	MSD TETK FPSSDGGGKKEGE	YIKLVIGQDSSEIHFKVKMTTHLKKLKESYSQRQGVPMNSLFFEFEGQRIADNHTPKELGMEEDVIEVYQEQTGG CRND
Cae SUMO1 [SMT3_CAEEL]	MADDA AQA GDNAE	YIKIKVVGQDSNVHFVRVYKYSMAKLLKSYADRTGVAVNSLRFLFDGRRINDDDTPKTEMEDDDVIEVYQEQTGG F
SUMO2/3		
Xen SUMO2 [AI031364]	MAD DKP KEGVKTENND	HINLKVAGQDGSVVQFKIKRHTPLSKLMKAYCERQGLSMRQIRFRFDWLPINETDTPAQLMEDEDTIDVFQQQTGG SF
Hum SUMO2 [SM31_HUMAN]	MSE EKP KEGVKTEND	HINLKVAGQDGSVVQFKIKRHTPLSKLMKAYCERQGLSMRQIRFRFDGQPINETDTPAQLRMEDEDTIDVFQQQTGG VPESLAGHSF
Zeb SUMO2 [AI883590]	MSE EKP KEGVKTEND	HINLKVAGQDGSVVQFKIKRHTPLSKLMKAYCERQGLSIRQIRFRFDGQPINETDTPAQLMEDEDTIDVFQQQTGG SC
Hum SUMO3 [SM32_HUMAN]	MA DEK PKEGVKTENND	HINLKVAGQDGSVVQFKIKRHTPLSKLMKAYCERQGLSMRQIRFRFDGQPINETDTPAQLMEDEDTIDVFQQQTGG VY
Dro SUMO [AAD19219]	MS DEK KGGETE	HINLKVAGQDGSVVQFKIKRHTPLSKLMNAYCDRAGLSMQVVRFRFDGQPINETDTPSLEMEEGDTIEVYQEQTGG AP
sil SUMO [AU004547]	MA DEK KGENE	HINLKVAGQDGSVVQFKIKRHTPLSKLMHAYCDRAGLSMQVVRFRFDGQPINETDTPSLEMEEGDTIEVYQEQTGG VSLVXI

Abbildung 2.2: Sequenz-Homologievergleich von Ubiquitin, Nedd8 und SUMO-Proteinen (human).
 (gelb: Unstrukturierte und flexible N-terminale Sequenz der SUMO-Proteine; grün: C-terminales GG-Motiv; rot (Buchstaben): N-terminales Sequenz-Motiv (D/E)xKP; orange (Buchstaben): hydrolytisch abgespaltene C-terminale AS)

Die mittlerweile in Metazoen, Protozoen, Pflanzen und Hefen/Pilzen entdeckten SUMO-Proteine bilden unter den Ubiquitin-ähnlichen Modifizierern eine eigene Familie (Melchior, 2000). In einigen Spezies der Metazoen existiert nur ein einziges SUMO-Gen, das menschliche Genom besitzt insgesamt drei Gene und in *A. thaliana* liegen sogar acht SUMO-Gene vor (Kurepa et al., 2003). Die humanen Proteine SUMO2 und SUMO3 sind zu 87% identisch, SUMO1 teilt mit SUMO2/3 jedoch nur 47% Identität. Auf dieser Tatsache beruht die Gliederung der SUMO-Protein-Familie in zwei große Untergruppen. Die SUMO1-Proteine der Metazoen sind denen aus Hefe und Pilzen ähnlicher und die SUMO2/3-Proteine gleichen eher den SUMO-Proteinen der Pflanzen.

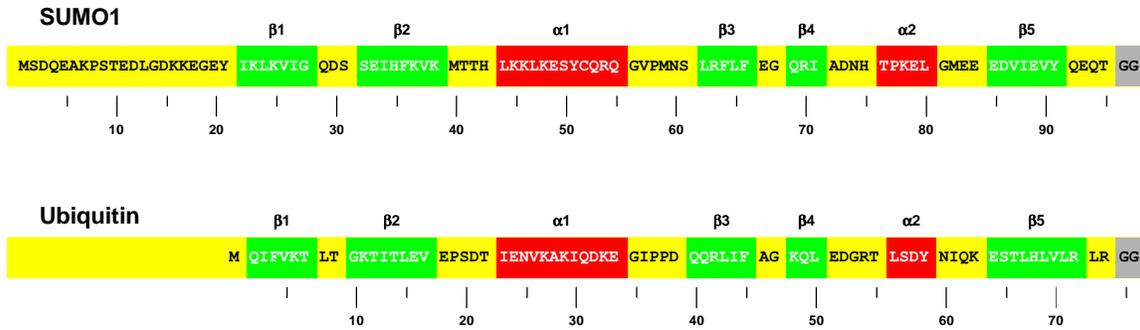
SUMO-Proteine scheinen in Eukaryonten ubiquitär exprimiert zu werden (Chen et al., 1998; Howe et al., 1998; Lapenta et al., 1997; Mannen et al., 1996; Shen et al., 1996) und

in *S. cerevisiae* sind Smt3p und dessen Konjugation essentiell (Johnson und Blobel, 1997; Johnson et al., 1997; Meluh und Koshland, 1995). Die weite Verbreitung der SUMO-Proteine in Spezies unterschiedlicher Stufen der Evolution kann zusätzlich als Beleg für deren essentielle Funktionen gesehen werden (Hochstrasser, 2000).

Obwohl einige der Ubiquitin-ähnlichen Proteine auf Primärsequenz-Ebene nicht mehr mit Ubiquitin verwandt sind, zeichnen sie sich alle durch das Ubiquitin-Faltungsmotiv $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ aus. Dieses besteht in seinen Grundzügen aus einer α -Helix, die mehrere β -Faltblattstrukturen dicht gepackt umschließen (Abb. 2.3). Wie NMR-Studien zeigen gilt dies auch für SUMO1, das - obwohl es zu Ubiquitin nur 18% identisch ist - eine ähnliche Struktur aufweist (Bayer et al., 1998; Jin et al., 2001).

Hauptunterschied der 3-D-Strukturen von SUMO1 und Ubiquitin ist ein flexibler, unstrukturierter N-Terminus in SUMO1 (Abb. 2.3). Dieses Strukturmerkmal der SUMO-Proteine setzt sich überwiegend aus geladenen Aminosäuren, Glycin- und Prolin-Resten zusammen (Abb. 2.2, 2.3). Die Länge des N-Terminus variiert unter den Mitgliedern der SUMO-Protein-Familie zwischen 11-35 AS, diese Variabilität trifft auch auf die verschiedenen SUMO-Proteine innerhalb einer Spezies zu. In einigen SUMO-Proteinen weist diese N-terminale Sequenz das Motiv (D/E)xKP auf, dem jedoch bislang noch keine Funktion zugewiesen werden konnte (Abb. 2.2).

Als ein wichtiger und markanter Unterschied zwischen SUMO1 und Ubiquitin ist deren isoelektrischer Punkt zu erwähnen, der für SUMO1 bei 4,5 und für Ubiquitin bei 9,2 liegt.



Ubiquitin-Faltungsmotiv:

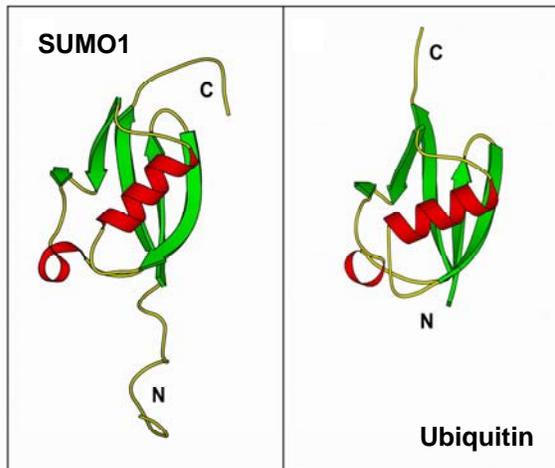


Abbildung 2.3:
Sequenz- und Strukturvergleich von SUMO1 zu Ubiquitin.
 SUMO1 (human) und Ubiquitin (human) als Struktur-Balkendiagramm samt korrespondierender Protein-Sequenz und als 3-D-Struktur (Bayer et al., 1998).
 (grau: C-terminales GG-Motiv; grün: β -Faltblattstruktur; rot: α -Helix)

2.1.2 SUMO's konjugierende Enzymkaskade und Dekonjugation

Die Strukturverwandtschaft zwischen SUMO1 und Ubiquitin zieht einen ähnlichen Konjugationsmechanismus nach sich. Die SUMOylierung wird analog zur Ubiquitinierung in mehreren Schritten (Prozessierung, Aktivierung, Konjugation, Ligation) enzymatisch katalysiert. Im Gegensatz zu Ubiquitin werden SUMO-Proteine nicht als Fusionsprotein, sondern mit C-terminalem Überhang von nur wenigen Aminosäuren exprimiert. Spezifische SUMO-Proteasen katalysieren die Prozessierung

des Vorläuferproteins. Von SUMO1 werden beispielsweise vier AS (HSTV) hydrolytisch abgespalten, um das für die Konjugation essentielle GG-Motiv freizulegen.

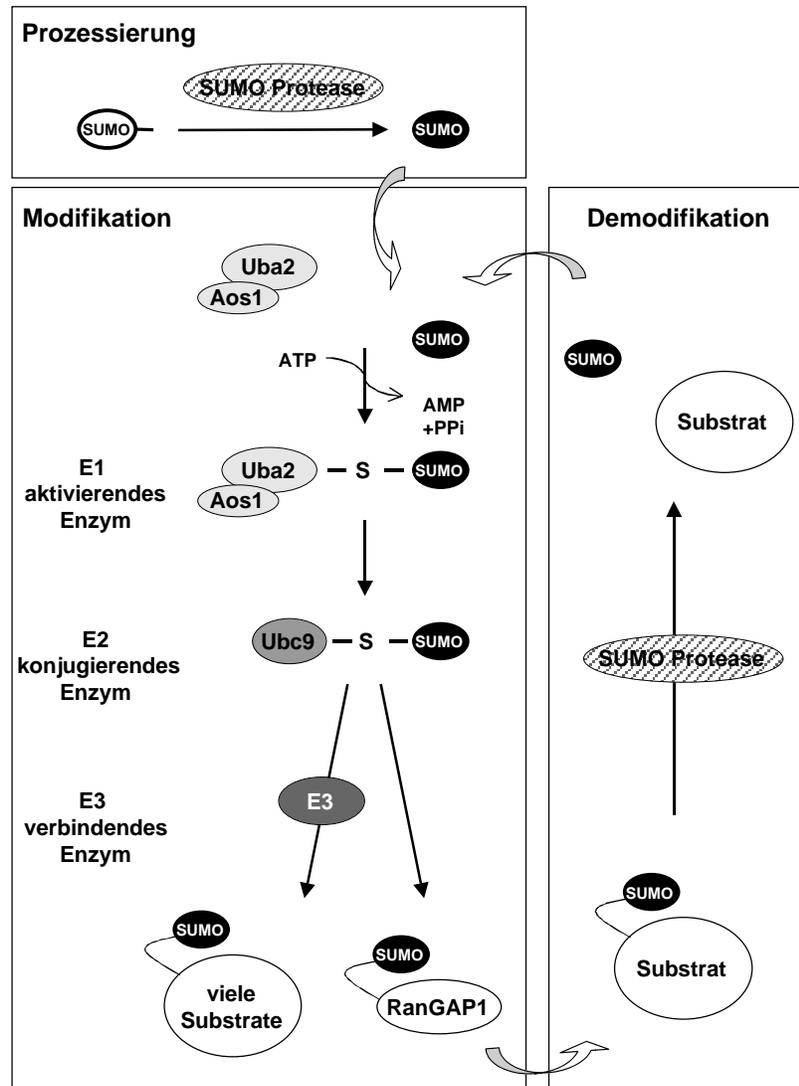


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der SUMOylierung mit den die Prozessierung, die Modifikation und die Demodifikation katalysierenden Enzymen.

Für die SUMOylierung ist - wie für die Ubiquitinierung - nur ein einziges E1-Enzym, das Heterodimer Aos1/Uba2 bekannt. Aos1/Uba2 aktiviert SUMO durch Adenylierung und bildet zwischen dem aktiven Cystein in Uba2 und dem C-terminalen Glycin des SUMO-Proteins (SUMO1: G97) einen Thioester aus. Aos1 (38 kDa) entspricht der N-terminalen, Uba2 (72 kDa) der C-terminalen Sequenz des Ubiquitin-E1-Enzyms (Uba1).

Beide Untereinheiten sind von der Hefe bis zum Menschen konserviert und werden in allen Geweben exprimiert (Melchior, 2000). Ein detaillierter Reaktionsmechanismus für alle E1-Enzyme wurde von der Struktur des E1-Enzyms der Nedd8-Modifikation (AppBP1/Uba3) abgeleitet (Walden et al., 2003). Basierend auf drei Domänen (Adenylierungsdomäne, E1-spezifische Domäne, E2-Erkennungsdomäne), die strukturell zwei Bindungsspalten bilden, werden die Abläufe so koordiniert, dass eine Reaktion die nächste nach sich zieht. Die C-terminale E1-spezifische Domäne besitzt das Nukleotid-Bindungsmotiv und den aktiven Cystein-Rest (Hatfield et al., 1990; Johnson et al., 1997; Liakopoulos et al., 1998; Osaka et al., 1998). Die E2-Erkennungsdomäne besitzt - mit Ausnahme eines entgegengesetzt orientierten β -Faltblatts - das Ubiquitin-Faltungsmotiv, welches als Interaktionsfläche für die E2-Bindung in Frage kommt (Bencsath et al., 2002; Kitada et al., 1998; Pickart et al., 1994; Stebbins et al., 1999).

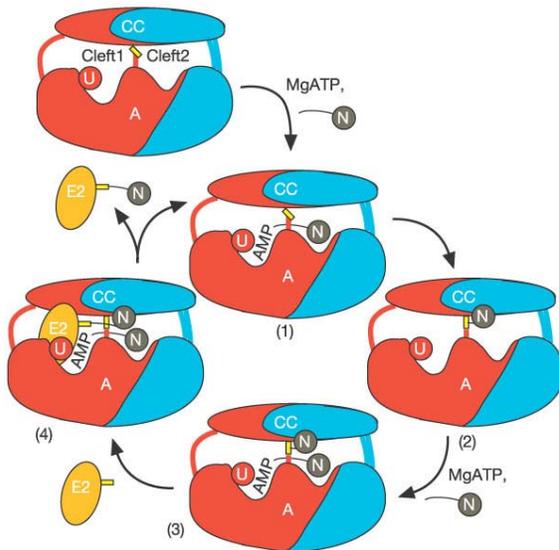


Abbildung 2.5:
Struktur-basiertes Modell der E1-Enzym-Reaktion Ubiquitin-ähnlicher Modifizierer.

Cyan: AppBP1, E1-Enzym-Untereinheit; **rot:** Uba3, E1-Enzym-Untereinheit; **grau:** Nedd8, Modifizierer; **orange:** Ubc12, E2-Enzym. **Gelber Balken:** katalytisches Cystein in E1- und E2-Enzym.

A, AppBP1-Uba3 Adenylierungsdomäne;

CC, katalytische Cystein-Domäne;

U, Ubiquitin-ähnliche Domäne.

(1) erste Adenylierungsreaktion: Nukleotid-Bindung an Bindungsspalte 1 (**Cleft1**) und Nedd8-Bindung an Bindungsspalte 2 (**Cleft2**); (2) Thioesterbildung: zwischen katalytischem Cystein (Uba3) und Nedd8; (3) zweite Adenylierungsreaktion: ein zweites Molekül Nedd8 wird adenyliert; (4) E1-E2-Enzym-Transfer: ein in Bindungsspalte 1 erneut gebundenes Nukleotid ermöglicht die Bindung des E2-Enzyms (Cleft1) und bewirkt den Transfer des E1-Thioester-gebundenen Nedd8 auf das E2-Enzym, unter Ausbildung des Thioesters zwischen E2-Enzym und Modifizierer. Entnommen: (Walden et al., 2003)

Für den zweiten Schritt der Enzymkaskade ist in der SUMOylierung einzig Ubc9 als E2-Enzym bekannt. Die erneute Ausbildung eines Thioesters findet zwischen C93 (Ubc9) und G97 (SUMO1) statt. Die E2-Enzyme aller Ubiquitin-ähnlichen Modifizierer

besitzen eine stark konservierte Topologie ihrer Basis-Domäne, in der das aktive Cystein auf einem Verbindungsstück zwischen Faltblatt- β 4 und Helix- α 2 lokalisiert ist. Nach strukturellen Unterschieden lassen sich die E2-Enzyme in vier Kategorien einordnen, nach denen Ubc9 der Klasse I angehört (Tab. 2.2).

Tabelle 2.2: Struktur-Kategorien der konjugierenden E2-Enzyme.

Klasse	Struktur der konjugierenden E2-Enzyme
I	ungefähr 150 AS samt aktivem Cystein
II	zusätzlich N-terminale Verlängerung
III	zusätzlich C-terminale Verlängerung
IV	zusätzlich N- und C-terminale Verlängerung

Entnommen: (Goettsch und Bayer, 2002)

Ein E2-Enzym muß Interaktionen mit bis zu vier verschiedenen Bindungspartnern eingehen: E1-Enzym, Modifizierer, E3-Ligase und Substrat. In *S. cerevisiae* wurde am Beispiel des Smt3p gezeigt, dass die E1-Enzym-Bindung - nicht die Bindung des Modifizierers - für die Ausbildung des Thioesters zwischen E2-Enzym und Modifizierer entscheidend ist (Bencsath et al., 2002). Da eine nicht-kovalente Bindung des E1-Enzyms mit dem modifizierenden Protein ausgeschlossen wird (Bencsath et al., 2002; Ciechanover et al., 1982; Haas et al., 1982), kann die E2-Enzym-Bindung an das korrekte E1-Enzym gleichzeitig als Selektion für das modifizierende Protein gesehen werden (Abb. 2.5). Die spezifische Interaktion mit dem E1-Enzym-Modifizierer-Adenylat-Komplex wird den konservierten Aminosäuren der E2-Enzyme zugeschrieben, die flexible E3-Ligase- und Substrat-Bindung den nicht-konservierten Aminosäuren (Goettsch und Bayer, 2002).

Im dritten Schritt der Enzymkaskade wird die Verknüpfung des aktivierten SUMO mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysins im Substrat katalysiert. Erst in den letzten zwei Jahren wurden SUMO-E3-Ligasen entdeckt. Diese gehören drei verschiedenen Proteinfamilien an. Die meisten der identifizierten SUMO-E3-Ligasen gehören der PIAS-Protein-Familie (*Protein inhibitor of activated STAT*, PIAS) an (Hochstrasser, 2001; Jackson, 2001). Es wird spekuliert, dass diese analog zu den Ubiquitin-E3-Ligasen eine RING-Finger-

ähnliche Struktur besitzen, die für ihre E3-Ligase-Aktivität essentiell ist. In *S. cerevisiae* sind zwei (Siz1, Siz2) (Johnson und Gupta, 2001; Takahashi et al., 2001), in Säugern bislang fünf PIAS-Proteine (PIAS1, PIAS3, PIASx α , PIASx β , PIASy) bekannt (Tab. 2.3). Die zweite Art der SUMO-E3-Ligasen repräsentiert ein einziger Vertreter: RanBP2/Nup358 (*GTPase Ran binding protein 2*, RanBP2; *nucleoporin 358*, Nup358). Das nur in Vertebraten vorkommende Protein ist eine Komponente der zytoplasmatischen Filamente am Zellkernporenkomplex. Ein 30 kDa großes Fragment des insgesamt 358 kDa großen Proteins kann die SUMOylierung *in vitro* verstärken (Pichler et al., 2002). Da es zwar mit Ubc9, jedoch mit keinem der gefundenen Substrate zu interagieren scheint, fungiert RanBP2 möglicherweise als allosterischer Kofaktor des Ubc9. Die dritte Art der SUMO-E3-Ligasen vertritt das humane Pc2 (Kagey et al., 2003). Es gehört der Familie der „Polycomb-Proteine“ an, die durch Bildung großer multimerer Komplexe („PcG-bodies“) Transkription inhibieren.

Tabelle 2.3: SUMO-E3-Ligasen der Säuger und deren bislang identifizierten Substrate.

E3-Ligase	Substrat	Referenzen
1. PIAS-Proteine		
PIAS1	AR; c-Jun; CtBP1; GRIP1; p53; Sp3	(Kahyo et al., 2001; Kotaja et al., 2002a; Kotaja et al., 2002b; Lin et al., 2003b; Nishida und Yasuda, 2002; Sapetschnig et al., 2002; Schmidt und Muller, 2002)
PIAS3	IRF-1	(Nakagawa und Yokosawa, 2002)
PIASxα / ARIP3	AR; c-Jun; Smad4; STAT1	(Kotaja et al., 2002b; Lee et al., 2003; Nishida und Yasuda, 2002; Rogers et al., 2003)
PIASxβ / Miz1	c-Jun, p53; CtBP1	(Lin et al., 2003b; Schmidt und Muller, 2002)
PIASy	C/EBP α ; c-Myb; LEF1; Smad4; Tcf-4	(Dahle et al., 2003; Lee et al., 2003; Sachdev et al., 2001; Subramanian et al., 2003; Yamamoto et al., 2003)
2. RanBP2-Protein		
RanBP2 / Nup358	HDAC4; Sp100	(Kirsh et al., 2002; Pichler et al., 2002)
3. Pc2-Protein		
Pc2	CtBP1, CtBP2	(Kagey et al., 2003)

Entnommen: (Melchior et al., 2003)

In Abhängigkeit des SUMO-Substrats und der Konzentrationen des E1- und E2-Enzyms kann SUMOylierung *in vitro* auch ohne die Aktivität einer E3-Ligase stattfinden. Ob dies auch *in vivo* möglich ist, konnte noch nicht eindeutig gezeigt werden.

Für die sehr effiziente *in vitro* SUMOylierung des RanGAP1 der Vertebraten, die für kaum ein anderes Substrat festgestellt werden konnte, geben die Strukturdaten des

RanGAP1-Ubc9-Komplexes eine mögliche Erklärung (Bernier-Villamor et al., 2002). Das Akzeptor-Lysin (K526) des RanGAP1 ragt direkt in die katalytische Tasche des Ubc9 hinein. Die das Lysin flankierenden Aminosäuren des SUMOylierungsmotivs sowie die mit Ubc9 interagierenden Aminosäuren am C-Terminus von RanGAP1 scheinen den Komplex zusätzlich zu stabilisieren. Diese Strukturdaten erlauben - zumindest für RanGAP1 - eine Modifizierung ohne Beteiligung einer E3-Ligase *in vivo* zu postulieren.

Die SUMOylierung ist ein dynamischer, reversibler Prozess, der sich aus Prozessierung, Modifikation und Demodifikation zusammensetzt. Für SUMO-Proteine existieren spezifische Proteasen, die sowohl C-terminale Hydrolase-Aktivität (SUMO-Prozessierung) als auch Isopeptidase-Aktivität (DeSUMOylierung) besitzen. Obwohl Ubiquitin- und SUMO-Proteasen zu den Cystein-Proteasen gehören, sind sie strukturell verschieden (Mossessova und Lima, 2000). Die SUMO-Proteasen werden nach der in *S. cerevisiae* zuerst identifizierten Protease Ulp1 (*ubiquitin-like-protease 1*) als Ulp1-Protein-Familie bezeichnet (Li und Hochstrasser, 1999). Strukturell lassen sich die SUMO-Proteasen in mehrere N-terminale und eine C-terminale Domäne unterteilen. Die N-terminalen Domänen variieren in Größe und Sequenz und regulieren wahrscheinlich die intrazelluläre Lokalisation, Substrat-Spezifität und Aktivität der SUMO-Proteasen (Li und Hochstrasser, 2003). Die C-terminale Domäne umfasst ca. 200 AS und besitzt die katalytische Triade aus Cystein, Histidin und Asparagin (Conserved Domain Database, pfam02902).

Aus der Hefe sind Ulp1 (am Zellkernporenkomplex) und Ulp2/Smt4 (im Nukleoplasma) bekannt, die in ihren Funktionsspektren nur teilweise überlappen (Li und Hochstrasser, 1999; Li und Hochstrasser, 2000; Schwienhorst et al., 2000). Ulp1 ist essentiell und an der Prozessierung sowie der Demodifikation beteiligt. Ulp2 ist zwar nicht essentiell, doch führt dessen Deletion deutlich zu verlangsamtem Wachstum, Chromatin-Defekten und erhöhter Sensitivität gegenüber DNS-Schädigung (Li und Hochstrasser, 2000). Für Ulp2 wird angenommen, dass es auch die Aufrechterhaltung der Chromatid-Kohäsion am Zentromer in Metaphase-Zellen aufrecht erhält (Bachant et al., 2002). Die Phänotypen beider Deletionsmutanten lassen erkennen, dass nicht das Verhältnis konjugierter zu

nicht-konjugierter SUMO-Substrate, sondern die reversible Modifikation an sich entscheidend ist (Li und Hochstrasser, 2003).

Im Genom der Säuger sind insgesamt sieben Gene für Ulp1-Proteasen zu finden, von denen für das Produkt des Gens SENP8, Nedp1/Den1, nicht Spezifität für SUMO, sondern für Nedd8 nachgewiesen wurde (NCBI UniGene Datenbank: www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene). Neben den in voller Länge exprimierten Proteasen existieren mehrere, aus „alternativem Splicing“ hervorgegangene, kürzere Isoformen. Die Nomenklatur der Gene, aller bekannten exprimierten Proteasen und „Splice“-Varianten sowie deren Spezifität und Lokalisation, sind in Tabelle 2.4 zusammengefasst.

Tabelle 2.4: Ulp1-Protein-Familie der Säuger.

Gen / Spezifität	Protein / Größe	Lokalisation	Referenz
SENP1 / SUMO	hSenp1 / 643 AS	Nukleoplasma; Kernkörper, Zellkernperipherie	(Bailey und O'Hare, 2002; Gong et al., 2000)
	<i>mSenp1</i> / 640 AS		<i>P5911</i>
SENP2 / SUMO	hSenp2 / 589 AS	Zellkernporenkomplex	(Hang und Dasso, 2002; Zhang et al., 2002)
	<i>mSenp2</i> / 588 AS		<i>Q91ZX6</i>
	rAxam / 588 AS	Zellkern	(Kadoya et al., 2002)
	mAxam2 / mSmt3IP2 / 541 AS	Zytoplasma, Vesikel-assoziiert	(Nishida et al., 2001)
	mSuPr-1 / 507 AS	PML-Körper	(Best et al., 2002)
SENP3 / SUMO	<i>hSenp3</i> / 574 AS		<i>Q9H4L4</i>
	mSmt3IP1 / 568 AS	Nukleoli	(Nishida et al., 2000)
SENP5 / ?	<i>hSenp5</i> / 755 AS		<i>Q96H10</i>
SENP6 / SUMO	hSusp1 / 1112 AS	Zytoplasma	(Kim et al., 2000)
SENP7 / ?	<i>hSenp7</i> / 984 AS		<i>Q9BQF6</i>
SENP8 / Nedd8	Nedp1/Den1 / 212 AS		(Gan-Erdene et al., 2003; Mendoza et al., 2003; Wu et al., 2003)

Zusammenstellung bislang bekannter Ulp1-Proteasen, deren Isoformen der Säuger sowie deren zelluläre Lokalisationen. Entnommen: (Melchior et al., 2003)

Senp6/Susp1 (Zytoplasma) scheint - zumindest *in vitro* - ausschließlich Hydrolase-Aktivität auszuüben (Kim et al., 2000), Smt3IP1 und Axam2 zeigen Substratspezifität für SUMO2/3 (Nishida et al., 2001; Nishida et al., 2000), Senp1, Senp2 und Axam sind sowohl gegenüber SUMO1 als auch SUMO2/3 aktiv (Gong et al., 2000; Kadoya et al., 2002; Zhang et al., 2002). Ob die Funktions- und Substratspezifitäten lokalisationsabhängig und/oder eventuell auch speziesabhängig sind, konnte noch nicht

geklärt werden (Melchior et al., 2003). Allerdings lässt sich am Beispiel des SUMO1-Substrats RanGAP1 für die Substratspezifität der SUMO-Proteasen ein kombinierter Einfluss katalytischer Eigenschaften und intrazellulärer Lokalisation ableiten. Senp1 demodifiziert RanGAP1*SUMO1 zwar *in vitro*, aber eine Überexpression von Senp1 führt nicht zur DeSUMOylierung des an den zytoplasmatischen Fibrillen des Zellkernporenkomplexes assoziierten RanGAP1*SUMO1. Das im Nukleus lokalisierte Tumor-Suppressor-Gen PML (*promyelocytic leukemia*) wird hingegen unter gleichen Bedingungen deSUMOyliert (Gong et al., 2000). Ein ähnlicher Zusammenhang wurde für Ulp1 in *S. pombe* gezeigt, dessen Zellzyklus-abhängige Lokalisation (S-/G2-Phase: Zellkernperipherie; Anaphase: Nukleus) Einfluss auf die Substrat-Spezifität der SUMO-Protease nimmt (Taylor et al., 2002).

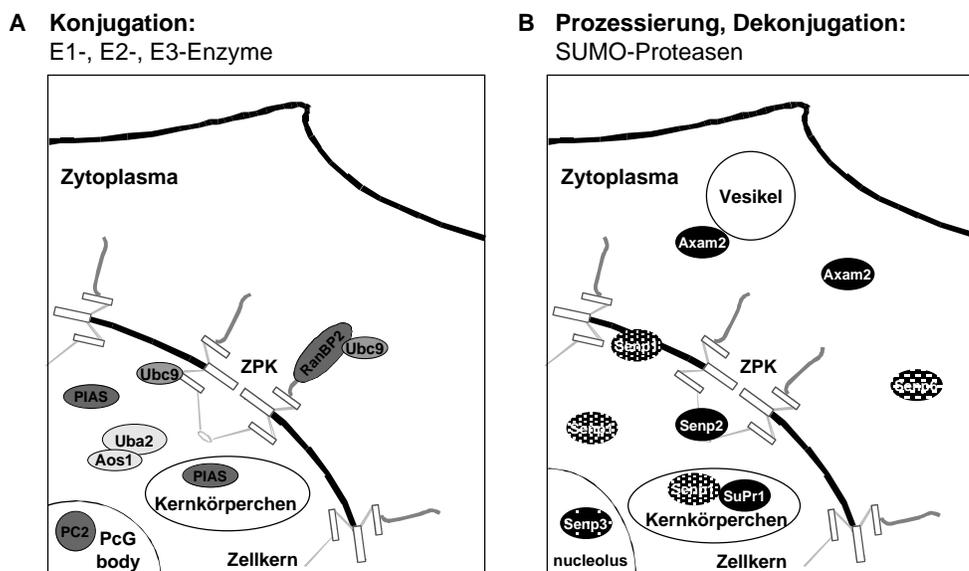


Abbildung 2.6: Zelluläre Lokalisation der an den Schritten der SUMOylierung beteiligten Enzyme.

(A) Enzyme der SUMO-Modifikation. Das aktivierende E1-Enzym **Aos1/Uba2** lokalisiert vorwiegend im Zellkern, das konjugierende E2-Enzym **Ubc9** wurde hauptsächlich im Nukleus und am Zellkernporenkomplex (**ZPK**) nachgewiesen. **Bemerkung:** Beide Enzyme sind vorwiegend nukleär vorhanden, finden sich aber in geringer Konzentration auch im Zytoplasma. **PIAS**-E3-Ligasen lokalisieren im Nukleoplasma und in **Kernkörperchen**, die E3-Ligase **Pc2** in „PcG-bodies“ und die E3-Ligase **RanBP2** ist Teil des Zellkernporenkomplexes.

(B) Enzyme der SUMO-Prozessierung und -Demodifikation. **Senp1-3** und **Senp6** werden von unterschiedlichen Genen kodiert, **SuPR1** und **Axam2** sind „Splice“-Varianten von **Senp2**.

Bemerkung: Einige der hier gezeigten Lokalisationen basieren ausschließlich auf Daten überexprimierter Fusionsproteine. Entnommen: (Melchior et al., 2003)

Die modifizierenden Enzyme (Aos1/Uba2, Ubc9, E3-Ligasen) lokalisieren verstärkt im Zellkern und am Zellkernporenkomplex, die prozessierenden/demodifizierenden Enzyme (SUMO-Proteasen) sind im Zellkern und im Zytoplasma vorhanden (Abb. 2.6). Daraus resultierend kann angenommen werden, dass reversible Modifikation sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma und am Zellkernporenkomplex stattfinden kann.

2.1.3 SUMOylierungssignal und SUMO-Bindungsstelle

Im Unterschied zu den Signalsequenzen der Ubiquitin-Substrate, z.B. der „Destruction Box“ (Sequenz: **RXALGXIXN**; siehe 2.2.2), ist das SUMOylierungssignal gleichzeitig die SUMO-Bindungsstelle mit dem für die Modifikation benötigten Akzeptor-Lysin. Viele SUMO-Substrate besitzen die als SUMOylierungsmotiv bezeichnete minimale Konsensus-Sequenz $\Psi KxE/D$ (Ψ : große aliphatische AS). In RanGAP1 konnte diesem SUMOylierungsmotiv eine entscheidende Rolle in der Interaktion mit Ubc9 (E2-Enzym) zugeschrieben werden (Bernier-Villamor et al., 2002; Sampson et al., 2001). Ob die Ubc9-Substrat-Interaktion für alle SUMO-Bindungsstellen zutrifft, wurde noch nicht überprüft. Zumindest liegt die für PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) in *S. cerevisiae* entdeckte untypische SUMO-Bindungsstelle TKET, vergleichbar mit dem SUMOylierungsmotiv in RanGAP1, in einer exponierten Proteinschleife (Hoegel et al., 2002). In einem weiteren SUMO-Substrat, Smad4, konnte neben dem Konsensus-Motiv VKDE (K159) ein weiteres alternatives Motiv mit der Sequenz VKYC (K113) definiert werden (Lee et al., 2003; Lin et al., 2003a).

Nach der Identifikation alternativer SUMOylierungsmotive stellt sich die Frage, ob Ubc9 verschiedene Motive erkennen kann oder ob für die alternativen Motive weitere Erkennungsfaktoren, z.B. E3-Ligasen, erforderlich sind. Entscheidenden Einfluss könnte außerdem die an das SUMOylierungsmotiv angrenzende Sequenz ausüben.

2.1.4 Funktionen der SUMOylierung

Von den mittlerweile identifizierten Substraten ist abzuleiten, dass die SUMOylierung wichtige zelluläre Regulationsprozesse beeinflussen kann. SUMO-Substrate sind in der Signaltransduktion, der Transkription, der DNS-Reparatur, der Chromatin-Remodellierung, der Mitose und dem Kern-Zytoplasma-Transport involviert. SUMOylierung ruft primär Veränderungen in der Protein- oder DNS-Interaktion hervor. Im Fall von RanGAP1 resultiert dies in einer Lokalisationsveränderung. Ausschließlich die SUMOylierte Form von RanGAP1 bindet an RanBP2, einem Teilstück der Filamente des Zellkernporenkomplexes. Dies scheint eine Voraussetzung für effizienten Kern-Zytoplasma-Transport zu sein. Hingegen wird der Transkriptionsrepressor CtBP1 über eine durch SUMOylierung hervorgerufene Lokalisationsveränderung aus dem Zellkern ins Zytoplasma in seiner Funktion inhibiert (Lin et al., 2003b).

Die Hitzeschock-induzierte SUMOylierung des Transkriptionsfaktors HSF1 scheint für dessen DNS-Bindung erforderlich zu sein (Hietakangas et al., 2003; Hong et al., 2001). Im Zusammenhang mit der Funktion der Thymin-DNS-Glykosylase konnte dagegen gezeigt werden, dass SUMOylierung zu einer Reduktion der DNS-Affinität führt und somit die bis dahin ungeklärte Frage des Abdissoziierens der Thymin-DNS-Glykosylase im basischen Nukleotidaustausch (*base excision repair*, BER) übernimmt (Hardeland et al., 2002).

Gegenspieler der SUMOylierung sind zum einen die spezifischen SUMO-Proteasen (Abb. 2.6), zum anderen post-translationale Modifikationen, die das Akzeptor-Lysin blockieren. Beispiele hierfür sind der Transkriptionsfaktor Sp3, für dessen Lysin-Rest neben der SUMOylierung auch Acetylierung nachgewiesen werden konnte. Für beide Modifikationen wird eine Inhibition der transkriptionellen Aktivität angenommen (Braun et al., 1999; Sapetschnig et al., 2002). Antagonistisch scheinen sich dagegen die Funktionen der post-translationalen Modifikationen am gleichen Akzeptor-Lysin in I κ B α und in PCNA zu verhalten (Desterro et al., 1998; Hoege et al., 2002; Stelter und Ulrich, 2003). Für diese beiden SUMO-Substrate wird ein Ubiquitin-Antagonismus postuliert, der im Fall von I κ B α aus dem Schutz vor proteasomaler Degradation (SUMOylierung) und der Markierung zur proteasomalen Degradation (K48-Poly-Ubiquitinierung)

zusammengesetzt sein würde. Im Fall von PCNA würde die Funktion der DNS-Reparatur (Ubiquitinierung) mit der Kombination aus deren Inhibition und einer Funktion in der DNS-Reparatur (SUMOylierung) konkurrieren.

Die angeführten SUMO-Substrate und SUMOylierungsfunktionen verdeutlichen, dass eine durch SUMOylierung hervorgerufene Veränderung der Protein-Protein- oder Protein-DNS-Interaktion an verschiedenen Substraten zu entgegengesetzten Funktionen führen kann. Daraus folgt, dass die Funktion der SUMOylierung Substrat-abhängig ist.

2.4 Aufgabenstellung

Die SUMOylierung verläuft mechanistisch analog zur Ubiquitinierung (Modifikation: modifizierende Enzymkaskade; Demodifikation: SUMO-spezifische Proteasen). Als Ubiquitin-ähnliches Protein besitzt SUMO1 das mit Ubiquitin identische Ubiquitin-Faltungsmotiv. Trotzdem weisen SUMOylierung und Ubiquitinierung jeweils ein individuelles Substratspektrum auf. Folglich existieren für die verschiedenen post-translationalen Modifizierer Substrat-Spezifitäten, die auf der Kombination spezifischer Enzyme sowie auf Struktur- und Sequenzunterschieden beruhen könnten. Insbesondere die an der Proteinoberfläche liegenden Aminosäure-Reste sollten für fehlerfreie Enzym- und Substrat-Interaktionen verantwortlich sein.

Ziel dieser Arbeit war zunächst, auf der Basis einer SUMO1-Mutagenese, die Funktionen der für SUMO1 spezifischen Struktur- und Sequenzunterschiede (flexibler N-Terminus; nicht-konservierte Aminosäure-Reste) zu bestimmen. Interessante SUMO1-Mutanten sollten biochemisch und zellbiologisch charakterisiert werden, um Zusammenhänge zwischen Struktur, Sequenz und Funktion zu erkennen. Im Laufe der Arbeit ergaben sich erste Hinweise auf eine mögliche Ubiquitinierung von SUMO1. Die Aufgabenstellung wurde daher um die Analyse diesen Befundes erweitert.

3 Material und Methoden

Die aufgeführten Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, aus Sambrook *et al.* (1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, *Current Protocols in Protein Science* und *Current Protocols in Cell Biology* abgeleitet.

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Soweit nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien und Feinchemikalien in Analyse-Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), SERVA (Heidelberg) und Roth (Karlsruhe) bezogen. In dieser Arbeit verwendetes Wasser wurde über eine „Purelab Plus UV/UF“-Filteranlage der Firma USF (Ransbach-Baumbach) aufbereitet. Es wird im folgenden als ddH₂O bezeichnet.

Computeranalysen

Datenbankrecherchen (Sequenzsuche, Literaturrecherchen) wurden mit Hilfe des „National Center for Biotechnology Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt. Für Sequenzanalysen (Auswertung von DNS-Sequenzierungen, Vergleich von Proteinsequenzen) wurde das Programm Gene Jockey II (BIOSOFT, Cambridge, UK) verwendet. Proteinstrukturen wurden mit dem Programm RasMol für Macintosh (RasMac) dargestellt.

3.1.1.1 Radiochemikalien

Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen.

Desoxycytidin-5'-[α -³²P]triphosphat, Triethylammonium-Salz, 3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l Pro-mix L-[³⁵S], Gemisch aus L-[³⁵S]Methionin und L-[³⁵S]Cystein zur metabolischen Markierung, >1000 Ci/mmol, 14,3 μ Ci/ μ l

3.1.1.2 Materialien zur Filtration und Dialyse

Centricon 5K, 10K, 30K	Millipore, Eschborn
MF-Millipore Membranfilter	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
UH 100/10 und 100/30 Ultrahülsen	Schleicher & Schuell, Dassel
Whatman 3 MM, Filterpapier	Maidstone, England
Zentrifugen Filtereinheiten 3K, 10K, 30K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.1.1.3 Chromatographische Matrices, fertig gepackte Chromatographiesäulen

CNBr-Sepharose 4B	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ni-Nitrilotriacetic Acid (NTA)-Agarose	Qiagen, Hilden
Sepharose-Q (FF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Superdex75 HR 10/30	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Superdex200 HR 10/30	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Superdex200 pg HiLoad 26/60	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

3.1.1.4 Molekulargewichts- und Längenstandards

BenchMark Protein Ladder, Protein Größenstandard	Life Technologies, Karlsruhe
GeneRuler 100bp Ladder Plus, DNS Größenstandard	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler 1kb Ladder Plus, DNS Größenstandard	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
MW-GF-200, Gelfiltrations Marker 12-200 kDa	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.1.1.5 Komplexe Reagenzien und Reaktions-Sets („Kits“)

Amplify, Fluorographie-Reagenz	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Big Dye Terminator	
Cycle Sequencing RR-Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Desoxynucleotide Set	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ECF Western Blotting Reagenz	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Effectene, Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
Freund's Adjuvant „incomplete“	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GLOW, Mounting Medium	Energene, Regensburg
HiSpeed™ Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Micro BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Rockford, USA
Mounting Medium	Molecular Probes, Eugene, USA
Polyfect, Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
Prime-a-Gene Markierungs System	Promega, Mannheim
Qiagen Plasmid Kit (Mini, Midi, Maxi)	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QuickChange	
Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
RNase-Free-DNase Set	Qiagen, Hilden
RNAeasy Kit	Qiagen, Hilden
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Superfect, Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
Super Signal	Pierce, Rockford, USA
Super Signal West Femto (Maximum Sensitivity Substrate)	Pierce, Rockford, USA
TA-Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
TiterMax Gold, Adjuvanz	CytRx Corporation, Norcross, USA

3.1.1.6 Verbrauchsmaterial

Kunststoffware

Einmal-Kunststoffwaren wurden von den Firmen B. Braun (Melsungen), Becton Dickinson (Heidelberg), Biozym Diagnostik (Hess. Oldendorf), Brand (Wertheim), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickenhausen), Josef Peske (Aindling-Pichl), Sarstedt (Nümbrecht), und Zinsser Analytic (Frankfurt) bezogen.

Lieferanten für Zellkulturgefäße waren die Firmen Becton Dickinson (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen) und Nunc (Wiesbaden).

Einmal-Kanülen wurden von der Firma Terumo (Frankfurt), Einmal-Handschuhe von der Firma Semperit (Wien) geliefert.

Sterilfilter stammten von den Firmen Millipore (Eschborn), Pall (Dreieich) und Renner (Darmstadt).

Transfer-Membranen

Hybond-N+

Nylon-Transfer-Membran (0,45 µm) Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Immun-Blot™

PVDF-Membran (0,2 µm) BioRad Laboratories, Hercules, USA

PROTRAN

NC-Transfer-Membran (0,45 µm) Schleicher & Schuell, Dassel

Röntgenfilme

Es wurden verschiedene Röntgenfilmtypen der Firma Kodak (Stuttgart) eingesetzt: BioMax MS, BioMax MR, X-Omat AR und X-Omat LS.

3.1.2 Puffer und Lösungen

Amidoschwarz-Färbelösung	0,2% (w/v) Amidoschwarz 10B, 10% (v/v) Methanol, 2% (v/v) Essigsäure
Amidoschwarz-Entfärber	90% (v/v) Methanol, 2% (v/v) Essigsäure
Blocklösung (IF)	2% (w/v) BSA in PBS
Blockpuffer (WB)	5% (w/v) Magermilchpulver in PBS-T

Coomassie-Färbelösung	50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,1% (w/v) SERVA Blue R (SERVA)
Coomassie-Entfärber	50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure
DNS-Auftragspuffer, 6x	10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, 30% (w/v) Glycerin, 0,1% (w/v) Bromphenolblau
FA-Gel-Puffer, 10x	200 mM MOPS, 50 mM NaAc, 10 mM EDTA, eingestellt auf pH 7,0 mit NaOH
FA-Gel-Laufpuffer, 1x	0,7% (v/v) Formaldehyd, in FA-Gel-Puffer
FA-Lösung (IF)	3,7% (v/v) Formaldehyd in PBS
Northern-Auftragspuffer, 6x	50% (w/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,1% (w/v) Bromphenolblau in FA-Gel-Puffer
Northern-Probenpuffer	50% (v/v) Formamid, 6,7% (w/v) Formaldehyd, in FA-Gel-Puffer
Methylenblau-Färbelösung	0,04% (w/v) Methylenblau in SSC
P1 (Qiagen Plasmid Kit)	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
P2 (Qiagen Plasmid Kit)	200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS
P3 (Qiagen Plasmid Kit)	3 M K-Acetat (pH 5,5)
Para-FA-Lösung (IF)	2% (w/v) Paraformaldehyd in PBS, eingestellt auf pH 7,4 mit NaOH
PBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , eingestellt auf pH 7,5 mit NaOH
PBS-T	0,05% oder 0,2% (v/v) Tween-20 in PBS
Ponceaurot-Färbelösung	0,5% (w/v) Ponceau S, 1% (v/v) Essigsäure
Protease-Inhibitoren-Mix (Prot-I-Mix)	je 1 µg/ml Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin und wahlweise 0,1 mM PEFA oder 0,2 mM PMSF
Puffer1	6 M Guanidinium/HCl, 0,1 M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (pH 6,3 oder pH 8,0)
Puffer2	50 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (pH 8,0), 100 mM KCl, 20% (w/v) Glycerin, 0,2% (v/v) Nonidet P-40
SDS-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer, 10x	209 mM Tris/HCl (pH 6,8), 41% (w/v) Glycerin, 7,7% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) Bromphenolblau, 17% (v/v) β-Mercaptoethanol

SDS-Probenpuffer, 2x	100 mM Tris/HCl (pH 6,8), 20 % (w/v) Glyzerin, 4% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) Bromphenolblau, frisch dazu 200 mM DTT
SDS-Sammelgelpuffer	500 mM Tris/HCl (pH 6,8), 0,1% (w/v) SDS
SDS-Trenngelpuffer	2,0 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,1% (w/v) SDS
SSC, 20x	300 mM Tri-Natriumcitrat/HCl, 3 M NaCl, eingestellt auf pH 7,0 mit NaOH
STE	10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
„Stripping“-Puffer	60 mM Tris/HCl (pH 6,8), 2% (w/v) SDS, 100 mM (v/v) β -Mercaptoethanol
TAE, 1x	40 mM Tris, 0,1% (v/v) Essigsäure, 1 mM EDTA, eingestellt auf pH 7,7 mit HCl
TE	10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA
Triton-X-100-Lösung	0,2% (v/v) Triton-X-100 in PBS
Transferpuffer A, 5x	1,5 M Tris/HCl (pH 10,5)
Transferpuffer B, 5x	125 mM Tris/HCl (pH 9,4), 200 mM 6-Aminocaprionsäure
Transferpuffer (Standard)	47,9 mM Tris, 38,6 mM Glycin, 0,037% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol
Transportpuffer, 10x	200 mM HEPES (pH 7,3), 1,1M KOAc, 20 mM Mg(OAc) ₂ , 10 mM EGTA, eingestellt auf pH 7,3 mit KOH
TSS	10% (w/v) Polyethylenglykol 6000, 5% (v/v) DMSO, 50 mM MgCl ₂ in LB-Medium
Hybridisierungslösung	1 M NaCl, 10% (w/v) Dextransulfat, 1% (w/v) SDS, 0,01% (w/v) Heringssperma-DNS

3.1.3 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur

3.1.3.1 Medienbestandteile und Medienzusätze

L-Cystein, Hydrochloride Monohydrate Stammlösung 25 mg/ml in PBS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glucose, ohne Natriumpyruvat	LifeTechnologies, Karlsruhe
DMEM mit 4,5 g/l Glucose, ohne L-Glutamin, Natriumpyruvat, L-Cystein, L-Methionin	LifeTechnologies, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin, 100x	LifeTechnologies, Karlsruhe
Joklik's Medium	LifeTechnologies, Karlsruhe
L-Methionin, 98% (TLC), L-2-Amino-4-(methylthio)butansäure, Stammlösung 25 mg/ml in PBS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumpyruvat, 100x	Life Technologies, Karlsruhe
Neugeborenen Kälberserum (NCS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin, 100x	Life Technologies, Karlsruhe
Trypsin/EDTA, 1x	Life Technologies, Karlsruhe

3.1.3.2 Medien-Zusammensetzung

Standard-Medium (adhärente HeLa-, 293T-Zellen)	DMEM mit 4,5 g/l Glucose, 10% (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin 1 mM Natriumpyruvat
Standard-Medium (HeLa-Suspensionszellen)	Joklik's Medium, 5% (v/v) NCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Pulse-Medium	Hunger-Medium mit 0,05 mCi/ml Pro-mix L-[³⁵ S]
Chase-Medium	Standard-Medium mit 0,1 mg/ml L-Methionin, 0,12 mg/ml L-Cystein, 25 mM HEPES/KOH (pH 7,4)
Hunger-Medium	DMEM mit 4,5 g/l Glucose, 10% (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 25 mM HEPES/KOH (pH 7,4)

3.1.4 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium 1% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) NaCl

SB-Medium 3,5% (w/v) Bactotrypton, 2% (w/v) Hefe-Extrakt, 0,5% (w/v) NaCl

Festmedien wurden durch Zugabe von 1,5% (w/v) Agar hergestellt.

Selektionsmedien enthielten 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin.

3.1.5 Antikörper

Tabelle 3.1: Eingesetzte Primär- und Sekundär-Antikörper.

Primär-Antikörper

Antikörper	Abk.	Spezifität	Spezies	Bezugsquelle
anti-Aos1/	αAos1	hAos-1 (AS 1-380)	Ziege	A.Pichler, U.Gärtner, AG Melchior, MPI für Biochemie, Martinsried
anti-GFP(FL): sc-8334	αGFP	GFP (AS 1-238)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-GMP1	αGMP1	(Klon 21C7)	Maus	Zymed Laboratories, South San Francisco, USA
anti-HA.11	αHA	(Klon 16B12), Zellüberstand	Maus	BAbCo, Richmond, USA
anti-His	αHis	(H-15) sc-803	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti- RanGAP1	αRG	mRanGAP1 (AS 1-589)	Ziege	U.Gärtner, AG Melchior, MPI für Biochemie, Martinsried
anti- RanGAP1tail	αRGtail	RanGAP1tail (AS 400-589)	Kaninchen	F. Melchior, AG Melchior, MPI für Biochemie, Martinsried
anti-SUMO1	αS1	hSUMO1 (AS 1-97)	Ziege	diese Arbeit
anti- SUMO2/3	αS2	hSUMO2 (AS 1-92)	Ziege	T.Büsgen, AG Melchior, MPI für Biochemie, Martinsried
anti-Ubc9	αUbc9	mUbc9 (AS 1-158)	Ziege	A.Pichler, U.Gärtner, AG Melchior, MPI für Biochemie, Martinsried
anti-Ubiquitin	αUbi	(Klon P4D1): sc-8017	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Sekundär-Antikörper

Antikörper	Markierung	Spezies	Bezugsquelle
anti-Ziege IgG	(H+L), Peroxidase	Esel	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, USA
anti-Ziege IgG	(H+L), alkalische Phosphatase	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
anti-Maus IgG	(H+L), Cy TM ₃	Esel	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, USA
anti-Maus IgG	(H+L), Alexa Fluor 488	Ziege	Molecular Probes/MoBiTec, Göttingen
anti-Maus IgG	(H+L), FITC	Ziege	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, USA
anti-Maus IgG	(H+L), Peroxidase	Ziege	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, USA

Zusammenstellung der in dieser Arbeit in Immunoblot-Analysen (3.4.8.1) und Immunfluoreszenz-Mikroskopie (3.4.8.3) eingesetzten Primär- und Sekundär-Antikörper.

3.1.6 Rekombinante Proteine

His-hAos1 (AS 1-380)
pET-28a

PCR Amplifikation von EST-Klon DKFZp434J0913,
AG Melchior, MPI für Biochemie, Martinsried

GST-hRanBP2ΔFG (AS 2553-2838)
pGEX-3x

diese Arbeit

mRanGAP1 (AS 1-589)
pET-11d

AG Melchior, MPI für Biochemie, Martinsried

CFP-mRanGAP1tail (AS 400-589)
pET-11d

AG Melchior, MPI für Biochemie, Martinsried

hSUMO1ΔC4 (AS 1-97)
pET-11a

diese Arbeit

YFP-hSUMO1ΔC4 (AS 1-97)
pET-11d

AG Melchior, MPI für Biochemie, Martinsried

hUba2 (AS 1-660)
pET-11d

PCR Amplifikation von EST-Klon DKFZp434DO717,
AG Melchior, MPI für Biochemie, Martinsried

mUbc9 (AS 1-158)
pET-23a

PCR Amplifikation von EST-Klon IMAGp998A061122,
AG Melchior, MPI für Biochemie, Martinsried

GST-Ulp1 (*S. c.*) (AS 1-621)
pGEX-KG

Mark Hochstrasser, Yale University, New Haven, USA

Desweiteren wurden Enzyme von den Firmen Calbiochem-Novabiochem GmbH (Bad Soden), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim) und Stratagene (Heidelberg) bezogen. Sofern nicht anders angegeben, wurden die vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen gewählt.

3.1.7 DNS-Oligonukleotide

DNS-Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) und Metabion (Martinsried) bezogen.

Tabelle 3.2: Primer-DNS-Oligonukleotide.

Primer-DNS-Oligonukleotide für die gerichtete SUMO1-Mutagenese

1. Austausch zu Alanin

Primer-Name	DNS-Sequenz
S1/E5A/K7A	5' -GTCTGACCAGGCGGCAGCGCCTTCAACTG-3'
S1/E5A/K7A/r	5' -CAGTTGAAGGCGCTGCCGCTGGTCAGAC-3'
Lys23Ala	5' -GGTGAATATATTGCACTTAAGGTCATTGGACAGG-3'
Lys23Ala/r	5' -CCTGTCCAATGACCTTAAGTGCAATATATTCACC-3'
Lys25Ala	5' -GGTGAATATATTAAGCTTGCAGTCATTGGACAGG-3'
Lys25Ala/r	5' -CCTGTCCAATGACTGCAAGCTTAATATATTCACC-3'
Lys45Ala	5' -CAACACATCTCGCGAAGCTTAAAGAATCATAC-3'
Lys45Ala/r	5' -GTATGATTCTTTAAGCTTCGCGAGATGTGTTG-3'
Lys46Ala	5' -CAACACATCTCAAGGCACTTAAGGAATCATACTG-3'
Lys46Ala/r	5' -CAGTATGATTCTTTAAGTGCCTTGAGATGTTG-3'
Arg54Ala	5' -CTCAAGAACTTAAGGAATCATACTGTCAAGCACAGGGTGTTC-3'
Arg54Ala/r	5' -GAACACCCTGTGCTTGACAGTATGATTCTTTAAGTTCTTGAG-3'
Glu83Ala	5' -GAACTGGGAATGGCGGAAGAAGACGTCATTGAAGTTTATC-3'
Glu83Ala/r	5' -GATAAACTTCAATGACGCTTCTTCCGCCATTCCCAGTTC-3'
Glu84Ala	5' -GGAATGGAGGAGAAGACGTCATTGAAGTTTATC-3'
Glu84Ala/r	5' -GATAAACTTCAATGACGCTTCTTCCGCCATTCCC-3'
Glu85Ala	5' -GGAATGGAGGAGAAGACGTCATTGAAGTTTATC-3'
Glu85Ala/r	5' -GATAAACTTCAATGACGCTTCTTCCGCCATTCCC-3'
Asp86Ala	5' -GAGGAAGAAGCTGTGATTGAAGTATACCAGGAACAAACG-3'
Asp86Ala/r	5' -CGTTTGTTCCTGGTATACTTCAATCACAGCTTCTTCCCTC-3'
Glu89Ala	5' -GATGTGATTGCAGTATACCAGGAACAAACG-3'
Glu89Ala/r	5' -CGTTTGTTCCTGGTATACTGCAATCACATC-3'
K45A/K46A	5' -CAACACATCTCGCGCACTTAAGGAATCATACTG-3'
K45A/K46A/r	5' -CAGTATGATTCTTTAAGTGCCTTGAGATGTGTTG-3'
E83A/E84A/E85A	5' -CTGGGAATGGCGGCAGCAGATGTGATTGAAGTATACCAGGAACAAACG-3'
E83A/E84A/E85A/r	5' -CGTTTGTTCCTGGTATACTTCAATCACATCTGCTGCCGCCATTCCCAG-3'

2. Austausch zur analogen Aminosäure des Ubiquitins

Primer-Name	DNS-Sequenz
Tyr21Leu	5' - GGAAGGTGAATTAATTAAGCTTAAAGTCATTGG - 3'
Tyr21Leu/r	5' - CCAATGACTTTAAGCTTAATTAATTCACCTTCC - 3'
Lys23Glu	5' - GGTGAATATATTGAACTTAAAGTCATTGGACAGG - 3'
Lys23Glu/r	5' - CCTGTCCAATGACCTTAAAGTTCAATATATTCACC - 3'
Phe36Leu	5' - GTGAGATTCATTTAAAAGTAAAAATG - 3'
Phe36Leu/r	5' - CATTTTCACTTTTAAATGAATCTCAC - 3'
Lys37Glu	5' - GATTCACTTCGAAGTAAAAATGAC - 3'
Lys37Glu/r	5' - GTCATTTTCACTTCGAAGTGAATC - 3'
Lys39Glu	5' - GAGATTCACTTTAAAGTGGAAATGACAACAC - 3'
Lys39Glu/r	5' - GTGTTGTCAATTTCCACTTTAAAGTGAATCTC - 3'
Gln69Lys	5' - GGTTCCTCTTCGAAGGTAAGAGAATTGC - 3'
Gln69Lys/r	5' - GCAATTCCTTACCTTCGAAGAGAAACC - 3'
Lys78Ser	5' - CATACTCCAAGTGAGCTCGGAATGGAGG - 3'
Lys78Ser/r	5' - CCTCCATTCGAGCTCACTTGGAGTATG - 3'
Tyr91Val	5' - GATTGAAGTTGTACAGGAACAAAACG - 3'
Tyr91Val/r	5' - CGTTTGTTCCTGTACAACCTTCAATC - 3'
F36L/K39E	5' - GTGAGATTCATTTAAAAGTGGAAATG - 3'
F36L/K39E/r	5' - CATTTCCACTTTTAAATGAATCTCAC - 3'
E83Q/E84K/D	5' - GAACTGGGAATGCAGAAAGAAAGTGTGATTGAAGTATACCAGGAACAACG - 3'
E83Q/E84K/D/r	5' - CGTTTGTTCCTGGTATACTTCAATCACACTTCTTTCTGCATTCCCATTCC - 3'
Q92L/E93R/Q94L	5' - GATGTGATTGAAGTATACCTGCGACTAACGGGGGGTTAG - 3'
Q92L/E93R/Q94L/r	5' - CTAACCCCCCGTTAGTCGCAGGTATACTTCAATCACATC - 3'

3. Austausch hypothetischer Phosphorylierungsstellen

Primer-Name	DNS-Sequenz
Ser9Ala	5' - GGAGGCAAAACCTGCAACTGAAGACTTGGGGGATAAG - 3'
Ser9Ala/r	5' - CTTATCCCCAAGTCTTCAGTTGCAGGTTTTGCCTCC - 3'
Ser9Asp	5' - GGAGGCAAAACCTGCAACTGAAGACTTGGGGGATAAG - 3'
Ser9Asp/r	5' - CTTATCCCCAAGTCTTCAGTTGCAGGTTTTGCCTCC - 3'
Ser9Glu	5' - GGAGGCAAAACCTGAAACTGAAGATTGGGGGATAAG - 3'
Ser9Glu/r	5' - CTTATCCCCAAGTCTTCAGTTTTCAGGTTTTGCCTCC - 3'
Thr76Ala	5' - GAATTGCTGATAATCATGCTCCAAAAGAGCTCGGAATGGAGGAAG - 3'
Thr76Ala/r	5' - CTTCCTCCATTCAGGCTCTTTTGGAGCATGATTATCAGCAATTC - 3'
Thr76Asp	5' - GAATTGCTGATAATCATGATCCAAAAGAGCTCGGAATGGAGGAAG - 3'
Thr76Asp/r	5' - CTTCCTCCATTCAGGCTCTTTTGGATCATGATTATCAGCAATTC - 3'
Thr76Glu	5' - GAATTGCTGATAATCATGAACAAAAGAGCTCGGAATGGAGGAAG - 3'
Thr76Glu/r	5' - CTTCCTCCATTCAGGCTCTTTTGGTTCATGATTATCAGCAATTC - 3'

4. Austausch N-terminaler Lysine

Primer-Name	DNS-Sequenz
Lys7Arg	5' - CCAGGAGGCAAGGCCTTCAACTGAGG - 3'
Lys7Arg/r	5' - CCTCAGTTGAAGGCCTTGCCTCCTGG - 3'
Lys16Arg	5' - GAGGACTTGGGCGATCGGAAGGAAGGTG - 3'
Lys16Arg/r	5' - CACCTTCCTTCCGATCGCCCAAGTCCTC - 3'
Lys17Arg	5' - GGGGGATAAGAGGGAAAGGTGAATATATATAAACTCAAAGTCATTGG - 3'
Lys17Arg/r	5' - CCAATGACTTTGAGTTTAAATATATTCACCTTCCCTCTTATCCCCC - 3'
K16R/K17R	5' - GGACTTGGGGGATAGGAGGGAAAGGTGAATA - 3'
K16R/K17R/r	5' - TATTCACCTTCCCTCCTATCCCCAAGTCC - 3'

Primer-DNS-Oligonukleotide für SUMO1-ΔGG-Konstrukte

Primer-Name	DNS-Sequenz
S1ΔC4/ΔC7	5' - GAAGTTTATCAGGAACAATAGGGGGTTAGTGTGCGACG - 3'
S1ΔC4/ΔC7/r	5' - CGTCGACACTAACCCCCCTATTGTTCTGATAAACTTC - 3'

Primer-DNS-Oligonukleotide für ein zusätzliches Stop-Codon in pIRES-hrGFP-2a

Primer-Name	DNS-Sequenz
S1-non-tag	5' - GTTTATCAGGAACAAACGTAGATCCGAATTCGCATGCG - 3'
S1-non-tag/r	5' - CGCATGCGAATTCGGATCTACGTTTGTTCCTGATAAAC - 3'

Primer-DNS-Oligonukleotide für SUMO1-Amplifikationen

1. SUMO1

Primer-Name	DNS-Sequenz
GSTS3'	5' - CGGCTTAAATGAATCCTAACCCCGTTTG - 3'
GSTSfl5'	5' - GGTTCGCGTGGACATATGTCTGACCAGG - 3'
pIRES/S1/BamHI/r	5' - AAACGCGGATCCGCGTTTGTTCCTGATAAACTTCAATCAC - 3'
WT/pHAG	5' - CGGGATCCATGTCTGACCAGGAGG - 3'
WT/N10/N19/pHAG/r	5' - ATAGTTTAGCGCCGCACGTTTGTTCCTGATAAAC - 3'

2. Deletion N-terminaler Aminosäuren in SUMO1

Primer-Name	DNS-Sequenz
Δ10-SUMO/pET11a	5' - GGAGATATACATGGAAGATCTGGGGGATAAG - 3'
Δ10-SUMO/r	5' - CTTATCCCCCAGATCTTCCATGTATATCTCC - 3'
dN10-N-term	5' - GGAATTCATATGGACTTGGGGGATAAGAAGG - 3'
dN10-C-term	5' - CGCGGATCCTAACCCCGTTTGTTCCTG - 3'
N10/pHAG	5' - CGGGATCCATGGAGGACTTGGGGG - 3'
N19S1	5' - GGAAGATCTGAATATATTAAGTC - 3'
N19S1/r	5' - ACGCGTCGACACTAACCCCGTTTGTTCCTG - 3'
ΔN19S1/pET11a	5' - GGAATTCATATGGAATATATTAAGTC - 3'
S1ΔN19YFP	5' - CGAGCTCATGGAATATATTAAGTCAAAGTCAT - 3'
N19/pHAG	5' - CGGGATCCATGGAATATATTAAGTC - 3'
Δ21-S	5' - CCCCAGATCGATTAAAGTCAAAGTCATTGGACAGGATAGC - 3'
Δ21-S/r	5' - GCTATCCTGTCCAATGACTTTGAGTTAATCGATCGGGG - 3'
pET11a/ΔN-S	5' - GAAGGAGATATACATATTAAGCTTAAAGTCATTGGACAGGATAGC - 3'
pET11a/ΔN-S/r	5' - GCTATCCTGTCCAATGACTTTAAGCTTAATATGTATATCTCCTTC - 3'
WT/N10/N19/pHAG/r	5' - ATAGTTTAGCGCCGCACGTTTGTTCCTGATAAAC - 3'
GSTS5'	5' - GGAAGGTGAACATATGAAACTCAAAGTC - 3'
HAS5'	5' - GATTACGCTAGCTTGATTAAGCTTAAAGTCATTGGAC - 3'
HAS5'/r	5' - GTCCAATGACTTTAAGCTTAATCAAGCTAGCGTAATC - 3'

Primer-DNS-Oligonukleotide für die Sequenzierung der SUMO-Konstrukte

Primer-Name	DNS-Sequenz
pHHS10B	5' -CCCAAGCTTCTAGAGATCCCTCG- 3'
T7	5' -TAATACGACTCACTATAGGG- 3'
T3	5' -ATTAACCCTCACTAAAG- 3'
T7-terminator	5' -GCTAGTTATTGCTCAGCGG- 3'
EGFP-N	5' -CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG- 3'
BGH	5' -CCTCGACTGTGCCTTCTA- 3'

Primer-DNS-Oligonukleotide für die Amplifikation und Sequenzierung von RanBP2 Δ FG (AS 2553-2838)

Primer-Name	DNS-Sequenz
5'RanBP2-7634	5' -CGCGGATCCCGACAACACCAAAAGCAGTGGTTTCTCC- 3'
3'RanBP2-8806	5' -CCGGAATTCGAACTTTACCGGCTGACTGGGTCC- 3'
pGEX5'seq.primer	5' -GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG- 3'
pGEX3'seq.primer	5' -CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG- 3'

Zusammenstellung der Primer-DNS-Oligonukleotide, die für die Synthese sowie Sequenzierung der in dieser Arbeit benutzten DNS-Konstrukte in PCR-Reaktionen eingesetzt worden sind.

3.1.8 Plasmide

pCR TM II	Invitrogen, Groningen, Niederlande
c-myc-pCRUZ	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
pET-11a	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
pGEX-2T, -3X	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pHAG	AG Stefan Grimm, MPI für Biochemie, Martinsried
pHHS10B	Rohit Mahajan, Scripps Institute, La Jolla, USA
pIRES-hrGFP-2a	Stratagene, Heidelberg
pMT107	Bruce Stillman, Cold Spring Harbor, New York, USA (Original-Labor: Dirk Bohmann, EMBL, Heidelberg)

3.1.9 Bakterienstämme

BL21(DE3)	Stamm <i>E. coli</i> B; F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> λ(DE3)
DH5α	F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44</i> λ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>

3.1.10 Eukaryontische Zell-Linien

HeLa, Suspensionszellen	menschliche Cervix-Karzinomzell-Linie
HeLa, adhärenente Zellen	menschliche Cervix-Karzinomzell-Linie
293T	humane, embryonale Nierenzellen, 293 (ATTC-Nummer: CRL-1573) zusätzlich mit dem großem T-Antigen des SV-40 Virus transformiert

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNS

Für die Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNS aus *E. coli* wurden 3 ml LB-Medium in einem 14 ml Falcon-Rundbodenröhrchen mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C mit 230 Upm geschüttelt. 2 ml der Übernachtskultur wurden in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und 5 min bei 2500 g abzentrifugiert. Das Bakterien-Pellet wurde in 200 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer Lösung P2 wurde das Gemisch vorsichtig invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 µl eisgekühlter Puffer P3 zugegeben und vorsichtig gemischt. Einer 5 minütigen Inkubation bei RT folgten 10 min Inkubation auf Eis. Die ausgefallenen Proteine und Bakterienrückstände wurden abzentrifugiert (15 min, 15800 g, 4°C) und die Plasmid-DNS mit 0,7 VT Isopropanol aus dem Überstand gefällt. Die Plasmid-DNS wurde durch 10 minütige Zentrifugation bei 8000 g (RT) sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 25-40 µl ddH₂O oder TE gelöst.

Zur Isolierung größerer Mengen reiner, intakter Plasmid-DNS wurde der „Midi- bzw. Maxi-Plasmid Kit“ oder der „HiSpeed™ Plasmid Midi Kit“ der Firma Qiagen nach den Empfehlungen des Herstellers eingesetzt. Die aufgereinigte DNS wurde für die Transfektion von Gewebekulturzellen benutzt.

3.1.2 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die DNS- und RNS-Konzentration wurden spektralphotometrisch bestimmt. Dafür wurde die Extinktion einer verdünnten Nukleinsäurelösung bei 260 nm im Spektralphotometer (Spectrophotometer DU 640, Beckman, München) gemessen. Eine Extinktion von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNS und einer

Konzentration von 40 µg/ml für RNS. Das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm zur Extinktion bei 280 nm ist Maß für die Reinheit einer Nukleinsäurelösung und sollte für DNS bei etwa 1,8, für RNS bei etwa 2,0 liegen (gilt für Lösungen mit pH 8,0).

3.1.3 Hydrolytische Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsspaltungen von DNS erfolgten bei der vom Hersteller für die jeweilige Nuklease angegebenen Puffer- und BSA-Konzentration. Pro 1 µg DNS wurden 2-5 U Restriktionsenzym eingesetzt. Um unspezifische Spaltaktivität der Endonuklease zu verhindern, wurde darauf geachtet, dass das Volumen der Glycerin-haltigen Enzymlösung maximal 1/10 Vol. des Reaktionsvolumens ausmachte. Die Dauer der Restriktionsspaltung betrug 1-3 h bei der vom Hersteller für das jeweilige Enzym angegebenen optimalen Temperatur. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/5 Vol. 6x-DNS-Auftragspuffer gestoppt.

DNS-Doppelspaltungen erfolgten unter vorgegebenen Puffer-Bedingungen des Herstellers oder wurden seriell durchgeführt.

3.1.4 Dephosphorylierung von DNS-Enden

Um bei ungerichteten Plasmid-Insert-Ligationen die Re-Ligation des Plasmids zu unterdrücken, wurden die freien Enden des Plasmids vor der Ligation möglichst vollständig dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung wurde ohne Pufferwechsel direkt an die Restriktionsspaltung angeschlossen. Dazu wurde der Restriktionsansatz 1:1 mit ddH₂O verdünnt, mit 1/9 Vol. 10x-CIAP-Puffer (Roche) und 3 U CIAP pro µg des eingesetzten Plasmids versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 60 min bei 37°C inkubiert und die Dephosphorylierung mit 1/5 Vol. 6x-DNS-Auftragspuffer beendet.

3.1.5 Ligation von DNS-Fragmenten

Zur Verknüpfung eines DNS-Fragments mit einem Plasmidvektor über kohäsive DNS-Enden wurden 50-100 ng Plasmid-DNS und ein dreifach molarer Überschuss des DNS-Fragments mit 2 µl 10x-Ligasepuffer, 2 U T4-DNS-Ligase, 5% PEG und ddH₂O zu einem Endvolumen von 20 µl vereinigt. Je 10 µl des Reaktionsansatzes wurden 1 h bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Um die noch vorhandene Ligaseaktivität zu stoppen, wurde der Ligationsansatz 10 min bei 65°C inkubiert. Nach Abkühlung auf RT wurden 1-3 µl in der Transformation von Bakterien eingesetzt.

Zur Ligation von DNS-Fragmenten über glatte DNS-Enden wurde die DNS-Menge des Fragments um das vierfache erhöht und die eingesetzte Ligaseaktivität verdoppelt.

3.1.6 Agarose-Gel-Elektrophorese

Je nach Größe der zu trennenden DNS-Fragmente wurden 0,8-2,5%ige Agarose-Gele verwendet. Die erforderliche Menge Agarose wurde mit TAE-Puffer versetzt, in der Mikrowelle aufgeköcht, in eine Gelkammer gegossen und ein Kamm zur Aussparung der Geltaschen hineingesteckt. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt und mit 1x TAE überschichtet. Die DNS-Proben wurden mit 1/5 Vol. 6x-DNS-Auftragspuffer versetzt, in die Geltaschen pipettiert und bei 80-90 V aufgetrennt (Elektrophoresis Power Supply EPS300, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Zur Auswertung wurde das Agarose-Gel 15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer) inkubiert und die DNS-Banden im UV-Durchlicht digital aufgenommen (ImageMaster VDS 1D, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

3.1.7 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Isolierung eines DNS-Fragments aus einem Agarose-Gel wurde mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen durchgeführt. Das Gelstück mit der gewünschten DNS-Bande wurde im UV-Durchlicht (365 nm) ausgeschnitten und nach Herstellerangaben weiterbehandelt. Dabei erfolgten Isolierung und Aufreinigung der DNS an einer Silica-Gel-Membran.

3.1.8 Gerichtete *in vitro* Mutagenese

Die gerichtete *in vitro* Mutagenese von Plasmiden wurde in abgewandelter Form nach dem Protokoll des „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kits“ der Firma Stratagene mittels PCR durchgeführt. Das Plasmid, in das die Mutation eingeführt werden sollte, diente zugleich als Matrize für die Synthese des zu mutagenisierenden Plasmids. Die dabei verwendeten Primer-Oligonukleotide waren zueinander komplementär und enthielten die gezielten Sequenzänderungen (3.1.7).

Tabelle 3.3: Standard-Reaktionsansatz und -PCR-Programm der gerichteten *in vitro* Mutagenese.

Reaktionsansatz (Σ : 25 μ l)

Komponente	Konzentration
Plasmid-DNS	30 ng
erstes Primer-Oligonukleotid	15 pmol
zweites Primer-Oligonukleotid	15 pmol
dNTP-Mix (dA-/dC-/dG-/dTTP)	5 nmol
10x- <i>Pfu</i> -DNS-Polymerasepuffer	2,5 μ l
<i>PfuTurbo</i> TM -DNS-Polymerase	1,25 U
ddH ₂ O	x μ l

PCR-Programm

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	30 sec
2	12 - 18	95°C	30 sec
		55°C	1 min
		72°C	2 min/kb Plasmid-Länge

Die Temperatur während der Hybridisierungsphase wurde auf die jeweils eingesetzten Primer-Oligonukleotide abgestimmt bzw. mit Hilfe eines Heizblock-Temperatur-Gradienten (T-Gradient, Biometra, Göttingen) optimiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt, mit 10 U *DpnI* versetzt und 2 h bei 37°C inkubiert, um die methylierte DNS des Stammplasmids selektiv abzubauen. 2-5 µl des Reaktionsansatzes wurden direkt in *E.coli*-Zellen transformiert.

3.1.9 Nichtradioaktive DNS-Sequenzierung (Sanger et al., 1977)

Die Sequenzier-Reaktion wurde mit dem „Big Dye Terminator Cycle Sequencing RR-Mix“ (BD-Mix) der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Dieses Reagenz enthält *Taq*-Polymerase, dNTPs und mit unterschiedlichen Fluorophoren markierte ddNTPs.

Tabelle 3.4: Reaktionsansatz und PCR-Programm der nichtradioaktiven DNS-Sequenzierung.

Reaktionsansatz (Σ : 10 µl)

Komponente	Konzentration
Plasmid-DNS	0,6 µg
Primer-DNS-Oligonukleotid	5,0 pmol
BD-Mix	4,0 µl
ddH ₂ O	x µl

PCR-Programm

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	96°C	2 min
2	40	96°C	30 sec
		50°C	15 sec
		60°C	4 min

Die Auftrennung und Detektion der Reaktionsprodukte wurden von einem hausinternen Service oder einem kommerziellen Service-Anbieter (Metabion, Martinsried) durchgeführt.

3.1.10 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterienzellen

Um transformierbare Bakterien zu gewinnen, wurden 500 µl einer stationären Kultur von *E. coli* DH5α oder BL21(DE3) mit 50 ml LB-Medium verdünnt und in einem Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 kultiviert. Die Bakterien wurden bei 4°C und 2000 g abzentrifugiert und das Bakterien-Pellet in 2 ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde die Bakteriensuspension mit 500 µl 87% (w/v) Glycerin vorsichtig gemischt, aliquotiert (je 100 µl), in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.1.11 Transformation chemisch-kompetenter Bakterienzellen

Die bei -80°C gelagerten kompetenten Bakterien (100 µl) ließ man auf Eis auftauen. Je nach Art der Plasmid-DNS (Mini- oder Midi-DNS-Präparation, PCR-Reaktion der gerichteten *in vitro* Mutagenese, Ligationsansatz) wurden 1-5 µl DNS zu den Bakterien gegeben, gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Das Bakterien-DNS-Gemisch wurde für 50 sec bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und im Anschluss daran direkt für 2 min auf Eis gestellt. Mit zusätzlich 900 µl LB-Medium wurde der Ansatz für 30-60 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Im Falle einer Transformation mit Mini- oder Midi-DNS-Präparationen wurden 10-20 µl verdünnt in 100 µl LB-Medium auf einer vorgetrockneten Agar-Selektionsplatte ausplattiert, anderenfalls die Bakteriensuspension konzentriert (Zentrifugation: 1 min, 2500 g; Resuspension in kleinerem Volumen) und der gesamte Ansatz ausplattiert. Die Inkubation der Selektionsplatten erfolgte über Nacht bei 37°C.

3.1.12 Isolierung der Gesamt-RNS aus Gewebekulturzellen

Die Gesamt-RNS transient transfizierter 293T-Zellen wurde durch Anionenaustausch-Chromatographie mit Hilfe des „RNeasy-Mini-Kits“ der Firma Qiagen isoliert. Die an die Säulenmatrix gebundene RNS wurde zusätzlich mit RNase-freier DNase I („RNase-Free-DNase-Set“, Qiagen) behandelt, um störende Plasmid-DNS vollständig zu entfernen. Die RNS wurde in zwei Schritten mit RNase-freiem ddH₂O (30 µl, 15 µl) eluiert. Quantität und Qualität der Präparate durch Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt.

3.1.13 Northern-Blot: RNS-Transfer auf eine Nylon-Membran

Für eine Analyse der Gesamt-RNS ist es notwendig diese mit Hilfe der Northern-Blot-Technik an einer Nylon-Membran zu fixieren. Dafür wurden 5 µg Gesamt-RNS in vierfachem Volumen Northern-Probenpuffer aufgenommen, 3-5 min bei 65°C denaturiert und im Eisbad sofort abgekühlt. Nach Zugabe von 1/5 Vol. 6x-Northern-Auftragspuffer wurde die RNS in einem denaturierenden 1,2% FA-Agarose-Gel (0,22 M Formaldehyd in 1x FA-Gel-Puffer) in 1x FA-Gel-Laufpuffer bei 5-7 V/cm aufgetrennt. Alle benutzten Gefäße sowie die Utensilien der Gel-Elektrophorese-Laufkammer waren zuvor mit 2% H₂O₂ gesäubert worden, um RNase-Aktivitäten zu vermeiden. Nach dem Lauf wurde das Gel dreimal für 30 min in ddH₂O gewaschen und anschließend 30 min in 20x SSC äquilibriert. Im Northern-Blot wird die RNS über Kapillarkräfte auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech) transferiert. Für den Blot wurde das Gel auf drei Lagen Whatman-3MM-Papier (20x SSC getränkt) gelegt, deren Enden in das 20x SSC-Puffer-Reservoir eintauchten. In angegebener Reihenfolge wurde der Blot-Aufbau vervollständigt: mit einer passend zugeschnittenen Nylon-Membran, drei der Gelgröße entsprechenden Lagen Whatman-3MM-Papier (20x SSC getränkt) und mehreren Lagen Zellstoff mit Glasplatte und Gewicht (3 g/cm²) als Abschluss. Nach 12-24 h wurde der Blot abgebaut, die Membran zur Fixierung der RNS mit UV-Licht

bestrahlt (240 nm; Autocrosslink-Funktion des UV-Stratalinker 1800, Stratagene, Heidelberg) und zur Sichtbarmachung der ribosomalen RNS einige Minuten in Metylenblau-Färbelösung geschwenkt. Nach dem Entfärben mit ddH₂O wurde die Membran zum Trocknen auf ein Whatman-3MM-Papier gelegt und bei RT gelagert. Eine deutlich stärkere Anfärbung der 28S-RNS spricht für eine gute Qualität der aufgetrennten RNS.

3.1.14 Herstellung [³²P]-markierter cDNS-Sonden für die Northern-Blot-Analyse

Als Matritze für die Synthese der radioaktiven Sonden diente ein DNS-Fragment, das der humanen cDNS von Nukleotid-Position 66 bis 291 entsprach. Die Mischung radioaktiver DNS-Sonden zur Detektion der spezifischen RNS wurde mit Hilfe des „Prime-a-Gen-Labeling-Systems“ (Promega) mittels der Klenow-Polymerase mit „Zufalls“-Primern synthetisiert. Für die Markierungsreaktion wurden folgende Komponenten zu einem Endvolumen von 50 µl vereinigt: 20 µl ddH₂O, 10 µl 5x Puffer mit Zufallshexanukleotiden, 2 µl dNTP-Mix ohne dCTP (Endkonzentration: je 20 µM), 10 µl hitzedenaturierte DNS-Matritze (25 ng), 2 µl nukleasefreies BSA (10 mg/ml), 5 µl α-[³²P]-dCTP (50 µCi, 3000 Ci/mmol) und 1 µl Klenow-Fragment (5 U). Das Reaktionsgemisch wurde 1-2 h bei RT inkubiert.

Die nicht-eingebauten Nukleotide und Primer-Oligonukleotide wurden mit Hilfe von Micro Bio-Spin[®] Chromatographie-Säulchen (BioRad) durch Gelfiltration an Sephadex-G25 (Sigma-Aldrich) mit STE als Säulenpuffer entfernt. Das Eluat wurde mit TE auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt. Die Inkorporation von Radioaktivität wurde durch Messung der Cherenkov-Strahlung von 1 µl des Eluats überprüft.

3.1.15 Spezifischer Nachweis membrangebundener RNS mit [³²P]-cDNS-Sonden

Vor der Hybridisierung wurde die Blot-Membran mit 2x SSC benetzt und in Hybridisierungslösung im Hybridisierungsofen für 1 h bei 65°C rotierend inkubiert. Dadurch wurde die Membran mit unspezifisch bindender DNS abgesättigt. Die DNS-Sonden wurden 2 min bei 95°C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt, anschließend zur Hybridisierungslösung gegeben und mindestens 16 h weiterinkubiert. Im Anschluss daran wurde die Membran bei 65°C zweimal für 15 min mit 2x SSC, 0,1% (w/v) SDS und zweimal für 10 min mit 1x SSC, 0,1% (w/v) SDS gewaschen. Die Membran wurde mit 2x SSC gespült und feucht in Plastikfolie eingeschweißt. Die gebundene Radioaktivität wurde durch Autoradiographie bzw. mit einem Phosphoimager (Fuji-Film BAS-2500, Fuji, Tokyo, Japan) sichtbar gemacht. Die Blot-Membran wurde zur weiteren Verwendung in 2x SSC bei -80°C gelagert.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung von Gewebekulturzellen

Adhärenente Säugetier-Zell-Linien (HeLa, 293T) wurden in Standard-Medium bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit (Hera cell, Zellkultur-Inkubator, Heraeus, Hanau) in Zellkulturschalen variabler Größe kultiviert und alle drei Tage bzw. vor Erreichen der Konfluenz passagiert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 1x-Trypsin/EDTA abgelöst und in einer Verdünnung von 1:3 bis 1:6 auf neuen Kulturschalen ausgesät. Zellzahlen wurden in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.3.2 Einfrieren und Auftauen von Gewebekulturzellen

Die Zellen wurden aus einer logarithmisch wachsenden Population geerntet und eingefroren. Dazu wurden die adhärenenten Zellen mit PBS gewaschen, mit 1x Trypsin/EDTA (Volumen entsprechend der Kulturgefäßgröße) für 5 min bei 37°C inkubiert, in Medium aufgenommen, abzentrifugiert (300 g, 5 min) und in Einfriermedium (Standard-Medium mit 20% FCS und 10% DMSO) resuspendiert. Die Zellen einer 250 ml Zellkulturflasche wurden in 15 ml Einfriermedium resuspendiert. Je 1 ml der Suspension wurde in Einfriererörchen abgefüllt, in einem Isopropanoltank langsam auf -80°C abgekühlt (1°C/min) und für die dauerhafte Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Das Auftauen der Zellen erfolgte zügig bei 37°C im Wasserbad. 1 ml aufgetaute Zellsuspension wurde mit 10 ml Standard-Medium direkt in einer 10 cm Zellkulturschale verdünnt und bei 37°C weiterkultiviert. Nach dem Absitzen der Zellen wurde das Medium erneuert, um das DMSO des Einfriermediums zu entfernen.

3.3.3 Transiente Transfektion von Säugerzellen

Adhärenente HeLa- und 293T-Zellen wurden mit einem der aufgeführten Transfektionsreagenzien und entsprechenden Puffern der Firma Qiagen transfiziert. Zum Zeitpunkt der Transfektion waren die Zellen ca. 40% konfluent. Die Mengen eingesetzter Plasmid-DNS, Transfektionsreagenzien und Medien richteten sich nach Zell-Linie und Kulturgefäßgröße (Tab. 3.6, 3.7).

Tabelle 3.5: Transfektionsreagenzien.

Transfektionsreagenz	Zell-Linie	Mechanismus
Effectene	293T, HeLa	Verstärker kondensiert die DNS und Effectene schließt diese in kationische Mizellen ein.
Polyfect	293T	Bildung großer DNS-Ringe durch Einlagerung des stark verzweigten Polyfects.
Superfect	293T, HeLa	Bildung großer DNS-Ringe durch Einlagerung des stark verzweigten Superfects.

Liste der für die transiente Transfektion von Säugerzellen benutzten Transfektionsreagenzien (Qiagen).

Transfektion mit Effectene

Tabelle 3.6: Effectene als Transfektionsreagenz.

293T-Zellen (Effectene)

Schale Ø	DNS	EC-Puffer	Verstärker	Effectene	DMEM in Mix	DMEM in Schale
3,5 cm	0,8 µg	80 µl	3,2 µl	10 µl	0,3 ml	2,1 ml
6 cm	1,8 µg	80 µl	7 µl	22 µl	0,6 ml	2,6 ml
10 cm	4,5 µg	550 µl	18 µl	55 µl	2,5 ml	6 ml

HeLa-Zellen (Effectene)

Schale Ø	DNS	EC-Puffer	Verstärker	Effectene	DMEM in Mix	DMEM in Schale
3,5 cm	0,3 µg	100 µl	1,1 µl	3,5 µl	600 µl	2,2 ml
10 cm	5 µg	570 µl	10 µl	12 µl	1,5 ml	6,5 ml

DNS-Menge und Volumina der für die Transfektion mit Effectene benötigten Reagenzien für unterschiedlich große Zellkulturschalen.

Die zu transfizierende DNS wurde in angegebener Menge EC-Puffer aufgenommen, mit Verstärker-Reagenz versetzt und gemischt. Nach 5 min Inkubation (RT) wurde dem Gemisch „Effectene“ zugegeben, nach weiteren 15 min dieses mit DMEM-Standard-Medium verdünnt und vorsichtig in das vorgelegte Mediumvolumen in der bewachsenen

Zellkulturschale pipettiert. Nach 3-6 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 12-48 h in Standard-Medium bei 37°C kultiviert.

Transfektion mit Polyfect und Superfect

Tabelle 3.7: Polyfect bzw. Superfect als Transfektionsreagenz.

293T-Zellen (Polyfect)

Schale Ø	DNS	serumfreies DMEM	Polyfect	DMEM in Mix	DMEM in Schale
10 cm	6 µg	300 µl	50 µl	1 ml	8 ml
15 cm	12 µg	450 µl	120 µl	3 ml	11 ml

293T-, HeLa-Zellen (Superfect)

Schale Ø	DNS	serumfreies DMEM	Superfect	DMEM in Mix	DMEM in Schale
Kammer	1,5 µg	45 µl	5 µl	250 µl	300 µl

DNS-Menge und Volumina der für die Transfektion mit Polyfect bzw. Superfect benötigten Reagenzien für unterschiedlich große Zellkulturschalen.

Die zu transfizierende DNS wurde in Standard-Medium (ohne Serum) verdünnt und mit „Polyfect“ bzw. „Superfect“ 10 sec kräftig gemischt. Nach 10 min Inkubation (RT) wurde das Gemisch mit Standard-Medium (mit Serum) versetzt und in das vorgelegte Mediumvolumen in die bewachsenen Zellkulturschalen pipettiert. Je nach Experiment wurde das Transfektionsgemisch nach 5-15 h gegen Standard-Medium ausgetauscht und die Zellen für 12-48 h bei 37°C weiterkultiviert.

3.1.4 Behandlung von Säugerzellen mit Proteasom-Inhibitoren

Die Anzahl der behandelten Zellen korrelierte mit dem Umfang des Experiments. Standardmäßig wurde eine 10 cm Zellkulturschale mit 293T-Zellen (ca. 50% konfluent) trypsinisiert und auf vier 6 cm Zellkulturschalen (je 6 ml Standard-Medium) verteilt. Nach 17-22 h wurden 3 ml Medium abgenommen und ein Proteasom-Inhibitor bzw. ddH₂O oder DMSO (Negativkontrolle) zu dem verbliebenen Medium gegeben (Tab. 3.8). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in 100 µl 2x-SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C inkubiert. 10 µl des Zell-Lysats

wurden für eine spätere Bestimmung der Proteinkonzentration (3.2.2) weggefroren, bevor das Lysat mit DTT versetzt wurde. Nach wiederholter Inkubation bei 95°C wurden die Lysate in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Tabelle 3.8: Standard-Bedingungen eingesetzter Proteasom-Inhibitoren.

Proteasom-Inhibitor	Endkonzentration	Inkubationsdauer	Negativkontrolle
Lactacystin	10 µM	12 h	ddH ₂ O
LLNL	50 µM	12 h	ddH ₂ O
MG132	10 µM	2h, 6h, 12h	DMSO

Zusammenfassung der in dieser Arbeit eingesetzten Proteasom-Inhibitoren, deren Endkonzentration, Inkubationsdauer und Negativkontrolle.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Standard-Methoden

3.1.1.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration standen drei Methoden zur Wahl. Die Konzentration rekombinanter Proteine wurde entweder im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel oder mit dem „Micro BCA Protein Assay Reagent“-Kit der Firma Pierce bestimmt. Als Standard diente jeweils eine BSA-Verdünnungsreihe. Der Kit wurde insbesondere zur Normalisierung der Gesamt-Proteinkonzentration von Zell-Lysaten transfizierter Zellen genutzt. Alternativ wurde eine Proteinkonzentration durch Messung der Extinktion bei 280 nm bestimmt ($OD_{280} = 1$ entspricht dabei 1 mg/ml).

3.1.1.2 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)

In der diskontinuierlichen Gel-Elektrophorese (Laemmli, 1970) werden die Proteine im niedrigprozentigen Sammelgel fokussiert und im höherprozentigen Trenngel nach Molekulargewicht aufgetrennt. In dieser Arbeit wurden homogene 8%ige oder 15%ige Trenngele sowie 5-20%ige oder 15-20%ige Gradienten-Trenngele benutzt, die jeweils mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet waren. Nach Polymerisation wurde das Gel in eine Vertikal-Elektrophoresekammer gespannt und deren Reservoirs mit SDS-Elektrophoresepuffer gefüllt. Vor dem Auftragen wurden die Proteinlösungen mit 1x-, 2x- oder 10x-SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte mit 10-20 V/cm.

3.1.1.3 Coomassie-Färbung von Protein-Gelen

Ein SDS-PAGE-Gel wurde zum Färben 15-30 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert, anschließend im Entfärber differenziert und digital dokumentiert.

3.1.2 Expression rekombinanter Proteine in Bakterien

Für die Expression rekombinanter Proteine wurden die entsprechenden Plasmid-Konstrukte in den *E.coli* Stamm BL21(DE3) transformiert. 50 ml LB-Medium (entsprechender Resistenz) wurden mit einer frischen Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Übernacht-Kulturen mit Kanamycin-Resistenz wurden direkt in 1-2 l LB-Medium verdünnt, Übernacht-Kulturen mit Ampicillin-Resistenz wurden zuvor abzentrifugiert, resuspendiert und dann verdünnt. In der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,5$ bis $0,75$) wurde die Protein-Expression mit 1 mM IPTG induziert. Nach 4-5 h bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen, direkt aufgearbeitet oder in entsprechendem Puffer für den folgenden Aufreinigungsschritt resuspendiert und bei -80°C gelagert.

3.1.3 Aufreinigung des rekombinanten SUMO

E. coli BL21(DE3)-Zellen wurden transformiert und bei 37°C schüttelnd inkubiert. 4-5 h nach der Expressionsinduktion mit IPTG wurden die Zellen abzentrifugiert, in 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 50 mM NaCl resuspendiert und nach Zugabe von Prot-I-Mix (je 1 mg/ml Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, hier mit 0,1 mM PMSF) sowie 2 mM DTT mit Ultraschall auf Eis lysiert. Das Zell-Lysat wurde ultra-zentrifugiert (100000 g, 1 h bei 4°C) und der Überstand mit gewaschener, äquilibrierter Sepharose-Q (Sigma-Aldrich) inkubiert, um das Lysat von negativ geladenen Proteinen und DNS zu trennen. Der Überstand mit rekombinantem SUMO wurde in einem 5K Centricon ankonzentriert, bei 4°C mit 100000 g für 1 h ultra-zentrifugiert, gefiltert (Porengröße 0,2 µm, nicht-pyrogen) und über eine analytische Superdex75-FPLC-Säule bzw. analytische oder präparative Superdex200-FPLC-Säule bei 4°C nach dem Stoke'schen Radius der Proteine aufgetrennt (Abb. 4.1 A). Die gesammelten Fraktionen (analytisch: 0,5 ml oder präparativ: 5 ml) wurden in einem 15%igen SDS-PAGE-Gel analysiert (Abb. 4.1 A).

Fractionen mit rekombinantem SUMO wurden vereinigt, als kleine Volumina in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.4.4 Aufreinigung des rekombinanten RanBP2 Δ FG (AS 2553-2838)

Die durch Dr. T. Nishimoto (Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka, Japan) freundlicherweise zur Verfügung gestellte cDNS des humanen RanBP2 (358 kDa) diente als Matrize für die Amplifikation der mit RanGAP1*SUMO1 interagierenden Sequenz (AS 2553-2838; ca. 30 kDa). Das aus der PCR-Reaktion resultierende Fragment wurde in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX-3x kloniert und als GST-Fusionsprotein exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Standard-Protokoll des Herstellers der Glutathion-Sepharose (Glutathion-Sepharose 4B, Amersham Pharmacia Biotech).

In einem Dialyseschritt wurde das GST-RanBP2-Fragment in 1x Transportpuffer überführt und gemäß den Herstellerangaben mit Faktor Xa geschnitten (Novagen, CN Biosciences, Merck). Um alle noch vorhandenen GST-Fragmente zu entfernen, wurde die RanBP2 Δ FG-Präparation (AS 2553-2838) mit Glutathion-Sepharose inkubiert, bevor diese in einem letzten Aufreinigungsschritt einer Gelfiltration über eine analytische Superdex200-FPLC-Säule in 1x Transportpuffer zugeführt wurde.

3.4.5 RanGAP1-Modifikation mit SUMO1 *in vitro*

Für die *in vitro* RanGAP1-Modifikation mit SUMO1 wurde ein Reaktionsmix aus rekombinantem Aos1/Uba2 (E1-Enzym), RanGAP1 (Substrat) und ATP in 1x Transportpuffer mit Tween20 und Ovalbumin angesetzt, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren (Tab. 3.9). Das benötigte Volumen wurde auf Eis aufgetaut, rekombinantes SUMO1 in geeigneter Konzentration hinzugegeben und die Reaktion mit

rekombinantem Ubc9 (E2-Enzym) gestartet. In der Negativkontrolle wurde Ubc9 durch 1x Transportpuffer (Tween20, Ovalbumin) ersetzt.

Tabelle 3.9: *In vitro* SUMOylierung von RanGAP1.

Komponente	Konzentration
Aos1/Uba2	6,8 nM
Ubc9	10 nM
SUMO1 Δ C4-Konstrukt	1 μ M
RanGAP1	135 nM
ATP	1 mM
Ovalbumin Grade VI	0,2 mg/ml
Tween20	0,05% (v/v)
Transportpuffer (Prot-I-Mix, DTT)	1x

Standard-Reaktionsansatz (Σ : 10 μ l) der *in vitro* SUMOylierung von RanGAP1: Komponenten und Konzentrationen.

Je 10 μ l Reaktionsgemisch wurden in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß (Anzahl entsprechend der Zeitpunkte) gegeben und bei 37°C inkubiert. Jede Reaktion wurde mit 10 μ l 2x-SDS-Probenpuffer gestoppt, direkt für 5 min bei 95°C inkubiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die weitere Analyse wurden die Proben in einem 8%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und mit Hilfe der Immunoblot-Analyse ausgewertet.

3.4.6 DeSUMOylierung von RanGAP1*SUMO1 *in vitro*

Für die *in vitro* DeSUMOylierung von RanGAP1*SUMO1 wurde entweder die Aktivität endogener Isopeptidasen (HeLa-Zell-Lysat) oder die Aktivität der SUMO-spezifischen Isopeptidase Ulp1 aus *S. cerevisiae* (als GST-Ulp1) genutzt.

Zunächst wurde, wie unter 3.4.5 beschrieben, eine *in vitro* SUMOylierung durchgeführt. Zur Beendigung der Konjugationsreaktion wurde diese durch Zugabe von Apyrase ATP-depletiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde ebenfalls mit Apyrase ATP-depletiertes HeLa-Zell-Lysat (5 U in 100 μ l Zell-Lysat) zu den Ansätzen gegeben und diese bei 37°C inkubiert. Nach 3 h wurden die Reaktionen mit 2x-SDS-Probenpuffer gestoppt, für 5 min bei 95°C inkubiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Alternativ wurde statt des ATP-depletierten HeLa-Zell-Lysats aufgereinigtes GST-Ulp1 zu den ATP-depletierten Reaktionen gegeben.

3.4.7 Interaktion von RanGAP1*SUMO1 mit rekombinantem RanBP2 Δ FG *in vitro*

Für die Analyse der *in vitro* Interaktion von RanGAP1*SUMO1 mit RanBP2 Δ FG wurde RanGAP1 mit verschiedenen SUMO1-Konstrukten *in vitro* modifiziert. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 100 μ l angesetzt und 30 min bei 30°C inkubiert (Tab. 3.10). Nach Zugabe von 400 μ l Transportpuffer (mit Prot-I-Mix) wurde die Reaktion durch ATP-Depletion über eine Nap5-Säule (Amersham Pharmacia Biotech) gestoppt. Das mit 750 μ l Transportpuffer (mit Prot-I-Mix) eluierte Reaktionsvolumen wurde in einem 3K Centricon (Millipore) auf ein Volumen von 200-250 μ l reduziert und 30 μ l als Inputkontrolle in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Tabelle 3.10: *In vitro* SUMOylierung von RanGAP1 in größerem Maßstab.

Komponente	Konzentration
Aos1/Uba2	0,23 μ M
Ubc9	2,5 μ M
SUMO1 Δ C4-Konstrukt	10 μ M
RanGAP1	7,1 μ M
ATP	1 mM
Ovalbumin Grade VI	0,2 mg/ml
Tween20	0,05% (v/v)
Transportpuffer (Prot-I-Mix, DTT)	1x

Standard-Reaktionsansatz (Σ :100 μ l) der *in vitro* SUMOylierung von RanGAP1 für die Interaktion von RanGAP1*SUMO1 mit RanBP2 Δ FG: Komponenten und Konzentrationen.

Der restliche Ansatz wurde mit 25 μ g rekombinantem RanBP2 Δ FG (AS 2553-2838) versehen und zunächst für 30 min bei 4°C, dann für 30 min bei RT, auf einem Überkopf-Rotator inkubiert. Um eventuelle Präzipitate zu beseitigen, wurde der Ansatz für 15 min bei 4°C mit 15000 g abzentrifugiert. Über eine analytische Superdex200-FPLC-Säule

wurden die Komponenten des Reaktionsgemisches nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Der FPLC-Lauf wurde mit Transportpuffer (Prot-I-Mix, DTT; gefiltert; 4°C) durchgeführt und das Eluat in Fraktionen von 500 µl Volumen gesammelt. Je 400 µl der Fraktionen wurden einer Chloroform-Methanol-Präzipitation unterzogen. Die gefällten Proteine wurden in je 30 µl 1x-SDS-Probenpuffer resuspendiert, für 5 min bei 95°C inkubiert und in einem 5-20%igen SDS-PAGE-Gradienten-Gel aufgetrennt. Die restlichen 100 µl wurden zu drei gleichen Aliquoten in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert, bis diese für die *in vitro* Demodifikation mit Ulp1 benötigt wurden. Welche Fraktion jeweils den für die Demodifikation notwendigen RanGAP1*SUMO1*RanBP2ΔFG-Komplex enthielt, wurde anhand der mit Coomassie-Färbelösung angefärbten Gele bestimmt.

Demodifikation mit Ulp1 *in vitro*

Die jeweiligen Komplex-Fraktionen wurden auf Eis aufgetaut und je 15 µl direkt mit 2x-SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Weitere 15 µl der Fraktionen wurden mit GST-Ulp1 versehen, für 10 min bei 37°C inkubiert, mit 2x-SDS-Probenpuffer gestoppt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Die Ansätze wurden komplett in einem 8%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und mit Hilfe der Immunoblot-Analyse ausgewertet.

3.4.8 Immunologische und immunbiochemische Methoden

3.4.8.1 Immunoblot-Analyse: Proteintransfer auf Membranen (Western-Blot) und Inkubation mit spezifischen Antikörpern

Die in einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennten Proteine wurden entweder im „Semi-dry“- oder „Wet-Blot“-Elektrotransfer auf eine PVDF- oder NC-Membran transferiert. Die PVDF-Membran wurde vorher einige Sekunden in Methanol geschwenkt, die NC-Membran wurde direkt in Standard-Transferpuffer oder Transferpuffer A äquilibriert.

„Semi-dry“-Methode

Auf die Anode der Blot-Apparatur wurden drei Lagen in Standard-Transferpuffer bzw. Transferpuffer A getränktes Whatman 3MM-Papier, die Membran, das Trenngel, zwei weitere Lagen in Standard-Transferpuffer bzw. Transferpuffer B getränktes Whatman 3MM-Papier geschichtet und zuoberst die Kathode platziert. Der Transfer erfolgte für 1 h mit 1,85 mA pro cm² Trenngelfläche.

Für die anschließende Detektion des SUMO1-Modifikationsmusters wurden stets Transferpuffer A und B in Kombination mit einer PVDF-Membran (0,2 µm) verwendet.

„Wet-Blot“-Methode

Der Blot-Aufbau erfolgte wie unter „Semi-dry“-Methode beschrieben. Der Stapel aus Whatman 3MM-Papier, Membran und Trenngel wurde zwischen zwei Filzmatten gelegt, in ein Plastikgitter geklemmt und in den mit Standard-Transferpuffer gefüllten Blot-Tank gehängt. Der Transfer erfolgte für 1 h mit 400 mA oder über Nacht mit 30 V jeweils bei 4°C und unter konstanter Umwälzung des Puffers durch einen Magnetrührer.

Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde eine PVDF-Membran einige Minuten in Amidoschwarz-Färbelösung inkubiert und mit 90% Methanol (v/v), 2% (v/v) Essigsäure differenziert. Eine NC-Membran wurde in Ponceaurot-Färbelösung inkubiert und in 1%iger Essigsäure differenziert.

Für die spezifische Proteindetektion wurde die Membran bei RT 45-60 min in Blockpuffer abgesättigt und anschließend für 1 h mit dem Primär-Antikörper (optimale Verdünnung in Blockpuffer) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T (je 10 min) wurde die Membran mit einem gegen den Primär-Antikörper gerichteten Sekundär-Antikörper (1:10000 in Blockpuffer) für 1 h inkubiert und letztendlich noch viermal mit PBS-T (je 8 min) gewaschen.

Im Fall einer Röntgenfilm-Exposition wurden an Peroxidase gekoppelte Sekundär-Antikörper (1:10000 in Blockpuffer) eingesetzt. Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz mit „Super Signal“ (Pierce). Bei sehr schwachen Signalen wurde die Detektion mit dem „Super Signal West Femto“-System (Pierce) wiederholt.

Für eine Quantifizierung im Phosphoimager (Fuji-Film FLA 2000, Fuji, Tokyo, Japan) wurden an alkalische Phosphatase gekoppelte Sekundär-Antikörper (1:2000 in Blockpuffer) benutzt. Mit dem „ECF Western Blotting Reagenz“ (Amersham Pharmacia Biotech) erfolgte die Detektion über Chemifluoreszenz. Die Auswertung der Signale wurde mit dem Computerprogramm „AIDA Image Analyzer“ (Version 326001) durchgeführt.

Vor erneuter Detektion mit einem anderen Primär-Antikörper wurde die Membran „gestrippt“. Nach drei PBS-T-Waschschritten wurde die Membran 1 h bei 50°C in „Stripping“-Puffer inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten mit PBS-T wurde die Membran erneut in Blockpuffer gesättigt.

3.4.8.2 Herstellung von Antiseren und Affinitätsaufreinigung von Antikörpern

Für die erste Injektion wurde das aus Bakterien aufgereinigte Protein (1 mg/ml) im Verhältnis 1:1 mit TiterMax Gold (CytRxCorporation, Norcross, USA) über eine Doppelkanüle intensiv emulgiert. Die Injektion mit 500 µg Protein erfolgte subkutan. Nach sechs Wochen wurde die Ziege ein zweites Mal gespritzt, wobei TiterMax Gold durch Freund's Adjuvant „incomplete“ (Sigma-Aldrich) ersetzt wurde. Weitere Injektionen erfolgten mit Freund's Adjuvant „incomplete“ in vierwöchigem Abstand. Um jeweils zwei Wochen versetzt wurden der immunisierten Ziege Blutproben entnommen. Die frischen Blutproben wurden 2 h bei RT inkubiert, währenddessen mehrmals mit einem Glasstab gerührt und über Nacht bei 4°C stehengelassen. Das geronnene Blut wurde für 15 min bei 4000 g abzentrifugiert und das Serum bei -20°C gelagert.

Für die Affinitätsaufreinigung des Antikörpers wurden 2-4 mg des Antigens (SUMO1ΔC4) kovalent an Zyanbromid-aktivierte-Sepharose 4B (Sigma-Aldrich) gekoppelt. Die Sepharose wurde vorher zum Quellen für 10 min in 1 mM HCl inkubiert und mit 0,2 M Carbonatpuffer (pH 8,9) gewaschen. Das Antigen wurde über Nacht ebenfalls gegen 0,2 M Carbonatpuffer (pH 8,9) dialysiert. Die Kopplung erfolgte in einem Verhältnis von 0,2-2 mg pro ml Sepharose während einer Inkubation bei RT (1 h) oder bei 4°C (über Nacht). Im Anschluß daran wurde die Sepharose zweimal mit Carbonatpuffer gewaschen und für 1 h in 100 mM Ethanolamin inkubiert, um freie

Bindungsstellen zu blocken. Nach weiteren drei Waschschrritten mit Carbonatpuffer wurde die mit Antigen gekoppelte Sepharose entweder bei 4°C gelagert oder direkt zweimal mit 0,5 M NaCl in 1x PBS gewaschen.

Das aufgetaute Ziegenserum wurde mit 1x PBS 1:1 verdünnt und über Nacht mit dem immobilisierten Antigen auf einem Überkopf-Rotator bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose fünfmal mit 0,5 M NaCl in 1x PBS gewaschen und in eine Säule überführt. Die Elution des Antikörpers erfolgte mit 0,2 M Essigsäure und 0,5 M NaCl (pH 1,8 bis pH 2,8). Die gesammelten Fraktionen wurden sofort neutralisiert (100 µl 1 M Tris/HCl (pH 9,0) zu 500 µl Eluat) und ein Aliquot auf Nitrocellulose getropft, um mit Ponceaurot-Färbung deren Antikörpergehalt zu überprüfen. Die positiven Fraktionen wurden vereinigt, gegen 1x PBS dialysiert und eingengt (UH 100/1 Ultrahülsenapparatur, Schleicher & Schuell, Dassel). Die Antikörperlösung wurde im Verhältnis 1:1 mit 87% Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert.

3.4.8.3 Immunozytologie und Immunfluoreszenz-Mikroskopie (IF)

Adhärente Säugerzellen wurden auf sterilen Deckgläschen in 3,5 cm Zellkulturschalen oder in 1,7 cm² Glas-Objektträger-Kammern ausgesät, transfiziert, weiterkultiviert (24 h, 48 h oder 72 h) und fixiert (Tab. 3.11). Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen entweder mit 3,7%iger FA-Lösung oder 2%iger Para-FA-Lösung für 10 min bei RT fixiert. Nach zwei PBS-Waschschrritten wurden die Zellen mit einer Triton-X-100-Lösung für 5 min auf Eis permeabilisiert. Die Zellen wurden in Blocklösung abgesättigt und anschließend mit dem Primär-Antikörper (Verdünnung in Blocklösung) für 45 min bei RT inkubiert. Nach drei PBS-Waschschrritten folgte die Inkubation mit einem Alexa-, FITC- oder Rhodamin-gekoppelten Sekundär-Antikörper (Verdünnung in Blocklösung) für 45 min bei RT in der Dunkelheit. Zur Anfärbung der DNS wurde der Verdünnung des Sekundär-Antikörpers Hoechst oder DAPI zugesetzt. Abschließend wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen, die Deckgläschen kurz abgetropft und mit „GLOW-Mounting-Medium“ überschichtet auf einen Objektträger gebracht oder im Fall der Objektträger-Kammern mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Auswertung erfolgte nach Polymerisation des Mounting-Mediums an einem Axioskop-II-Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Jena) mit Hilfe der IP Lab Software Scientific Image Processing 3.5.5

(Scanalytics, Inc.) und einer MicroMax CCD Kamera (Princeton Instruments, New Jersey, USA). Die Präparate wurden längerfristig bei 4°C gelagert.

Tabelle 3.11: Immunfluoreszenz-Methoden.

	Deckgläschen	Objektträger-Kammer
Transfektion	Effectene, Superfect	Superfect
Fixierung	Para-FA, FA; 2 ml	Para-FA; im Glas-Tank
PBS Waschschrift	2 ml	im Glas-Tank
Triton-X-100-Lösung	2 ml	0,5 ml
Blocklösung	2 ml	0,25 ml
Primär-Antikörper	85 µl	150 µl
Sekundär-Antikörper	85 µl	150 µl
„Mounting-Medium“	10 µl	5 Tropfen

Zusammenstellung der in der Immunfluoreszenz eingesetzten Reagenzien und deren Volumina für auf Deckgläschen oder in Glas-Objektträger-Kammern kultivierte adhärenente Säugerzellen.

3.4.9 Präparation von Gesamt-Zell-Lysat

Um Gesamt-Zell-Lysat adhärenenter Gewebekulturzellen für SDS-PAGE-Proben zu präparieren, wurden die Zellen direkt in 2x-SDS-Probenpuffer ohne Bromphenolblau aufgenommen und sofort bei 95°C für 5 min inkubiert. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Aliquot abgenommen, die restliche Probe mit DTT versetzt, nochmals bei 95°C inkubiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.4.10 *In vitro* DeSUMOylierung Proteasom-Inhibitor-behandelter 293T-Zellen

293T-Zellen wurden 5-7 h mit Proteasom-Inhibitor MG132 (10 µM) behandelt, im Anschluss daran trypsiniert, für 2 min bei 400 g abzentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Für eine spätere Weiterverarbeitung wurden die Zellen als Pellet auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die *in vitro* DeSUMOylierung wurden die eingefrorenen Zellen aufgetaut und in 1x Transportpuffer (mit Apyrase 5 U/ μ l Puffer, Prot-I-Mix) lysiert, indem sie zehnmal durch eine 0,4 mm Kanüle gespült wurden. Ein Aliquot wurde direkt als t_0 -Wert abgenommen, mit 2x-SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95°C für 5 min inkubiert und eingefroren. Das restliche Zell-Lysat wurde bei 37°C inkubiert und nach 1 h und 3 h ein Aliquot mit 2x-SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95°C für 5 min inkubiert und eingefroren.

3.4.11 Nachweis der Ubiquitinierung von SUMO *in vivo*

Für den Nachweis der Ubiquitinierung von SUMO *in vivo* wurde das His-Ubiquitin-Konstrukt pMT107, welches ein multimeres Vorläufer-Protein mit acht His₆-Ubiquitin-Einheiten kodiert (Treier et al., 1994), in 293T-Zellen überexprimiert. Deren Zell-Lysate wurden einem Ni-NTA-„Pulldown“ unterzogen.

Standardmäßig wurden zwei 10 cm Zellkulturschalen 293T-Zellen (40-60% konfluent) mit je 2 μ g SUMO-Konstrukt und 8 μ g His-Ubiquitin ko-transfiziert (mit Polyfect). Für den Nachweis der Ubiquitinierung von endogenem SUMO1 wurden acht 10 cm Schalen mit 8 μ g His-Ubiquitin pro Schale transfiziert (mit Polyfect). In einigen Experimenten wurden die Zellen nach 20-24 h Transfektion zusätzlich für 5-7 h mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt. Geerntet wurden die Zellen in denaturierendem Puffer1 (pH 8,0) mit 5 mM Imidazol (2 ml pro 10 cm Schale) mit Hilfe eines Zellschabers. Um Proteindegradation und Demodifikation der SUMO- und Ubiquitin-Konjugate zu unterbinden, wurde der Puffer mit Prot-I-Mix und 10 mM Jodoacetamid versetzt. Die Lysate wurden dreimal 30 sec auf Eis mit Ultraschall behandelt und für 30 min mit 100000 g bei 4°C zentrifugiert. Deren Überstände wurden mit gewaschener und äquilibrierter Ni-NTA-Agarose der Firma Qiagen (150 μ l 50%iger Ni-NTA-Lösung pro zwei 10 cm Schalen) in einem 15 ml Falcon-Gefäß auf einem Überkopf-Rotator über Nacht bei 4°C inkubiert. In den folgenden Waschsritten wurden die Zell-Lysate, wie beschrieben (Treier et al., 1994), von denaturierenden zu nativen Bedingungen umgepuffert. Alle Puffer enthielten Prot-I-Mix und 1 mM β -Mercaptoethanol.

Der Puffer des ersten, vierten, fünften und siebten Waschschriffs sowie der Elution wurde jeweils mit 10 mM Jodoacetamid versetzt. Mit dem letzten Waschschriff wurde die Ni-NTA-Agarose in ein Micro Bio-Spin® Chromatographie-Säulchen der Firma BioRad überführt. Die Elution erfolgte mit 1 ml Puffer2 (pH 8,0) und 250 mM Imidazol pro Säulchen. Das Eluat wurde mit Puffer2 bis auf eine Konzentration von 6,25 mM Imidazol verdünnt (Prot-I-Mix, 1 mM β -Mercaptoethanol) und ein zweites Mal mit gewaschener, äquilibrierter Ni-NTA-Agarose der Firma Qiagen (70 μ l 50%iger Ni-NTA-Lösung pro zwei 10 cm Schalen) in einem 50 ml Falcon-Gefäß für 1,5 h bei RT oder einige Stunden bei 4°C auf einem Überkopf-Rotator inkubiert. Die Ni-NTA-Agarose wurde für 2 min mit 350 g abzentrifugiert und in 1 ml Puffer2 mit 10 mM Imidazol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Ni-NTA-Agarose in 150 μ l 2x-SDS-Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95°C inkubiert und mit 15000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.4.11.1 Ulp1-Behandlung der an Ni-NTA-Agarose gebundenen His-Ubiquitin-Proteine *in vitro*

Für die *in vitro* Ulp1-Behandlung wurden die mit His-Ubiquitin modifizierten Proteine einer *in vivo* Ubiquitinierung (3.4.11) - noch an Ni-NTA-Agarose gebunden - in 1x Transportpuffer (Prot-I-Mix mit PEFA, β -Mercaptoethanol) überführt. Nach vier Waschschriffen (1x Transportpuffer) wurde die Ni-NTA-Agarose in zwei gleiche Volumina geteilt, so dass letztendlich 30 μ l 50%iger Ni-NTA-Lösung mit 30 μ l Transportpuffer versetzt waren (gilt für Standard-Ansatz aus zwei 10 cm Zellkulturschalen 293T-Zellen). Eines der beiden Ni-NTA-Volumina wurde mit GST-Ulp1 versetzt, das andere mit Transportpuffer (Kontrolle). Unter mehrmaligem Aufwirbeln der Ni-NTA-Agarose wurden die Ansätze 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlung der Ansätze auf Eis wurden diese mit 350 g bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 2x-SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95°C für 5 min inkubiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die an der Ni-NTA-Agarose gebundenen Proteine wurden drei weiteren Waschschriffen (1x Transportpuffer) unterzogen, nach

dem letzten Waschschrift mit 150 μ l 2x-SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95°C für 5 min inkubiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.4.12 *In vitro* SUMOylierung von RanGAP1 als Konkurrenz von SUMO1-Wildtyp mit SUMO1-Mutanten in der FRET-Analyse

Der Reaktionsansatz für eine FRET-Messung (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET) der RanGAP1-Modifikation mit SUMO1 *in vitro* enthielt die Komponenten der RanGAP1-Modifikation mit SUMO1 *in vitro* (3.4.5). Statt RanGAP1 und SUMO1 wurden jedoch die Fluorophoren-Fusionsproteine CFP-RanGAP1tail (Donor) und YFP-SUMO1 Δ C4 (Akzeptor) eingesetzt. Ein Reaktionsmix (Prämix) aus rekombinantem Aos1/Uba2 (E1-Enzym), Ubc9 (E2-Enzym), CFP-RanGAP1tail (Substrat) und YFP-SUMO1 Δ C4 wurde in Transportpuffer mit Tween20 und Ovalbumin hergestellt, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren (Tab. 3.12). Das benötigte Prämix-Volumen wurde auf Eis aufgetaut und kompetitierend ein nicht-fluoreszierendes SUMO1 Δ C4-Konstrukt hinzugegeben. Für eine parallele Messung der Konkurrenz verschiedener SUMO1 Δ C4-Konstrukte wurden die rekombinanten SUMO1-Proteine im Coomassie-Gel abgeglichen und von jedem eine zehnstufige Verdünnungsreihe (4 μ M Start-Konzentration, 1:1 Verdünnungsschritte) in Transportpuffer (Prot-I-Mix, DTT) angesetzt. Je 20 μ l Prämix wurden mit 5 μ l einer SUMO1-Verdünnungsstufe direkt in der Vertiefung einer „Fluorescence Reader“-Platte gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 μ l ATP (Endkonzentration: 1 mM) gestartet und im Fluoreszenzspektrometer (Fluoroskan *Ascent* FL Type 374, LabSystems, Finnland) bei 30°C inkubiert. Die Extinktionswerte für CFP (485 nm) und YFP (527 nm) wurden alle zwei Minuten gemessen und aufgezeichnet. Die Analyse der gesammelten Daten (Dauer der Messung 100 Minuten) wurde mit dem Computerprogramm Fluoroskan *Ascent* FL der Firma LabSystems durchgeführt.

Als Kontrolle der CFP-RanGAP1tail-Modifikation wurden nach der Messung Aliquots der Reaktionen mit 2x-SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C inkubiert, im 8%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und in der Immunoblot-Analyse ausgewertet.

Tabelle 3.12: Standard-Reaktionsansatz (Σ :20 μ l) für die SUMOylierung von RanGAP1 als Konkurrenz von SUMO1-Wildtyp mit SUMO1 Δ C4-Konstrukten in der FRET-Analyse.

Komponente	Konzentration
Aos1/Uba2	8 nM
Ubc9	10 nM
YFP-SUMO1 Δ C4	1 μ M
CFP-RanGAP1tail	100 nM
Ovalbumin Grade VI	0,2 mg/ml
Tween20	0,05% (v/v)
Transportpuffer (Prot-I-Mix, DTT)	1x
ATP	1 mM
SUMO1 Δ C4-Konstrukt	Start-Konzentration: 4 μ M

4 Ergebnisse

Die allgemeine Fragestellung nach Mechanismus und Funktion der reversiblen SUMOylierung war Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführte SUMO1-Mutagenese. Die Analyse der Mutanten erfolgte in zwei parallelen Ansätzen:

- 1.) Deletionsmutanten des SUMO-spezifischen N-Terminus und eine Mutante einer gegenüber Ubiquitin stark abweichenden C-terminalen Sequenz wurden mit diversen biochemischen und zellbiologischen Verfahren untersucht (4.2.1-4.2.6).
- 2.) Eine größere Anzahl von Mutanten mit Mutationen der Oberflächen-exponierten Aminosäure-Reste wurde in der transienten Transfektion bezüglich ihres SUMOylierungsmusters sowie mit der Immunfluoreszenz-Mikroskopie bezüglich ihrer zellulären Lokalisation analysiert (4.3.1-4.3.3).

4.1 Herstellung von Reagenzien

Für die geplante Analyse wurde zunächst ein Verfahren zur Expression und Aufreinigung von SUMO-Proteinen etabliert und ein SUMO1-spezifischer Antikörper generiert. Außerdem wurde ein rekombinantes Fragment von RanBP2, einem Protein der zytoplasmatischen Filamente des Zellkernporenkomplexes (2.3.4) benötigt, welches in Zusammenarbeit mit Dr. A. Gast kloniert, exprimiert und aufgereinigt wurde.

4.1.1 Expression und Reinigung nicht-markierter SUMO1-Proteine

Für die biochemische Analyse sowie für die Generierung des SUMO1-spezifischen polyklonalen Antikörpers wurden nicht-markierte rekombinante SUMO1-Proteine in größerem Maßstab benötigt. Ausgehend von GST-SUMO1(AS 1-101) im bakteriellen Expressionsvektor pGEX2T wurden zunächst die Konstrukte SUMO1WT Δ C4, Δ N10 Δ C4 und Δ N21 Δ C4 mittels PCR-Amplifikation und Ligation in den bakteriellen Expressionsvektor pET11a kloniert. Weitere SUMO1-Mutanten wurden ausgehend von

SUMO1 Δ C4 mit Hilfe der gerichteten Mutagenese in einer PCR-Reaktion hergestellt. Δ C4-Konstrukte entsprechen der C-terminal prozessierten und somit konjugierbaren Form des humanen SUMO1, die C-terminal mit dem für die Konjugation essentiellen GG-Motiv endet.

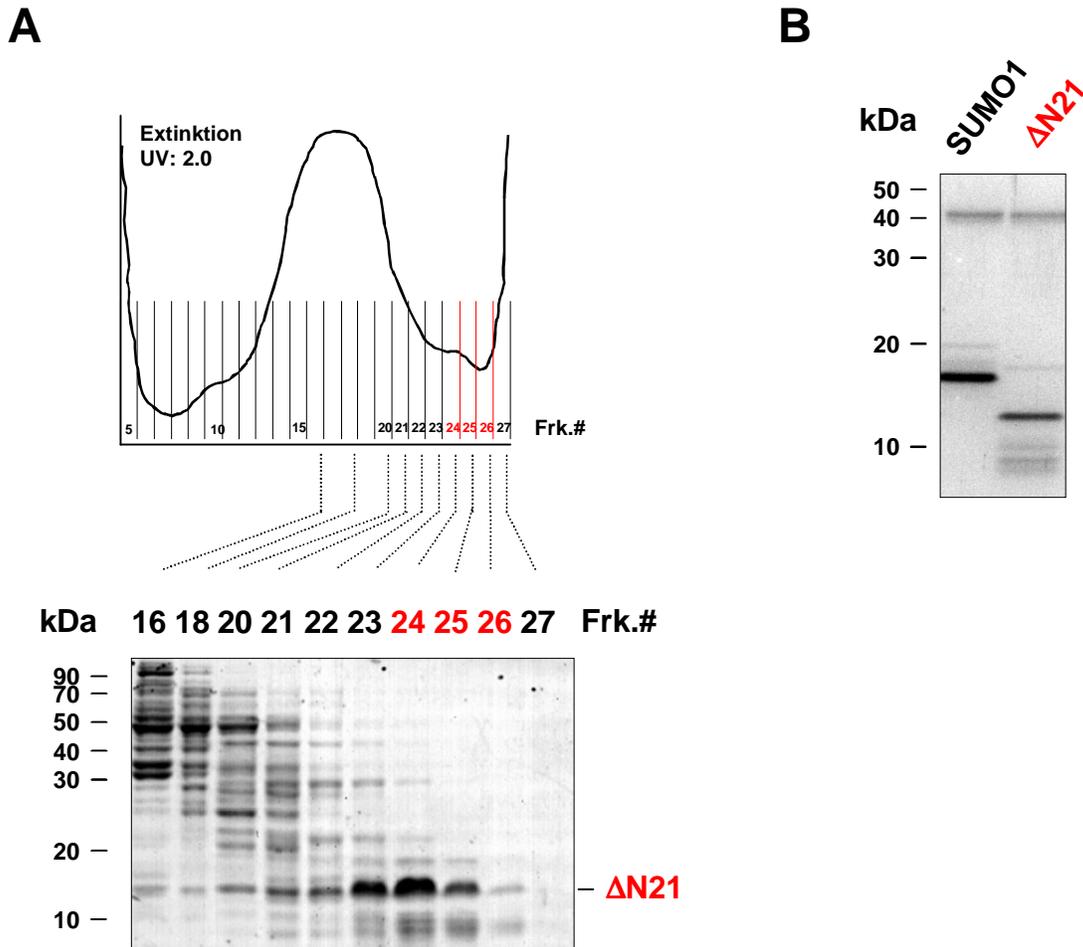


Abbildung 4.1: Aufreinigung rekombinanter SUMO-Proteine.

(A) Säulenelutionsprofil der Aufreinigung rekombinanten SUMO1 Δ N21 Δ C4 über eine analytische Superdex200-FPLC-Säule und Coomassie-Gel der Fraktionen 16, 18 und 20-27.

(B) Um die Proteinmengen verschiedener SUMO-Präparationen abzugleichen, wurden diese in einem 15%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt und mit der Software „Image Master 1D Elite Version 3.00“ (Amersham Pharmacia Biotech) ausgewertet. (SUMO1, Δ N21: Tab. 4.1)

Nach Austesten verschiedener Inkubationstemperaturen und Expressionszeiten wurde die Expression in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen bei 37°C und eine IPTG-Induktionsdauer von 4-5 h als optimal herausgearbeitet. Die Zell-Lyse auf Eis mit Ultraschall erfolgte unter

den Pufferbedingungen, die für den an eine Ultra-Zentrifugation anschließenden Aufreinigungsschritt über einen Anionen-Austauscher (Q-Sepharose) optimiert worden waren (50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 50 mM NaCl). In einer Gelfiltration über eine analytische Superdex75-FPLC-Säule bzw. präparative Superdex200-FPLC-Säule wurden die in Lösung gebliebenen Proteine nach ihrem Stoke'schen Radius aufgetrennt (Abb. 4.1 A). Dieses Aufreinigungsprotokoll lieferte bis zu 2 mg SUMO-Protein pro Liter Bakterienkultur von 80-90%iger Reinheit. Diese Methode wurde als Standard-Aufreinigung bakteriell exprimierter SUMO-Proteine in der Arbeitsgruppe etabliert.

Aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichts der N-terminalen SUMO1-Deletionsmutanten und des variierenden Verunreinigungsgrades durch bakterielle Proteine von Präparation zu Präparation, wurden die Konzentrationen der jeweils im Experiment benötigten SUMO1-Präparationen anhand eines Coomassie-Gels abgeglichen (Abb. 4.1 B). Die Auswertung erfolgte mit der Software „Image Master 1D Elite Version 3.00“ (Amersham Pharmacia Biotech).

4.1.2 Herstellung und Charakterisierung des polyklonalen SUMO1-spezifischen Antikörpers

Für die SUMO1-Struktur-/Funktionsanalyse war es erforderlich neben dem kommerziell zu beziehenden monoklonalen Antikörper α GMP1 einen polyklonalen Antikörper zur Verfügung zu haben. Dieser wurde mit rekombinantem nicht-markiertem SUMO1 Δ C4 als Antigen in einer Ziege hergestellt. Die erste Injektion erfolgte mit TiterMax Gold im Verhältnis 1:1 mit dem aus Bakterien aufgereinigten SUMO1 Δ C4 (1mg/ml). Nach sechs Wochen wurde die Immunisierung in vierwöchigem Abstand mit Freund's Adjuvant „incomplete“ fortgesetzt.

Aus dem Ziegen-Antiserum wurde der SUMO1-spezifische Antikörper über Affinitätsaufreinigung gewonnen. Das mit 1x PBS verdünnte Serum (im Verhältnis 1:1) wurde mit dem an Zyanbromid-aktivierte-Sepharose gebundenen Antigen (SUMO1 Δ C4) über Nacht inkubiert. Nach Waschschritten mit 0,5 M NaCl in 1x PBS erfolgte die Elution über eine Säule mit 0,2 M Essigsäure und 0,5 M NaCl (pH 1,8 bis pH 2,8) und

sofortige Neutralisation mit 1 M Tris/HCl (pH 9,0). Die gegen 1x PBS dialysierte Antikörper-Lösung wurde ankonzentriert, mit Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert. Die Qualität des gereinigten Antikörpers wurde anhand einer Verdünnungsreihe im Immunoblot überprüft. Abbildung 4.2 zeigt die beiden Antikörper αGMP1 (monoklonal) und αS1 (polyklonal) im Vergleich. SUMO1-Konjugate des HeLa-Zell-Lysats konnten mit αGMP1 erheblich besser detektiert werden als mit αS1 (nur für αGMP1 gezeigt, Abb. 4.2 A).

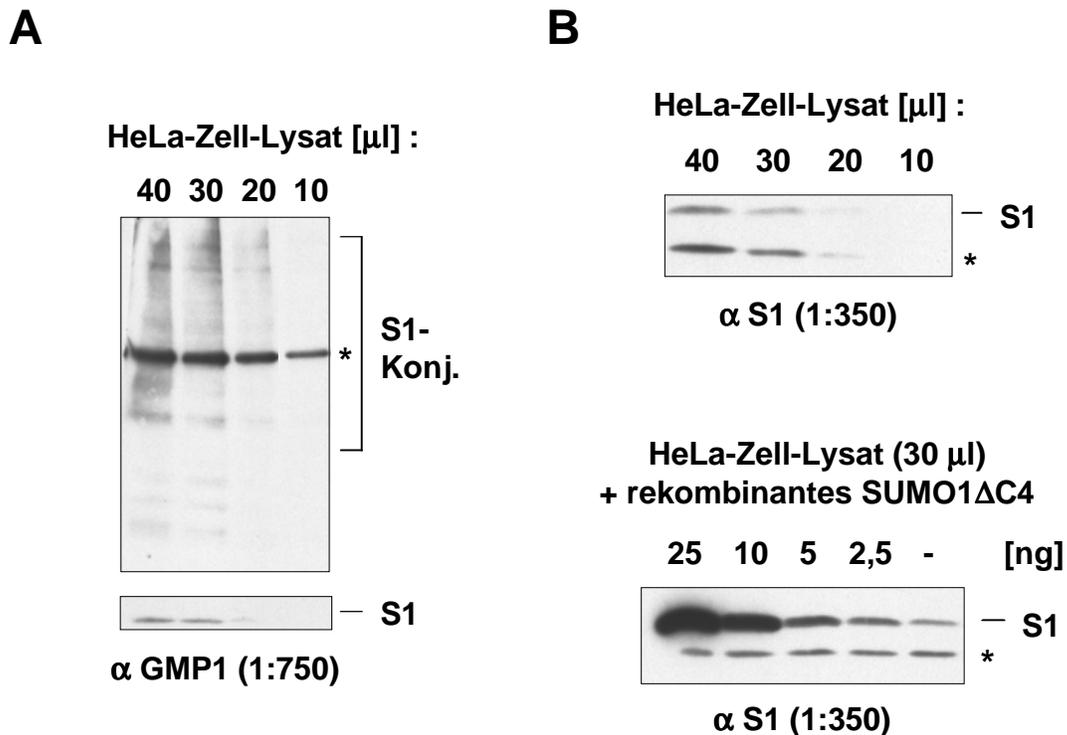


Abbildung 4.2: Antikörper-Titration zur optimalen Detektion von endogenem SUMO1 (nicht-konjugiert und konjugiert).

(A) Die angegebenen Mengen HeLa-Zell-Lysat wurden in einem 15%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und mit dem monoklonalen Antikörper αGMP1 (1:750) immunologisch detektiert. Der sekundäre Antikörper αIgG /Maus wurde 1:10000 eingesetzt.

(B) Die angegebenen Mengen HeLa-Zell-Lysat oder 30 μl HeLa-Zell-Lysat mit rekombinantes S1 ΔC4 wurden in einem 15%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und mit dem polyklonalen, affinitätsgereinigten Ziegen-Antikörper αS1 (1:350) immunologisch detektiert. Der sekundäre Antikörper αIgG /Ziege wurde 1:10000 verdünnt eingesetzt. Bemerkung: αS1 hauptsächlich gegen SUMO1-C-Terminus gerichtet.

(*: kreuzreagierende Bande)

Im Gegensatz dazu wurde nicht-konjugiertes oder rekombinantes SUMO1 (nur für α S1 gezeigt / Abb.4.2 B) von beiden Antikörpern in den jeweils optimalen Verdünnungen gleichermaßen detektiert. Eine Erklärung dafür wurde im Laufe der Arbeit gefunden. Der polyklonale Antikörper α S1 scheint hauptsächlich ein C-terminales Epitop zu erkennen, welches in Konjugaten maskiert ist. Dementsprechend wurde der polyklonale Antikörper α S1 in der Immunoblot-Analyse vorwiegend zur Detektion des nicht-konjugierten SUMO1 eingesetzt.

4.1.3 Expression und Reinigung von RanBP2 Δ FG

Eines der biochemischen Verfahren für die Analyse der N-terminalen Deletionsmutanten war die RanGAP1*SUMO1-Interaktion mit RanBP2 Δ FG (4.2.4). Hierfür wurde die RanGAP1*SUMO1-Interaktion vermittelnde Sequenz (ca. 30 kDa) des humanen RanBP2 (358 kDa) als rekombinantes Fragment benötigt. In Zusammenarbeit mit Dr. A. Gast wurde dieses Fragment (AS 2553-2838), ausgehend von der durch Dr. T. Nishimoto freundlicherweise zur Verfügung gestellten cDNS des humanen RanBP2, in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert und als GST-Fusionsprotein bei 37°C exprimiert. Das über Glutathion-Sepharose angereicherte GST-RanBP2 Δ FG wurde mit Faktor Xa geschnitten und die Präparation nochmals mit Glutathion Sepharose inkubiert, um die noch vorhandenen GST-Fragmente zu entfernen. Mit Hilfe der über eine präparative Superdex200-FPLC-Säule erfolgten Gelfiltration wurde die RanBP2 Δ FG-Präparation in einem letzten Schritt von eventuellen Degradationsprodukten und bakteriellen Proteinen gereinigt.

4.2 Biochemische und zellbiologische Analyse von N- und C-terminalen SUMO1-Mutanten

4.2.1 Etablierung von Mutanten für bakterielle und zelluläre Expression

Innerhalb der Gruppe Ubiquitin-ähnlicher Proteine ist die unstrukturierte N-terminale Sequenz das hervorstechende Merkmal der SUMO-Protein-Familie. Die Funktion dieser Domäne ist aber unbekannt (2.3.1, Abb. 2.3). Um die daraus resultierende Frage nach der Funktion dieses Strukturmerkmals beantworten zu können, wurden N-terminale SUMO1-Deletionsmutanten (SUMO1 Δ N10, - Δ N21) hergestellt und in einer Struktur-/Funktionsanalyse charakterisiert.

Ergänzend zu der Analyse der N-terminalen Sequenz wurde die C-terminale Sequenz QEQ (AS 92-94) anhand einer Tripel-Mutation (T-ubi) mit Austausch zu den analogen Aminosäure-Resten in Ubiquitin (Q92L/E93R/Q94L) untersucht. Dabei wurden die zwei polaren Aminosäure-Reste (Q) durch neutrale (L) ersetzt und die saure Seitenkette (E) gegen eine hydrophobe ausgetauscht (R). Ein oder zwei polare Aminosäure-Reste sind an dieser C-terminalen Position für die SUMO-Proteine charakteristisch (Abb. 2.2). Für den Aminosäure-Rest R72 in Ubiquitin ist die Beteiligung an der Interaktion mit dem Ubiquitin-E1-Enzym schon lange bekannt (Burch und Haas, 1994). SUMO1-T-ubi wurde mit SUMO1 Δ C4/pET11a als Matrize in einer gerichteten *in vitro* Mutagenese hergestellt.

Tabelle 4.1: SUMO1-Konstrukte für die bakterielle und zelluläre Expression.

SUMO1-Mutante	Abkürzung	N-Terminus	C-Terminus
S1 (AS 1-97)	WT	MSDQEAKPSTEDLGDKKEGEYIKL...	...EVYQEQTGG
S1 (AS 11-97)	Δ N10	EDLGDKKEGEYIKL...	...EVYQEQTGG
S1 (AS 22-97)	Δ N21	IKL...	...EVYQEQTGG
S1/Q92L/E93R/Q94L Δ C4	T-ubi	MSDQEAKPSTEDLGDKKEGEYIKL...	...EVYLRRTGG

N- und C-terminale Aminosäure-Sequenzen des SUMO1-Wildtyps (WT) und der SUMO1-Mutanten (Δ N10, Δ N21, T-ubi) für die ausführliche biochemische und zellbiologische Analyse. (S1: SUMO1)

4.2.2 *In vitro* SUMOylierung

Für eine erste Charakterisierung wurden die SUMO1-Mutanten (Δ N10, Δ N21, T-ubi) auf ihre Fähigkeit der SUMOylierung getestet. Hierfür wurden zwei verschiedene *in vitro* Systeme genutzt, in denen jeweils RanGAP1 als Substrat eingesetzt wurde.

- 1.) In der *in vitro* SUMOylierung wird ein Reaktionsansatz entweder mit den bakteriell exprimierten Proteinen Aos1/Uba2 (E1-Enzym), Ubc9 (E2-Enzym), RanGAP1 (Substrat) und SUMO1 oder mit HeLa-Zell-Lysat (endogene Mengen E1-, E2-Enzym, E3-Ligasen, Substrate) und SUMO1 auf Eis gemischt, bevor die Reaktion mit ATP bei 37°C gestartet wird. Die Auswertung erfolgt über Auftrennung der Ansätze in einem SDS-PAGE-Gel und anschließender Immunoblot-Analyse. Für RanGAP1 als Substrat wird anhand des 20kDa-Größenunterschieds von RanGAP1 und RanGAP1*SUMO1 quantifiziert, für HeLa-Zell-Lysat als Substratquelle wird anhand der gebildeten SUMO1-Konjugate im hochmolekularen Bereich ausgewertet. Diese Methode wurde unter Mithilfe von U. Gärtner (Aufreinigung der E1-, E2-Enzyme und RanGAP1; Austesten der Konditionen) in unserem Labor etabliert.
- 2.) Die zweite Methode der *in vitro* SUMOylierung basiert auf einer FRET-Analyse (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET) zwischen den beiden fluoreszierenden Proteinen CFP (*cyan fluorescence protein*) und YFP (*yellow fluorescence protein*). FRET findet statt, wenn das Absorptionsspektrum des Akzeptorproteins (YFP) mit dem Emissionsspektrum des Donorproteins (CFP) überlappt (Abb. 4.3 A). Diese Standard-Reaktion von CFP-RanGAP1tail (Donor) mit YFP-SUMO1 Δ C4 (Akzeptor) wurde im Labor von U. Gärtner etabliert (Abb. 4.3 B). Die Möglichkeit parallel angesetzte Titrationsreihen mit einer großen Anzahl an Zeitmesspunkten zu kombinieren führt zu einer Quantifizierung von hoher Genauigkeit.

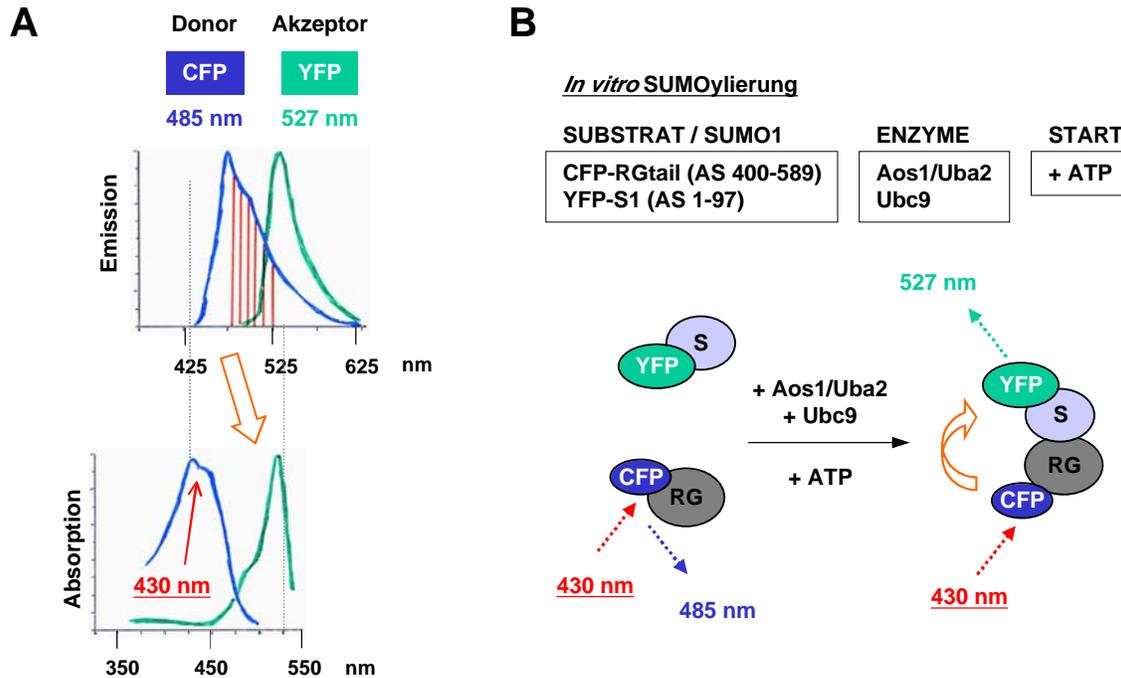


Abbildung 4.3: *In vitro* SUMOylierung von RanGAP1 in der FRET-Analyse.

(A) Anregungs- und Emissionsspektren der beiden Fluorophore CFP/Donor (430 nm; 485 nm) und YFP/Akzeptor (485 nm; 527 nm).

(B) Schematische Darstellung der *in vitro* SUMOylierung von RanGAP1 in der FRET-Analyse. Die rekombinanten Proteine CFP-RanGAP1tail (AS 400-589) (240 ng), Aos1/Uba2 (30 ng), Ubc9 (1 ng) und YFP-SUMO1 Δ C4 (AS 1-97) (240 ng) werden auf Eis gemischt. Die mit ATP gestartete Reaktion wird im Fluoreszenzspektrometer bei 30°C inkubiert und währenddessen mit 430 nm angeregt. Die Emissionsspektren von CFP (485 nm) und YFP (527 nm) werden im Abstand von 2 min aufgezeichnet.

In vitro SUMOylierung von RanGAP1

Für die *in vitro* SUMOylierung wurden SUMO1 Δ N10, - Δ N21, -T-ubi und -WT bakteriell exprimiert, biochemisch aufgereinigt und deren Konzentrationen über ein Coomassie-Gel abgeglichen (4.1.1, Abb. 4.1). Die *in vitro* SUMOylierung wurde mit den vier SUMO1-Konstrukten parallel über einen bestimmten Zeitverlauf durchgeführt. In der anschließenden Immunoblot-Analyse mit α RanGAP1 wurden RanGAP1*SUMO1 und RanGAP1 detektiert (Abb. 4.4). Beide N-terminalen Deletionsmutanten zeigten im Vergleich zu der SUMOylierungskinetik des Wildtyps keine signifikanten Unterschiede. Dies lässt vermuten, dass der N-Terminus in SUMO1 für die SUMOylierung - zumindest des GTPase Ran aktivierenden Proteins RanGAP1 - unter den gewählten Bedingungen

nicht essentiell ist. Die C-terminale Tripel-Mutante (T-ubi) zeigte hingegen im Vergleich zu SUMO1WT eine erheblich verlangsamte SUMOylierungskinetik. Dies deutet auf eine reduzierte Enzym-Interaktion infolge des Austausches zu den analogen AS des Ubiquitins (Q92L/E93R/Q94L).

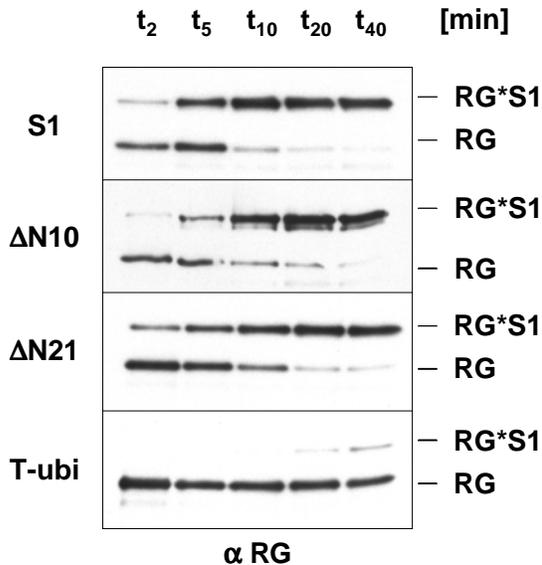


Abbildung 4.4:

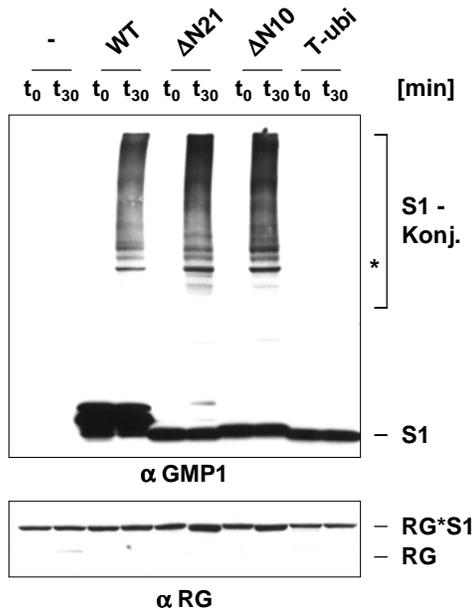
***In vitro* SUMOylierung von RanGAP1.**

Rekombinantes RanGAP1 (AS 1-589) (225 ng) wurde mit rekombinantem E1-Enzym (20 ng), E2-Enzym (100 ng) und je einem SUMO1-Konstrukt (100 ng) bei 37°C inkubiert. Die mit ATP (1 mM) gestartete SUMOylierung wurde zu den angegebenen Zeitpunkten (min) mit 2x-SDS-Probenpuffer gestoppt und in der Immunoblot-Analyse mit α RanGAP1 nachgewiesen.

(**RG*S1**: RanGAP1*SUMO1-Konstrukt; **RG**: RanGAP1; **S1**: SUMO1; **Δ N10**, **Δ N21**, **T-ubi**: Tab. 4.1)

In vitro SUMOylierung mit HeLa-Zell-Lysat (Substrate) und endogenen E3-Ligasen

Die bislang durchgeführte *in vitro* SUMOylierung beschränkte sich auf RanGAP1 als Substrat. Um die SUMOylierungseigenschaften der SUMO1-Mutanten zum einen anhand eines erweiterten Substratspektrums, zum anderen unter Einfluss endogener SUMO-E3-Ligasen zu analysieren, wurde eine *in vitro* SUMOylierung mit HeLa-Zell-Lysat angesetzt. Die SUMO1-Proteine SUMO1WT, - Δ N10, - Δ N21 und -T-ubi wurden jeweils mit HeLa-Zell-Lysat versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Das gleiche Volumen HeLa-Zell-Lysat ohne rekombinantes SUMO1 wurde parallel als Kontrolle inkubiert. Start- und Endpunkt der Reaktionen wurden in einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und in der Immunoblot-Analyse mit α GMP1 die SUMO1-Konjugate detektiert (Abb. 4.5).

**Abbildung 4.5:*****In vitro* SUMOylierung mit HeLa-Zell-Lysat als Substratquelle.**

Rekombinantes SUMO1 (100 ng) wurde mit HeLa-Zell-Lysat für 30 min bei 37°C inkubiert. Start- und Endpunkt der Reaktionen wurden in einem 5-20%igen SDS-PAGE-Gradienten-Gel aufgetrennt und in der Immunoblot-Analyse mit α GMP1 und α RanGAP1 immunologisch detektiert.

(-: Kontrolle ohne rekombinantes SUMO1; **W T**, **S1**: SUMO1; **Δ N21**, **Δ N10**, **T-ubi**: Tab. 4.1; **R G**: RanGAP1; *: RanGAP1*SUMO1)

Die N-terminalen Mutanten Δ N10 und Δ N21 zeigten dem Wildtyp entsprechende SUMOylierungsmuster. Somit scheinen die Substratspektren der Mutanten mit dem des Wildtyps identisch zu sein und die Deletion des N-Terminus scheint keine Auswirkung auf die SUMO-E3-Ligase-Aktivitäten zu haben. Für die C-terminale Tripel-Mutante T-ubi wurden unter diesen Bedingungen keine SUMO1-Konjugate detektiert. Dies bedeutet, dass der Defekt in der SUMOylierungsfähigkeit Substrat-unabhängig ist.

In vitro SUMOylierung von RanGAP1 als Konkurrenz von SUMO1-Wildtyp mit SUMO1-Mutanten in der FRET-Analyse

Mit dieser FRET-Methode wird die Fähigkeit verschiedener SUMO1-Mutanten mit YFP-SUMO1 zu konkurrieren analysiert. Gemessen wird die *in vitro* SUMOylierung von RanGAP1 (Standard-Reaktion, Abb. 4.3 B) mit ansteigenden Mengen von nicht-fluoreszierendem SUMO1. Eine Inhibition der Bildung von CFP-RanGAP1tail*YFP-SUMO1-Konjugaten und somit des FRETs wird entweder durch Bildung von CFP-RanGAP1tail*SUMO1-Konjugaten verursacht oder resultiert aus der Inhibition von Teilreaktionen der SUMOylierung (E1- oder E2-Enzym-Thioester-Bildung), verursacht durch das nicht-fluoreszierende SUMO1-Konstrukt.

Bei vollständiger Konkurrenz gleicht das Emissionsspektrum der Kontrolle (-ATP), findet keine Konkurrenz durch das nicht-fluoreszierende SUMO1 statt, gleicht das Emissionsspektrum der Standard-Reaktion.

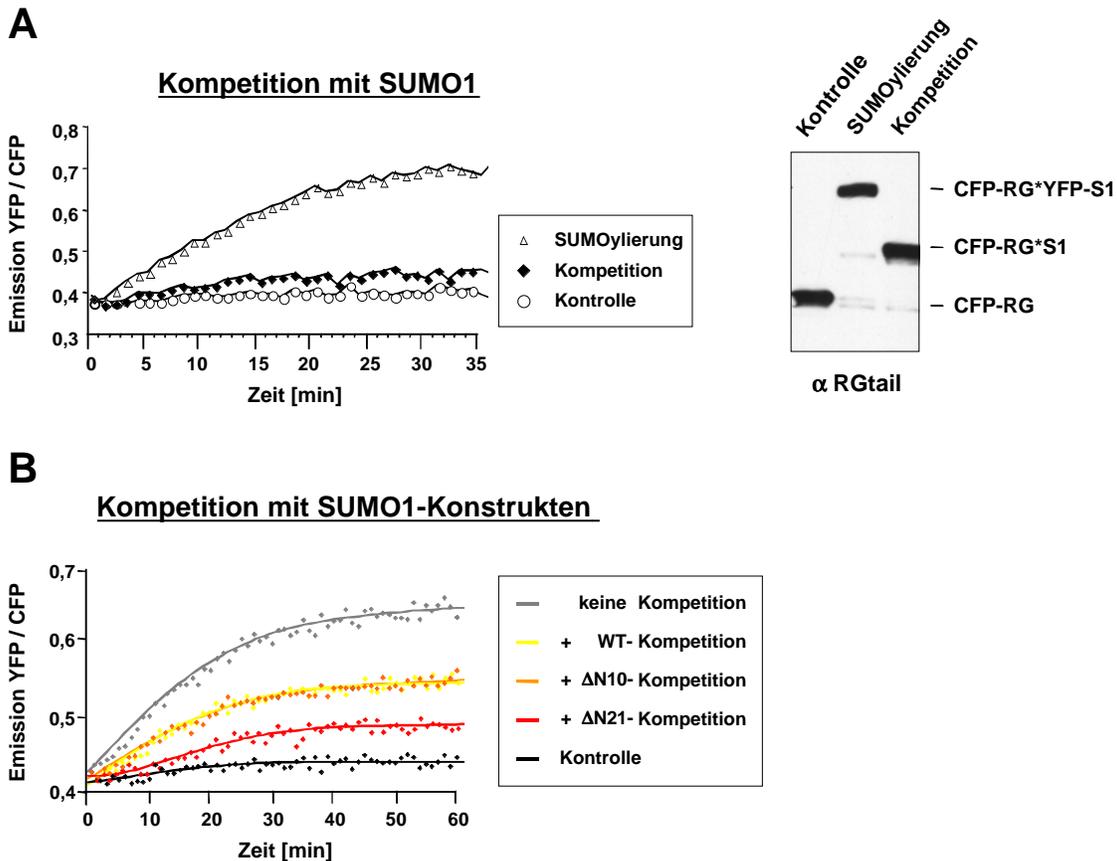


Abbildung 4.6: *In vitro* SUMOylierung von RanGAP1 als Konkurrenz von YFP-SUMO1WT mit den nicht-fluoreszierenden SUMO1-Konstrukten WT, ΔN10 und ΔN21 in der FRET-Analyse.

(A) FRET-Analyse (Diagramm der Emissionsquotienten) und Immunoblot-Analyse der *in vitro* SUMOylierung von RanGAP1 als Konkurrenzstudie. **SUMOylierung:** Reaktion Abb.4.3 B; **Konkurrenz:** SUMOylierung mit Zusatz nicht-fluoreszierenden SUMO1WTΔC4; **Kontrolle:** SUMOylierung ohne ATP. In der Immunoblot-Analyse mit αRGtail wurde die SUMOylierung von CFP-RanGAP1tail in der Konkurrenzreaktion überprüft.

(B) Diagramm der Emissionsquotienten je einer Verdünnungsstufe der konkurrierenden SUMO1-Konstrukte (ΔN10ΔC4, ΔN21ΔC4, WTΔC4) in der *in vitro* SUMOylierung von RanGAP1.

(CFP-RG: CFP-RanGAP1tail (AS 400-589); YFP-S1: YFP-SUMO1ΔC4 (AS 1-97); S1: SUMO1ΔC4; **keine Konkurrenz:** SUMOylierung Abb.4.6 B; +: Konkurrenz mit angegebenem SUMO1-Konstrukt; WT: SUMO1; ΔN10, ΔN21: Tab. 4.1; **Kontrolle:** SUMOylierung ohne ATP)

Die Komponenten der *in vitro* SUMOylierung wurden zunächst auf Eis gemischt und die Reaktion kurz vor Beginn der Messung im Fluoreszenzspektrometer (Fluoroskan *Ascent* FL Type 374, LabSystems, Finnland) mit ATP gestartet. Während der Inkubation bei 30°C wurde CFP-RanGAP1tail (AS 400-589) mit 430 nm angeregt. In ausreichend geringem Abstand, als CFP-RanGAP1tail*YFP-SUMO1, wurde YFP-SUMO1 (AS 1-97) durch die Emission des CFP angeregt. Im Abstand von 2 min wurden die Emissionsspektren beider Fluorophoren (CFP: 485 nm, YFP: 527 nm) aufgezeichnet (Abb. 4.3) und deren Quotient (527 nm/485 nm) mit der Zunahme der Konjugate direkt korreliert. Abbildung 4.6 A zeigt als Auswertungsbeispiel ein Diagramm, in dem die Daten einer optimalen SUMOylierung, einer starken Kompetition und einer Kontrolle (-ATP) aufgetragen sind. Durch die in der Kompetition gewählten Menge nicht-fluoreszierenden SUMO1 wird der Anstieg des Emissionsquotienten fast auf das Niveau der Kontrolle reduziert. Die Immunoblot-Analyse der abgelaufenen Reaktionen zeigt, dass in der Kompetitionsreaktion die Modifikation von CFP-RanGAP1tail mit nicht-fluoreszierendem SUMO1 Δ C4 stattgefunden hat.

Im Diagramm in Abbildung 4.6 B sind die Emissionsquotienten nur einer Verdünnungsstufe der Konstrukte WT, Δ N10 und Δ N21 aufgetragen. Die Kompetitionsstärke der N-terminalen Mutante Δ N10 ist mit der des Wildtyps identisch, die der Deletionsmutante Δ N21 weicht mit einer Tendenz zu stärkerer Kompetition geringfügig ab. Dieser Effekt wurde noch nicht auf Signifikanz überprüft.

Abbildung 4.7 A zeigt für SUMO1-T-ubi Δ C4 sowie für SUMO1WT Δ C4, die Emissionsquotienten vier verschiedener Verdünnungsstufen in je einem Diagramm. Die Kompetitionsstärke dieser Mutante ist so gering, dass deren Emissionsquotienten dem Quotienten der *in vitro* SUMOylierung ohne Kompetition entsprechen. In der Immunoblot-Analyse ist als Bestätigung der FRET-Messung eine vollständige YFP-SUMOylierung von CFP-RanGAP1tail zu sehen (Abb. 4.7 B). Mit großer Wahrscheinlichkeit zeigt dieses Resultat, dass die Mutante T-ubi nicht mehr in der Lage ist einen Thioester mit dem E1-Enzym Aos1/Uba2 zu bilden. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen der bereits durchgeführten *in vitro* SUMOylierungen überein (4.2.2).

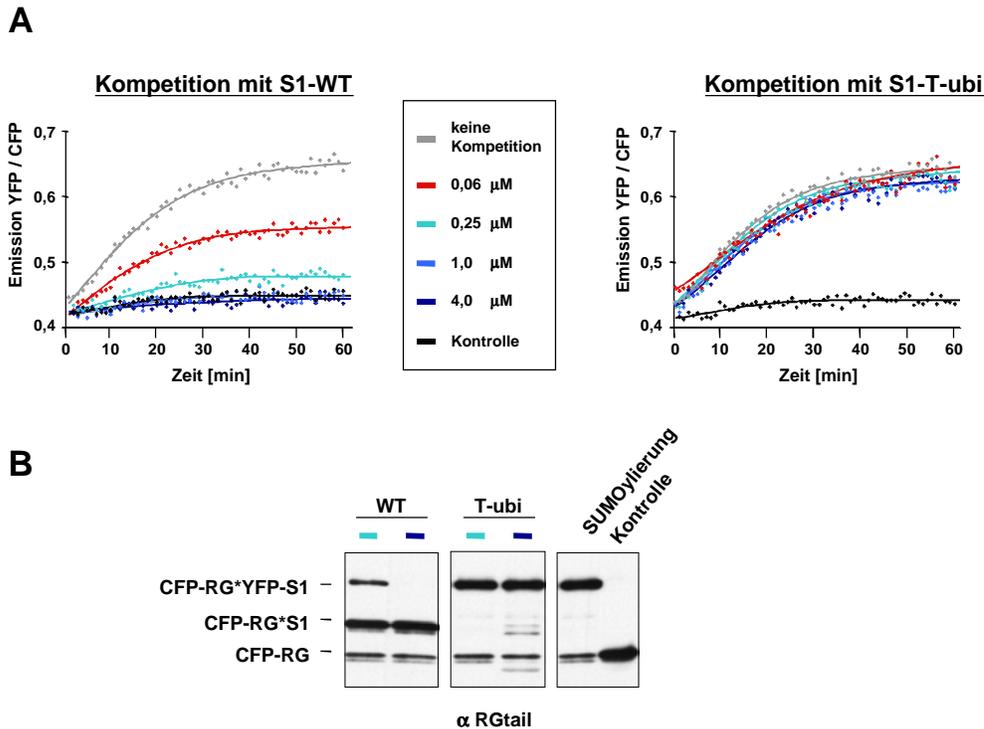


Abbildung 4.7: *In vitro* SUMOylierung von RanGAP1 als Konkurrenz von YFP-SUMO1WT mit den nicht-fluoreszierenden SUMO1-Konstrukten WT und T-ubi in der FRET-Analyse.

(A) Diagramm der Emissionsquotienten von vier Verdünnungsstufen der kompetitierenden SUMO1-Konstrukte (WT Δ C4, T-ubi Δ C4) in der *in vitro* SUMOylierung von RanGAP1.

(B) Immunoblot-Analyse der *in vitro* SUMOylierung von RanGAP1 zweier Verdünnungsstufen der kompetitierenden SUMO1-Konstrukte (WT Δ C4, T-ubi Δ C4). Anhand der Detektion von CFP-RanGAP1tail mit α RGtail wurde die SUMOylierung in der Konkurrenzreaktion überprüft.

(keine Konkurrenz: SUMOylierung Abb. 4.6 B; Kontrolle: SUMOylierung ohne ATP; WT: SUMO1; T-ubi: Tab. 4.1; CFP-RG: CFP-RanGAP1tail (AS 400-589); YFP-S1: YFP-SUMO1 Δ C4 (AS 1-97); S1: SUMO1 Δ C4)

Zusammenfassend folgt aus den drei Experimenten der Analyse der *in vitro* SUMOylierung, dass die N-terminale Sequenz in SUMO1 für die Modifikation nicht essentiell ist. Die Ergebnisse für Δ N10 und Δ N21 entsprechen stets den Ergebnissen für SUMO1WT. Hingegen weist die Tripel-Mutante T-ubi nicht nur Defizite in der Konjugation auf, sondern konkurriert auch nicht mehr mit SUMO1WT um die E1- oder E2-Enzym-Bindung. Vermutlich ist diese Mutante schon für den ersten Schritt in der SUMOylierung - der Ausbildung eines Thioesters mit dem E1-Enzym - inkompetent.

4.2.3 *In vitro* DeSUMOylierung

In einem weiteren Charakterisierungsschritt wurde untersucht, ob die N-terminale Sequenz in SUMO1 - wenn nicht für die SUMOylierung - für die DeSUMOylierung essentiell sei. Dies wurde anhand von SUMOyliertem RanGAP1 und SUMOylierten HeLa-Zell-Lysat-Proteinen analysiert. Als deSUMOylierende Enzyme wurden entweder endogene Isopeptidasen (HeLa-Zell-Lysat) oder rekombinantes Ulp1 (SUMO-spezifische Isopeptidase aus *S. cerevisiae*) eingesetzt (Li und Hochstrasser, 1999).

In vitro DeSUMOylierung von RanGAP1*SUMO1

Für die *in vitro* DeSUMOylierung wurde zunächst rekombinantes RanGAP1 mit den SUMO1-Konstrukten *in vitro* SUMOyliert (4.2.2). Die Modifikation wurde durch ATP-Depletion (Apyrase-Behandlung) auf Eis gestoppt. Da zu dem Zeitpunkt der Experimente noch keine humane SUMO1-Isopeptidase identifiziert worden war, wurden endogene Isopeptidasen in Form von HeLa-Zell-Lysat in der *in vitro* DeSUMOylierung eingesetzt. Nach 3 h Inkubation bei 37°C wurden die Reaktionen durch Zugabe von 2x-SDS-Probenpuffer gestoppt und im Immunoblot-Verfahren mit α RanGAP1 analysiert (Abb. 4.8 A). RanGAP1*SUMO1 Δ N10 und - Δ N21 konnten *in vitro* durch endogene Isopeptidasen deSUMOyliert werden. Die Kontrolle mit N-Ethylmaleimid (NEM) bestätigt, dass die DeSUMOylierung auf Cysteinprotease-Aktivität beruht. Somit ist die N-terminale SUMO1-Sequenz für die DeSUMOylierung von RanGAP1 - zumindest *in vitro* - nicht erforderlich.

Um eventuell vorhandene Unterschiede in der DeSUMOylierungskinetik festzustellen, wurde die *in vitro* DeSUMOylierung optimiert. Statt HeLa-Zell-Lysat wurde Ulp1-Aktivität in die DeSUMOylierung eingesetzt und die Reaktion zu drei Zeitpunkten abgestoppt. Die Proben je einer SUMO1-Mutante und die Proben des Wildtyps wurden nebeneinander im SDS-PAGE-Gel aufgetragen und die Signale der Immunoblot-Analyse mit α RanGAP1 im Phosphoimager ausgewertet. Im Diagramm sind die Signalstärken des jeweiligen RanGAP1*SUMO1-Konstrukts prozentual dargestellt (Abb. 4.8 B).

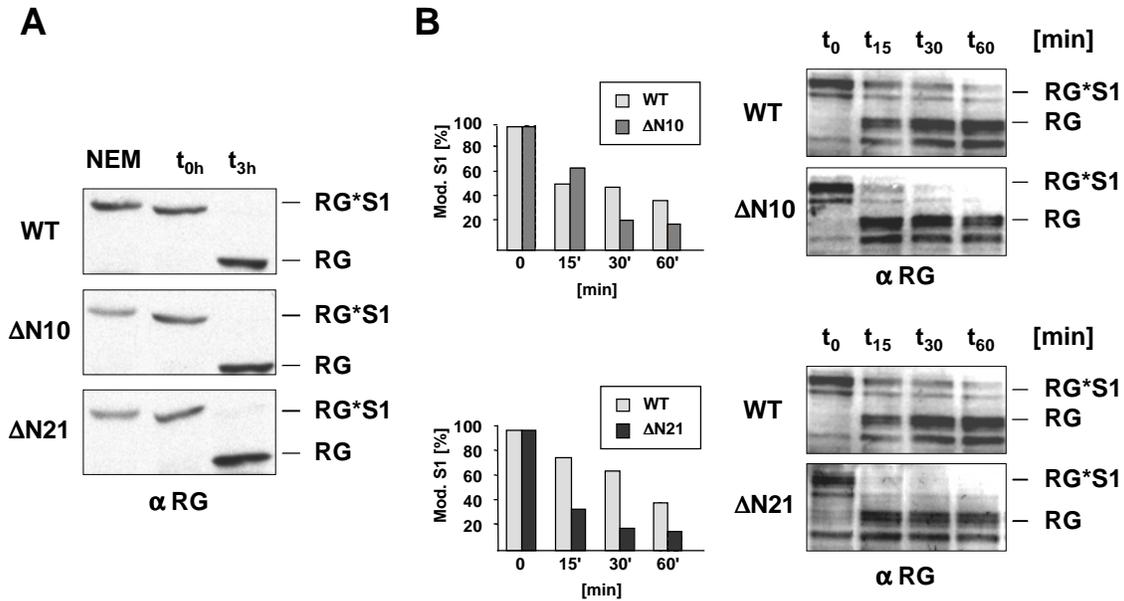


Abbildung 4.8: *In vitro* DeSUMOylierung von RanGAP1*SUMO1-Konstrukten durch endogene Isopeptidasen (A) oder rekombinantes GST-Ulp1 (B).

(A) *In vitro* SUMOyliertes RanGAP1 wurde mit HeLa-Zell-Lysat (-ATP, ProtI-Mix) bei 37°C inkubiert. Start- und Endpunkt (t_{0h} und t_{3h}) der Reaktion wurden mit 2x-SDS-Probenpuffer gestoppt und in einem 8%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. RanGAP1*SUMO1 und RanGAP1 konnten in der Immunoblot-Analyse mit αRanGAP1 detektiert werden.

(B) *In vitro* SUMOyliertes RanGAP1 wurde mit GST-Ulp1 bei 37°C inkubiert (-ATP, ProtI-Mix). Die vier Punkte des Zeitkurses wurden mit 2x-SDS-Probenpuffer abgestoppt und in einem 8%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Die Immunoblot-Analyse mit αRanGAP1 wurde im Phosphoimager ausgewertet.

(NEM: Kontrolle; WT: SUMO1; ΔN10, ΔN21: Tab. 4.1; RG*S1: RanGAP1*SUMO1-Konstrukt; RG: RanGAP1)

Im Rahmen der experimentellen Genauigkeit konnten bezüglich der Kinetik der DeSUMOylierung keine signifikanten Unterschiede zwischen RanGAP1-Konjugaten der N-terminalen Mutanten und SUMO1-Wildtyp nachgewiesen werden.

In vitro DeSUMOylierung mit HeLa-Zell-Lysat als Substratquelle

Für ein umfangreicheres Substratspektrum in der *in vitro* DeSUMOylierung wurde HeLa-Zell-Lysat als Quelle für SUMO1-Konjugate genutzt. Parallel wurde mit je einem rekombinanten SUMO1-Konstrukt (ΔN10, ΔN21, WT) eine *in vitro* SUMOylierung mit HeLa-Zell-Lysat angesetzt. Anschließend wurden die Ansätze auf Eis ATP-depletiert (Apyrase-Behandlung) und GST-Ulp1 hinzugegeben. Nach 3 h Inkubation bei 37°C wurden die Reaktionen mit 2x-SDS-Probenpuffer gestoppt. Aus der Immunoblot-Analyse

ist zu erkennen, dass die DeSUMOylierung durch Ulp1 für SUMO1WT-, SUMO1 Δ N10- und SUMO1 Δ N21-Konjugate mit vergleichbarer Effizienz stattfindet (Abb. 4.9). Die beobachtete Degradation des freien SUMO1 Δ N21 (Abb. 4.9: α S1) konnte auf Metalloprotease-Aktivität des HeLa-Zell-Lysats zurückgeführt werden (Stabilisierung des SUMO1 Δ N21 durch Zugabe von 5 mM EDTA). Aus diesem Grund wurde für weitere *in vivo* Experimente die Deletionsmutante SUMO1 Δ N19 kloniert. Beide *in vitro* Ansätze zeigen, dass die N-terminale SUMO1-Sequenz in der DeSUMOylierung keine essentielle Funktion übernimmt.

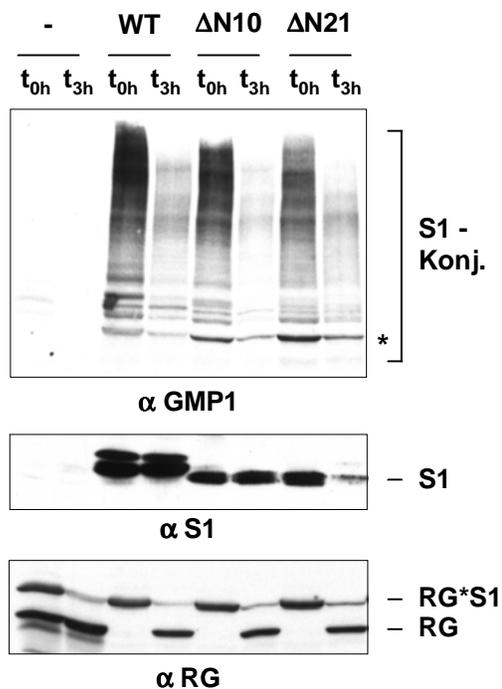


Abbildung 4.9:

***In vitro* DeSUMOylierung mit HeLa-Zell-Lysat als Substratquelle.**

Die mit rekombinantem SUMO1WT, - Δ N10 und - Δ N21 durchgeführte *in vitro* SUMOylierung in HeLa-Zell-Lysat wurde mit Apyrase (5 U/100 μ l Lysat) ATP-depletiert, mit rekombinantem Gst-Ulp1 versetzt, bei 37°C für 3 h inkubiert und mit 2x-SDS-Probenpuffer abgestoppt. In der Immunoblot-Analyse wurden SUMO1-Konjugate (α GMP1), nicht-konjugiertes SUMO1 (α S1) und RanGAP1 (α RG) detektiert.

(-: Kontrolle ohne rekombinantes SUMO1-Konstrukt; **WT**: SUMO1; **Δ N10**, **Δ N21**: Tab. 4.1; **RG**: RanGAP1)

4.2.4 RanGAP1*SUMO1-Interaktion mit RanBP2 Δ FG

Die bisherigen Daten lassen der N-terminalen SUMO1-Sequenz weder in der SUMOylierung noch in der DeSUMOylierung eine Funktion zuschreiben. Dies bedeutet jedoch nicht, dass eine Beteiligung an Substrat-spezifischen Funktionen der SUMOylierung ausgeschlossen werden kann. Die Varianz des N-Terminus in Länge und Sequenz, sowohl zwischen verschiedenen Spezies als auch im Fall mehrerer

SUMO-exprimierender Gene innerhalb einer Spezies (2.3.1, Abb. 2.2), bietet optimale Voraussetzungen für individuelle Funktionen. Im Fall von RanGAP1 führt SUMOylierung zur Lokalisation am Zellkernporenkomplex. Diese Lokalisation beruht auf der Interaktion mit RanBP2, einem Protein der zytoplasmatischen Filamente des Zellkernporenkomplexes (2.3.4, Abb. 4.10).

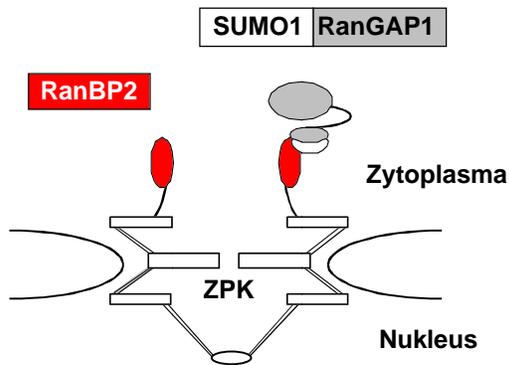


Abbildung 4.10:

RanGAP1*SUMO1 am Kernporenkomplex.

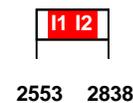
Schematische Darstellung der RanGAP1*SUMO1-Lokalisation über RanBP2 am Zellkernporenkomplex (ZPK) und der Domänen in RanBP2 (AS 1-3224) sowie in dem Konstrukt RanBP2ΔFG (AS 2553-2838) (Matunis et al., 1998; Wu et al., 1995; Yokoyama et al., 1995).

(LEU: Leucin-reiche Sequenz; R1-R4: vier RanGTP Bindungsdomänen; ZF: Zinkfinger-Domäne; I1, I2: internes Wiederholungsmotiv; CY: Cyclophilin-Domäne)

RanBP2



RanBP2ΔFG



Um diese Funktion der SUMOylierung *in vitro* zu testen, wurde aus humanem RanBP2 (358 kDa) die RanGAP1*SUMO1-Interaktion vermittelnde Sequenz (ca. 30 kDa) in einen bakteriellen Expressionsvektor (pGEX-3x) kloniert und als RanBP2ΔFG (AS 2553-2838) aufgereinigt (Matunis et al., 1998). RanGAP1 wurde mit SUMO1WT, -ΔN10 oder -ΔN21 *in vitro* SUMOyliert, mit rekombinantem RanBP2ΔFG (AS 2553-2838) inkubiert und die Ansätze in einer Gelfiltration über Superdex200-Material aufgetrennt. Die Fraktionen wurden in einem 5-20%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und das Gel mit Coomassie gefärbt. Mit einem SUMOylierungsansatz ohne ATP wurde kontrolliert, in welcher Fraktion RanGAP1 und RanBP2ΔFG laufen. Als Kontrolle, in welcher Fraktion RanGAP1*SUMO1WT eluiert, diente ein SUMOylierungsansatz ohne RanBP2ΔFG (Abb. 4.11 A). Die Analyse der Coomassie-Gele ergab, dass sowohl RanGAP1*WT (Frk.13), RanGAP1*ΔN10 sowie RanGAP1*ΔN21 im Komplex mit RanBP2ΔFG (Frk. 9, 10, 11) vorliegen.

Folglich ist die N-terminale SUMO1-Sequenz für die Interaktion von RanGAP1*SUMO1 mit RanBP2 nicht essentiell.

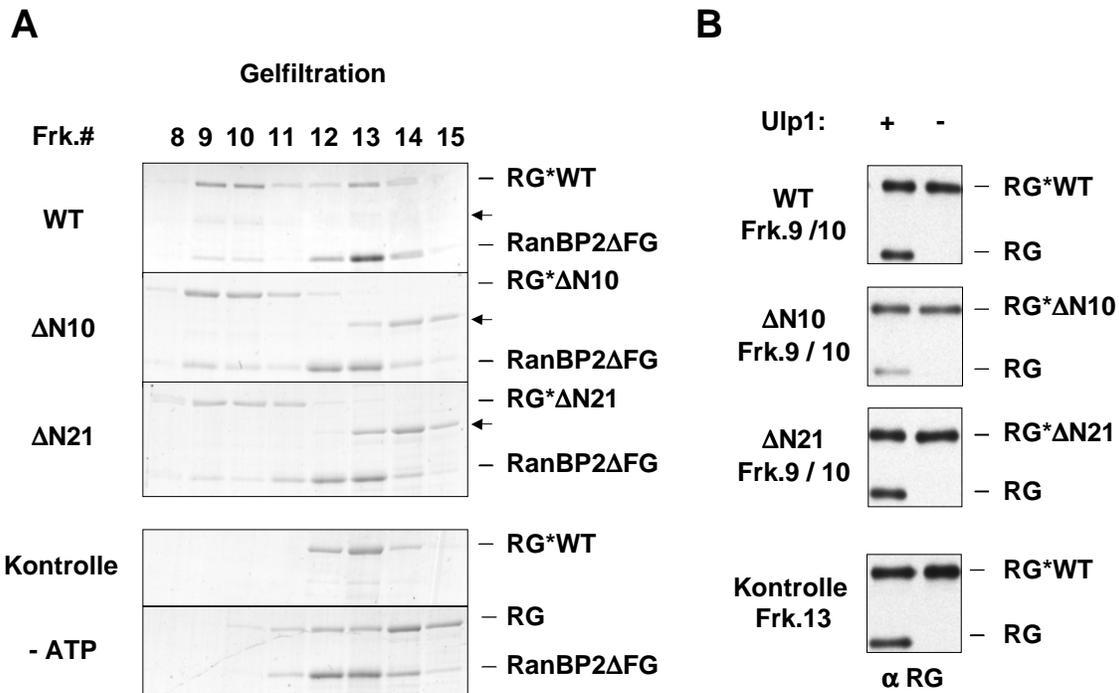


Abbildung 4.11: Interaktion zwischen RanGAP1*SUMO1 und RanBP2ΔFG *in vitro*.

(A) Interaktion zwischen RanGAP1*SUMO1-Konstrukten und RanBP2ΔFG (AS 2553-2838) *in vitro*. RanGAP1 (50 μg) wurde unter Zugabe von Aos1/Uba2 (2,5 μg) und Ubc9 (5 μg) mit rekombinantem SUMO1WTΔC4, -ΔN10ΔC4 oder -ΔN21ΔC4 (10 μg) *in vitro* modifiziert. Nach Aufreinigung über Nap5-Säulchen (ATP-Depletion) wurden die Reaktionen mit je 25 μg RanBP2ΔFG (AS 2553-2838) für 30 min bei 4°C und 30 min bei RT rotierend inkubiert. Die Ansätze wurden mittels Gelfiltration über Superdex200-Material fraktioniert, die Proteine der Fraktionen nach Chloroform-Methanol-Fällung in einem 5-20%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt und analysiert. Gezeigt sind die Fraktionen 8-15.

(B) DeSUMOylierung von RanGAP1*SUMO1-Konstrukten im Komplex mit RanBP2ΔFG *in vitro*. Fraktionen mit RanGAP1*SUMO1/RanBP2ΔFG-Komplex wurden in eine *in vitro* DeSUMOylierung mit Ulp1 eingesetzt. Anhand der Immunoblot-Analyse mit αRanGAP1 wurde die DeSUMOylierung dokumentiert.

(WT: SUMO1; ΔN21, ΔN10: Tab. 4.1; RG: RanGAP1; Pfeil: nicht modifiziertes RanGAP1 aus der *in vitro* SUMOylierung)

In vitro DeSUMOylierung von RanGAP1*SUMO1 im Komplex mit RanBP2ΔFG

Am Beispiel von RanGAP1*SUMO1 im Komplex mit RanBP2ΔFG sollte zudem getestet werden, ob der SUMO1-N-Terminus ein Substrat vor Dekonjugation schützen kann. Hierzu wurde mit den Fraktionen der *in vitro* Interaktion, die den

RanGAP1*SUMO1/RanBP2 Δ FG-Komplex enthielten, eine *in vitro* DeSUMOylierung mit Ulp1 durchgeführt. Die Immunoblot-Analyse mit α RanGAP1 zeigte, dass der SUMO1-N-Terminus RanGAP1*SUMO1 im Komplex mit RanBP2 - unter den gewählten *in vitro* Bedingungen - nicht vor DeSUMOylierung schützt (Abb. 4.11 B).

In vivo Lokalisation von RanGAP1*SUMO1

Die Lokalisation von RanGAP1*SUMO1 am Zellkernporenkomplex, kann *in vivo* mit Hilfe der Immunfluoreszenz (IF) nachgewiesen werden. Daher wurden die *in vitro* Daten der Interaktion mit RanBP2 in der Immunfluoreszenz überprüft. Hierfür wurden die vorhandenen Konstrukte über die Klonierung in den Säuger-Expressionsvektor pHHS10B N-terminal mit dem Hämagglutinin (HA)-Epitop fusioniert. Adhärenente HeLa-Zellen wurden mit den SUMO-Konstrukten (HA-SUMO1WT, Δ N10 und Δ N21) transfiziert, mit Paraformaldehyd fixiert und mit 0,005% Digitonin behandelt. In geeigneter Konzentration permeabilisiert Digitonin ausschließlich die cholesterinhaltige Zellmembran und die Zellkernhülle bleibt intakt. Die in der Immunzytologie eingesetzten Antikörper diffundieren daher nicht in den Zellkern, sondern interagieren ausschließlich mit den Proteinen auf zytoplasmatischer Seite.

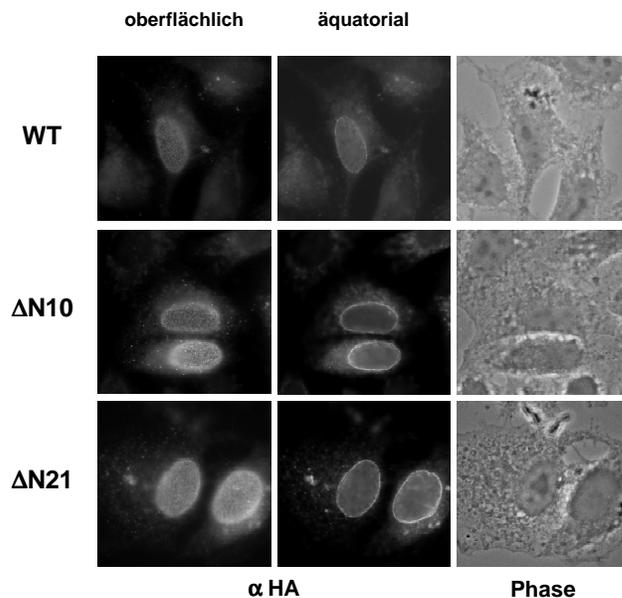


Abbildung 4.12:

Immunfluoreszenz-Analyse der *in vivo* Lokalisation von RanGAP1*SUMO1 mit den HA-SUMO1 Δ C4-Konstrukten WT, Δ N10 und Δ N21.

Auf Deckgläschen gewachsene adhärenente HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen SUMO1-Konstrukten transfiziert, nach 24 h mit 2% Paraformaldehyd fixiert und die Zellmembran mit 0,005% Digitonin permeabilisiert. Die überexprimierten SUMO1-Konstrukte wurden mit α HA immunologisch detektiert.

(WT: SUMO1; Δ N10, Δ N21: Tab. 4.1)

In der Immunfluoreszenz mit α HA-Antikörper konnte für jedes SUMO1-Konstrukt in der äquatorialen Ebene des Zellkerns ein „Ring“-Signal detektiert werden (Abb. 4.12). Mit höherer Auflösung ist zu erkennen, dass dieses „Ring“-Signal aus vielen „Punkt“-Signalen zusammengesetzt ist. Jedes „Punkt“-Signal repräsentiert einen Zellkernporenkomplex, an dem RanGAP1*SUMO1 lokalisiert ist (Matunis et al., 1996). Mit diesem Ergebnis werden die Daten der *in vitro* Interaktion bestätigt: Die N-terminale SUMO1-Sequenz wird auch für die *in vivo* Lokalisierung von RanGAP1*SUMO1WT am Zellkernporenkomplex nicht benötigt.

Zusammenfassend haben die bisherigen *in vitro* und *in vivo* Experimente gezeigt, dass die N-terminale Sequenz in SUMO1 weder an der SUMOylierung oder deren Funktion (Lokalisation von RanGAP1*SUMO1 am Zellkernporenkomplex) noch an der DeSUMOylierung essentiell beteiligt ist. Die C-terminalen AS Q92, E93, Q94 scheinen hingegen in den Enzym-Interaktionen der SUMOylierung (Aos1/Uba2, Ubc9) eine entscheidende Rolle zu übernehmen.

4.2.5 *In vivo* Lokalisation der SUMO1-Mutanten im Vergleich zu SUMO1-Wildtyp

In vivo Lokalisation der N-terminalen Deletionsmutanten

Die oben beschriebene Lokalisation der N-terminalen Deletionsmutanten am Zellkernporenkomplex zeigt, dass zumindest RanGAP1 *in vivo* modifiziert und korrekt lokalisiert wird. Um die Analyse auf andere Substrate auszuweiten, wurde eine Immunfluoreszenz mit Triton-Permeabilisierung durchgeführt.

In proliferierenden Zellen lokalisiert SUMO1 hauptsächlich diffus im Zellkern, ist aber auch diffus im Zytoplasma vorzufinden. Dies beruht zum einen auf der Tatsache, dass nicht-konjugiertes SUMO1 mit einem Molekulargewicht von 10 kDa zu freier Diffusion durch den Zellkernporenkomplex fähig ist, und zum anderen viele SUMO1-Substrate nukleäre Proteine sind. Zusätzlich werden die intranukleären Signale im Vergleich zu den Signalen im Zytoplasma durch die Höhe des Zellkerns optisch verstärkt. Daneben findet man SUMO1 häufig angereichert in verschiedenen subnukleären Strukturen

(z.B. *PML bodies*, *PcG bodies*), deren Form und Anzahl mit dem Zellzyklus variiert (Melchior et al., 2003).

Zur Herstellung der IF-Präparate wurden adhärenente HeLa-Zellen mit HA-SUMO1 Δ C4-Konstrukten (WT, Δ N10, Δ N21) transfiziert, mit Paraformaldehyd fixiert und - im Unterschied zur Immunfluoreszenz als Kontrolle der Lokalisation von SUMOyliertem RanGAP1 (Abb. 4.12) - nicht mit Digitonin, sondern mit Triton permeabilisiert. In dieser Präparation werden sowohl Zellmembran als auch Zellkernhülle permeabilisiert, so dass die Gesamtheit aller in der Zelle vorliegenden SUMOylierten Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert werden kann. Hier wurden überexprimiertes SUMO1 und dessen Konjugate immunologisch mit α HA-Antikörper detektiert.

Die Auswertung im Fluoreszenz-Lichtmikroskop ergab für beide N-terminalen Deletionsmutanten - im Vergleich zu der Lokalisation des SUMO1WT - keine auffälligen Unterschiede (Abb. 4.13).

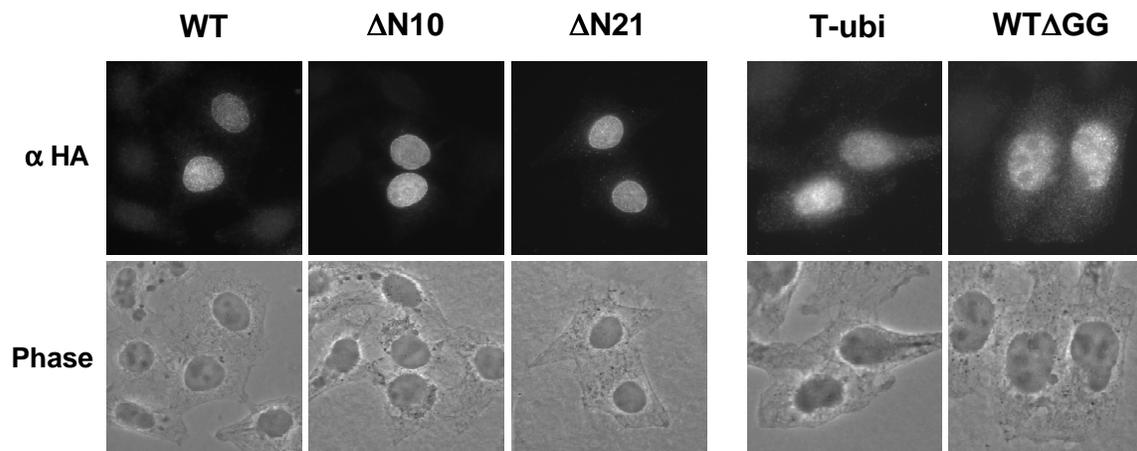


Abbildung 4.13: Immunfluoreszenz-Analyse der *in vivo* Lokalisation der HA-SUMO1 Δ C4-Konstrukte WT, Δ N10, Δ N21, T-ubi und des Konstrukts SUMO1WT Δ GG-HA.

Auf Deckgläschen gewachsene adhärenente HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen SUMO1-Mutanten transfiziert, nach 24 h mit 2% Paraformaldehyd fixiert und mit 0,2% Triton permeabilisiert. Die überexprimierten SUMO1-Konstrukte wurden mit α HA immunologisch detektiert.

(WT: SUMO1; Δ N10, Δ N21, T-ubi: Tab. 4.1; WT Δ GG: nicht-konjugierbares SUMO1)

In vivo Lokalisation der Mutante SUMO1-T-ubi

Mit der gleichen Methode wurde die zelluläre Lokalisation der Mutante SUMO1-T-ubi analysiert. Da für diese Mutante in den biochemischen Charakterisierungsverfahren

SUMOylierungsinkompetenz nachgewiesen werden konnte, wurde parallel das nicht-konjugierbare SUMO1-Konstrukt SUMO1WT Δ GG-HA bezüglich seiner zellulären Lokalisation untersucht. Für beide Konstrukte konnte ein ähnliches Lokalisationsmuster detektiert werden. Im Gegensatz zu konjugierbarem SUMO1WT, lokalisieren SUMO1-T-ubi und SUMO1WT Δ GG, wie schon für nicht-konjugierbares SUMO1 bekannt, verstärkt diffus im Zytoplasma (Mahajan et al., 1998). Somit bestätigen diese *in vivo* Daten das Ergebnis der bisherigen Charakterisierungsschritte, die der Mutante SUMO1-T-ubi Defekte in der SUMOylierung zuschreiben (Abb. 4.4, 4.5, 4.7).

4.2.6 Analyse der SUMO1-Modifikationsmuster *in vivo*

Um unter Einbeziehung aller physiologischen Faktoren das SUMOylierungsverhalten der N-terminalen Deletionsmutanten und der Mutante T-ubi zu analysieren, wurden diese als HA-SUMO1 Δ C4-Konstrukte transient transfiziert und deren SUMOylierungsmuster in der Immunoblot-Analyse mit dem des Wildtyps verglichen. Das SUMOylierungsmuster des endogenen SUMO1 setzt sich in proliferierenden Zellen aus einem schwachen Signal des nicht-konjugierten SUMO1 und dem hochmolekularen Signal der SUMO1-Konjugate zusammen. Effekte der Mutationen sollten anhand unterschiedlicher Signalstärken des konjugierten und nicht-konjugierten SUMO1-Konstrukts im Vergleich zu SUMO1-Wildtyp sichtbar werden.

Für die Analyse der SUMOylierungsmuster wurden 293T-Zellen mit je einem HA-SUMO1 Δ C4-Konstrukt und GFP ko-transfiziert. Die Zellen wurden nach 40 h geerntet und die Zell-Lysate in einem 15%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. In der Immunoblot-Analyse wurden die SUMOylierungsmuster mit α HA-Antikörper und das ko-transfizierte GFP mit α GFP-Antikörper detektiert (Abb. 4.14 B). Die GFP-Signale dienten als Transfektionskontrolle.

Im Vergleich zu überexprimiertem SUMO1WT ist die Menge an konjugiertem SUMO1 Δ N10 eindeutig erhöht. Freies SUMO1 Δ N10 erscheint - im Vergleich zu freiem SUMO1WT - gleichfalls angereichert. Ein diesem Phänotyp entgegengesetztes Bild zeigt die Mutante SUMO1 Δ N21. Konjugate, wie auch nicht-konjugiertes SUMO1 Δ N21,

werden im Vergleich zu SUMO1WT nur in drastisch reduzierter Menge detektiert. Im Zusammenhang mit der für SUMO1 Δ N21 *in vitro* festgestellten Instabilität in HeLa-Zell-Lysat (4.2.3, Abb. 4.9) wäre ein Abbau des überexprimierten SUMO1 Δ N21 durch Protease-Aktivitäten auch *in vivo* denkbar. Der Phänotyp der Mutante SUMO1 Δ N19 unterstützt die Hypothese, dass die Deletion der ersten 21 AS das Protein destabilisiert. Das SUMO1 Δ N19-Modifikationsmuster entspricht dem des SUMO1WT, wobei die höher laufende der beiden freien SUMO1 Δ N19-Formen, in Bezug auf den Wildtyp, ein stärkeres Signal zeigt. Für diese höher laufende Form des freien SUMO1 ist anzunehmen, dass es sich um eine modifizierte Form von SUMO1, vermutlich eine phosphorylierte Form, handelt (4.3.1). Die SUMO1-Mutation T-ubi weist - wie schon in den *in vitro* Experimenten (Abb. 4.4, 4.5, 4.7) - sehr schwache Signale für SUMO-Konjugate auf und liegt als freie Form, im Vergleich zu SUMO1WT, angereichert vor.

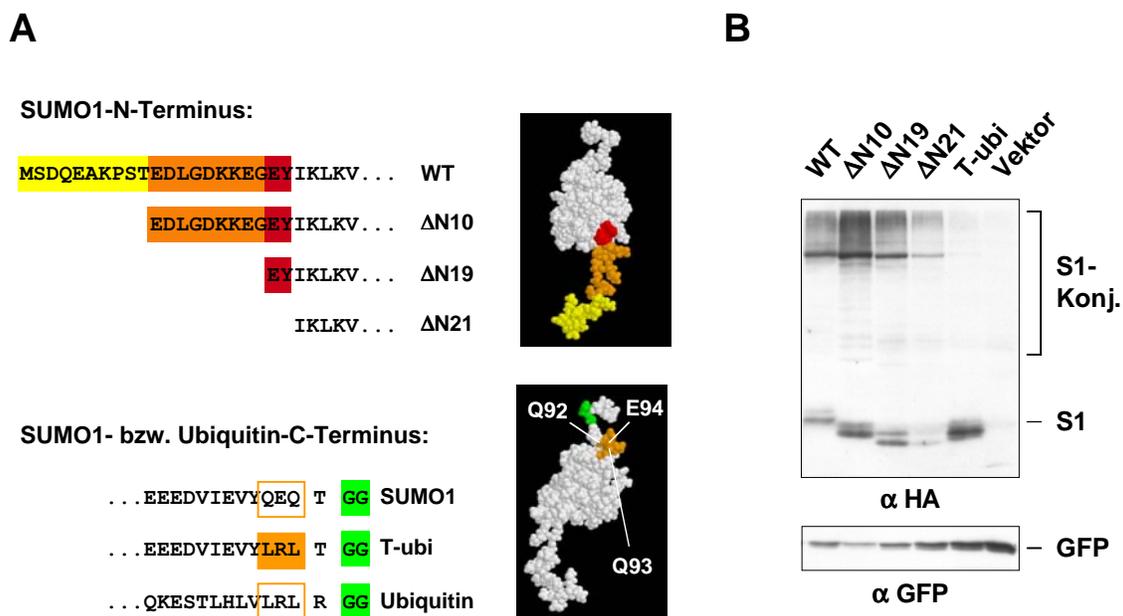


Abbildung 4.14: N- bzw. C-terminale-AS-Sequenz der transfizierten HA-SUMO1 Δ C4-Konstrukte (WT, Δ N10, Δ N19, Δ N21, T-ubi) und des Ubiquitins, Position der Mutationen in der 3-D-Struktur von SUMO1 sowie Immunoblot-Analyse der SUMO1-Modifikationsmuster *in vivo*.

293T-Zellen wurden mit den angegebenen HA-SUMO1 Δ C4-Konstrukten und GFP ko-transfiziert, nach 40 h in 2x-SDS-Probenpuffer lysiert und sofort bei 95°C inkubiert. Die Lysate wurden in einem 15%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und in der Immunoblot-Analyse mit α HA und α GFP detektiert.

(WT: SUMO1; Δ N10, Δ N19, Δ N21, T-ubi: Tab. 4.1; Vektor: pHHS10B; 3-D-Struktur von SUMO1 nach (Bayer et al., 1998)).

Diese auf mehreren unabhängig durchgeführten Experimenten basierende Charakterisierung der SUMOylierungsmuster *in vivo* weist für die N-terminalen Deletionsmutanten $\Delta N10$ und $\Delta N19$ zum Wildtyp qualitativ ähnliche Muster auf, im Fall der Mutante $\Delta N10$ sind jedoch quantitativ erhebliche Unterschiede festzustellen. Für die Mutante T-ubi wird deren SUMOylierungsdefizit wiederholt bestätigt.

Unter Beachtung der Ergebnisse aller durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Charakterisierungsschritte, kann festgehalten werden, dass die N-terminale Sequenz in SUMO1 nicht essentiell an den Teilschritten der SUMOylierung beteiligt ist. Hingegen ist die mutierte C-terminale Sequenz in SUMO1-T-ubi (Q92L, E93R, Q94L) mit großer Wahrscheinlichkeit entscheidend an der Erkennung des E1-Enzyms Aos1/Uba2 beteiligt.

4.3 Zellbiologische Analyse einer großen Anzahl weiterer SUMO1-Mutanten

Ein weiterer Schwerpunkt der SUMO1-Mutagenese waren die Oberflächen-exponierten Aminosäure-Reste in SUMO1, deren Einfluss auf die SUMOylierung anhand von Mutationen überprüft werden sollte. Alle SUMO1-Mutanten wurden transient transfiziert, um deren SUMOylierungsmuster und zellulären Lokalisationsmuster im Vergleich zu SUMO1-Wildtyp zu analysieren.

4.3.1 Die diversen Aspekte der SUMO1-Mutagenese

Die SUMO1-Mutanten wurden ausgehend von HA-SUMO1WT Δ C4/pHHS10B mittels gerichteter *in vitro* Mutagenese hergestellt und mit Hilfe transients Transfektion auf Veränderungen im SUMOylierungsmuster *in vivo* untersucht (Tab. 4.2).

Erhebliche Unterschiede zwischen SUMO1 und Ubiquitin sind die unstrukturierte N-terminale Sequenz in SUMO1 (Strukturmerkmal der SUMO-Proteine) und die Ladungen der Oberflächen-exponierten Aminosäure-Reste. Trotz identischer Faltung beider Proteine ($\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ -Ubiquitin-Faltungsmotiv) sind Art und Verteilung der Ladungen sehr verschieden (2.3.1). Dies deutet an, dass die Verteilung der Oberflächenladungen die Spezifität der Modifikation auf Enzym-Ebene beeinflusst.

Um dies zu überprüfen, wurden gezielt die auf der Oberfläche exponierten positiv oder negativ geladenen Aminosäure-Reste in SUMO1 verändert. Die geladenen und konservierten Aminosäuren wurden gegen Alanin oder analoge Aminosäuren des Ubiquitins ausgetauscht, wobei letzteres die durch eine Mutation eventuell auftretenden Faltungsprobleme vermeiden sollte. Zusätzlich zu den Mutanten mit dem Austausch einer Aminosäure wurden Mutanten mit Kombinationen aus zwei, drei oder vier veränderten Aminosäuren hergestellt. Die kombinierten Mutationen waren Aminosäure-Reste, die anhand der dreidimensionalen Struktur von SUMO1 als nah beieinander liegend bestimmt werden konnten (Tab. 4.2, 1.-3.).

Tabelle 4.2: Die diversen Aspekte der SUMO1-Mutagenese.

SUMO1-Mutagenese

1. Alanin

SUMO1-Mutation	strukturelle Lokalisation
K23A Δ C4	β 1
K25A Δ C4	
K45A Δ C4	α 1
K46A Δ C4	
R54A Δ C4	
E83A Δ C4	
E84A Δ C4	β 5
E85A Δ C4	
D86A Δ C4	
E89A Δ C4	
K23A/E85A Δ C4	
K45A/K46A Δ C4	α 1/ α 1
E83A/E84A/E85A Δ C4	-/- β 5

2. Analoge AS des Ubiquitins

SUMO1-Mutation	strukturelle Lokalisation
Y21L Δ C4	β 1
F36L Δ C4	β 2
K37E Δ C4	
K39E Δ C4	
Q69K Δ C4	β 4
K78S Δ C4	α 2
Y91V Δ C4	β 5
F36L/K39E Δ C4	β 2/ β 2
E83Q/E84K/D86S Δ C4	-/- β 5
Q92L/E93R/Q94L Δ C4	

3. Alanin / analoge AS des Ubiquitins

SUMO1-Mutation	strukturelle Lokalisation
K23A/F36L Δ C4	β 1/ β 2
K39E/K46A Δ C4	β 2/ α 1
K23E/E83Q/E84K/D86S Δ C4	β 1/-/ β 5

4. Hypothetische Phosphorylierungsstellen

SUMO1-Mutation	strukturelle Lokalisation
S9A Δ C4	N-Terminus
S9D Δ C4	
S9E Δ C4	
T76A Δ C4	α 2
T76D Δ C4	
T76E Δ C4	
S9A/T76A Δ C4	N-Term./ α 2

5. Konserviertes N-terminales Motiv

SUMO1-Mutation	strukturelle Lokalisation
E5A/K7A Δ C4	N-Terminus

6. N-terminale Lysin-Reste

SUMO1-Mutation	strukturelle Lokalisation
K7R Δ C4	N-Terminus
K16R Δ C4	
K17R Δ C4	

Zusammenstellung der SUMO1-Mutanten und deren strukturelle Lokalisation in SUMO1.

(**1.-3.:** Austausch geladener Aminosäuren an der SUMO1-Oberfläche zu Alanin und/oder zu analogen Aminosäuren des Ubiquitins; **4.:** Austausch hypothetischer Phosphorylierungsstellen in SUMO1; **5.:** Alanin-Mutation des konservierten N-terminalen Motivs in SUMO1; **6.:** Austausch N-terminaler Lysin-Reste in SUMO1; **Δ C4:** alle Mutanten wurden als prozessierte SUMO1-Form kloniert (AS 1-97))

Im Hinblick auf eine eventuelle Regulation von SUMO1 sind auch hypothetische Phosphorylierungsstellen in SUMO1 interessant. Die Phosphorylierung verschiedener SUMO-Substrate ist sowohl als verstärkendes als auch inhibierendes Signal für die SUMOylierung beschrieben (z.B. verstärkend: (Hietakangas et al., 2003), inhibierend:

(Yang et al., 2003)). Mit Hilfe des Suchprogrammes „NetPhos 2.0 Prediction Results“ wurden die zwei Aminosäuren Serin an Position 9 (S9) und Threonin an Position 76 (T76) mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit als Phosphorylierungsstellen für CK2 (Caseinkinase 2) vorhergesagt. S9 und T76 wurden jeweils zu Alanin und zu den beiden Pseudo-Phosphorylierungsformen mit Aspartat bzw. Glutamat verändert (Tab. 4.2, 4.). Für die CK2-Kinase, die im Unterschied zu anderen Kinasen konstitutiv aktiv ist, wird unter anderem postuliert, dass deren Substrate durch Phosphorylierung „Protein-Protein-Adhäsionsmodule“ bilden (Meggio und Pinna, 2003). Dies ist im Zusammenhang mit der SUMOylierung ein durchaus interessanter Aspekt. Darüber hinaus sind auch einige SUMO1-Substrate als CK2-Substrate beschrieben, so dass eine parallele Phosphorylierung von Substrat und SUMO1 denkbar wäre. Beispiele sind c-jun, c-Myb, HSF1, I κ B α , Topoisomerase I, Topoisomerase II α und PR (Meggio und Pinna, 2003; Soncin et al., 2003).

Im SUMO1-N-Terminus (AS 1-21) wurden neben S9 noch weitere N-terminale Aminosäuren gezielt verändert. Zum einen wurde das in den SUMO-Proteinen konservierte Motiv „D/E A/E KP“, dem bislang noch keine Funktion zugewiesen werden konnte, zu „AAP“ verändert (Tab. 4.2, 5.). Zum anderen wurden Arginin-Mutanten der Lysin-Reste K7, K16 und K17 hergestellt (Tab. 4.2, 6.), um diese potentiellen Stellen post-translationaler Modifikation im Zusammenhang mit dem SUMO1 Δ N10-Phänotyp analysieren zu können.

Von allen hier beschriebenen SUMO1-Mutanten wurde das *in vivo* SUMOylierungsmuster und die *in vivo* Lokalisation analysiert.

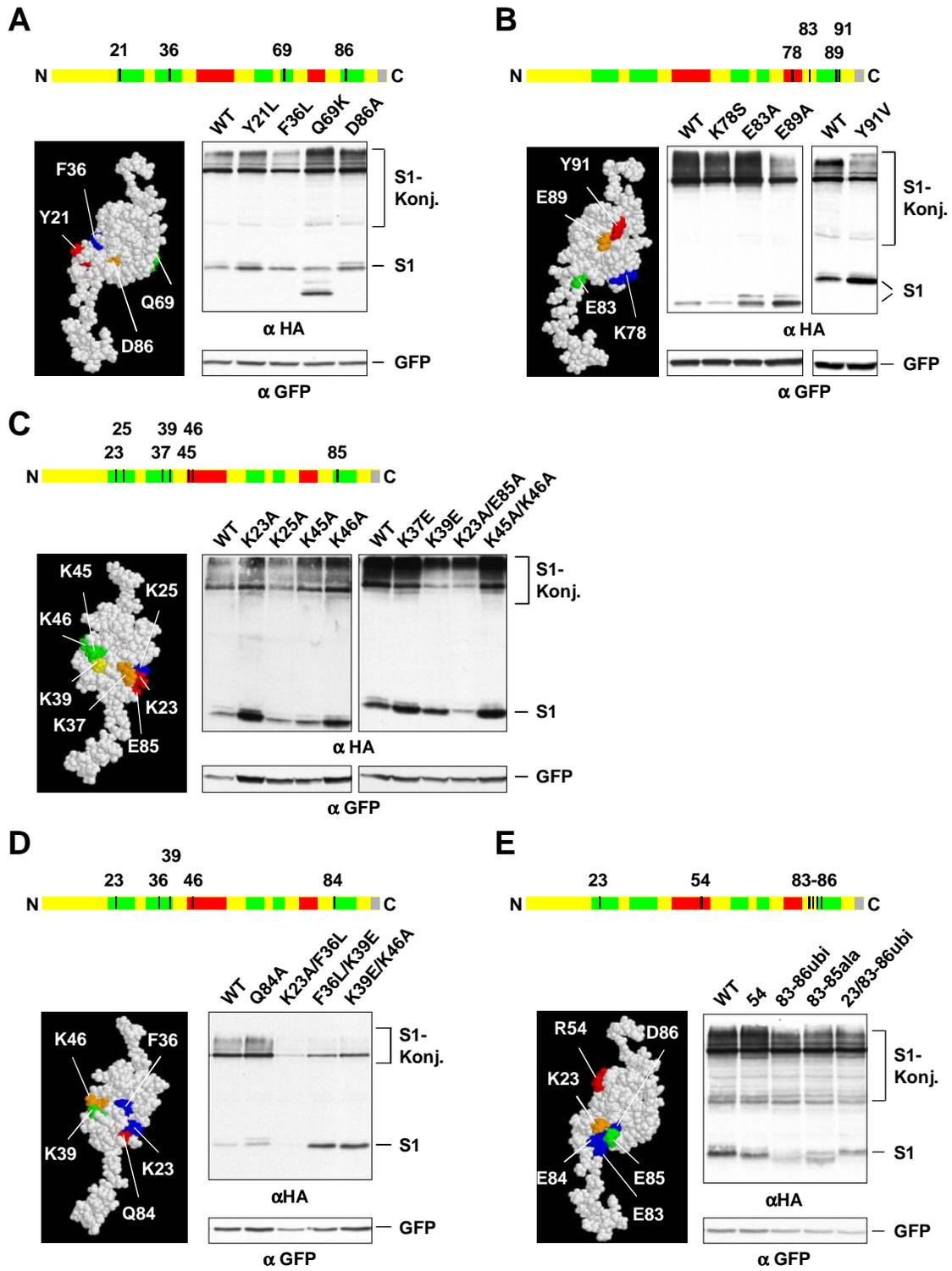
4.3.2 Analyse der SUMO1-Modifikationsmuster *in vivo*

Wie unter 4.2.6 beschrieben, wurden 293T-Zellen parallel mit je einem SUMO1-Konstrukt und GFP ko-transfiziert. Nach 40 h wurden die Zellen in 2x-SDS-Probenpuffer geerntet und sofort bei 95°C inkubiert. Gleiche Volumina der Zell-Lysate wurden in einem 15%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und die

überexprimierten SUMO1-Mutanten sowie ko-transfiziertes GFP immunologisch mit α HA- und α GFP-Antikörper nachgewiesen.

Die Abbildungen 4.15 und 4.16 zeigen repräsentative Beispiele von mehrfach wiederholten Experimenten. Zwar zeigte keine der Mutanten einen kompletten Verlust der Konjugation, jedoch konnten Unterschiede im Verhältnis von nicht-konjugiertem zu konjugiertem SUMO1 beobachtet werden.

Abbildung 4.15 (nächste Seite): Mutationen der an der Oberflächenladung beteiligten AS in SUMO1. (A, B, C, D, E) Position der ausgetauschten Aminosäure-Reste in SUMO1-Sequenz und -Struktur (Sequenz-Balkendiagramm (AS 1-97); 3-D-Struktur von SUMO1 nach (Bayer et al., 1998), siehe auch Abb. 2.3) sowie Immunoblot-Analyse der SUMO1-Modifikationsmuster *in vivo*. 293T-Zellen wurden mit den angegebenen HA-SUMO1 Δ C4-Konstrukten (Tab. 4.2, 1.-3.) und GFP ko-transfiziert, nach 40 h in 2x-SDS-Probenpuffer lysiert und sofort bei 95°C inkubiert. Die Lysate wurden in einem 15%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und eine Immunoblot-Analyse mit α HA- und α GFP-Antikörper durchgeführt.



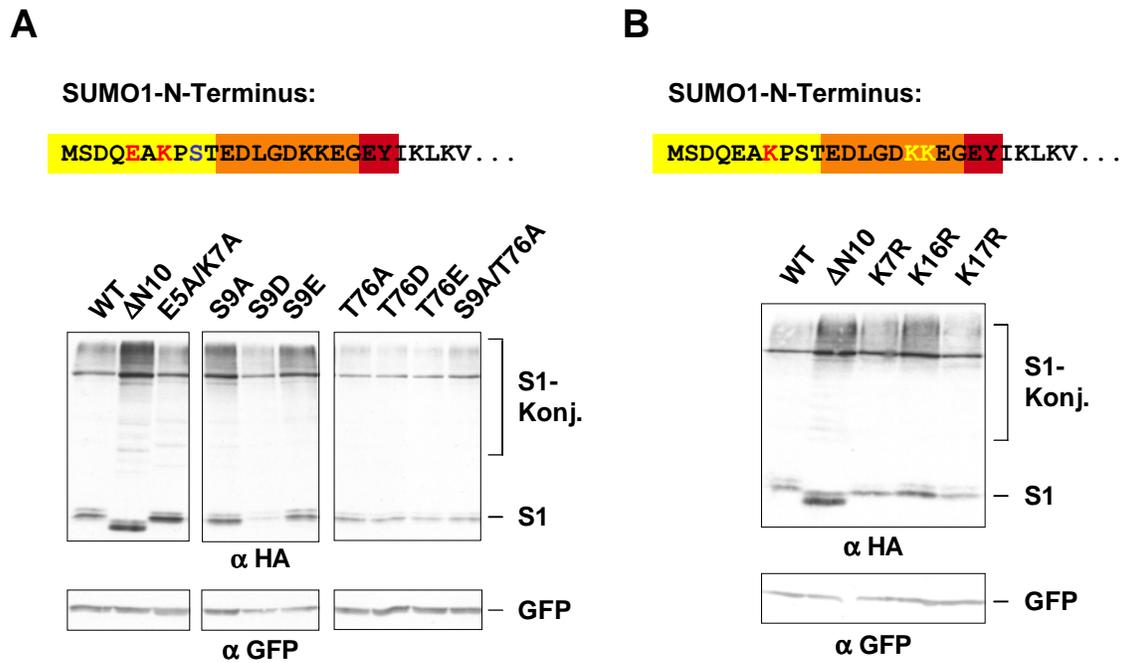


Abbildung 4.16: Mutationen der hypothetischen Phosphorylierungsstellen, des konservierten N-terminalen Motifs (D/E A/E KP) und der N-terminalen Lysin-Reste in SUMO1.

SUMO1-N-Terminus (Sequenz-Balkendiagramm (AS 1-21), siehe auch Abb. 4.14) und Immunoblot-Analyse der SUMO1-Modifikationsmuster *in vivo*.

(A) Mutante des konservierten N-terminalen SUMO1-Motivs (D/E A/E KP) und SUMO1-Mutanten hypothetischer Phosphorylierungsstellen.

(B) SUMO1-Mutanten N-terminaler Lysine.

Wie Abb. 4.15, jedoch mit den oben angegebenen HA-SUMO1 Δ C4-Konstrukten (Tab. 4.2, 4.-6.).

Die SUMOylierungsmuster der Mutanten können anhand der Signalstärken des nicht-konjugierten SUMO1, der SUMO1-Konjugate und deren Verhältnis zueinander mit dem SUMOylierungsmuster des Wildtyps verglichen werden. Nach diesem Kriterium wurden die Mutanten in sieben Gruppen verschiedener Signalstärken gegliedert (Tab. 4.3). SUMO1-Mutanten, die nicht in der Tabelle aufgeführt sind, verhielten sich wie SUMO1WT.

Tabelle 4.3: Gliederung der SUMO1-Mutanten anhand der Signale des Modifikationsmusters *in vivo*.

SUMO1-Signale	Mutante	Struktur-Position	Effekt (Hypothese)
frei: +	E5A/K7A Δ C4	N-Terminus	Modifikation inhibierend, SUMO1 stabilisierend
	Y21L Δ C4	β 1	
	K23A Δ C4	β 1	
	K37E Δ C4	β 2	
	K46A Δ C4 (konj/+)	α 1	
	E83A Δ C4		
	Y91V Δ C4 (konj/-)	β 5	
K45A/K46A Δ C4	α 1/ α 1		
frei: -	S9D Δ C4	N-Terminus	Demodifikation inhibierend, SUMO1 destabilisierend
	K17R Δ C4	N-Terminus	
	R54A Δ C4 (+band)	α 1	
	K78S Δ C4	α 2	
	83-85-ala Δ C4	-/-/ β 5	
	83, 84, 86-ubi Δ C4	-/-/ β 5	
konjugiert: +	S9A/E Δ C4	N-Terminus	Modifikation effizienter, SUMO1 stabilisierend
	Q69K Δ C4	β 4	
konjugiert: -	F36L Δ C4	β 2	Demodifikation effizienter, SUMO1 destabilisierend
	K39E Δ C4	β 2	
frei: + konjugiert: +	* Δ N10 Δ C4	N-Terminus	SUMO1 stabilisierend
	K16R Δ C4	N-Terminus	
	D86A Δ C4	β 5	
frei: - konjugiert: -	* Δ N21 Δ C4	N-terminus	SUMO1 destabilisierend
	T76A/D/E Δ C4	α 2	
	S9A/T76A Δ C4	N-Terminus/ α 2	
	K23A/F36L Δ C4	β 1/ β 2	
	K23A/E85A Δ C4	β 1/ β 5	
frei: + konjugiert: -	E89A Δ C4	β 5	Modifikation inhibierend und Demodifikation effizienter
	F36L/K39E Δ C4	β 2/ β 2	
	K39E/K46A Δ C4	β 2/ α 1	
	*T-ubi Δ C4	C-Terminus	

SUMO1-Mutanten, deren SUMOylierungsmuster *in vivo* im Vergleich zu SUMO1WT veränderte Signale zeigen, sind entsprechend der Signale für freies und konjugiertes SUMO1 in sieben Gruppen unterteilt. Den Gruppen sind aus den Signalen abzuleitende hypothetische Effekte zugeordnet. Jede der aufgelisteten Mutanten ist in mindestens zwei Experimenten analysiert worden.

(frei: nicht-konjugiertes SUMO1; konjugiert: SUMO1-Konjugate; +: in der Immunoblot-Analyse im Vergleich zu SUMO1WT Signalverstärkung; -: in der Immunoblot-Analyse im Vergleich zu SUMO1WT Signalreduktion; *: Abb. 4.14, sonst Abb. 4.15 und 4.16; 3-D-Struktur von S1 nach (Bayer et al., 1998))

Abbildung 4.17 zeigt für jede Signal-Gruppe die Mutationen der jeweiligen Mutanten farblich markiert anhand der 3-D-Struktur von SUMO1. Die Aminosäure-Reste einiger Mutationen der gleichen Gruppe liegen in der 3-D-Struktur räumlich nah beieinander.

Deren Effekte im SUMOylierungsmuster könnten daher auf der gleichen Ursache beruhen.

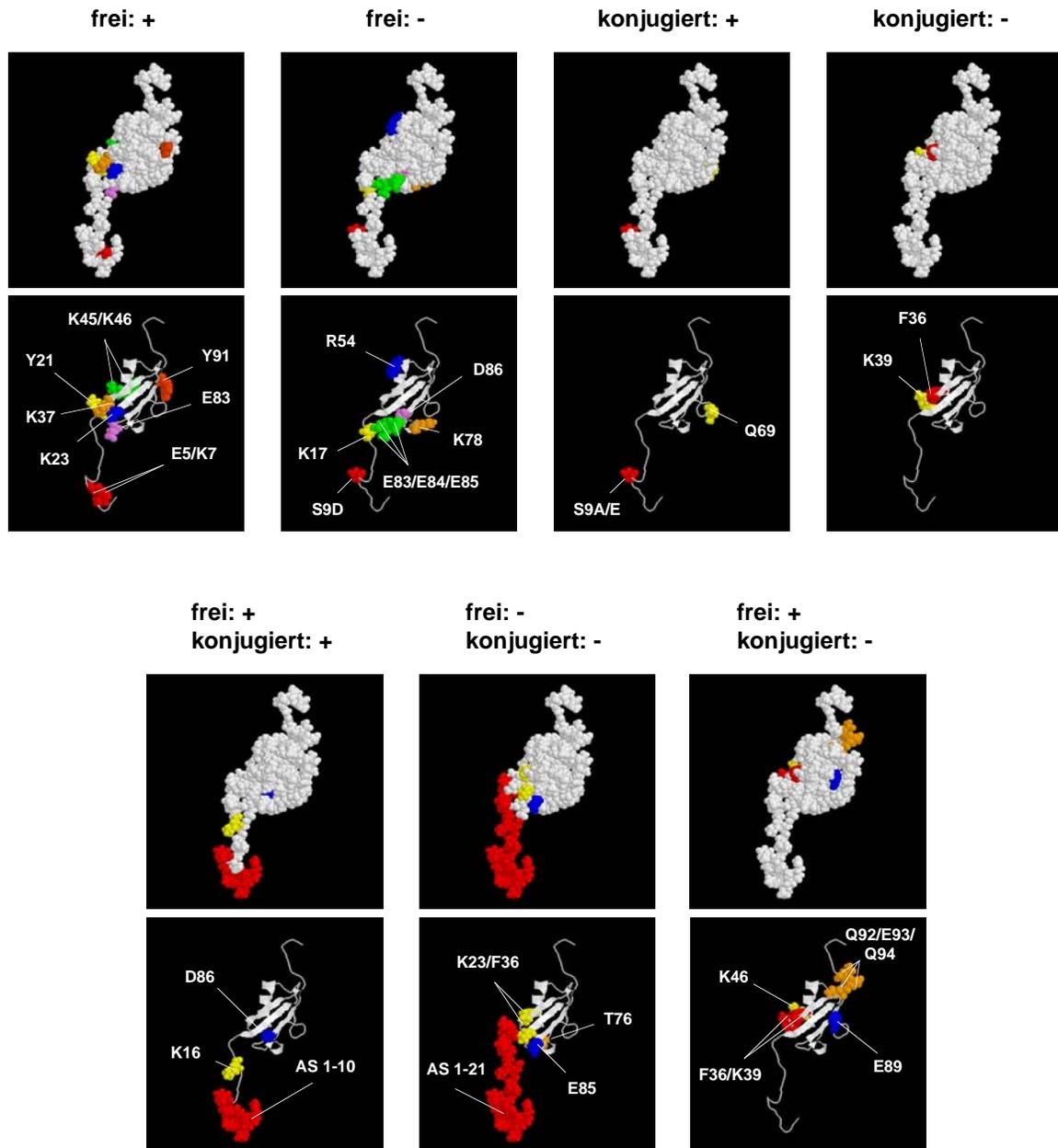


Abbildung 4.17: Gruppierungen der SUMO1-Mutanten nach SUMOylierungsmuster *in vivo*.

Zusammenstellung der in sieben Gruppen gegliederten SUMO1-Mutationen, die in der Analyse des SUMO1-Modifikationsmusters *in vivo* im Vergleich zu SUMO1-Wildtyp Veränderungen aufweisen (Tab.4.3). Die Aminosäure-Reste der Mutationen sind in der 3-D-Struktur von SUMO1 farbig hervorgehoben (Bayer et al., 1998).

4.3.3 Analyse der SUMO1-Lokalisation *in vivo*

In der Analyse der SUMOylierungsmuster *in vivo* (4.3.2) konnten für viele Mutationen verschiedene Effekte beobachtet werden. Da die SUMOylierung ein dynamischer Prozess ist, kann aus Veränderungen jedoch nicht eindeutig bestimmt werden, welche der beiden Teilreaktionen - Modifikation oder Demodifikation - betroffen ist. Um zu überprüfen, ob zusätzlich Veränderungen in der zellulären Lokalisation diese Effekte hervorrufen, wurden die SUMO1-Mutanten mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Wie unter 4.2.4 bereits beschrieben, wurden für die IF-Präparate adhärente HeLa-Zellen mit den HA-SUMO1 Δ C4-Konstrukten der SUMO1-Mutanten transfiziert, mit Paraformaldehyd fixiert und mit Triton permeabilisiert. Die überexprimierten SUMO1-Mutanten wurden mit einem α HA-Antikörper detektiert (Abb. 4.18).

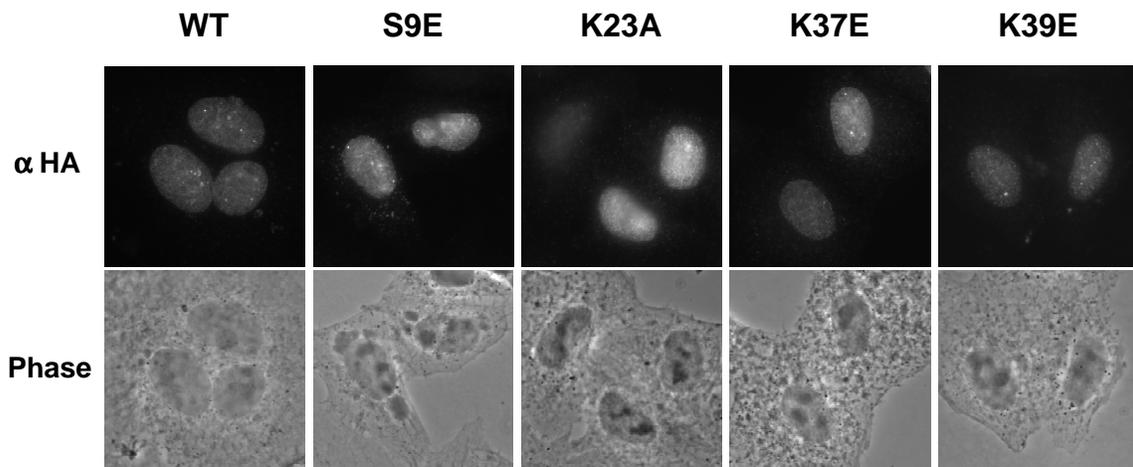


Abbildung 4.18: Immunfluoreszenz-Analyse der *in vivo* Lokalisation verschiedener HA-SUMO1 Δ C4-Konstrukte aus der SUMO1-Mutagenese; repräsentativ gezeigt: WT, S9E, K23A, K37E, K39E.

Auf Deckgläschen gewachsene adhärente HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen SUMO1-Konstrukten transfiziert, nach 24 h mit 2% Paraformaldehyd fixiert und mit 0,2% Triton permeabilisiert. Überexprimiertes SUMO1 wurde mit α HA-Antikörper immunologisch detektiert.

(WT: SUMO1; S9E, K23A, K37E, K39E: Tab. 4.2)

In der Auswertung der Präparate im Fluoreszenz-Lichtmikroskop konnte für keine der SUMO1-Mutanten eine veränderte *in vivo* Lokalisation nachgewiesen werden. Die in Abbildung 4.18 gezeigte Auswahl präsentiert *in vivo* Lokalisationsmuster von

SUMO1-Mutanten, deren SUMOylierungsmuster *in vivo* unterschiedliche Effekte aufweisen (Abb. 4.15, 4.16; Tab. 4.3). Die Mutanten lokalisieren wie SUMO1-Wildtyp: primär diffus im Zellkern, zusätzlich in subnukleären Strukturen und an der Zellkernhülle angereichert sowie ebenfalls diffus im Zytoplasma. Somit sind die beobachteten Veränderungen im SUMOylierungsmuster der SUMO1-Mutanten keinesfalls in Veränderungen der *in vivo* Lokalisation begründet.

Eine Reihe von Mutanten mit deutlichen Effekten, insbesondere die, deren Mutationen in der Ubc9-Interaktionsfläche von SUMO1 lokalisieren (E83A, D86A, E83A/E84A/E85A, E83Q/E84A/D86S) und die, deren veränderte Aminosäure-Reste eventuell an E3-Ligase-Interaktionen beteiligt sind (F36L/K39E, K39E/K46A), sollen in zukünftigen Studien auch biochemisch untersucht werden (siehe Diskussion).

In der Analyse der SUMO1-Mutagenese wurden die Mutanten bezüglich ihres *in vivo* SUMOylierungsmusters und ihrer Lokalisation charakterisiert. Bei mehreren Mutanten konnte der *in vivo* Effekt der SUMO1 Δ N10-Mutante, meist schwächer ausgeprägt, als Phänotyp beobachtet werden. Eine gleichzeitige Veränderung der Signale für nicht-konjugiertes SUMO1 und SUMO1-Konjugate könnte bedeuten, dass die jeweilige Mutation Einfluss auf die Stabilität von SUMO1 ausübt.

Ein Modifikationssystem, das wie die SUMOylierung wichtige zelluläre Vorgänge reguliert, wäre durchaus effektiver, wenn es selbst Regulationsmechanismen unterläge. In Abhängigkeit von äußeren Bedingungen könnte die Menge an verfügbarem SUMO1 hoch- oder herunterreguliert werden. Beispielsweise findet die SUMOylierung des Transkriptionsfaktors HSF1 (*heat shock transcription factor 1*) in Abhängigkeit äußerer Signale statt (Hietakangas et al., 2003; Hilgarth et al., 2003; Hong et al., 2001). Mögliche Ansatzpunkte eines Regulationsmechanismus sind die beteiligten Enzyme bzw. deren intrazelluläre Lokalisation oder der Modifizierer (SUMO1) selbst. Tatsächlich zeigen - neben SUMO1 Δ N10 - mehr als die Hälfte der in Tabelle 4.3 aufgeführten SUMO1-Mutanten einen Effekt, der als Stabilisierung oder Destabilisierung von SUMO1 interpretiert werden könnte. Dieser Aspekt wird im folgenden Abschnitt näher untersucht.

4.4 SUMO1-Ubiquitinierung

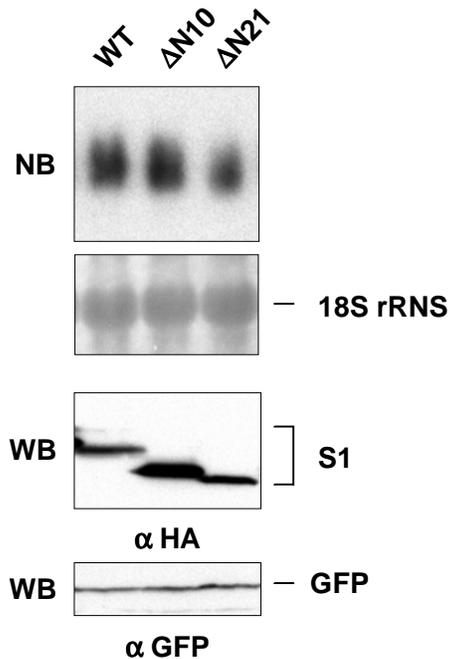
Die Analyse der *in vivo* SUMOylierungsmuster ergab für mehrere Mutanten eine vom Wildtyp abweichende Signalstärke für die Gesamtmenge an SUMO1 (nicht-konjugiert und konjugiert). Diese Unterschiede in der SUMO1-Signalstärke deuten auf eine über die eingeführte Mutation hervorgerufene Stabilisierung bzw. Destabilisierung und sind somit - wie der SUMO1 Δ N10-Phänotyp - möglicherweise ein Hinweis auf eine intrazelluläre Regulation der SUMO1-Menge. Die Fragestellung der SUMO1-Stabilität auf Proteinebene und einer eventuellen Regulation von SUMO1 wurde ausgehend vom SUMO1 Δ N10-Phänotyp im zweiten Abschnitt der Arbeit untersucht.

4.4.1 Wird freies SUMO1 auf Protein-Ebene reguliert?

Der SUMO1 Δ N10-Phänotyp war anhand des HA-SUMO1 Δ C4-Konstrukts entdeckt worden. Um in weiterführenden Experimenten Effekte der SUMOylierung und DeSUMOylierung ausschalten zu können, wurden über die Einführung eines Stop-Codons HA-SUMO1 Δ GG-Konstrukte kloniert (Δ GG: Deletion des für die SUMOylierung essentiellen „GG-Motivs“ (AS 96, 97), 2.2.1, 2.3.2). In einem ersten Experiment wurden diese Konstrukte bzgl. ihrer Stabilität auf Protein-Ebene sowie auf ihre mRNA-Menge überprüft. Die Analyse sollte zeigen, ob die Stabilisierung und somit eine eventuelle SUMO1-Regulation an nicht-konjugiertem SUMO1 ansetzt.

RNS- und Protein-Menge nicht-konjugierbarer SUMO1-Konstrukte

293T-Zellen wurden mit HA-SUMO1 Δ GG-Konstrukten (WT, Δ N10, Δ N21) und GFP ko-transfiziert. Aus transfizierten 293T-Zellen wurde parallel Gesamt-RNS für die Northernblot-Analyse isoliert und Gesamt-Zell-Lysat für die Immunoblot-Analyse hergestellt. Für die Hybridisierung in der Northernblot-Analyse wurden spezifische radioaktiv-markierte cDNA-Sonden (dsDNA-Matrize: SUMO1 (Nukleotide 66-291)) synthetisiert.

**Abbildung 4.19:**

Northern- und Immunoblot-Analyse mit HA-SUMO1ΔGG-Konstrukten (WT, ΔN10, ΔN21).

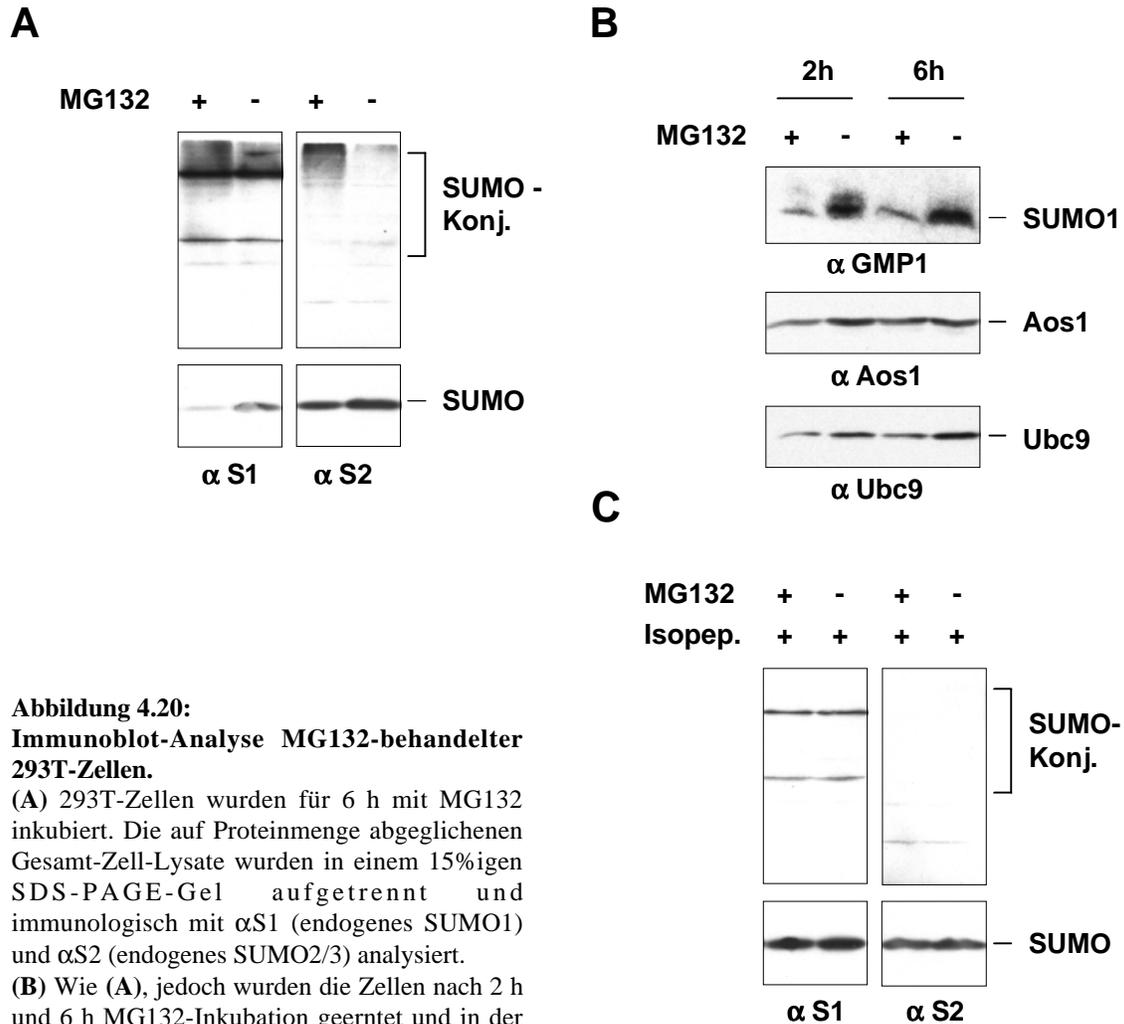
293T-Zellen wurden mit den angegebenen SUMO1-Mutanten transfiziert, lysiert und 5 µg der isolierten Gesamt-RNS über ein denaturierendes Agarosegel aufgetrennt. Die auf eine Nylonmembran transferierte Gesamt-RNS wurde mit radioaktiv-markierten cDNS-Sonden (Matrize für „Random-prime-labeling“-Synthese: SUMO1 (Nukleotide 66-291)) hybridisiert und die gebundene Radioaktivität über Autoradiographie sichtbar gemacht. Als Ladekontrolle ist die Anfärbung der 18 rRNS mit Methylenblau gezeigt. Die überexprimierten SUMO1-Konstrukte und kotransfiziertes GFP wurden in einer Immunoblot-Analyse der Gesamt-Zell-Lysate mit αHA und αGFP detektiert.

(WT: SUMO1; ΔN10, ΔN21: Tab. 4.1)

Die Quantifizierung im Phosphoimager ergab keine erheblichen Unterschiede auf mRNA-Ebene. Auf Protein-Ebene wurde - wie schon als HA-SUMO1ΔC4-Konstrukt - die Mutante SUMO1ΔN10 stärker exprimiert als SUMO1WT (Abb. 4.19). Dieses Ergebnis führte zur Hypothese einer SUMO1-Regulation auf Protein-Ebene über nicht-konjugiertes SUMO1. Ein möglicher Regulationsmechanismus auf Protein-Ebene wäre die proteasomale Degradation. Dies wurde im Folgenden für endogenes SUMO1 untersucht.

Verändertes endogenes SUMOylierungsmuster unter Proteasom-Inhibitor-Einfluss

Um zu klären, ob endogenes SUMO1 proteasomaler Degradation unterliegt, wurden 293T-Zellen für 6 h mit Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt. Die SUMOylierungsmuster der Gesamt-Zell-Lysate nicht-behandelter und behandelter 293T-Zellen wurden in einer Immunoblot-Analyse mit αS1-Antikörper miteinander verglichen. Der Einfluss des Proteasom-Inhibitors zeigte eine Anreicherung endogener SUMO1-Konjugate bei gleichzeitiger Abnahme von nicht-konjugiertem SUMO1 (Abb. 4.20 A).

**Abbildung 4.20:****Immunoblot-Analyse MG132-behandelter 293T-Zellen.**

(A) 293T-Zellen wurden für 6 h mit MG132 inkubiert. Die auf Proteinmenge abgeglichenen Gesamt-Zell-Lysate wurden in einem 15%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und immunologisch mit α S1 (endogenes SUMO1) und α S2 (endogenes SUMO2/3) analysiert.

(B) Wie (A), jedoch wurden die Zellen nach 2 h und 6 h MG132-Inkubation geerntet und in der Immunoblot-Analyse mit α GMP1 (endogenes SUMO1), α Aos1 und α Ubc9 detektiert.

(C) 293T-Zellen wurden für 6 h mit MG132 inkubiert, durch Einfrieren und Auftauen lysiert und in Transportpuffer (ProtI-Mix, Apyrase) resuspendiert. Nach 1,5 h Inkubation bei 37°C (Reaktivierung der endogenen Isopeptidasen) wurden die Reaktionen mit 2x-SDS-Probenpuffer gestoppt, gleiche Volumina der Zell-Lysate in einem 15%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und immunologisch mit α S1 (endogenes SUMO1) und α S2 (endogenes SUMO2/3) analysiert.

(+: 10 μ M MG132 bzw. 37°C-Inkubation; -: DMSO)

Würde SUMO1-Regulation über proteasomale Degradation des nicht-konjugierten SUMO1 ablaufen, hätte die Proteasom-Inhibitor-Behandlung neben einer Anreicherung der SUMO1-Konjugate zusätzlich eine Anreicherung des freien SUMO1 bewirkt.

Um zu testen, ob es sich um ein SUMO1-spezifisches Verhalten handelt, wurden die gleichen Gesamt-Zell-Lysate einer Immunoblot-Analyse mit α S2-Antikörper unterzogen.

Obwohl die Abnahme des nicht-konjugierten SUMO2/3 unter MG132-Einfluss nicht so deutlich zu sehen war (SUMO2 liegt in proliferierenden Zellen vorwiegend nicht-konjugiert vor (Saitoh und Hinchey, 2000)), hatte der Proteasom-Inhibitor prinzipiell auf endogenes SUMO2/3 den gleichen Effekt wie auf SUMO1.

Für diesen Effekt gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Naheliegender ist eine durch den Inhibitor hervorgerufene Stabilisierung von 26S-Proteasom-Substraten, die zugleich SUMO1- bzw. SUMO2/3-Substrate sind. In diesem Fall stehen dem frei in der Zelle vorliegendem SUMO unter MG132-Einfluss mehr Substrate zur Verfügung. Einen ähnlichen Effekt könnte der Inhibitor zeigen, falls die modifizierenden Enzyme der SUMOylierung proteasomalem Abbau unterworfen wären. Unter der Annahme eines Überschusses an SUMO-Substraten würde eine größere Menge modifizierender Enzyme zu einer Anreicherung von SUMO-Konjugaten führen. Diese Hypothese wurde für Aosl (Untereinheit des E1-Enzym) und Ubc9 (E2-Enzym) überprüft (Abb. 4.20 B). Weder Aosl noch Ubc9 wurden durch MG132 stabilisiert. In diesem Zusammenhang ebenfalls denkbar wäre eine Stabilisierung von SUMO-E3-Ligasen, die noch zu überprüfen wäre.

Da die Quantität hochmolekularer Signale in einer Immunoblot-Analyse aufgrund mangelnder Linearität nicht eindeutig zu bestimmen ist, kann eine weitere Erklärungsmöglichkeit nicht ausgeschlossen werden. Die Anreicherung potentieller SUMO-Substrate könnte, kombiniert mit einer SUMO-Stabilisierung, ebenfalls den gezeigten Effekt des MG132 auf endogenes SUMO hervorrufen.

Um diese Frage zu klären, wurden MG132-behandelte und nicht-behandelte Gesamt-Zell-Lysate in eine *in vitro* DeSUMOylierung eingesetzt. Die Zell-Lysate wurden ATP-depletiert (Apyrase), um die Modifikation zu inhibieren, zum Schutz vor Degradation mit Protease-Inhibitoren versetzt und anschließend bei 37°C inkubiert. Dies erlaubte endogenen Isopeptidasen die SUMO-Konjugate zu spalten und SUMO als nicht-konjugierte Form freizusetzen. Die Immunoblot-Analyse wurde wiederum mit α S1- und α S2-Antikörper durchgeführt. Nach vollständiger DeSUMOylierung konnte weder für endogenes SUMO1 noch für endogenes SUMO2 ein Anstieg der SUMO-Gesamtmenge detektiert werden (Abb. 4.20 C). Dies zeigte eindeutig, dass SUMO1 und SUMO2/3 keine Substrate des schnellen proteasomalen Abbaus sind.

SUMO1 ist kein Substrat der proteasomalen Degradation

Das Ergebnis in Abbildung 4.20 C zeigt, dass endogenes SUMO1 nicht der schnellen proteasomalen Degradation unterliegt. Daher erscheint die $\Delta N10$ -Phänotyp-Hypothese der Resistenz gegenüber proteasomaler Degradation nun nicht mehr haltbar. Um dies zu überprüfen, wurde die Protein-Stabilität der nicht-konjugierbaren SUMO1-Konstrukte unter Proteasom-Inhibitor-Einfluss parallel getestet. Als Ersatz für die Mutante SUMO1 $\Delta N21$ war hier SUMO1 $\Delta N19$ eingesetzt worden (4.2.3, Abb. 4.9). Die HA-SUMO1 ΔGG -Konstrukte (WT, $\Delta N10$, $\Delta N19$) wurden in 293T-Zellen überexprimiert und 6 h mit MG132 behandelt. Das Gesamt-Zell-Lysat transfizierter Zellen mit und ohne MG132-Behandlung wurde in einem Immunoblot mit α HA-Antikörper analysiert (Abb. 4.21 A). Erstaunlicherweise wurden alle drei Konstrukte unter MG132-Einfluss stabilisiert. Im Hinblick auf die Resultate für endogenes SUMO1 kann die Instabilität nur mit dem N-terminal fusionierten HA-Epitop, dem einzigen Unterschied zwischen den Konstrukten und endogenem SUMO1, erklärt werden. Diese Vermutung wurde durch die Tatsache verstärkt, dass SUMO1-Proteine mit anderen N-terminalen Markierungen, wie *c-myc*, His oder YFP, nicht auf Proteasom-Inhibitor-Einfluss reagieren (Daten nicht gezeigt).

Für eine endgültige Klärung der Stabilität von nicht-konjugierbarem SUMO1 wurden deshalb die gleichen Konstrukte (WT, $\Delta N10$, $\Delta N19$) ohne Epitop-Markierung in den Säuger-Expressionsvektor pIRES kloniert und das Proteasom-Inhibitor-Experiment mit diesen Konstrukten wiederholt. Im Gegensatz zu den HA-SUMO1 ΔGG -Konstrukten zeigten die SUMO1 ΔGG -Konstrukte keinen Stabilisierungseffekt nach Inhibitor-Behandlung (Abb. 4.21 B). Dies bedeutet, dass das N-terminal über vier zusätzliche Aminosäuren (LPRS) fusionierte HA-Epitop (YPYDVDPDYAS) die pHHS10B-SUMO1-Konstrukte artifiziell destabilisiert.

In Bezug auf überexprimiertes SUMO1 steht damit fest, dass es - wie schon für endogenes SUMO1 gezeigt - kein Substrat der schnellen proteasomalen Degradation ist. Den unterschiedlichen Protein-Mengen der drei nicht-konjugierbaren SUMO1-Konstrukte muss folglich eine andere Ursache zugrunde liegen, die bisher noch nicht geklärt werden konnte. Möglicherweise liegen unterschiedliche Translationsraten vor.

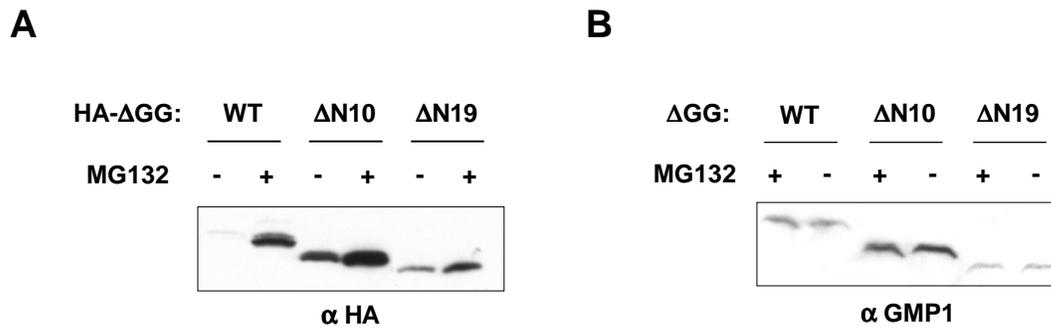


Abbildung 4.21: Immunoblot-Analyse transfizierter 293T-Zellen nach MG132-Behandlung (HA-SUMO1ΔGG-Konstrukte (A), SUMO1ΔGG-Konstrukte (B)).

(A) 293T-Zellen wurden parallel mit HA-SUMO1ΔGG-Konstrukten transfiziert und nach 24 h für 6 h mit MG132 inkubiert. Gleiche Proteinmengen der Gesamt-Zell-Lysate wurden in einem 15%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und überexprimiertes SUMO1 in der Immunoblot-Analyse mit αHA detektiert.

(B) Wie (A), jedoch wurden die Zellen mit SUMO1ΔGG-Konstrukten ohne N-terminale Epitop-Markierung transfiziert und die Immunoblot-Analyse mit αGMP1 durchgeführt.

(WT: SUMO1; ΔN10, ΔN19: Tab. 4.1)

Bestimmung der Halbwertszeit von SUMO1

Die Experimente der Proteasom-Inhibitor-Behandlung gaben einen ersten Hinweis darauf, dass SUMO1 ein relativ stabiles Protein ist. Um auszuschließen, dass neben der proteasomalen Degradation keine weiteren Faktoren die Stabilität von SUMO1 beeinflussen, wurde mit dem nicht-konjugierbaren SUMO1ΔGG-HA ein „Pulse-Chase“-Experiment durchgeführt. Dieses Konstrukt wurde gewählt, um zunächst die Stabilität von nicht-konjugiertem SUMO1 zu untersuchen. Hierfür wurden 293T-Zellen transfiziert und metabolisch mit [³⁵S]-Methionin und -Cystein markiert (Pulse). Die Zellen wurden 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 8 h und 19 h nach Austausch gegen Medium mit nicht-radioaktivem Methionin und Cystein (Chase) geerntet. Die Radioaktivität des mit αHA-Antikörper immunpräzipitierten SUMO1ΔGG-HA wurde im Phosphoimager quantifiziert, gegen die eingesetzte Gesamt-Proteinmenge abgeglichen und in einem Diagramm dargestellt (Abb. 4.22).

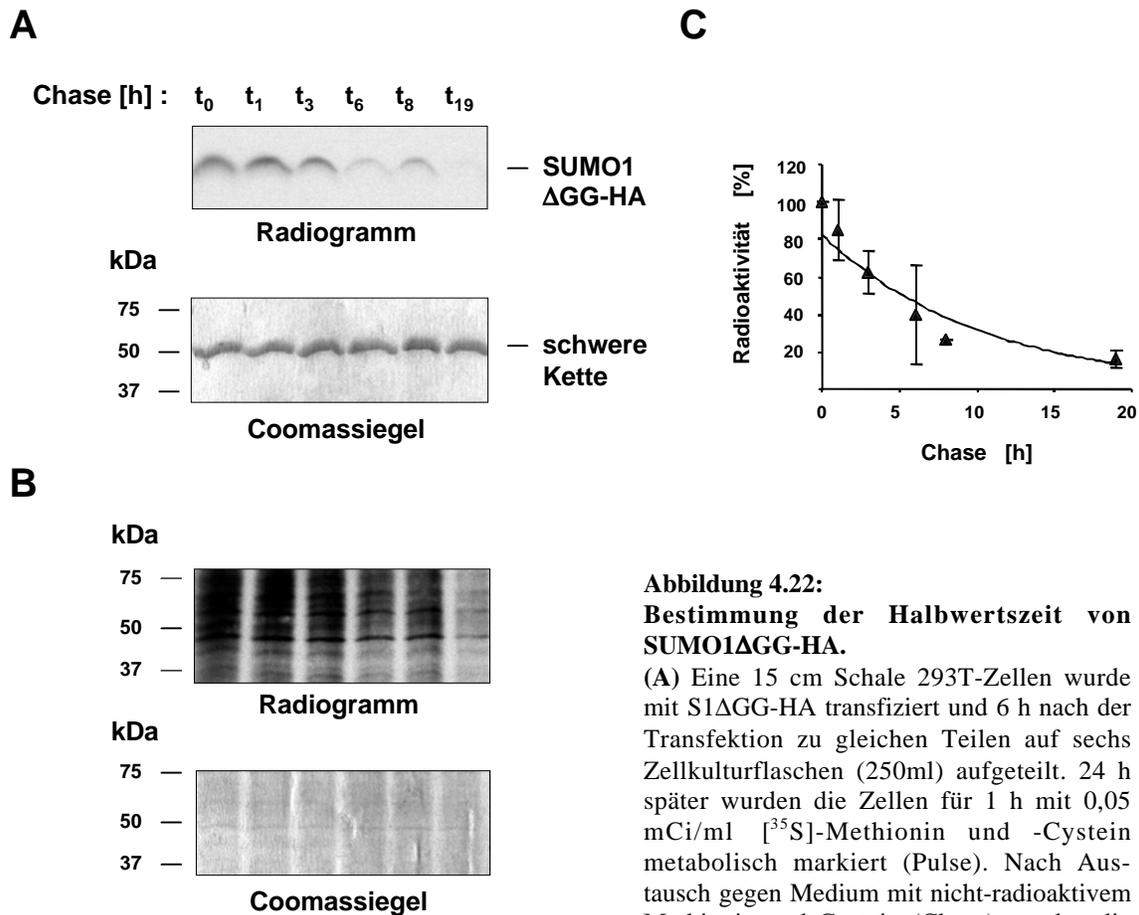


Abbildung 4.22:

Bestimmung der Halbwertszeit von SUMO1ΔGG-HA.

(A) Eine 15 cm Schale 293T-Zellen wurde mit S1ΔGG-HA transfiziert und 6 h nach der Transfektion zu gleichen Teilen auf sechs Zellkulturflaschen (250ml) aufgeteilt. 24 h später wurden die Zellen für 1 h mit 0,05 mCi/ml [35 S]-Methionin und -Cystein metabolisch markiert (Pulse). Nach Austausch gegen Medium mit nicht-radioaktivem Methionin und Cystein (Chase) wurden die Zellen entsprechend der angegebenen Zeiten weiterkultiviert und geerntet. Die Zell-Lysate

wurden auf ihre Proteinmengen abgeglichen, abzentrifugiert und radioaktiv-markiertes SUMO1ΔGG-HA mit α HA-Agarose immunpräzipitiert. Die Coomassiefärbung der aufgetrennten Präzipitate (unten) und das Radiogramm des getrockneten Gels (oben) sind gezeigt.

(B) Zur Ermittlung der eingesetzten Proteinmengen und der Inkorporationseffizienz von [35 S]-Methionin und -Cystein wurden die Zell-Lysate aus der Depletion mit α HA-Agarose in einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie angefärbt (unten) und getrocknet gegen einen Röntgenfilm exponiert (oben). Mit Hilfe des im Phosphoimager quantifizierten Radiogramms und Coomassiegels konnte die Inkorporationseffizienz ermittelt werden.

(C) Um die Halbwertszeit von SUMO1ΔGG-HA abschätzen zu können, wurden im Phosphoimager die Signale des radioaktiv-markierten SUMO1ΔGG-HA quantifiziert, gegen die Gesamt-Proteinmenge abgeglichen und prozentual gegen die Chase-Zeiten aufgetragen.

Anhand des in Abb. 4.22 dokumentierten Experiments konnte für das nicht-konjugierbare SUMO1ΔGG-HA eine Halbwertszeit von 8 h abgeschätzt werden. In einem parallel durchgeführten „Pulse-Chase“-Experiment ergab die Berechnung einen Wert von 7 h.

Darüber hinaus ließen erste Ergebnisse der Halbwertszeit-Bestimmung von endogenem SUMO1 entsprechende Werte bezüglich der Protein-Stabilität erkennen (Daten nicht gezeigt). Somit zeigen die „Pulse-Chase“-Experimente, dass SUMO1 - nicht nur unter Proteasom-Inhibitor-Bedingungen - ein relativ stabiles Protein ist.

4.4.2 Interferieren SUMOylierung und Ubiquitinierung?

Der Effekt des Proteasom-Inhibitors auf das SUMOylierungsmuster des endogenen SUMO1 könnte bedeuten, dass SUMOylierung und Ubiquitinierung interferieren. Der deutliche Anstieg der SUMO1-Konjugate durch MG132-Einfluss lässt vermuten, dass viele SUMO-Substrate der proteasomalen Degradation unterliegen (Abb. 4.20 A). Daraus folgend kann spekuliert werden, dass viele SUMO1-Konjugate gleichzeitig ubiquitiniert sind. Dies wirft die Frage auf, ob sich SUMOylierung und Ubiquitinierung gegenseitig beeinflussen oder gar voneinander abhängig sind.

SUMO1 wird ubiquitiniert

Für den Nachweis, dass viele SUMO1-Konjugate gleichzeitig ubiquitiniert werden können, wurde eine *in vivo* Ubiquitinierung mit überexprimiertem His-Ubiquitin (HisU) etabliert. 293T-Zellen wurden mit *c-myc-SUMO1 Δ C4* und His-Ubiquitin ko-transfiziert, ein Ansatz mit MG132 behandelt, alle Zellen unter denaturierenden Bedingungen geerntet und die ultra-zentrifugierten Lysate mit Ni-Chelat-Matrix inkubiert. Im letzten Schritt der Aufreinigung wurden die an die Ni-Chelat-Matrix gebundenen, His-Ubiquitin-modifizierten Proteine durch Aufkochen in 2x-SDS-Probenpuffer in Lösung gebracht und über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Wie in Abbildung 4.23 gezeigt, fand sich SUMO1 tatsächlich im His-Ubiquitin-„Pull-down“. Nach Proteasom-Inhibitor-Behandlung konnte ein stärkeres hochmolekulares SUMO1-Signal nachgewiesen werden. Die Spezifität der Signale war durch den Kontroll-Ansatz ohne Ko-Expression von His-Ubiquitin gegeben, in dem kein endogenes oder überexprimiertes SUMO1 detektiert werden konnte.

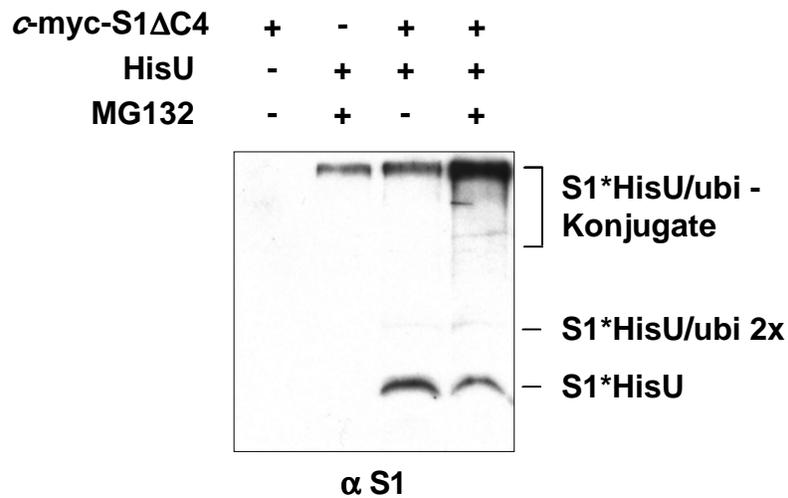


Abbildung 4.23: Immunoblot-Analyse des His-Ubiquitin-„Pulldowns“ transfizierter 293T-Zellen (c-myc-SUMO1ΔC4, His-Ubiquitin) nach MG132-Behandlung.

293T-Zellen wurden wie angegeben mit His-Ubiquitin und c-myc-SUMO1ΔC4 transfiziert. Nach 36 h wurde die Inkubation mit MG132 (6 h) gestartet. Unter denaturierenden Bedingungen wurden die Zellen geerntet, bei 45000 g ultra-zentrifugiert und aus den Überständen His-Ubiquitin-Konjugate aufgereinigt ((Treier et al., 1994), 3.4.11). Die Überstände der in 2x-SDS-Probenpuffer bei 95°C inkubierten Ni-Chelat-Matrices wurden zu gleichen Volumina in einem 15%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und immunologisch mit αS1 analysiert. (**HisU**: His-Ubiquitin; **S1**: SUMO1; **ubi**: endogenes Ubiquitin)

Die Mono-His-Ubiquitin-Form des überexprimierten SUMO1 ist ein eindeutiger und erstmaliger Befund für eine direkte Verbindung zwischen den beiden post-translationalen Modifikationen SUMOylierung und Ubiquitinierung. Dieser wirft viele neue Fragen bzgl. der Art des Mechanismus und der Funktion einer SUMO-Ubiquitinierung auf. Zum einen interessiert, ob ausschließlich nicht-konjugiertes SUMO1 ubiquitiniert wird oder ob SUMO1 erst am Substrat eine zusätzliche Ubiquitinierungsstelle bietet. Zum anderen stellt sich die Frage, ob SUMO1 auch poly-ubiquitiniert werden kann. Eventuell entsteht mono-ubiquitiniertes SUMO1 aber auch erst durch die Aktivität von SUMO-Proteasen.

Konjugiertes SUMO1 trägt Poly-Ubiquitin-Ketten

Aus dem Resultat des His-Ubiquitin-„Pulldown“-Experiments mit überexprimiertem c-myc-SUMO1ΔC4 kann zum einen festgehalten werden, dass eine mono-ubiquitinierte SUMO1-Form gebildet werden kann, zum anderen, dass viele SUMOylierte Proteine gleichzeitig ubiquitiniert werden können.

Danach sind zwei verschiedene Modelle der Modifikation abzuleiten (Abb. 4.24 B). Entweder wird ein Protein parallel SUMOyliert und ubiquitiniert (Substrat A) oder - unter Einbeziehung der nachgewiesenen möglichen mono-ubiquitinierten SUMO1-Form - direkt an SUMO1 ubiquitiniert (Substrat B). Im Fall einer Poly-Ubiquitinierung könnte sogar eine Funktion der SUMOylierung als alternative Ubiquitinierungsstelle postuliert werden (Proteasom-Inhibitor-Effekt, Abb. 4.23).

Um die Möglichkeit der Ubiquitinierung von konjugiertem SUMO1 zu überprüfen, sollten die aus einer *in vivo* Ubiquitinierung an der Ni-Chelat-Matrix angereicherten His-Ubiquitin-modifizierten Proteine mit der Isopeptidase Ulp1 (*S. cerevisiae*) deSUMOyliert werden. Danach wären als an der Matrix gebundene Proteine allein ubiquitinierte Proteine - darunter auch SUMO1 - zu erwarten (Abb. 4.24 B).

Für diese *in vivo* Ubiquitinierung wurden 293T-Zellen mit HA-SUMO1 Δ C4 und His-Ubiquitin ko-transfiziert und die an die Ni-Chelat-Matrix gebundenen Proteine einer *in vitro* DeSUMOylierung mit Ulp1 unterzogen. Die Immunoblot-Analyse mit α HA-Antikörper zeigte ohne Ulp1-DeSUMOylierung das bereits bekannte Muster von mono-ubiquitiniertem SUMO1 und starken SUMO1-Signalen im hochmolekularen Bereich (Abb. 4.23). Diese hochmolekularen Signale verschwinden fast vollständig nach der Behandlung mit Ulp1. Gleichzeitig konnte jetzt HA-SUMO1 Δ C4 als ein-, zwei-, drei- und vierfach-ubiquitiniertes SUMO1 detektiert werden (Abb. 4.24 A).

Daraus folgt, dass zumindest einige der im His-Ubiquitin-„Pulldown“ angereicherten SUMOylierten Proteine direkt über SUMO1 ubiquitiniert sind. Die verschiedenen Kombinationen der beiden post-translationalen Modifikationen sind in Abbildung 4.24 B dargestellt. Nach effizienter Ulp1-DeSUMOylierung sollten an die Ni-Chelat-Matrix nur noch ubiquitinierte Proteine und ubiquitiniertes HA-SUMO1 Δ C4 gebunden sein. Tatsächlich konnten mit dem α HA-Antikörper Poly-Ubiquitin-Ketten an SUMO1 nachgewiesen werden.

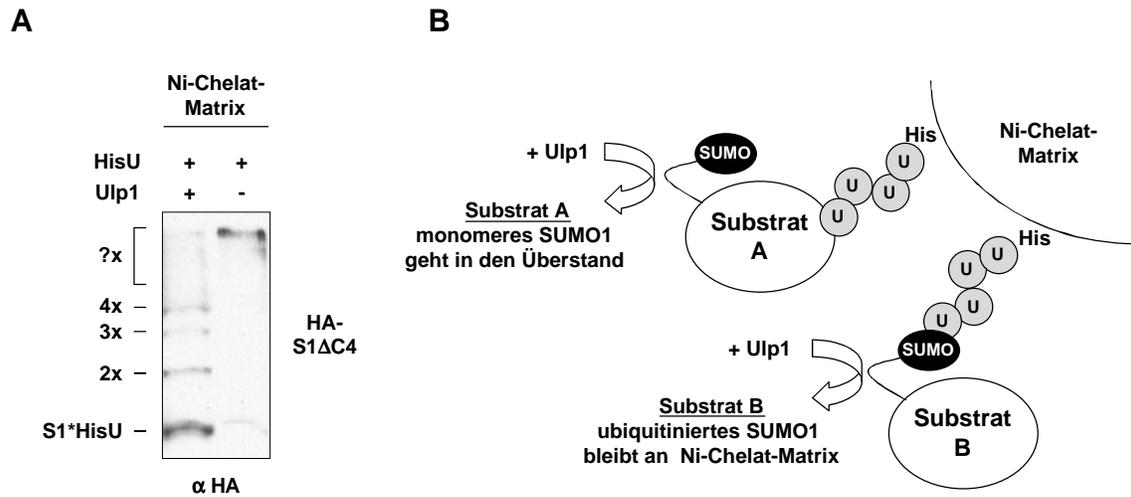


Abbildung 4.24: Immunoblot-Analyse des His-Ubiquitin-„Pulldowns“ transfizierter 293T-Zellen (HA-SUMO1ΔC4, His-Ubiquitin) nach *in vitro* DeSUMOylierung mit GST-Ulp1.

(A) 293T-Zellen wurden mit HA-SUMO1ΔC4 und His-Ubiquitin ko-transfiziert, unter denaturierenden Bedingungen geerntet, bei 45000 g ultra-zentrifugiert und aus den Überständen His-Ubiquitin-Konjugate aufgereinigt (3.4.11). Die Ni-Chelat-Matrix mit gebundenen His-Ubiquitin-modifizierten Proteinen wurde in 1x Transportpuffer umgepuffert, deren Volumen halbiert und mit bzw. ohne GST-Ulp1 für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Proteine der in 2x-SDS-Probenpuffer bei 95°C inkubierten Ni-Chelat-Matrices wurden zu gleichen Volumina in einem 15%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und immunologisch mit αHA analysiert.

(B) Skizze der zwei Möglichkeiten gleichzeitig SUMOylierter und ubiquitinerter Proteine, die im His-Ubiquitin-„Pulldown“ an die Ni-Chelat-Matrix binden.

(HisU: His-Ubiquitin; S1: SUMO1; U: endogenes oder His-markiertes Ubiquitin; Ulp1: GST-Ulp1; ?x: poly-ubiquitinierte Proteine)

Im Zusammenhang mit der SUMO1-Stabilität gegenüber schneller proteasomaler Degradation könnte dies bedeuten, dass konjugiertes SUMO1 ubiquitiniert wird, anschließend aufgrund der Poly-Ubiquitin-Kette samt Substrat zum 26S-Proteasom transportiert, dort jedoch nicht selbst degradiert, sondern wie Ubiquitin abgespalten wird. Während das Substrat proteasomal degradiert werden könnte, würde SUMO1, wie auch Ubiquitin, wiederum für die Modifikation zur Verfügung stehen (Wilkinson, 1997).

Bei dem eben beschriebenen Experiment muss berücksichtigt werden, dass für HA-SUMO1ΔGG, welches sich von dem hier benutzten HA-SUMO1ΔC4 nur C-terminal unterscheidet, Instabilität nachgewiesen wurde (Abb. 4.21 A). Trotzdem wurde das Konstrukt im Hinblick auf bessere Nachweisbarkeit mit dem αHA-Antikörper in diesem

Pilotprojekt eingesetzt. Der Befund einer Poly-Ubiquitinierung des im Konjugat vorliegenden SUMO1 konnte später auch für endogenes SUMO1 nachgewiesen werden. Hierfür wurde die *in vivo* Ubiquitinierung samt anschließender *in vitro* DeSUMOylierung mit Ulp1 in größerem Maßstab - ohne SUMO1-Überexpression - wiederholt. Dieses Mal wurden sowohl die an die Ni-Chelat-Matrices gebundenen Proteine als auch die nach DeSUMOylierung mit Ulp1 im Überstand gelöst vorliegenden Proteine in einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Um in der Immunoblot-Analyse endogenes SUMO1 (mit $\alpha S1$) und His-Ubiquitin (mit αHis) zweifelsfrei detektieren zu können, wurden die Proteine zweimal nebeneinander aufgetragen.

Wie schon für HA-SUMO1 $\Delta C4$ konnte auch für endogenes SUMO1 der Nachweis erbracht werden, dass konjugiertes SUMO1 poly-ubiquitiniert werden kann. Die mit $\alpha S1$ -Antikörper detektierten Banden der an die Ni-Chelat-Matrix gebundenen Proteine entsprachen dem in Abbildung 4.24 A gezeigten Ergebnis für die HA-SUMO1 $\Delta C4$ -Überexpression (Abb. 4.25 A). Der Ansatz nach DeSUMOylierung mit Ulp1 (+Ulp1) zeigte deutliche Signale für ein-, zwei-, drei- und vierfach-ubiquitiniertes SUMO1. Die Doppelbande im molekularen Bereich des zweifach-ubiquitinierten SUMO1 zeigt wahrscheinlich die verschiedenen Ubiquitin-Ketten-Kombinationen (His-Ubiquitin*His-Ubiquitin, His-Ubiquitin*Ubiquitin). In der Probe ohne Ulp1 (-Ulp1) wurden dagegen nur im hochmolekularen Bereich SUMO1-Signale detektiert. SUMO1*His-Ubiquitin konnte im „-Ulp1“-Ansatz zwar nicht im $\alpha S1$ -Immunoblot, jedoch aufgrund höherer Sensitivität des αHis -Antikörpers im αHis -Immunoblot detektiert werden.

Des Weiteren zeigten die Signale des αHis -Immunoblots im „-Ulp1“-Ansatz eindeutig ein-, zwei- und dreifach Ubiquitin-Formen sowie im hochmolekularen Bereich poly-ubiquitinierte Substrate. Zusätzlich waren schwächere Signale auf Höhe des ein- und zweifach-ubiquitinierten SUMO1 zu sehen. Der „+Ulp1“-Ansatz ließ, bereichert um die Signale der jeweiligen SUMO1-Ubiquitin-Formen, im αHis -Immunoblot die Ubiquitin-Signale des „-Ulp1“-Ansatzes erkennen. Die hochmolekularen Signale blieben nach *in vitro* DeSUMOylierung mit Ulp1 ähnlich stark. Dies war erwartet worden, da mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht jedes ubiquitinierte Protein auch SUMOyliert ist.

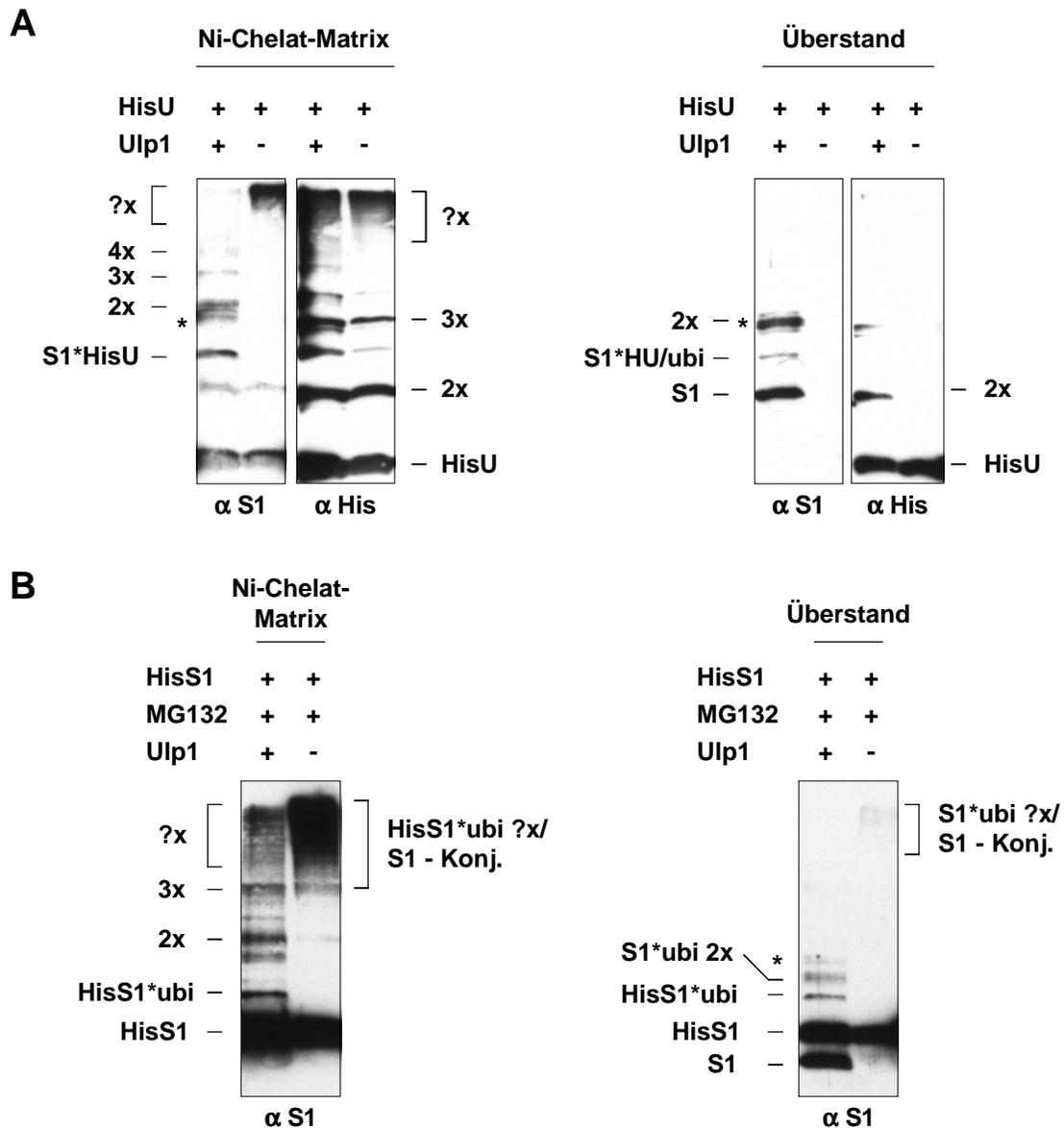


Abbildung 4.25: Immunoblot-Analyse des His-„Pulldowns“ transfizierter 293T-Zellen nach *in vitro* DeSUMOylierung mit GST-Ulp1 (His-Ubiquitin (A), His-SUMO1 Δ C4 (B)).

(A) 293T-Zellen wurden mit His-Ubiquitin transfiziert, unter denaturierenden Bedingungen geerntet, bei 45000 g ultra-zentrifugiert und aus den Überständen His-Ubiquitin-Konjugate aufgereinigt (3.4.11). Die Ni-Chelat-Matrix mit gebundenen His-Ubiquitin-modifizierten Proteinen wurde in 1x Transportpuffer umgepuffert, geteilt und mit bzw. ohne GST-Ulp1 für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Proteine der in 2x-SDS-Probenpuffer bei 95°C inkubierten Ni-Chelat-Matrices (**Ni-Chelat-Matrix**) sowie die gelöst vorliegenden Proteine nach DeSUMOylierung mit GST-Ulp1 (**Überstände**) wurden zu gleichen Volumina in einem 15%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und immunologisch mit α S1 und α His analysiert.

(B) Wie (A), jedoch wurden 293T-Zellen mit His-SUMO1 Δ C4 transfiziert (24 h) und für 6 h mit MG132 behandelt. Die Immunoblot-Analyse wurde mit α S1 durchgeführt.

(**HisU**: His-Ubiquitin; **HisS1**: His-SUMO1 Δ C4; **S1**: SUMO1; **ubi**: endogenes Ubiquitin; **?x**: poly-ubiquitinierte Proteine; *****: kreuzreagierende Bande)

Die Überstände nach Inkubation der Ni-Chelat-Matrix mit bzw. ohne Ulp1 wurden ebenfalls zweimal nebeneinander in einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und mit den Antikörpern α S1 und α His im Immunoblot analysiert. Im „+Ulp1“-Ansatz konnten eindeutig freies und mono-ubiquitiniertes SUMO1 nachgewiesen werden (α S1). Auf Höhe der zweifach-ubiquitinierten Form traten, wie schon im „+Ulp1“-Ansatz der Ni-Chelat-Matrix eine starke und zwei schwächere Banden auf. Erstere beruhte auf einer Kreuzreaktion von α S1 mit einem Protein der GST-Ulp1-Präparation, die zwei schwächeren Banden könnten die verschiedenen Kombinationen des mit endogenem und/oder mit His-Ubiquitin-modifiziertem SUMO1 darstellen.

Um ausschließen zu können, dass die *in vivo* Ubiquitinierung des endogenen SUMO1 ein von Ubiquitin-Überexpression (HisU, Abb. 4.25 A) abhängiger Prozess ist, wurde das Experiment statt mit His-Ubiquitin mit His-SUMO1 Δ C4 (HisS1, Abb. 4.25 B) transfizierten 293T-Zellen wiederholt. Wie schon im His-Ubiquitin-„Pulldown“ wurden die an der Ni-Chelat-Matrix gebundenen sowie die nach *in vitro* DeSUMOylierung mit Ulp1 gelöst vorliegenden Proteine im Immunoblot mit α S1-Antikörper analysiert. Die zwei Varianten der gleichzeitig SUMOylierten und ubiquitinierten Proteine der im His-SUMO1-„Pulldown“ an Ni-Chelat-Matrix gebundenen Proteine sind in Abbildung 4.26 skizziert.

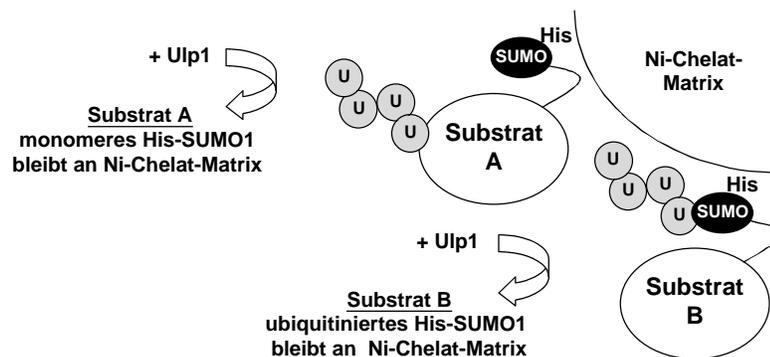


Abbildung 4.26: Gleichzeitig ubiquitinierte und SUMOylierte Proteine im His-SUMO1-„Pulldown“. Skizze der zwei Möglichkeiten gleichzeitig SUMOylierter und ubiquitiniertes Proteine, die im His-SUMO1-„Pulldown“ an die Ni-Chelat-Matrix binden. (U: endogenes Ubiquitin; Ulp1: GST-Ulp1)

Mit dem His-SUMO1-„Pull-down“ konnten ebenfalls hochmolekulare SUMO1-Konjugate nachgewiesen werden. Deren Signal-Abnahme nach DeSUMOylierung bei gleichzeitigem Auftreten niedermolekularer SUMO1-Formen entsprach dem Verhalten des endogenen SUMO1 im His-Ubiquitin-„Pull-down“ (Abb. 4.25 A). Die Menge des an der Ni-Chelat-Matrix gebundenen monomeren nicht-ubiquitinierten His-SUMO1 Δ C4 nahm nach Ulp1-Behandlung zu. Dieses His-SUMO1 Δ C4 muss aus Substraten hervorgegangen sein, die parallel ubiquitiniert und SUMOyliert oder mehrfach mit SUMO modifiziert waren.

Das im Überstand detektierte monomere His-SUMO1 Δ C4 könnte daraus resultieren, dass im Verlauf der Ulp1-Behandlung His-SUMO1 Δ C4 von der Ni-Chelat-Matrix abdiffundiert ist.

Die beiden Experimente zeigen, dass sowohl endogene Mengen SUMO1 (His-Ubiquitin-„Pull-down“) als auch endogene Mengen Ubiquitin (His-SUMO1-„Pull-down“) für die Poly-Ubiquitinierung von SUMO1 ausreichend sind und unterstützen die Hypothese der SUMOylierung als alternative Ubiquitinierungsstelle.

4.4.3 Mechanismus der SUMO1-Ubiquitinierung

Nachdem poly-ubiquitiniertes SUMO1 in endogenen SUMO1-Konjugaten nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage nach dem Mechanismus dieser Kombination post-translationaler Modifikationen. Wird zunächst das Substrat SUMOyliert und SUMO1 erst am Substrat ubiquitiniert? Oder wird das Substrat direkt mit ein-, zwei-, oder dreifach-ubiquitiniertem SUMO1 modifiziert? Die in den „Pull-down“-Experimenten detektierten Mono- oder Di-Ubiquitin-Formen (Abb. 4.23, 4.24 A, 4.25 B) gaben keine eindeutige Antwort. Diese Formen könnten in beiden Mechanismen als Zwischenstufen auftreten. Entweder modifizieren diese Zwischenformen noch ein Substrat oder stammen aus der DeSUMOylierung eines SUMO1-Konjugates; eventuell ist auch beides der Fall.

Kann freies SUMO1 poly-ubiquitiniert werden?

Eine Möglichkeit zu überprüfen, ob SUMO1 nicht-konjugiert überhaupt ubiquitiniert werden kann, ist der His-Ubiquitin-„Pulldown“ mit dem nicht-konjugierbaren SUMO1-Konstrukt SUMO1 Δ GG-HA. Tatsächlich konnte in dieser *in vivo* Ubiquitinierung ein-, zwei-, drei- und vierfach-ubiquitiniertes SUMO1 Δ GG-HA im Immunoblot mit α HA-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 4.27 A).

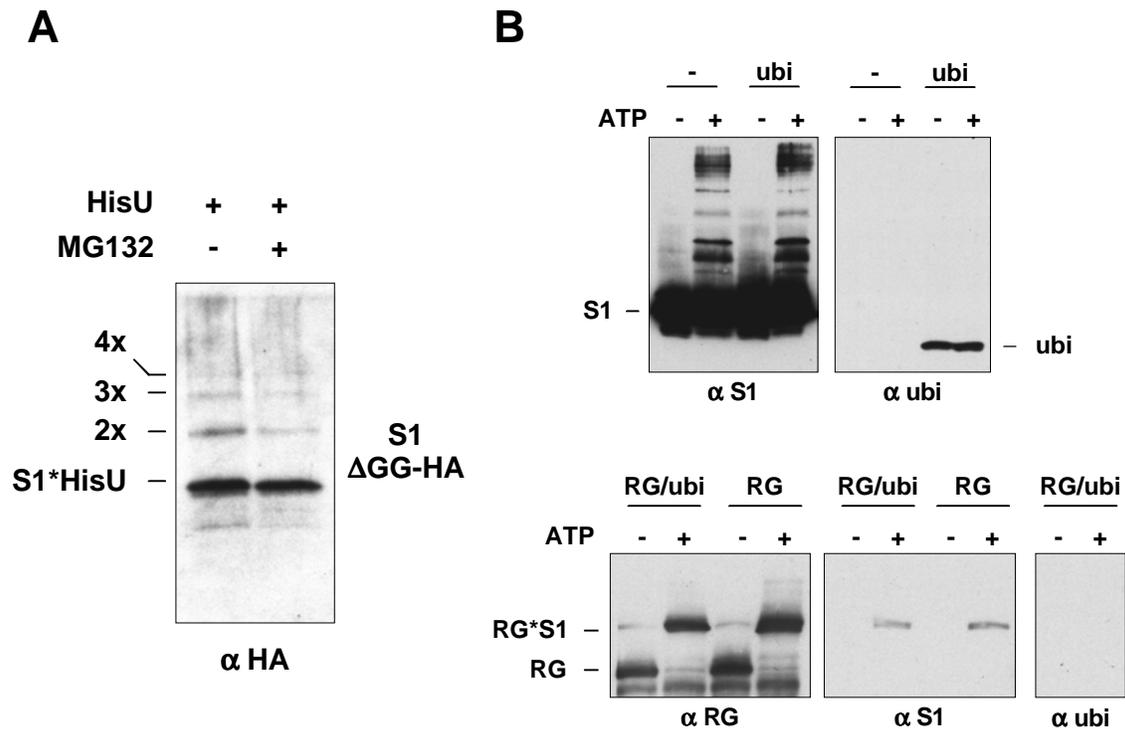


Abbildung 4.27: Immunoblot-Analyse des His-Ubiquitin-„Pulldowns“ mit SUMO1 Δ GG-HA nach MG132-Behandlung (A) und *in vitro* SUMOylierung von Ubiquitin (B).

(A) 293T-Zellen wurden mit SUMO1 Δ GG-HA und His-Ubiquitin ko-transfiziert, 6 h mit MG132 inkubiert und unter denaturierenden Bedingungen geerntet. Die Zell-Lysate wurden bei 45000 g ultra-zentrifugiert und aus den Überständen His-Ubiquitin-Konjugate aufgereinigt (3.4.11). Die Proteine der in 2x-SDS-Probenpuffer bei 95°C inkubierten Ni-Chelat-Matrices wurden zu gleichen Volumina in einem 15%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und immunologisch mit α HA analysiert.

(B) Rekombinantes Ubiquitin allein (oben) oder in Kombination mit RanGAP1 (unten) wurde mit rekombinanten E1-, E2-Enzym und SUMO1WT Δ C4 bei 30°C inkubiert. Die mit ATP (1 mM) gestartete SUMOylierungsreaktion wurde nach 45 min mit 2x-SDS-Probenpuffer gestoppt und in der Immunoblot-Analyse mit α S1, α ubi und α RanGAP1 überprüft.

(HisU: His-Ubiquitin; RG*S1: RanGAP1*SUMO1; RG: RanGAP1; S1: SUMO1; ubi: Ubiquitin)

Im Vergleich zu MG132-behandelten Zellen konnte keine Veränderung der Signale und somit kein Einfluss des Proteasom-Inhibitors festgestellt werden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der für endogenes SUMO1 gezeigten Resistenz gegenüber proteasomalem Abbau (Abb. 4.20).

Kann freies Ubiquitin SUMOyliert werden?

Die Feststellung, dass freies SUMO1 ubiquitiniert werden kann, ließ die Frage zu, ob analog auch freies Ubiquitin SUMOyliert werden kann. Dies wurde in einer *in vitro* SUMOylierung mit rekombinantem Ubiquitin als alleiniges Substrat getestet. In der parallelen Immunoblot-Analyse mit α S1- und α Ubi-Antikörper war jedoch im Vergleich zu der Kontrolle (-ATP) kein Unterschied zu erkennen (Abb. 4.27 B, oben). Die mit α S1 detektierten Banden entsprachen den SUMOylierten Formen der eingesetzten Enzyme Aos1/Uba2 und Ubc9.

Um zu überprüfen, ob an einem SUMO1-Substrat heterogene Ketten aus SUMO1 und Ubiquitin gebildet werden können, wurden in einem zweiten Ansatz Ubiquitin und RanGAP1 gleichzeitig als Substrate eingesetzt (Abb. 4.27 B, unten). In der Immunoblot-Analyse mit α RG- und α S1-Antikörper konnte im Gegensatz zu der Kontrolle (-ATP) RanGAP1*SUMO1 detektiert werden. Im Vergleich zu einem Ansatz, der nur RanGAP1 als Substrat enthielt, konnten jedoch keine Unterschiede festgestellt werden. Dies wurde durch die Immunoblot-Analyse mit α Ubi bestätigt, die kein hochmolekulares Signal zeigte. Daraus resultiert, dass unter den gewählten *in vitro* Bedingungen, in denen der Einfluss von E3-Ligasen nicht berücksichtigt war, kein SUMOyliertes Ubiquitin detektiert werden konnte (Abb. 4.27 B).

Aus diesen zwei Experimenten kann in Bezug auf den Mechanismus der SUMO1-Ubiquitinierung festgehalten werden, dass nicht-konjugiertes SUMO1 ubiquitiniert werden kann. Dies bedeutet, dass beide zuvor erwähnten Mechanismus-Varianten weiterhin postuliert werden können:

(A) Substrat-SUMOylierung, SUMO-Ubiquitinierung am Substrat

(B) SUMO-Ubiquitinierung, Substrat-SUMOylierung mit ubiquitiniertem SUMO

Festzuhalten bleibt, dass SUMO1 weiterhin die Funktion einer alternativen Ubiquitinierungsstelle zugeschrieben werden kann, wobei SUMO1 wie Ubiquitin recycelt wird, während das 26S-Proteasom das Substrat degradiert.

Ist die N-terminale Sequenz von SUMO1 in dessen Ubiquitinierung involviert?

Ein weiterer Teilaspekt des Mechanismus der SUMO1-Ubiquitinierung betrifft die Verknüpfungsstelle in SUMO1. Werden Lysin-Reste benutzt oder findet die Ubiquitinierung an der α -NH₂-Gruppe der ersten Aminosäure statt? SUMO1 besitzt insgesamt elf Lysine, von denen drei in der flexiblen N-terminalen Sequenz lokalisiert sind (K7, K16, K17). Außerdem könnte der SUMO1-N-Terminus Bindungsstellen für die zur Ubiquitinierung benötigten interagierenden Proteine bieten.

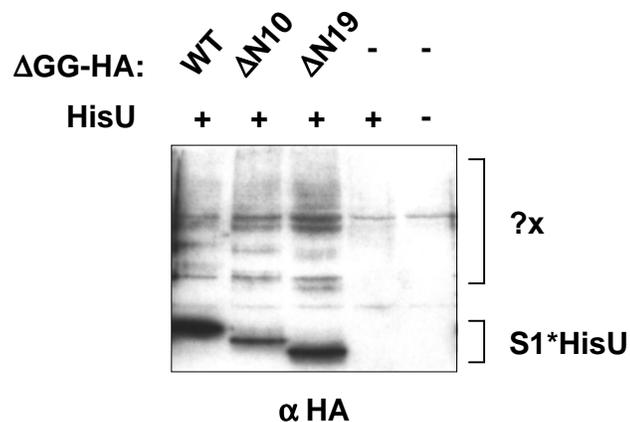
Abbildung 4.28:

Immunoblot-Analyse des His-Ubiquitin-„Pulldowns“ mit den N-terminalen Deletionsmutanten Δ N10 und Δ N19 als SUMO1 Δ GG-HA-Konstrukt.

293T-Zellen wurden mit den angegebenen SUMO1-Konstrukten und His-Ubiquitin ko-transfiziert, unter denaturierenden Bedingungen geerntet, bei 45000 g ultrazentrifugiert und aus den Überständen His-Ubiquitin-Konjugate aufgereinigt (3.4.11).

Die Proteine der in 2x-SDS-Probenpuffer bei 95°C inkubierten Ni-Chelat-Matrices wurden zu gleichen Volumina in einem 15%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und immunologisch mit α HA analysiert.

(HisU: His-Ubiquitin; S1: SUMO1; WT, Δ N10, Δ N19: Tab. 4.1; ?x: poly-ubiquitinierte Proteine)



Um zu kontrollieren, ob der N-Terminus in der Ubiquitinierung involviert ist, wurde die *in vivo* Ubiquitinierung mit SUMO1 Δ GG-HA-Konstrukten der N-terminalen Deletionsmutanten Δ N10 und Δ N19 wiederholt. Im Immunoblot mit α HA-Antikörper konnte einfach-, zweifach- und poly-ubiquitiniertes SUMO1WT Δ GG detektiert werden. Gleiches galt für die beiden N-terminalen Deletionsmutanten (Abb. 4.28). Demzufolge ist die N-terminale Sequenz in SUMO1 für die Ubiquitinierung - zumindest des nicht-konjugierten SUMO1 - nicht essentiell.

5 Diskussion

5.1 Struktur-/Funktionsanalyse von SUMO1

Die ursprüngliche Zielsetzung dieser Arbeit war die Identifikation der Aminosäure-Reste in SUMO1, die an den verschiedenen Prozessen der reversiblen SUMOylierung beteiligt sind. Dies ist erstens die Modifikation, die über Aos1/Uba2 (E1-Enzym), Ubc9 (E2-Enzym) und - mittlerweile auch für die SUMOylierung identifizierten - E3-Ligasen katalysiert wird, zweitens die Demodifikation, an der SUMO-spezifische Cystein-Proteasen beteiligt sind, und drittens die diversen Funktionen der SUMOylierung. Als Analysetechnik für die SUMO1-Mutanten wurde zunächst die transiente Transfektion in Säugerzellen gewählt. Diese erlaubt zum einen, die Modifikationsmuster der Mutanten mit Hilfe der Immunoblot-Technik zu vergleichen und zum anderen, deren zelluläre Lokalisation in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie zu überprüfen. Unter verschiedenen Gesichtspunkten wurden 42 SUMO1-Mutanten erzeugt (Tab. 4.1, 4.2) und mit den genannten Methoden analysiert. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 4.3 und Abbildung 4.17. Einige ausgewählte SUMO1-Mutanten werden im Folgenden diskutiert.

5.1.1 SUMO1-Mutagenese

Die an der Oberfläche exponierten Aminosäure-Reste stellen für die verschiedenen Ubiquitin-ähnlichen Proteine Möglichkeiten der Spezifität für Interaktionen dar. Insbesondere die Interaktionen mit den jeweils eigenen Enzymen der Modifikation und Demodifikation benötigen spezifische Interaktionsflächen. Abbildung 5.1 zeigt die Oberflächenladungen von SUMO1 und von Nedd8 jeweils im Vergleich zu Ubiquitin. Die drei identisch gefalteten Proteine unterscheiden sich durch die Verteilung der Oberflächenladung erheblich voneinander. Daher sind die an der Oberfläche von SUMO1

exponierten Aminosäure-Reste, insbesondere die, die sich von den analogen Aminosäure-Resten des Ubiquitins in ihren Eigenschaften abgrenzen, Schwerpunkt der SUMO1-Mutagenese gewesen.

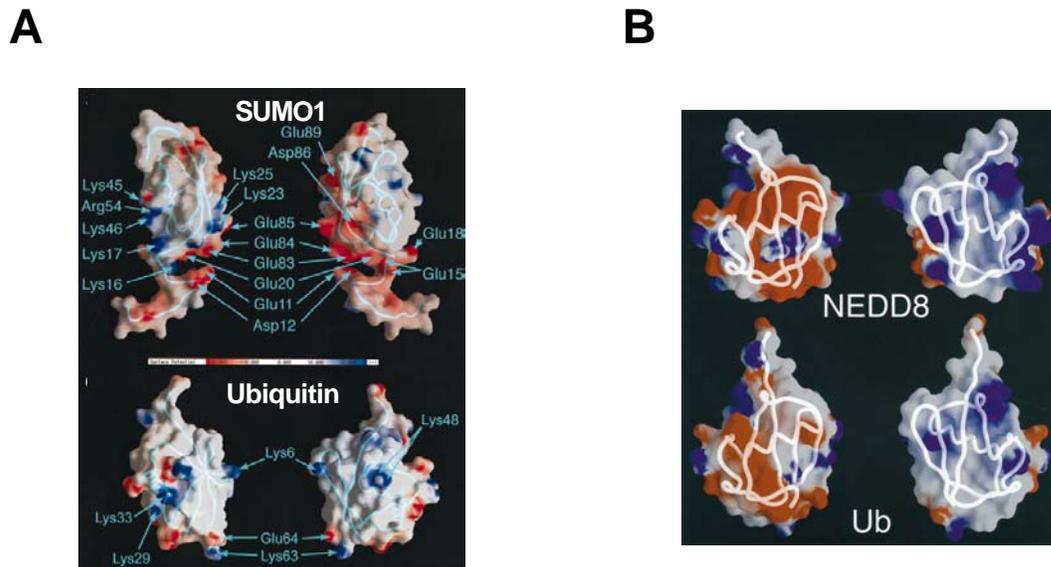


Abbildung 5.1: Oberflächenladungen von SUMO1, Ubiquitin und Nedd8.

Verteilung der Oberflächenladungen in humanem SUMO1 und Ubiquitin ((A) (Bayer et al., 1998)) sowie in humanem Nedd8 und Ubiquitin ((B) (Whitby et al., 1998)) im Vergleich.

Drastisch reduzierte SUMOylierung der C-terminalen Tripel-Mutante T-ubi

In der Mutante SUMO1-T-ubi sind C-terminal drei Aminosäure-Reste zu den analogen Aminosäure-Resten des Ubiquitins ausgetauscht (Q92/L71, E93/R72, Q94/L73). Die Analyse des *in vivo* SUMOylierungsmusters zeigt für diese Mutante im Vergleich zum SUMOylierungsmuster des Wildtyps eine besonders starke Reduktion an SUMO1-Konjugaten bei gleichzeitiger Zunahme des nicht-konjugierten SUMO1 (Abb. 4.14). Dieses Ergebnis könnte entweder auf einem die Modifikation inhibierenden Effekt oder auf einem die Demodifikation verstärkenden Effekt beruhen. Anhand parallel durchgeführter biochemischer Analysen der SUMO1-T-ubi-Mutante kann der Effekt eindeutig auf einen die Modifikation inhibierenden Effekt zurückgeführt werden: Beispielsweise ist die Effizienz dieser Mutante in der *in vitro* Modifikation von RanGAP1 drastisch reduziert (Abb. 4.4, 4.7). Die in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie

beobachtete zelluläre Lokalisation ist dahingehend verändert, dass SUMO1-T-ubi im Zellkern nur noch diffus und im Zytoplasma verstärkt vorliegt. Diese Lokalisation ist der des nicht-konjugierbaren SUMO1WT Δ GG-Konstrukts sehr ähnlich (Abb. 4.13). Das Ergebnis bestätigt sowohl die *in vitro* am Beispiel des RanGAP1 nachgewiesene Reduktion der SUMOylierungsfähigkeit von SUMO1-T-ubi als auch die *in vivo* festgestellte starke Reduktion von SUMO1-T-ubi-Konjugaten.

Starke Einbußen in der Modifikation könnten in einem Verlust der Thioester-Bildung mit dem E1- oder E2-Enzym der SUMOylierung begründet liegen. Abbildung 5.2 B zeigt aus Strukturdaten abgeleitet die Enzym-Interaktionsflächen (E1-, E2-Enzym, Protease) als farbig markierte Aminosäure-Reste in der 3-D-Struktur von SUMO1. In der zusätzlich gezeigten Sequenz von humanem SUMO1 sind die involvierten Aminosäure-Reste entsprechend farbig markiert. Im Fall des Aminosäure-Rests E93 ist für den analogen Aminosäure-Rest R72 in Ubiquitin eine essentielle Beteiligung an der Bindung von adenyliertem Ubiquitin-Intermediat und E1-Enzym bereits nachgewiesen worden (Burch und Haas, 1994) (* in Abb. 5.2 A). Konsistent mit der Interpretation, dass SUMO1-T-ubi bereits für die Interaktion mit dem E1-Enzym defizient ist, ist auch der Befund, dass selbst höchste Konzentrationen dieser Mutante nicht in der Lage sind, die Modifikation von SUMO1-Wildtyp zu inhibieren (Abb. 4.7). In diesem Zusammenhang kann darüber spekuliert werden, ob die Mutationen in der Tripel-Mutante SUMO1-T-ubi ausreichen, um einen Thioester mit dem E1-Enzym der Ubiquitinierung (Uba1) zu bilden. An der Position des - neben R72 - in Ubiquitin für die Bindung an das E1-Enzym als ebenso essentiell charakterisierten Aminosäure-Restes R42 weist SUMO1 auf jeden Fall ebenfalls einen Arginin-Rest (R63) auf (* in Abb. 5.2 A).

In einer weiteren Charakterisierung der Mutante SUMO1-T-ubi könnte die Thioester-Bildung mit den E1- und E2-Enzymen der SUMOylierung und der Ubiquitinierung *in vitro* überprüft werden. Zusätzlich könnte ein Ubc9-„Pull-down“-Experiment Aufschluss über die an SUMO1-T-ubi bindenden Enzyme geben.

Als an der Interaktion direkt beteiligt konnten insgesamt 16 Aminosäure-Reste definiert werden. Die sich daraus ergebende Interaktionsfläche trägt überwiegend negativ geladene und hydrophobe Aminosäure-Reste. Dementsprechend komplementär - überwiegend aus positiv geladenen und hydrophoben Aminosäure-Resten - ist die Interaktionsfläche in Ubc9 zusammengesetzt.

Aus der SUMO1-Mutagenese sind vier SUMO1-Mutanten hervorgegangen, deren mutierte Aminosäure-Reste in der Ubc9-Interaktionsfläche liegen und in der Analyse des *in vivo* SUMOylierungsmusters im Vergleich zu dem Muster des Wildtyps Veränderungen aufweisen (Abb. 5.2, 4.15 A, B, E). Dies sind die beiden Alanin-Mutanten E83A und D86A sowie die beiden Tripel-Mutanten E83A/E84A/E85A und E83Q/E84K/D86S. Generell ist zunächst festzuhalten, dass für alle vier Mutanten in der transienten Transfektion SUMO1-Konjugate nachgewiesen werden können. Die beiden Einfach-Mutanten zeigen sogar ein verstärktes Signal für nicht-konjugiertes SUMO1 und SUMO1-Konjugate. Die Tripel-Alanin-Mutante E83A/E84A/E85A und die Tripel-Mutante E83Q/E84K/D86S, deren Mutationen zu den analogen Seitenketten in Ubiquitin verändert sind, zeigen im Vergleich zu SUMO1-Wildtyp allenfalls ein abgeschwächtes Signal für nicht-konjugiertes SUMO1. Insbesondere der Nachweis der Modifikation für die beiden Tripel-Mutanten lässt vermuten, dass die nicht-kovalente Interaktion mit Ubc9 von der Thioester-Bildung funktionell getrennt ist.

Mit einem Ubc9-„Pull-down“-Experiment könnten diese Mutanten im Vergleich zu SUMO1-Wildtyp auf eine Reduktion bezüglich der Ubc9-Affinität getestet werden. Eine zusätzliche Quantifizierung der Modifikation *in vitro* könnte die Frage klären, ob die nicht-kovalente Ubc9-Interaktion eine von der Ubc9-Thioester-Bindung unabhängige Funktion besitzt.

Spezifische RanGAP1-SUMOylierung der Mutanten F36L/K39E und K39E/K46A

Die zwei Doppel-Mutanten F36L/K39E und K39E/K46A sind in der Immunoblot-Analyse der SUMOylierungsmuster *in vivo* fast ausschließlich als RanGAP1*SUMO1 und als nicht-konjugierte Form zu detektieren (Abb. 4.15 D). RanGAP1-SUMOylierung kann, wie mit *in vitro* Daten und Strukturanalyse belegt, sehr effizient ohne Beteiligung einer E3-Ligase stattfinden (2.3.2). Daher deutet das Ergebnis darauf hin, dass die

E1- und E2-Interaktionen durch die Mutationen nicht beeinflusst werden, möglicherweise aber die Interaktion mit E3-Ligasen, die für andere Substrate als RanGAP1 gebraucht werden. Die veränderten Aminosäure-Reste der Doppel-Mutanten F36L/K39E und K39E/K46A sind in SUMO1 in der Region der alpha-Helix 1 lokalisiert. Diese Region ist der ausgedehnten Ubc9-Interaktionsfläche abgewandt (Abb. 5.2 B). Die Interaktion einer E3-Ligase würde in diesem Modell die Ubc9-Interaktion nicht behindern. Der Nachweis einer direkten Interaktion der E3-Ligasen mit SUMO1 wurde bereits für PIASx α *in vitro* erbracht. Als SUMO1-Bindungsstelle in PIASx α wurden die Aminosäure-Reste 467-487 bestimmt, eine C-terminale Sequenzabfolge, die überwiegend aus sauren Seitenketten und Serin-Resten zusammengesetzt ist (Kotaja et al., 2002). Auch in weiteren E3-Ligasen liegen ähnliche Sequenzabfolgen vor.

Um die Hypothese der Beteiligung der SUMO1-Aminosäure-Reste F36, K39 und K46 an einer E3-Ligase-Interaktion zu bestätigen, könnte ein „Pull-down“-Experiment mit PIASx α durchgeführt werden. Außerdem könnten die Mutanten mit Hilfe von *in vitro* SUMOylierungen verschiedener Kombinationen aus E3-Ligase und Substrat (z.B. PIAS/p53, RanBP2/Sp100) im Vergleich zur RanGAP1-Modifikation - ohne Beteiligung einer E3-Ligase - getestet werden.

5.1.2 Funktionsanalyse des SUMO1-N-Terminus

Parallel zu der allgemeinen SUMO1-Mutagenese ist die konkrete Frage nach der Funktion des SUMO1-N-Terminus, der das Strukturmerkmal der SUMO-Proteine darstellt, detaillierter untersucht worden. Die weitgehend ungeklärte Rolle des SUMO1-N-Terminus wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Noch immer ist nicht geklärt, ob die N-terminale Sequenz Protein-Interaktionen vermittelt oder SUMO1 vor Interaktionen schützt (Bylebyl et al., 2003).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden mehrere N-terminale Punktmutationen sowie N-terminale Deletionsmutanten erzeugt und unter verschiedenen Aspekten untersucht.

In Tabelle 5.1 sind die zur Identifikation der N-Terminus-Funktion durchgeführten Experimente mit den dazugehörigen Mutanten aufgelistet.

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Charakterisierungsschritte der N-terminalen Mutanten.

SUMO1-Konstrukt	Modifikation <i>in vitro</i>		Demodifikation <i>in vitro</i>		RanBP2-Interaktion von RG1*SUMO1		Modifikation <i>in vivo</i>	Lokalisation <i>in vivo</i>
	RG1	Z-L	RG1	Z-L	<i>in vitro</i>	IF		
ΔN10	√	√	√	√	√	√	√	√
ΔN19						(√)	√	(√)
ΔN21	√	√	√	√	√	√	√	√
E5A/K7A							√	
S9A							√	(√)
S9D							√	(√)
S9E							√	√
K7R							√	(√)
K16R							√	(√)
K17R							√	(√)

(): Daten ermittelt, aber hier nicht als Abbildung gezeigt; **IF**: Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit Digitonin-Permeabilisation; **RG1**: RanGAP1 als Substrat; **Z-L**: HeLa-Zell-Lysat als Substratquelle.

SUMOylierung verläuft N-Terminus-unabhängig

Vor allen Dingen die quantifizierbaren *in vitro* Studien mit den N-terminalen Deletionsmutanten lassen den Schluss zu, dass der SUMO1-N-Terminus weder eine signifikante Rolle in der Erkennung des E1- und E2-Enzyms noch der SUMO-Proteasen übernimmt. Gegen einen starken Einfluss des N-Terminus auf die SUMO1-E3-Ligase-Interaktion sprechen deren *in vitro* Modifikation mit HeLa-Zell-Lysat als Substratquelle sowie die dem Wildtyp ähnlichen SUMOylierungsmuster *in vivo* (Abb. 4.5, 4.14). Die Quantifizierung der SUMOylierung in einem *in vitro* System mit spezifischer E3-Ligase-Aktivität war zu dem Zeitpunkt des Experiments mangels bekannter E3-Ligasen nicht möglich.

Aktuell wird für den SUMO1-N-Terminus eine Vermittlung spezifischer Protein-Interaktionen und somit die Beteiligung an der Funktion der SUMOylierung postuliert. Die für die N-terminalen SUMO1-Mutanten in der Immunfluoreszenz beobachtete zelluläre Lokalisation, die jeweils der Lokalisation des SUMO1-Wildtyps entspricht, kann diese Hypothese einer generellen Rolle des N-Terminus in der Protein-Interaktion jedoch nicht unterstützen (Abb. 4.12, 4.13). Außerdem wurde am Beispiel der Interaktion von RanGAP1*SUMO1 mit RanBP2 eine spezifische Funktion der SUMOylierung

(Lokalisation am Zellkernporenkomplex) auf die Beteiligung der N-terminalen Sequenz überprüft. Der *in vitro* Nachweis der Interaktion, wie auch die in der Immunfluoreszenz nachgewiesene Zellkernporenkomplex-Lokalisation weisen darauf hin, dass diese SUMO1-Funktion N-Terminus-unabhängig stattfinden kann (Abb. 4.11, 4.12). In ihrer Gesamtheit deutet die in dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung der N-terminalen SUMO1-Mutanten an, dass der N-terminalen Sequenz keine essentielle Rolle in der SUMOylierung zukommt. Zu diesem Resultat führten auch die vor kurzem veröffentlichten Experimente einer N-terminalen Deletionsmutante des Hefe-Homologs Smt3p (Bylebyl et al., 2003).

Effekte der N-terminalen Deletionsmutante SUMO1 Δ N10

In der Analyse der SUMOylierungsmuster *in vivo* zeigt die N-terminale Deletionsmutante SUMO1 Δ N10 reproduzierbar erhöhte Expression (Abb. 4.14). Sowohl nicht-konjugiertes SUMO1 als auch SUMO1-Konjugate sind gegenüber SUMO1-Wildtyp oder anderen Mutanten stark angereichert. Eine erhöhte Expression wurde auch für nicht-konjugierbare SUMO1 Δ N10-Konstrukte mit verschiedenen N-terminalen Markierungen sowie anhand des nicht-markierten Konstrukts beobachtet (Abb. 4.21). Dies lässt sich nicht durch Unterschiede in der Transkription erklären. Auch die anfängliche Vermutung, dass dieser Effekt auf eine N-Terminus-abhängige Regulation der SUMO1-Degradation zurückzuführen sei, konnte nicht bestätigt werden. Weder eine Veränderung der mRNS-Menge noch eine veränderte Sensitivität unter Proteasom-Inhibitor-Einfluss konnten im Vergleich zu SUMO1-Wildtyp nachgewiesen werden (Abb. 4.19, 4.21). Daraus folgt, dass die erhöhten Expressionsmengen im Vergleich zur Expression von SUMO1-Wildtyp möglicherweise auf einer veränderten Translationsrate der Mutante SUMO1 Δ N10 beruhen. Eine Überprüfung auf Translationsunterschiede zwischen SUMO1 Δ N10 und Wildtyp würde klären, ob dem „stabilisierenden“ Effekt andere Ursachen zugrunde liegen.

Besitzt die unstrukturierte Sequenz des SUMO1-N-Terminus die Funktion einer regulatorischen Domäne?

Nachdem für die N-terminale Sequenz in SUMO1 keine essentielle Funktion in der SUMOylierung nachgewiesen werden konnte, wird die Hypothese einer regulatorischen Rolle wahrscheinlicher. Beispielsweise wurde für das Hefe-Homolog Smt3p *in vitro* und *in vivo* eine zur Ubiquitinierung analoge Kettenbildung an K15 (N-Terminus) beobachtet (Bencsath et al., 2002; Bylebyl et al., 2003; Johnson und Gupta, 2001). Dieser Lysin-Rest gehört dem SUMO-Konsensus-Motiv VKPE an. In der SUMO1-Sequenz ist ein solches SUMO-Konsensus-Motiv nicht vorhanden und für SUMO1 ist Kettenbildung bislang nur *in vitro* - unabhängig von der N-terminalen Sequenz - bekannt (Pichler et al., 2002). Trotzdem könnte unter Beteiligung einer Phosphorylierung von S9 in der N-terminalen Sequenz ein SUMO-Konsensus-Motiv nachgeahmt werden und somit Kettenbildung *in vivo* postuliert werden. Die Sequenzabfolge AKPS ähnelt mit phosphoryliertem Serin-Rest der Konsensus-Sequenz $\Psi Kx E/D$. Interessant sind in diesem Zusammenhang die Punktmutationen S9A, S9D und S9E. Die Analyse der SUMOylierungsmuster zeigt im Vergleich zu SUMO1-Wildtyp für S9A und S9E eine Anreicherung an SUMO1-Konjugaten, für S9D eine Abnahme von freiem SUMO1 (Abb. 4.16). Diese gegenläufigen Effekte der SUMO1-Stabilisierung (S9A, S9E) und SUMO1-Destabilisierung (S9D) sprechen für eine Phosphorylierungsstelle. Mit dem Suchprogramm „NetPhos 2.0 Prediction Results“ wurde S9 mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit als Phosphorylierungsstelle für CK2 (Caseinkinase 2) vorhergesagt. Ein erstes *in vitro* Phosphorylierungsexperiment von SUMO1 mit CK2 war dementsprechend positiv (Daten nicht gezeigt).

Neben der erwähnten Funktion des SUMO-Konsensus-Motivs könnte eine Phosphorylierung an S9 auch andere molekulare Interaktionen beeinflussen und/oder als Regulationssignal dienen. Eine mit dem beobachteten Effekt der Stabilisierung einiger SUMO1-Mutanten im Zusammenhang stehende Funktion wäre die eines Ubiquitinierungssignals. Die Hypothese einer SUMO1-Ubiquitinierung wurde im zweiten Teil der Arbeit überprüft.

5.2 Die Ubiquitinierung von SUMO1

5.2.1 SUMOylierung und Ubiquitinierung modifizieren manche Substrate „kooperativ“

Als bisher einziger Berührungspunkt der beiden post-translationalen Modifikationen, SUMOylierung und Ubiquitinierung, wurde in der Literatur der Ubiquitin-Antagonismus der SUMOylierung beschrieben. Ein solcher Antagonismus wurde bisher für zwei Substrate postuliert: I κ B α wird mit K48-verknüpften Ubiquitin-Einheiten poly-ubiquitiniert und PCNA wird mono-ubiquitiniert bzw. mit K63-verknüpften Ubiquitin-Einheiten poly-ubiquitiniert (Desterro et al., 1998; Hoege et al., 2002; Stelter und Ulrich, 2003). Die Funktion der SUMOylierung als Ubiquitin-Antagonismus wird im Fall des I κ B α in der Inhibition der proteasomalen Degradation gesehen. Im Fall des PCNA inhibiert die SUMOylierung eine nicht-proteolytische Funktion der Ubiquitinierung (DNS-Reparatur) und verleiht dem Substrat zugleich eine neue Funktion (DNS-Replikation in der S-Phase).

In dieser Arbeit wird anhand der *in vivo* Ubiquitinierung mit anschließender Ulp1-katalysierten DeSUMOylierung erstmalig gezeigt, dass endogenes konjugiertes SUMO1 poly-ubiquitiniert wird. Mit der Proteasom-Inhibitor-Behandlung von 293T-Zellen in Kombination mit einer DeSUMOylierung durch endogene Isopeptidasen wird zudem bewiesen, dass SUMO1 kein Substrat der schnellen proteasomalen Degradation ist (Abb. 4.25). Der Nachweis einer Halbwertszeit für endogenes SUMO1 von ungefähr 10 h unterstützt diesen Befund (Daten nicht gezeigt). Eine Ubiquitinierung von SUMO1 erweitert das bekannte Spektrum der SUMO1-Funktionen um ein weiteres Zusammenspiel von SUMOylierung und Ubiquitinierung. Im Gegensatz zum Ubiquitin-Antagonismus deutet der hier erbrachte Nachweis der SUMOylierung als alternative Ubiquitinierungsstelle erstmalig auf eine „kooperative“, Substrat-spezifische, post-translationalen Modifikation mit SUMO1 und Ubiquitin. Die vielen interessanten Fragen, die daraus resultieren, bedürfen noch experimenteller Antworten und werden im Folgenden diskutiert.

5.1.2 Potentielle Substrate der SUMO1-Ubiquitinierung

Die wohl interessanteste Frage, die in engem Zusammenhang mit der Frage nach der Funktion der SUMO1-Ubiquitinierung steht, ist die nach den Substraten. Eine gegenseitige Beeinflussung der SUMOylierung und Ubiquitinierung wurde bereits in Form des Ubiquitin-Antagonismus als Funktion der SUMOylierung für die Substrate I κ B α und PCNA diskutiert. Für beide Substrate wird gezeigt, dass Poly-Ubiquitinierung oder SUMOylierung alternativ am gleichen Lysin-Rest des Substrats stattfinden können (Desterro et al., 1998; Hoege et al., 2002). Der Ubiquitin-Antagonismus ist eine plausible Interpretation, die der SUMOylierung eine wichtige regulatorische Rolle zuweist. Mit dem Wissen um die Möglichkeit von SUMO1 als Ubiquitinierungsstelle kann alternativ spekuliert werden, dass die nachgewiesenen Poly-Ubiquitin-Ketten im SUMOylierten Substrat über eine Ubiquitinierungsstelle in SUMO1 binden. Schließlich ist ein einzelnes SUMO1-Protein in einer hoch-polymeren Ubiquitin-Kette sehr wahrscheinlich schwierig nachzuweisen. Für I κ B α kann eine SUMO1-Poly-Ubiquitinierung mit K48-Ubiquitin-Verknüpfungen postuliert werden, die I κ B α der proteasomalen Degradation zuführt. SUMO1 würde, wie auch Ubiquitin, nicht der proteasomalen Degradation unterworfen, sondern prozessiert und erneut für die SUMOylierung bereitgestellt werden. Für PCNA müsste hingegen eine SUMO1-Poly-Ubiquitinierung mit K63-Ubiquitin-Verknüpfungen postuliert werden, die PCNA eine Funktion in der DNS-Reparatur zuschreibt.

Ein weiteres hypothetisches Substrat, das durch SUMO1-Ubiquitinierung der proteasomalen Degradation unterworfen werden könnte, ist Topoisomerase II β . Von den zwei in Vertebraten vorkommenden Isoformen α und β kann für Topoisomerase II α eine essentielle Funktion in der Chromosomen-Kondensation und -Segregation nachgewiesen werden. Für Topoisomerase II β ist bekannt, dass dieses Enzym an der neuronalen Entwicklung beteiligt ist (Gatto und Leo, 2003). Für Topoisomerase II β wird unter Einfluss der katalytischen Inhibitoren ICRF-193 oder VP-16 selektive proteasomale Degradation sowie gleichzeitige SUMO1-, SUMO2/3- und Ubiquitin-Modifikation nachgewiesen. In DT40-Zellen (*G. gallus*), die statt des endogenen Ubc9-Gens, ein Ubc9-Transgen mit Tetracyclin-abhängigem Promotor besitzen, wird Topoisomerase II β

unter den gleichen Inhibitor-Bedingungen stabilisiert (Isik et al., 2003). Dies weist darauf hin, dass SUMO-Konjugation die Degradation von Topoisomerase II β fördert.

Letztendlich gibt es im Zusammenhang der viralen Infektion (Herpes Simplex Virus Typ1) einen Hinweis auf PML als mögliches Substrat, das über SUMO1 als Ubiquitinierungsstelle poly-ubiquitiniert werden könnte. ICP0, ein regulierendes Protein der frühen Phase der viralen Infektion, besitzt Ubiquitin-E3-Ligase-Aktivität und induziert die proteasomale Degradation von PML. Diese führt zur Auflösung der sogenannten Kernkörperchen (*nuclear bodies*, ND10). Es wird gezeigt, dass für die Degradation von PML sowohl Sequenzen im C-terminalen Bereich des PMLs benötigt werden als auch der Lysin-Rest K160 erforderlich ist, der eines der drei Akzeptor-Lysine für PML-SUMOylierung darstellt. Die Ubiquitinierung von PML unter ICP0-Beteiligung kann jedoch *in vitro* weder für PML noch für PML*SUMO1 gezeigt werden. Daraus ist zu schließen, dass an der Ubiquitinierung von PML neben ICP0 zusätzliche Faktoren beteiligt sind (Boutell et al., 2003).

Im Prinzip können die unbekanntes Substrate mit der *in vivo* Ubiquitinierung, mit der die SUMO1-Ubiquitinierung nachgewiesen wurde, angereichert und identifiziert werden. Eine Identifikation mit Hilfe der Massenspektroskopie gelang bisher aber nicht, da die Abundanz dieser speziellen Formen sehr gering zu sein scheint. Eine Wiederholung des Experiments in größerem Maßstab sollte daher zur Identifikation der Substrate führen.

Von den vier potentiellen SUMO1-Substraten für SUMO1-Ubiquitinierung deuten drei Beispiele (IkB α , Topoisomerase II β , PML) einen Einfluss der SUMOylierung auf die proteasomale Degradation des SUMO1-Substrats an. Daraus lässt sich ein Modell der Poly-Ubiquitinierung an SUMO1 als Ubiquitinierungsstelle ableiten, in dem eine K48-verknüpfte Poly-Ubiquitin-Kette das SUMO1-Substrat zur proteasomalen Degradation markiert.

5.1.3 Kettenvarianten der SUMO1-Ubiquitinierung

Die im Zusammenhang mit dem Modell der Poly-Ubiquitinierung von SUMO1-Substraten erwähnten K48-verknüpften Ubiquitin-Ketten sind nur eine von mehreren möglichen Ketten-Varianten. Zwar lässt der in dieser Arbeit gezeigte Effekt des Proteasom-Inhibitors MG132 auf endogenes SUMO1 und SUMO2/3, der zur Anreicherung ubiquitiniertes SUMO-Konjugate führt, auf den ersten Blick Ubiquitin-K48-Verknüpfungen an SUMO1 vermuten (Abb. 4.20 A), aber der gleiche Effekt könnte auch auf parallel SUMOylierte und ubiquitinierte bzw. SUMO1-ubiquitinierte Proteine zurückgeführt werden. Daher sind K63-Verknüpfungen oder die erst kürzlich nachgewiesenen Verknüpfungen über K6, K11, K27 oder K33 für die Poly-Ubiquitin-Ketten an SUMO1 genauso wahrscheinlich wie K48-Verknüpfungen (Peng et al., 2003). Da die Funktion einer Ubiquitinierung an die Verknüpfungsart der Poly-Ubiquitin-Kette gekoppelt ist, könnte die Identifikation der Ubiquitin-Verknüpfungsart an SUMO1 Hinweise auf die Substrate des ubiquitinierten SUMO1 geben. K29- und K48-Verknüpfungen würden vermuten lassen, dass die an SUMO1 ubiquitinierten Substrate proteasomal abgebaut werden. In Anbetracht der Tatsache, dass SUMO1 selbst kein Substrat der proteasomalen Degradation ist, muss für SUMO1 gleichzeitig ein Recycling-Mechanismus - wie bereits für Ubiquitin vermutet - postuliert werden (Wilkinson, 1997; Wing, 2003). In diesem Modell würde die Beteiligung zumindest einer SUMO-spezifischen Protease gefordert. K63-Verknüpfungen würden der Ubiquitinierung von SUMO1 Funktionen in der Reparatur von DNS-Schäden, der Endozytose oder der Stress-Antwort zuschreiben (Arnason und Ellison, 1994; Hicke, 1999; Spence et al., 1995; Strous und Govers, 1999). Die Identifikation der SUMO1-Ubiquitin-Ketten könnte an überexprimiertem SUMO1 Δ GG-HA über die Methode der Massenspektroskopie erfolgen. Außerdem könnte eine *in vivo* Ubiquitinierung mit Ubiquitin-Lysin-Mutanten (K48R, K63R) durchgeführt werden.

In Bezug auf die Zusammensetzung der Poly-Ubiquitin-Ketten stellt sich zudem die Frage, ob auch Ubiquitin SUMOyliert werden kann. Wäre dies der Fall, würden die an SUMO1 beobachteten Ketten ein bislang unbekanntes neues Sekundär-Signal bestehend aus zwei verschiedenen post-translationalen Modifizierern darstellen. In einer ersten

Kontrolle wurde Ubiquitin als Substrat in der *in vitro* SUMOylierung überprüft. Das Ergebnis war negativ: zumindest die *in vitro* SUMOylierung mit E1- und E2-Enzymen führte zu keinem Ubiquitin*SUMO1-Konjugat. Um die Möglichkeit der Ubiquitin-SUMOylierung auszuschließen, sind jedoch noch *in vivo* Beweise erforderlich.

5.1.4 Optionen der Ubiquitinierungsstelle in SUMO1

SUMO1 besitzt neben den drei N-terminalen Lysin-Resten (K7, K16, K17) noch acht weitere Lysin-Reste im Kernprotein (K23, K25, K37, K39, K45, K46, K48, K78). Da bis auf K48 alle Lysin-Reste Oberflächen-exponiert sind und für die Ubiquitinierung keine Konsensus-Motive bekannt sind, kommen alle gleichermaßen als Akzeptor-Lysin für die Ubiquitinierung in Frage. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Ubiquitinierungsmaschinerie auf alternative Lysin-Reste ausweichen kann und daher Lysin-zu-Arginin-Mutanten nicht zwangsläufig zu einer Identifikation der Ubiquitinierungsstelle führen. Aus diesen Gründen soll die Ubiquitinierungsstelle für SUMO1 anhand einer *in vivo* Ubiquitinierung des nicht-konjugierbaren SUMO1 Δ GG mit Hilfe der Massenspektroskopie bestimmt werden.

Alternativ könnte auch eine Poly-Ubiquitinierung am freien N-Terminus von SUMO1 stattfinden, in der die E3-Ligasen des „N-end rule pathway“ involviert sein könnten (Varshavsky et al., 2000). Beispielsweise die E3-Ligase E3 α /Ubr1, die sowohl Substrate mit basischer als auch mit hydrophober N-terminaler Sequenz erkennen kann (Kwon et al., 2000; Reiss und Hershko, 1990). Die nicht-konjugierbaren SUMO1-Konstrukte SUMO1WT, Δ N10 und Δ N19, die drei unterschiedliche N-terminale Sequenzen repräsentieren, werden jedoch alle gleichermaßen ubiquitiniert. Somit erscheint eine N-terminale Poly-Ubiquitinierung eher unwahrscheinlich, kann aber erst endgültig mit dem Ergebnis der Massenspektroskopie ausgeschlossen werden.

5.1.5 Möglichkeiten des Mechanismus der SUMO1-Ubiquitinierung

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aller durchgeführten *in vivo* Ubiquitinierungsexperimente, dass sowohl nicht-konjugiertes als auch konjugiertes SUMO1 ubiquitiniert werden kann. Daraus lassen sich die folgenden verschiedenen Mechanismen der SUMO1-Ubiquitinierung ableiten (Abb. 5.3):

- 1.) Substrat-SUMOylierung, dann SUMO1-Poly-Ubiquitinierung
- 2.) SUMO1-Mono-Ubiquitinierung, dann Substrat-Mono-Ubiquitin-SUMOylierung, gefolgt von Poly-Ubiquitinierung
- 3.) SUMO1-Poly-Ubiquitinierung, dann Substrat-Poly-Ubiquitin-SUMOylierung

Die erste Mechanismus-Variante würde den hintereinander geschalteten Modifikationen erlauben, jeweils ihre spezifische Funktion auszuüben. Beispielsweise würde die SUMOylierung einen Transkriptionsfaktor zunächst in seiner Aktivität regulieren. Eine darauffolgende Poly-Ubiquitinierung mit K48-Verknüpfung würde anschließend den Transkriptionsfaktor der proteasomalen Degradation unterwerfen.

Die letzten zwei Varianten basieren auf dem Befund, dass nicht-konjugierbares (monomeres) SUMO1 poly-ubiquitiniert werden kann (Abb. 4.27 A). Hier würde die Ausübung einer allein auf der SUMOylierung beruhenden Funktion entfallen. Entweder würde die Modifikation mit poly-ubiquitiniertem SUMO1 ausschließlich eine auf die Ubiquitinierung zurückzuführende Funktion oder eine individuelle Funktion der kombinierten Modifikation ausüben.

Modell der Mechanismen der Poly-Ubiquitinierung von SUMO1

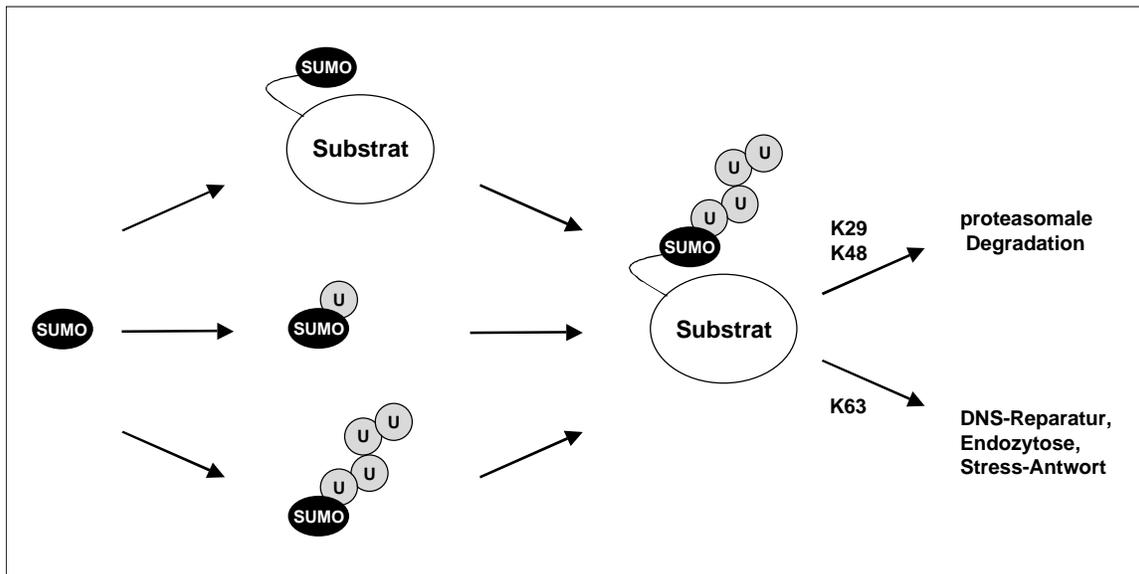


Abbildung 5.3: Modell der Mechanismen der Poly-Ubiquitinierung von SUMO1.

Schematische Darstellung möglicher Kombinationen von SUMOylierung und Ubiquitinierung, die zu poly-ubiquitinierten SUMO1-Konjugaten führen könnten. Die dritte Variante erscheint weniger plausibel, da bislang kein Hinweis für einen E1-Enzym-katalysierten Polymer-Transfer auf das Substrat existiert.

(U: Ubiquitin)

Für Variante zwei und drei werden Enzyme gefordert, die mono- bzw. poly-ubiquitiniertes SUMO1 auf ein SUMO1-Substrat übertragen können. Ist es für die SUMOylierung mit poly-ubiquitiniertem SUMO1 fragwürdig, ob eine E1-Enzym-Reaktion problemlos ablaufen könnte, so wird die zweite Mechanismus-Hypothese mit dem Beispiel des Ubiquitin-ähnlichen Proteins ISG15 gestützt und erscheint damit plausibel. ISG15 weist im Unterschied zu anderen Ubiquitin-ähnlichen Proteinen zwei Ubiquitin-Domänen auf und ist daher strukturell mit einem mono-ubiquitinierten SUMO1 vergleichbar. Darüber hinaus ist bekannt, dass ISG15 auch konjugiert und dekonjugiert werden kann (Kim und Zhang, 2003). Folglich sollte SUMO1*Ubiquitin von Aos1/Uba2 und Ubc9 auf Substrate übertragen werden können.

5.1.6 Erkennung von SUMO1 als Substrat der Ubiquitinierung

Auf die Frage nach dem Ubiquitinierungssignal der SUMO1-Ubiquitinierung gibt es unter Einbeziehung der drei Mechanismus-Hypothesen mehrere Möglichkeiten. Im Fall der ersten Variante kann das Ubiquitinierungssignal sowohl in SUMO1 als auch im Substrat vorliegen. Für die Varianten zwei und drei muss SUMO1 selbst das Ubiquitinierungssignal präsentieren. Dieses kann eine kurze Abfolge in der Primärsequenz des Proteins sein oder eine durch Phosphorylierung, Bindung eines Adapter-Proteins oder Beschädigung durch Fragmentierung, Oxidation oder Alterung hervorgerufene Konformationsänderung (2.2.2).

Die *in vivo* Ubiquitinierung mit SUMO1 Δ GG zeigt, dass SUMO1 selbst ein notwendiges Ubiquitinierungssignal besitzen muss (Abb. 4.27 A). Optionen für Phosphorylierung oder Bindung eines Adapter-Proteins bietet beispielsweise die unstrukturierte N-terminale SUMO1-Sequenz. Zum einen wurde der Aminosäure-Rest S9 mit Hilfe des Suchprogramms „NetPhos 2.0 Prediction Results“ mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit als Phosphorylierungsstelle für CK2 postuliert, zum anderen wird die gesamte unstrukturierte Sequenz als Vermittler von Interaktionen diskutiert.

Das Ergebnis der *in vivo* Ubiquitinierung mit den N-terminalen Deletionsmutanten SUMO1 Δ N10 Δ GG und SUMO1 Δ N19 Δ GG zeigt jedoch eindeutig, dass die Sequenz des N-Terminus für die Ubiquitinierung nicht essentiell ist (Abb. 4.28). Eine weitere Möglichkeit der Phosphorylierung als Ubiquitinierungssignal in SUMO1 bietet der Aminosäure-Rest T76, der ebenfalls mit hoher Wahrscheinlichkeit als Phosphorylierungsstelle für CK2 postuliert wird. Alternativ könnte der Ubiquitinierung auch die Modifikation einer Ubiquitin-E3-Ligase vorangehen, die erst aktiviert SUMO1 als Substrat bzw. Ubiquitinierungsstelle erkennt. Eine Aktivierung über Substrat-spezifische Phosphorylierung verschiedener Untereinheiten einer E3-Ligase wird zum Beispiel für den APC-Komplex vermutet (Glickman und Ciechanover, 2002).

Die Erkennung von SUMO1 als Substrat der Ubiquitinierung übernehmen die modifizierenden Ubiquitin-Enzyme. Die Frage nach den möglicherweise beteiligten Enzymen findet in der großen Auswahl an Ubiquitin-E2-Enzymen sowie in den für die Ubiquitinierung bekannten E3-Ligasen zahlreiche Antworten. Aufgrund der zellulären

Lokalisation von SUMO1 könnte jedes nukleäre oder zytoplasmatische Ubiquitin-E2-Enzym die SUMO1-Ubiquitinierung katalysieren. Interaktionen von Ubiquitin-E2-Enzymen mit Substraten der Ubiquitinierung - wie für Ubc9 und RanGAP1 - sind bislang nicht nachgewiesen worden. Daher ist eine direkte Erkennung von SUMO1 durch eine Ubiquitin-E3-Ligase wahrscheinlicher als durch ein E2-Enzym.

5.1.7 Post-translationale Modifikation Ubiquitin-ähnlicher Proteine?

Die hier nachgewiesene *in vivo* Ubiquitinierung von endogenem SUMO1 zeigt erstmalig, dass ein Ubiquitin-ähnliches Protein ubiquitiniert werden kann. Der gleichzeitige Nachweis, dass SUMO1 kein Substrat der schnellen proteasomalen Degradation ist, aber konjugiert poly-ubiquitiniert wird, führt zu der Hypothese einer Funktion der SUMOylierung als alternative Ubiquitinierungsstelle in SUMO1-Substraten.

Unter der Annahme von K48-Ubiquitin-Verknüpfungen an SUMO1 lässt sich daraus folgendes Modell erstellen: SUMO1 fungiert als Ubiquitinierungssignal von SUMO1-Substraten und markiert diese für den Abbau über das 26S-Proteasom. Das Substrat wird degradiert, SUMO1, wie auch Ubiquitin, demodifiziert und für erneute Modifikationen bereitgestellt.

Ob außer SUMO1 auch andere konjugierbare Ubiquitin-ähnliche Proteine ubiquitiniert werden können oder ob Ubiquitin post-translationally mit Ubiquitin-ähnlichen Proteinen modifiziert werden kann, ist noch zu zeigen. Diese Optionen würden zu einer Signal-Vielfalt heterogener Ketten führen, die aus verschiedenen Ubiquitin-ähnlichen Proteinen zusammengesetzt wären.

Bislang ist Kettenbildung für Nedd8, Smt3p, SUMO2/3 und Ubiquitin bekannt. Im Gegensatz zu den Poly-Ubiquitin-Ketten, die über verschiedene Lysin-Reste verknüpft sein können, wurde für SUMO2/3 und Smt3p je nur ein einziger verknüpfender Lysin-Rest identifiziert. Für Ubiquitin konnten neben den klassischen Kettenbildungen über K48 und K63 mittlerweile auch Kettenbildungen über K6, K11 und K29, sowie vor kurzem zusätzlich für K27 und K33, nachgewiesen werden (Baboshina und Haas, 1996;

Mastrandrea et al., 1999; Peng et al., 2003; Pickart, 2000; Pickart, 2001; You und Pickart, 2001). Einen ersten Hinweis auf Kombinationen verschiedener Lysin-Verknüpfungen gibt die Identifikation des Ketten-Verlängerungsfaktors E4. Kurze K29-Ketten scheinen dem Faktor als Signal zu dienen, der diese Ketten über K48-Verknüpfungen verlängert und die Substrate zur proteasomalen Degradation markiert (Koegl et al., 1999).

Mit dem hier erbrachten Nachweis der SUMO1-Ubiquitinierung sind, wie aus den Diskussionspunkten ersichtlich, neue Funktionen der SUMOylierung zu erwarten. Dieser Befund ist als wichtige Implikation für das Verständnis der Mechanismen von SUMOylierung und Ubiquitinierung zu sehen.

6 Literatur

- Arnason, T. und Ellison, M.J. (1994) Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain. *Mol Cell Biol*, **14**, 7876-7883.
- Baboshina, O.V. und Haas, A.L. (1996) Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2EPF and RAD6 are recognized by 26 S proteasome subunit 5. *J Biol Chem*, **271**, 2823-2831.
- Bachant, J., Alcasabas, A., Blat, Y., Kleckner, N. und Elledge, S.J. (2002) The SUMO-1 isopeptidase Smt4 is linked to centromeric cohesion through SUMO-1 modification of DNA topoisomerase II. *Mol Cell*, **9**, 1169-1182.
- Bailey, D. und O'Hare, P. (2002) Herpes simplex virus 1 ICP0 co-localizes with a SUMO-specific protease. *J Gen Virol*, **83**, 2951-2964.
- Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R. und Becker, J. (1998) Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol*, **280**, 275-286.
- Bencsath, K.P., Podgorski, M.S., Pagala, V.R., Slaughter, C.A. und Schulman, B.A. (2002) Identification of a multifunctional binding site on Ubc9p required for Smt3p conjugation. *J Biol Chem*, **277**, 47938-47945.
- Bernier-Villamor, V., Sampson, D.A., Matunis, M.J. und Lima, C.D. (2002) Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell*, **108**, 345-356.
- Best, J.L., Ganiatsas, S., Agarwal, S., Changou, A., Salomoni, P., Shirihai, O., Meluh, P.B., Pandolfi, P.P. und Zon, L.I. (2002) SUMO-1 protease-1 regulates gene transcription through PML. *Mol Cell*, **10**, 843-855.
- Boddy, M.N., Howe, K., Etkin, L.D., Solomon, E. und Freemont, P.S. (1996) PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene*, **13**, 971-982.
- Borden, K.L. (2000) RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol Biol*, **295**, 1103-1112.
- Boutell, C., Orr, A. und Everett, R.D. (2003) PML residue lysine 160 is required for the degradation of PML induced by herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0. *J Virol*, **77**, 8686-8694.
- Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.M., Finley, D. und Schmidt, M. (1999) The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol*, **1**, 221-226.
- Burch, T.J. und Haas, A.L. (1994) Site-directed mutagenesis of ubiquitin. Differential roles for arginine in the interaction with ubiquitin-activating enzyme. *Biochemistry*, **33**, 7300-7308.
- Bylebyl, G.R., Belichenko, I. und Johnson, E.S. (2003) The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast. *J Biol Chem*, **26**, 26.

- Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K. und Varshavsky, A. (1989) A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science*, **243**, 1576-1583.
- Chen, A., Mannen, H. und Li, S.S. (1998) Characterization of mouse ubiquitin-like SMT3A and SMT3B cDNAs and gene/pseudogenes. *Biochem Mol Biol Int*, **46**, 1161-1174.
- Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H. und Hershko, A. (1982) "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem*, **257**, 2537-2542.
- Dahle, O., Andersen, T.O., Nordgard, O., Matre, V., Del Sal, G. und Gabrielsen, O.S. (2003) Transactivation properties of c-Myb are critically dependent on two SUMO-1 acceptor sites that are conjugated in a PIASy enhanced manner. *Eur J Biochem*, **270**, 1338-1348.
- Deshaies, R.J. (1999) SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 435-467.
- Desterro, J.M., Rodriguez, M.S. und Hay, R.T. (1998) SUMO-1 modification of I κ B inhibits NF- κ B activation. *Mol Cell*, **2**, 233-239.
- Fisk, H.A. und Yaffe, M.P. (1999) A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **145**, 1199-1208.
- Galan, J.M. und Haguenaer-Tsapis, R. (1997) Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *Embo J*, **16**, 5847-5854.
- Gan-Erdene, T., Nagamalleswari, K., Yin, L., Wu, K., Pan, Z.Q. und Wilkinson, K.D. (2003) Identification and characterization of DEN1, a deneddylase of the ULP family. *J Biol Chem*, **278**, 28892-28900.
- Gatto, B. und Leo, E. (2003) Drugs acting on the beta isoform of human topoisomerase II (p180). *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, **3**, 173-185.
- Ghosh, S., May, M.J. und Kopp, E.B. (1998) NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, **16**, 225-260.
- Glickman, M.H. und Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, **82**, 373-428.
- Glotzer, M., Murray, A.W. und Kirschner, M.W. (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, **349**, 132-138.
- Goettsch, S. und Bayer, P. (2002) Structural attributes in the conjugation of ubiquitin, SUMO and RUB to protein substrates. *Front Biosci*, **7**, a148-162.
- Gong, L., Millas, S., Maul, G.G. und Yeh, E.T. (2000) Differential Regulation of Sentrinized Proteins by a Novel Sentrin- specific Protease. *J Biol Chem*, **275**, 3355-3359.
- Haas, A.L. und Rose, I.A. (1982) The mechanism of ubiquitin activating enzyme. A kinetic and equilibrium analysis. *J Biol Chem*, **257**, 10329-10337.
- Haas, A.L., Warms, J.V., Hershko, A. und Rose, I.A. (1982) Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J Biol Chem*, **257**, 2543-2548.
- Hang, J. und Dasso, M. (2002) Association of the human SUMO-1 protease SENP2 with the nuclear pore. *J Biol Chem*, **277**, 19961-19966.

- Hardeland, U., Steinacher, R., Jiricny, J. und Schar, P. (2002) Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *Embo J*, **21**, 1456-1464.
- Hari, K.L., Cook, K.R. und Karpen, G.H. (2001) The Drosophila Su(var)2-10 locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family. *Genes Dev*, **15**, 1334-1348.
- Hatfield, P.M., Callis, J. und Vierstra, R.D. (1990) Cloning of ubiquitin activating enzyme from wheat and expression of a functional protein in Escherichia coli. *J Biol Chem*, **265**, 15813-15817.
- Hershko, A. (1983) Ubiquitin: roles in protein modification and breakdown. *Cell*, **34**, 11-12.
- Hershko, A. und Ciechanover, A. (1998a) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, **67**, 425-479.
- Hershko, A. und Ciechanover, A. (1998b) The ubiquitin system (review). *Annu Rev Biochem*, **67**, 425-479.
- Hicke, L. (1999) Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol*, **9**, 107-112.
- Hietakangas, V., Ahlskog, J.K., Jakobsson, A.M., Hellesuo, M., Sahlberg, N.M., Holmberg, C.I., Mikhailov, A., Palvimo, J.J., Pirkkala, L. und Sistonen, L. (2003) Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol Cell Biol*, **23**, 2953-2968.
- Hilgarth, R.S., Hong, Y., Park-Sarge, O.K. und Sarge, K.D. (2003) Insights into the regulation of heat shock transcription factor 1 SUMO-1 modification. *Biochem Biophys Res Commun*, **303**, 196-200.
- Hochstrasser, M. (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet*, **30**, 405-439.
- Hochstrasser, M. (2000) Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nat Cell Biol*, **2**, E153-157.
- Hochstrasser, M. (2001) SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell*, **107**, 5-8.
- Hoegel, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G. und Jentsch, S. (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, **419**, 135-141.
- Hofmann, R.M. und Pickart, C.M. (1999) Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell*, **96**, 645-653.
- Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M.J., Mayhew, C.N., Goodson, M.L., Park-Sarge, O.K., Sarge, K.D. und Goodson, M. (2001) Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem*, **276**, 40263-40267.
- Howe, K., Williamson, J., Boddy, N., Sheer, D., Freemont, P. und Solomon, E. (1998) The ubiquitin-homology gene PIC1: characterization of mouse (Pic1) and human (UBL1) genes and pseudogenes. *Genomics*, **47**, 92-100.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S. und Howley, P.M. (1995) A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 2563-2567.

- Isik, S., Sano, K., Tsutsui, K., Seki, M., Enomoto, T. und Saitoh, H. (2003) The SUMO pathway is required for selective degradation of DNA topoisomerase IIbeta induced by a catalytic inhibitor ICRF-193(1). *FEBS Lett*, **546**, 374-378.
- Jackson, P.K. (2001) A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev*, **15**, 3053-3058.
- Jentsch, S. und Pyrowolakis, G. (2000) Ubiquitin and its kin: how close are the family ties ? *Trends Cell Biol*, **10**, 335-342.
- Jiang, F. und Basavappa, R. (1999) Crystal structure of the cyclin-specific ubiquitin-conjugating enzyme from clam, E2-C, at 2.0 Å resolution. *Biochemistry*, **38**, 6471-6478.
- Jin, C., Shiyanova, T., Shen, Z. und Liao, X. (2001) Heteronuclear nuclear magnetic resonance assignments, structure and dynamics of SUMO-1, a human ubiquitin-like protein. *Int J Biol Macromol*, **28**, 227-234.
- Johnson, E.S. und Blobel, G. (1997) Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J Biol Chem*, **272**, 26799-26802.
- Johnson, E.S. und Gupta, A.A. (2001) An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell*, **106**, 735-744.
- Johnson, E.S., Schwienhorst, I., Dohmen, R.J. und Blobel, G. (1997) The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *Embo J*, **16**, 5509-5519.
- Johnson, P.R., Swanson, R., Rakhilina, L. und Hochstrasser, M. (1998) Degradation signal masking by heterodimerization of MATalpha2 and MATA1 blocks their mutual destruction by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell*, **94**, 217-227.
- Kadoya, T., Yamamoto, H., Suzuki, T., Yukita, A., Fukui, A., Michiue, T., Asahara, T., Tanaka, K., Asashima, M. und Kikuchi, A. (2002) Desumoylation activity of Axin, a novel Axin-binding protein, is involved in downregulation of beta-catenin. *Mol Cell Biol*, **22**, 3803-3819.
- Kagey, M.H., Melhuish, T.A. und Wotton, D. (2003) The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell*, **113**, 127-137.
- Kahyo, T., Nishida, T. und Yasuda, H. (2001) Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell*, **8**, 713-718.
- Kang, R.S., Daniels, C.M., Francis, S.A., Shih, S.C., Salerno, W.J., Hicke, L. und Radhakrishnan, I. (2003) Solution structure of a CUE-ubiquitin complex reveals a conserved mode of ubiquitin binding. *Cell*, **113**, 621-630.
- Kawabe, Y., Seki, M., Seki, T., Wang, W.S., Imamura, O., Furuichi, Y., Saitoh, H. und Enomoto, T. (2000) Covalent modification of the Werner's syndrome gene product with the ubiquitin-related protein, SUMO-1. *J Biol Chem*, **275**, 20963-20966.
- Kim, K.I., Baek, S.H., Jeon, Y.J., Nishimori, S., Suzuki, T., Uchida, S., Shimbara, N., Saitoh, H., Tanaka, K. und Chung, C.H. (2000) A new SUMO-1-specific protease, SUSP1, that is highly expressed in reproductive organs. *J Biol Chem*, **275**, 14102-14106.
- Kim, K.I. und Zhang, D.E. (2003) ISG15, not just another ubiquitin-like protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **307**, 431-434.
- Kirsh, O., Seeler, J.S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F. und Dejean, A. (2002) The SUMO E3

- ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *Embo J*, **21**, 2682-2691.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. und Shimizu, N. (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, **392**, 605-608.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U. und Jentsch, S. (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, **96**, 635-644.
- Koepp, D.M., Harper, J.W. und Elledge, S.J. (1999) How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell*, **97**, 431-434.
- Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O.A. und Palvimo, J.J. (2002a) The nuclear receptor interaction domain of GRIP1 is modulated by covalent attachment of SUMO-1. *J Biol Chem*, **277**, 30283-30288.
- Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O.A. und Palvimo, J.J. (2002b) PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol Cell Biol*, **22**, 5222-5234.
- Kurepa, J., Walker, J.M., Smalle, J., Gosink, M.M., Davis, S.J., Durham, T.L., Sung, D.Y. und Vierstra, R.D. (2003) The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in Arabidopsis. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *J Biol Chem*, **278**, 6862-6872.
- Kwon, Y.T., Balogh, S.A., Davydov, I.V., Kashina, A.S., Yoon, J.K., Xie, Y., Gaur, A., Hyde, L., Denenberg, V.H. und Varshavsky, A. (2000) Altered activity, social behavior, and spatial memory in mice lacking the NTAN1p amidase and the asparagine branch of the N-end rule pathway. *Mol Cell Biol*, **20**, 4135-4148.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lake, M.W., Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K.V. und Schindelin, H. (2001) Mechanism of ubiquitin activation revealed by the structure of a bacterial MoeB-Moad complex. *Nature*, **414**, 325-329.
- Laney, J.D. und Hochstrasser, M. (1999) Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell*, **97**, 427-430.
- Lapenta, V., Chiurazzi, P., van der Spek, P., Pizzuti, A., Hanaoka, F. und Brahe, C. (1997) SMT3A, a human homologue of the *S. cerevisiae* SMT3 gene, maps to chromosome 21qter and defines a novel gene family. *Genomics*, **40**, 362-366.
- Lawson, T.G., Gronros, D.L., Evans, P.E., Bastien, M.C., Michalewich, K.M., Clark, J.K., Edmonds, J.H., Graber, K.H., Werner, J.A., Lurvey, B.A. und Cate, J.M. (1999) Identification and characterization of a protein destruction signal in the encephalomyocarditis virus 3C protease. *J Biol Chem*, **274**, 9871-9880.
- Lee, P.S., Chang, C., Liu, D. und Derynck, R. (2003) Sumoylation of Smad4, the common Smad mediator of transforming growth factor-beta family signaling. *J Biol Chem*, **278**, 27853-27863.
- Li, S.J. und Hochstrasser, M. (1999) A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature*, **398**, 246-251.
- Li, S.J. und Hochstrasser, M. (2000) The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein. *Mol Cell Biol*, **20**, 2367-2377.

- Li, S.J. und Hochstrasser, M. (2003) The Ulp1 SUMO isopeptidase: distinct domains required for viability, nuclear envelope localization, and substrate specificity. *J Cell Biol*, **160**, 1069-1081.
- Liakopoulos, D., Doenges, G., Matuschewski, K. und Jentsch, S. (1998) A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system. *Embo J*, **17**, 2208-2214.
- Lin, X., Liang, M., Liang, Y.Y., Brunicardi, F.C., Melchior, F. und Feng, X.H. (2003a) Activation of transforming growth factor-beta signaling by SUMO-1 modification of tumor suppressor Smad4/DPC4. *J Biol Chem*, **278**, 18714-18719.
- Lin, X., Sun, B., Liang, M., Liang, Y.Y., Gast, A., Hildebrand, J., Brunicardi, F.C., Melchior, F. und Feng, X.H. (2003b) Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. *Mol Cell*, **11**, 1389-1396.
- Liu, Q., Jin, C., Liao, X., Shen, Z., Chen, D.J. und Chen, Y. (1999) The binding interface between an E2 (UBC9) and a ubiquitin homologue (UBL1). *J Biol Chem*, **274**, 16979-16987.
- Lorick, K.L., Jensen, J.P., Fang, S., Ong, A.M., Hatakeyama, S. und Weissman, A.M. (1999) RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11364-11369.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. und Melchior, F. (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell*, **88**, 97-107.
- Mahajan, R., Gerace, L. und Melchior, F. (1998) Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. *J Cell Biol*, **140**, 259-270.
- Mann, M. und Jensen, O.N. (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol*, **21**, 255-261.
- Mannen, H., Tseng, H.M., Cho, C.L. und Li, S.S. (1996) Cloning and expression of human homolog HSMT3 to yeast SMT3 suppressor of MIF2 mutations in a centromere protein gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **222**, 178-180.
- Mao, Y., Desai, S.D. und Liu, L.F. (2000a) SUMO-1 conjugation to human DNA topoisomerase II isozymes. *J Biol Chem*, **275**, 26066-26073.
- Mao, Y., Sun, M., Desai, S.D. und Liu, L.F. (2000b) SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4046-4051.
- Mastrandrea, L.D., You, J., Niles, E.G. und Pickart, C.M. (1999) E2/E3-mediated assembly of lysine 29-linked polyubiquitin chains. *J Biol Chem*, **274**, 27299-27306.
- Matunis, M.J., Coutavas, E. und Blobel, G. (1996) A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, **135**, 1457-1470.
- Matunis, M.J., Wu, J. und Blobel, G. (1998) SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, **140**, 499-509.
- Matuschewski, K., Hauser, H.P., Treier, M. und Jentsch, S. (1996) Identification of a novel family of ubiquitin-conjugating enzymes with distinct amino-terminal extensions. *J Biol Chem*, **271**, 2789-2794.

- Meggio, F. und Pinna, L.A. (2003) One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *Faseb J*, **17**, 349-368.
- Melchior, F. (2000) SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 591-626.
- Melchior, F., Schergaut, M. und Pichler, A. (2003) SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends Biochem Sci*, **28**, 612-618.
- Meluh, P.B. und Koshland, D. (1995) Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. *Mol Biol Cell*, **6**, 793-807.
- Mendoza, H.M., Shen, L.N., Botting, C., Lewis, A., Chen, J., Ink, B. und Hay, R.T. (2003) NEDP1, a highly conserved cysteine protease that deNEDDylates Cullins. *J Biol Chem*, **278**, 25637-25643.
- Mossessova, E. und Lima, C.D. (2000) Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol Cell*, **5**, 865-876.
- Müller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G. und Jentsch, S. (2001) SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 202-210.
- Nakagawa, K. und Yokosawa, H. (2002) PIAS3 induces SUMO-1 modification and transcriptional repression of IRF-1. *FEBS Lett*, **530**, 204-208.
- Nishida, T., Kaneko, F., Kitagawa, M. und Yasuda, H. (2001) Characterization of a novel mammalian SUMO-1/Smt3-specific isopeptidase, a homologue of rat axam, which is an axin-binding protein promoting beta-catenin degradation. *J Biol Chem*, **276**, 39060-39066.
- Nishida, T., Tanaka, H. und Yasuda, H. (2000) A novel mammalian Smt3-specific isopeptidase 1 (SMT3IP1) localized in the nucleolus at interphase. *Eur J Biochem*, **267**, 6423-6427.
- Nishida, T. und Yasuda, H. (2002) PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *J Biol Chem*, **277**, 41311-41317.
- Okura, T., Gong, L., Kamitani, T., Wada, T., Okura, I., Wei, C.F., Chang, H.M. und Yeh, E.T. (1996) Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J Immunol*, **157**, 4277-4281.
- Osaka, F., Kawasaki, H., Aida, N., Saeki, M., Chiba, T., Kawashima, S., Tanaka, K. und Kato, S. (1998) A new NEDD8-ligating system for cullin-4A. *Genes Dev*, **12**, 2263-2268.
- Page, A.M. und Hieter, P. (1999) The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators. *Annu Rev Biochem*, **68**, 583-609.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D. und Gygi, S.P. (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol*, **21**, 921-926.
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J.S., Dejean, A. und Melchior, F. (2002) The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell*, **108**, 109-120.
- Pickart, C.M. (2000) Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci*, **25**, 544-548.
- Pickart, C.M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, **70**, 503-533.

- Pickart, C.M., Kasperek, E.M., Beal, R. und Kim, A. (1994) Substrate properties of site-specific mutant ubiquitin protein (G76A) reveal unexpected mechanistic features of ubiquitin-activating enzyme (E1). *J Biol Chem*, **269**, 7115-7123.
- Reiss, Y. und Hershko, A. (1990) Affinity purification of ubiquitin-protein ligase on immobilized protein substrates. Evidence for the existence of separate NH₂-terminal binding sites on a single enzyme. *J Biol Chem*, **265**, 3685-3690.
- Rock, K.L. und Goldberg, A.L. (1999) Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol*, **17**, 739-779.
- Rogers, R.S., Horvath, C.M. und Matunis, M.J. (2003) SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation. *J Biol Chem*, **278**, 30091-30097.
- Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F. und Grosschedl, R. (2001) PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev*, **15**, 3088-3103.
- Saitoh, H. und Hinchey, J. (2000) Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem*, **275**, 6252-6258.
- Saitoh, H., Pu, R., Cavenagh, M. und Dasso, M. (1997) RanBP2 associates with Ubc9p and a modified form of RanGAP1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3736-3741.
- Sampson, D.A., Wang, M. und Matunis, M.J. (2001) The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J Biol Chem*, **276**, 21664-21669.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sapetschnig, A., Rischitor, G., Braun, H., Doll, A., Schergaut, M., Melchior, F. und Suske, G. (2002) Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *Embo J*, **21**, 5206-5215.
- Schmidt, D. und Muller, S. (2002) Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 2872-2877.
- Schwienhorst, I., Johnson, E.S. und Dohmen, R.J. (2000) SUMO conjugation and deconjugation. *Mol Gen Genet*, **263**, 771-786.
- Shen, Z., Pardington-Purtymun, P.E., Comeaux, J.C., Moyzis, R.K. und Chen, D.J. (1996) UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. *Genomics*, **36**, 271-279.
- Sobko, A., Ma, H. und Firtel, R.A. (2002) Regulated SUMOylation and ubiquitination of DdMEK1 is required for proper chemotaxis. *Dev Cell*, **2**, 745-756.
- Soncin, F., Zhang, X., Chu, B., Wang, X., Asea, A., Ann Stevenson, M., Sacks, D.B. und Calderwood, S.K. (2003) Transcriptional activity and DNA binding of heat shock factor-1 involve phosphorylation on threonine 142 by CK2. *Biochem Biophys Res Commun*, **303**, 700-706.
- Spence, J., Gali, R.R., Dittmar, G., Sherman, F., Karin, M. und Finley, D. (2000) Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell*, **102**, 67-76.
- Spence, J., Sadis, S., Haas, A.L. und Finley, D. (1995) A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol*, **15**, 1265-1273.

- Stade, K., Vogel, F., Schwienhorst, I., Meusser, B., Volkwein, C., Nentwig, B., Dohmen, R.J. und Sommer, T. (2002) A lack of SUMO conjugation affects cNLS-dependent nuclear protein import in yeast. *J Biol Chem*, **277**, 49554-49561.
- Stebbins, C.E., Kaelin, W.G., Jr. und Pavletich, N.P. (1999) Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science*, **284**, 455-461.
- Stelter, P. und Ulrich, H.D. (2003) Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature*, **425**, 188-191.
- Strous, G.J. und Govers, R. (1999) The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J Cell Sci*, **112** (Pt 10), 1417-1423.
- Subramanian, L., Benson, M.D. und Iniguez-Lluhi, J.A. (2003) A synergy control motif within the attenuator domain of CCAAT/enhancer-binding protein alpha inhibits transcriptional synergy through its PIASy-enhanced modification by SUMO-1 or SUMO-3. *J Biol Chem*, **278**, 9134-9141.
- Takahashi, Y., Kahyo, T., Toh, E.A., Yasuda, H. und Kikuchi, Y. (2001) Yeast Ull1/Siz1 is a novel SUMO1/Smt3 ligase for septin components and functions as an adaptor between conjugating enzyme and substrates. *J Biol Chem*, **276**, 48973-48977.
- Taylor, D.L., Ho, J.C., Oliver, A. und Watts, F.Z. (2002) Cell-cycle-dependent localisation of Ulp1, a *Schizosaccharomyces pombe* Pmt3 (SUMO)-specific protease. *J Cell Sci*, **115**, 1113-1122.
- Treier, M., Staszewski, L.M. und Bohmann, D. (1994) Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell*, **78**, 787-798.
- Varshavsky, A. (1997) The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci*, **22**, 383-387.
- Varshavsky, A., Turner, G., Du, F. und Xie, Y. (2000) Felix Hoppe-Seyler Lecture 2000. The ubiquitin system and the N-end rule pathway. *Biol Chem*, **381**, 779-789.
- Verger, A., Perdomo, J. und Crossley, M. (2003) Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep*, **4**, 137-142.
- Walden, H., Podgorski, M.S. und Schulman, B.A. (2003) Insights into the ubiquitin transfer cascade from the structure of the activating enzyme for NEDD8. *Nature*, **422**, 330-334.
- Weissman, A.M. (2001) Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 169-178.
- Whitby, F.G., Xia, G., Pickart, C.M. und Hill, C.P. (1998) Crystal structure of the human ubiquitin-like protein NEDD8 and interactions with ubiquitin pathway enzymes. *J Biol Chem*, **273**, 34983-34991.
- Wilkinson, K.D. (1997) Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes (review). *Faseb J*, **11**, 1245-1256.
- Wilkinson, K.D. (2000) Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol*, **11**, 141-148.
- Wing, S.S. (2003) Deubiquitinating enzymes--the importance of driving in reverse along the ubiquitin-proteasome pathway. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**, 590-605.
- Wu, J., Matunis, M.J., Kraemer, D., Blobel, G. und Coutavas, E. (1995) Nup358, a cytoplasmically exposed nucleoporin with peptide repeats, Ran-GTP binding sites, zinc fingers, a cyclophilin A homologous domain, and a leucine-rich region. *J Biol Chem*, **270**, 14209-14213.

- Wu, K., Yamoah, K., Dolios, G., Gan-Erdene, T., Tan, P., Chen, A., Lee, C.G., Wei, N., Wilkinson, K.D., Wang, R. und Pan, Z.Q. (2003) DEN1 is a dual function protease capable of processing the C terminus of Nedd8 and deconjugating hyper-neddylated CUL1. *J Biol Chem*, **278**, 28882-28891.
- Yamamoto, H., Ihara, M., Matsuura, Y. und Kikuchi, A. (2003) Sumoylation is involved in beta-catenin-dependent activation of Tcf-4. *Embo J*, **22**, 2047-2059.
- Yamanaka, A., Hatakeyama, S., Kominami, K., Kitagawa, M., Matsumoto, M. und Nakayama, K. (2000) Cell cycle-dependent expression of mammalian E2-C regulated by the anaphase-promoting complex/cyclosome. *Mol Biol Cell*, **11**, 2821-2831.
- Yamano, H., Tsurumi, C., Gannon, J. und Hunt, T. (1998) The role of the destruction box and its neighbouring lysine residues in cyclin B for anaphase ubiquitin-dependent proteolysis in fission yeast: defining the D-box receptor. *Embo J*, **17**, 5670-5678.
- Yang, S.H., Jaffray, E., Hay, R.T. und Sharrocks, A.D. (2003) Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol Cell*, **12**, 63-74.
- Yokoyama, N., Hayashi, N., Seki, T., Pante, N., Ohba, T., Nishii, K., Kuma, K., Hayashida, T., Miyata, T., Aebi, U. und et al. (1995) A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. *Nature*, **376**, 184-188.
- You, J. und Pickart, C.M. (2001) A HECT domain E3 enzyme assembles novel polyubiquitin chains. *J Biol Chem*, **276**, 19871-19878.
- Zhang, H., Saitoh, H. und Matunis, M.J. (2002) Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex. *Mol Cell Biol*, **22**, 6498-6508.

Danksagung

Insbesondere gilt mein Dank Frau Dr. Frauke Melchior, Nachwuchsgruppe „Protein-Modifikation und Kerntransport“ am Max-Planck-Institut für Biochemie, für die Überlassung der Themenstellung und Bereitstellung der für die Arbeit benötigten Mittel. Darüber hinaus danke ich für ihre stete Diskussionsbereitschaft, ihren Enthusiasmus und Ideenreichtum sowie die Betreuung während der Höhen und Tiefen dieser Doktorarbeit.

Mein besonderer Dank gilt des Weiteren Herrn Prof. Dr. Wolfgang Baumeister für die spontane Übernahme der Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät und seinem Interesse an der Themenstellung.

Bedanken möchte ich mich ganz besonders bei den „Anfängen“ des Labors, bei Ulrike Gärtner, für die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die von ihr gelegten Grundsteine experimentellen Arbeitens und im Labor etablierten Techniken, die auch in diese Arbeit eingeflossen sind.

Ein großer Dank gilt ihrer Nachfolgerin, Andrea Klanner, die mir bei den zahlreichen und niemals endenden Klonierungen von SUMO1-Mutanten hilfreich unter die Arme gegriffen hat.

Dank an alle „Nachrücker“ der Arbeitsgruppe Melchior, die - jeder auf seine Art - das Labor um ihre Eigenarten bereichert haben, das Laborleben oftmals kunterbunt werden ließen und dem Labor seine ihm eigene Arbeitsatmosphäre verliehen. Jedem einzelnen sei für seinen Beitrag an dieser Stelle gedankt.

Ganz besonderer Dank gilt Dr. Michael Kullmann, der nicht müde wurde mit mir gemeinsam durch diese Arbeit in der Endphase einen roten Faden zu legen und mir somit eine große Stütze war.

Dank auch an die schon gegangenen und neu hinzugekommenen Mitglieder der Arbeitsgruppe Hengst, die zu wissenschaftlichem Austausch oder einem Teeplausch - sommers im Grünen, winters im Seminarraum - tagtäglich zur Verfügung standen.

Ein recht ordentliches Dankeschön wird hier an „Frau Annette“ gerichtet, die mir für so manchen musikalischen Hochgenuss während der Zeit der Doktorarbeit die Türe öffnete und mich mit so manch anderem sehr erfreute.

Ein Dank in Gedanken, ganz ohne Worte, von dieser Stelle aus an Gregor !!!