

Entwicklung neuer Verfahren zur Identifikation und Charakterisierung unbekannter SUMO- Substrate

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Willhelms-Universität Bonn**

vorgelegt von

Tanja Büsgen
aus Quierschied

München, 2004

Die vorliegende Dissertation wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Arbeitsgruppe „Protein-Modifikation und Kerntransport“ durchgeführt.

Prüfer: Hauptfach

Zellbiologie

1. Prof Dr. Volker Herzog

2. Prof Dr. Jörg Höhfeld

Nebenfach

Molekulare Physiologie und Entwicklungsbiologie

Prof Dr. Waldemar Kolanus

Tag der mündlichen Prüfung 24. Juni 2004

Erscheinungsjahr: 2005

Meiner Mutter

Danksagung

Frau Dr. Frauke Melchior danke ich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe „Protein- Modifikation und Kerntransport“ am Max-Planck-Institut für Biochemie, für die Überlassung des Themas und die allzeitige Diskussionsbereitschaft, sowie die für das Gelingen der Arbeit wichtigen Anregungen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Herzog für die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät. Ebenso danke ich Prof. Dr. Höfeld für die Übernahme des Koreferates.

Schließlich Dank an alle Leute, die im Bauteil L ihr Leben fristen:

Allen voran der Gruppe Melchior für ihre Hilfe und Unterstützung. Dabei besonders Marion für ihre witzigen Schlauchmomente. Florian („Flo“) dafür, daß ich jetzt Flugangst habe, Annette („Nette“) für Kaffee und stille Stunden, Kaska für ihr schönes Lachen und Andreas für Saarländisch-Pfälzische Streitereien. Unseren technische Assistentinnen, allen voran Uli, Jenny und Andrea, möchte ich für all die unentbehrliche Hilfe und Aufmunterung danken.

Den Mitgliedern der Gruppe Hengst will ich danken für die Solidarität, die Teestunden und die Schokolade.

Mein besonderer Dank gilt Thomas („Alles wird gut!“), Matthias („Ich habe ein Recht darauf cholerisch zu sein“), Michael alias Watson für sehr (!) abstruse Momente und Gregor („Sag mir das das ein Witz war!“). Ohne euch wäre es nicht halb schön gewesen.

Frau Dr. Monika M. Dell möchte ich für Licht in dunklen Stunden danken und für die schönen Seiten des Lebens, die immer zur rechten Zeit kamen.

Schließlich meiner Mutter, deren Lieblingssatz „Äs wird gäh Suppb so heiß gess, wie se gekocht wird“, mir durch trübe Stunden geholfen hat.

Veröffentlichungen

Liakopoulos D*, Büsgen T*, Brychzy A, Jentsch S, Pause A. **1999** Conjugation of the ubiquitin-like protein NEDD8 to cullin-2 is linked to von Hippel-Lindau tumor suppressor function.

Proc Natl Acad Sci U S A. May 11;96(10):5510-5.

*: gleichberechtigte Erstautoren

Bownes M, Hurd H, Büsgen T, Servay D, Alvis S, Popovic B, Bruce S, Burns I, Rothwell K, Walkinshaw M. **2002** Drosophila yolk protein produced in E. coli is accumulated by mosquito ovaries.

Insect Mol Biol. Oct;11(5):487-96.

Posterbeiträge

Tanja Büsgen, Marion Schergaut, Frauke Melchior: The Ubiquitin-related Protein SUMO

Forschungsfestival am Klinikum Großhadern, München 1998

Vorträge

Identification of novel SUMO targets

27th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies

Lissabon, Portugal, 30 Juni-5 Juli, 2001

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, im Zusammenhang mit DNA
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	„copy“-DNA
CIAP	engl.: calf intestinal alkaline phosphatase
C-Terminus	Carboxyterminus
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethan
ddH ₂ O	hochreines Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DMEM	engl.: Dulbecco' s Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E1	Ubiquitin/SUMO aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin/SUMO konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin/SUMO Ligase
E.	Escherichia
ECL	engl.: enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPLC	engl.: Fast Protein Liquid Chromatography
G	Guanosin
g	Erdbeschleunigung (im Kontext von Zentrifugation)
g	Gramm
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalaktopyranosid
k-	Kilo-
KAc	Kaliumacetat
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
m-	Milli-
M	Molar (mol/l)
min	Minute(n)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n-	Nano-
N-Terminus	Aminotermminus
NaAc	Natriumacetat

Abkürzungsverzeichnis

NCS	engl.: Newborn calf serum
NP-40	Nonidet P-40, nichtionisches Detergens
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
OD	optische Dichte
p-	Piko-
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
T	Thymin
TB	Transportpuffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	p-Isooctylphenylpolyoxyethylen
Tween-20	Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaureat
v/v	engl.: volume per volume
w/v	engl.: weight per volume
U	Uracil
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt

Einbuchstabencode für Aminosäuren

A	Alanin
M	Methionin
C	Cystein
N	Asparagin
D	Asparaginsäure
P	Prolin
E	Glutaminsäure
Q	Glutamin
F	Phenylalanin
R	Argenin

Abkürzungsverzeichnis

G	Glycin
S	Serin
H	Histidin
T	Threonin
I	Isoleucin
V	Valin
K	Lysin
W	Tryptophan
L	Leucin
Y	Tyrosin

Abkürzungen der Gene und ihrer Produkte

myc	engl.: v- <i>myc</i> avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
GFP	engl.: green fluorescent protein
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin
SCF	SKP1/Cullin-1/F-Box-Protein
SUMO	engl.: Small ubiquitin-like modifier
Ub	Ubiquitin
UP	engl.: unknown protein

1	Einleitung	1
1.1.	Ubiquitin und Ubiquitin-ähnliche Proteine	1
1.2.	SUMO.....	2
1.3.	Enzymatik der SUMO- Konjugation	4
1.3.1.	E1 und E2-Enzyme	4
1.3.2.	E1 und E2-Enzyme sind für die Modifikation einiger Proteine ausreichend	6
1.3.3.	E3-Ligasen.....	6
1.3.4.	Isopeptidasen oder ULPs.....	10
1.4.	Funktion der SUMO-Modifikation.....	11
1.4.1.	Änderung der Protein-Protein Interaktion durch SUMOylierung	12
1.4.2.	Änderung der Protein-DNA Interaktion durch SUMOylierung	13
1.4.3.	SUMO als Antagonist zu Ubiquitin	13
1.5.	Ziele dieser Arbeit.....	16
2.	Material und Methoden	17
2.1.	Material	17
2.1.1.	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	17
2.1.1.1.	Materialien zur Filtration und Dialyse.....	17
2.1.1.2.	Chromatographische Matrices und fertig gepackte Chromatographiesäulen.....	17
2.1.1.3.	Molekulargewichts- und Längenstandards	18
2.1.1.4.	Komplexe Reagenzien und Reaktions-Sets („Kits“).....	18
2.1.1.5.	Verbrauchsmaterial.....	19
2.1.2.	Puffer und Lösungen	19
2.1.3.	Medien und Medienzusätze für die Gewebekultur	21
2.1.3.1.	Medienbestandteile und Medienzusätze	21
2.1.3.2.	Medienzusammensetzung.....	22
2.1.4.	Medien für die Bakterienkultur.....	23
2.1.5.	Antikörper.....	23
2.1.6.	Enzyme	24
2.1.7.	Plasmide.....	24
2.1.8.	DNA-Oligonukleotide	25
2.1.9.	Bakterienstämme.....	26
2.1.10.	Eukaryontische Zelllinien.....	27
2.2.	Molekularbiologische Methoden	27
2.2.1.	Nukleinsäure-Fällung	27
2.2.2.	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	27
2.2.3.	Präparation von Plasmid-DNA	28
2.2.4.	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	28
2.2.5.	Dephosphorylierung von DNA-Enden mit CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase)	29
2.2.6.	Agarose-Gelelektrophorese	29
2.2.7.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	29
2.2.8.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	30
2.2.9.	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	30
2.2.10.	Gerichtete <i>in vitro</i> Mutagenese.....	30
2.2.11.	Herstellung kompetenter E. coli	31
2.2.12.	Transformation kompetenter Bakterien.....	31
2.2.12.1.	Transformation zur DNA-Extraktion	31

2.2.12.2.	Transformation zur Protein-Expression	32
2.2.13.	Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977)	32
2.3.	Zellbiologische Methoden	32
2.3.1.	Kultivierung humaner Zelllinien	32
2.3.2.	Einfrieren und Auftauen von Gewebekulturzellen.....	33
2.3.3.	Transiente Transfektion von Gewebekulturzellen.....	33
2.4.	Biochemische Methoden.....	34
2.4.1.	Grundlegende Standardmethoden	34
2.4.1.1.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	34
2.4.1.2.	Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ..	34
2.4.1.3.	Coomassie-Färbung von Proteingelen	34
2.4.1.4.	Silberfärbung von Proteingelen.....	35
2.4.2.	Immunologische und immunobiochemische Methoden.....	35
2.4.2.1.	Immunoblot-Analyse: Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot) und Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern.....	35
2.4.2.2.	Immunopräzipitation von Proteinen	36
2.4.2.3.	Immunozytologie	36
2.4.2.4.	Herstellung von Antiseren und Affinitätsreinigung von Antikörpern..	37
2.4.3.	Präparation von Gesamt-Zellysaten.....	38
2.4.4.	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	38
2.4.5.	Native Affinitätsreinigung von Histidine-Fusionsproteinen.....	39
2.4.6.	Aufreinigung von Glutathione-Fusions-Proteinen	39
2.4.7.	SUMO-Aufreinigung durch Ionenaustauscher-chromatographie und Gelfiltration	39
2.4.8.	Aufreinigung His-SUMO-1ΔC4-modifizierter Proteine aus 293T-Zellen	40
3.	Ergebnisse	41
3.1.	Identifikation neuer SUMO-Substrate und Interaktoren durch ein „In-Lösung-Modifikations-Verfahren“	41
3.1.1.	SUMOylierung von Proteinen in HeLa-Zell-Extrakten: „In-Lösung-Modifikations-Verfahren“	43
3.1.2.	Identifikation neuer SUMO-Substrate mittels Mikropeptidsequenzierung.....	46
3.1.3.	SUMO-Modifikation der modifizierenden Enzyme E1 und E2.....	48
3.1.4.	Charakterisierung des putativen SUMO-Targets UP: ein bisher unbekanntes WD-40-Domänen Protein	50
3.1.4.1.	Erzeugung eines polyklonalen UP-Antikörpers	52
3.1.4.2.	Keine SUMOylierung von UP im <i>in vitro</i> -Modifikations Verfahren ..	53
3.1.4.3.	UP wird unmodifiziert herausgezogen.....	53
3.1.4.4.	Keine direkte Interaktion von UP und SUMO <i>in vitro</i>	54
3.1.4.5.	Mitochondriale Lokalisation von UP	55
3.2.	Identifikation neuer SUMO-Substrate durch ein Filter-Modifikations-Verfahren.....	59
3.2.1.	Erzeugung von Biotinyliertem SUMO	60
3.2.2.	Vorversuch: SUMOylierung eines immobilisierten Proteins	62
3.2.3.	Analyse einer humanen cDNA Bank mit dem Filter Modifikations Verfahren	63
3.2.4.	Identifizierung der gefundenen Klone	63

3.2.5.	Expression und Aufreinigung der RZPD-Klone.....	69
3.2.6.	Unterscheidung zwischen SUMO-Substraten und SUMO-bindenden Proteinen.....	70
3.2.6.1.	Test auf nicht- kovalente Bindung mit SUMO-1	72
3.2.7.	<i>In vitro</i> Modifikation der aufgereinigten Proteine mit rekombinantem E1, E2, SUMO-1ΔC4 und ATP	73
3.2.8.	Klonierung und SUMOylierung von kompletten Proteinen.....	76
3.2.8.1.	PUF60 (Poly U binding factor 60) oder FIR	76
3.2.8.2.	Volle Länge PUF60 wird <i>in vitro</i> SUMOyliert.....	78
3.2.8.3.	Erzeugung eines affinitätsgereinigten polyklonalen PUF60-Antikörpers in Kaninchen	79
3.2.8.4.	Subzelluläre Lokalisation von PUF60 ist unabhängig von SUMO-1ΔC4 Überexpression	81
3.2.8.5.	Lysin 419 ist essentiell für die SUMOylierung von PUF60.....	83
3.2.9.	STAF65γ (SPTF-associated factor 65γ)	87
3.2.9.1.	STAF65γ wird mehrfach <i>in vitro</i> SUMOyliert	87
3.2.9.2.	Überexpression von SUMO-1ΔC4 hat keinen Einfluß auf die nukleare Lokalisation von YFP-STAF65γ	88
3.2.9.3.	STAF65γ besitzt 3 potentielle Akzeptorlysine für die SUMOylierung	89
3.2.10.	SNIP1 (Smad nuclear interacting protein).....	89
3.2.10.1.	Erzeugung und Aufreinigung eines Antikörpers gegen SNIP1 in Kaninchen.....	89
3.2.10.2.	SNIP1 wird <i>in vitro</i> einfach SUMOyliert.....	90
3.2.10.3.	Lokalisation von SNIP1 ist unabhängig von SUMO-1ΔC4 Überexpression	91
3.2.10.4.	SNIP1 besitzt zwei identische Konsensussequenzen zur SUMOylierung	92
3.2.11.	Test auf <i>in vivo</i> SUMOylierung bei PUF60, STAF65γ und SNIP1 durch Aufreinigung His-SUMO-1ΔC4-modifizierter Proteine aus 293T-Zellen	92
4.	Diskussion.....	95
4.1.	Identifikation neuer SUMO-Substrate und Interaktoren durch ein „In-Lösung-Modifikations Verfahren“ und anschließender Peptid-sequenzierung	95
4.1.1.	SUMO-Modifikation der modifizierenden Enzyme E1 und E2	96
4.1.2.	UP (<u>u</u> nknown <u>P</u> rotein).....	98
4.1.3.	DDB1.....	98
4.2.	Identifikation neuer SUMO-Substrate durch ein Filter Modifikations Verfahren.....	99
4.2.1.	Identifikation der SUMO-Substrate	99
4.2.2.	Machen die erhaltenen SUMO-Substrate Sinn?	104
4.2.2.1.	Neue SUMO-Substrate in der Transkriptionsregulation.....	104
4.2.2.2.	Neue SUMO-Substrate assoziiert mit Chromatin und DNA	104
4.2.2.3.	SUMOylierung und das Zytoskelett.....	105
4.2.2.4.	Verbindung zwischen SUMOylierung und Signaltransduktion....	106
4.2.3.	„Filter Modifikations Verfahren“- ein probates Mittel zur Identifizierung neuer SUMO-Substrate.....	106
4.2.4.	Untersuchung von volle Länge Proteinen auf ihre SUMOylierung.....	107

Inhaltsverzeichnis

4.2.4.1.	PUF60	107
4.2.4.2.	STAF65 γ	107
4.2.4.3.	SNIP1	108
4.2.5.	Probleme des <i>in vivo</i> Nachweises für SUMOylierte Proteine	109
4.2.6.	Vergleich der beiden neuen Verfahren	110
5.	Zusammenfassung	112
6.	Referenzen	113
Lebenslauf.....		124

1 Einleitung

1.1. Ubiquitin und Ubiquitin-ähnliche Proteine

Proteine sind der funktionstragende Teil einer Zelle. Zur Durchführung verschiedenster Funktionen und zur schnellen Antwort auf interne und externe Veränderungen müssen Proteine steuerbar, d.h. in ihrer Funktion und Aktivität regulierbar sein. Dies geschieht durch Modifikationen, die nach der Proteinsynthese erfolgen und deshalb als posttranslationale Modifikationen bezeichnet werden. Im Laufe der Jahre wurden die verschiedensten Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung, Methylierung und Glykosylierung verschiedener Aminosäurereste in Proteinen gefunden. 1975 wurde dann die Entdeckung gemacht, daß Proteine neben diesen Modifikationen mit kleinen Molekülen auch mit einem kleinen hochkonservierten Protein namens Ubiquitin modifiziert werden können. Diese kovalente Verknüpfung von Proteinen mit Ubiquitin, welches aus 76 Aminosäuren besteht, erfolgt durch eine Isopeptidbindung zwischen dem C-Terminus von Ubiquitin und der ϵ -Aminogruppe eines Lysin-Restes im Zielprotein. Darüber hinaus besitzt Ubiquitin ebenfalls mehrere Lysin-Reste und kann somit selbst ubiquitiniert werden, was zu Poly-Ubiquitin-Ketten führt. Man spricht hier von Polyubiquitinierung. Wird ein Protein polyubiquitiniert, führt dies zu seiner Erkennung durch eine zelleigene Degradationsmechanie, dem 26S Proteasom, der Hauptprotease des Zytoplasmas und Kerns eukaryotischer Zellen. Das Protein wird abgebaut, Ubiquitin wird abgespalten und der Zelle wieder zur Verfügung gestellt (Jentsch & Pyrowolakis, 2000, Hochstrasser, 1996, Hochstrasser, 2000). Neben dieser Polyubiquitinierung gibt es noch die so genannte Monoubiquitinierung, bei der nur ein einzelner Ubiquitin-Rest auf das Zielprotein übertragen wird (Hicke, 2001). Poly- und Monoubiquitinierung führen verschiedene Funktionen in der Zelle aus (Weismann, 2001, Hershko & Ciechanover, 1998, Pickart, 2000). Monoubiquitinierung spielt z.B. eine wichtige Rolle in der funktionalen Regulierung von Proteinen angefangen bei der Histonregulation und Endozytose bis hin zur VirusknoSpung.

Parallel zu Ubiquitin wurde eine wachsende Anzahl Ubiquitin-verwandter Proteine entdeckt. Man kann hierbei 2 Klassen unterscheiden: zum einen die so genannten

„Ubiquitin-like modifiers“ (UBLs) und zum anderen die „Ubiquitin domain proteins“ (UDPs). UBLs zeigen das typische Ubiquitin-Faltungsmotiv. Sie werden analog zur Ubiquitinierung kovalent mit spezifischen Zielproteinen verknüpft und verändern so deren Funktionalität in der Zelle. Genau wie die Ubiquitinierung ist auch die Modifikation mit den UBLs reversibel, d.h. sie werden durch spezifische Proteasen wieder von den Zielproteinen entfernt (Siehe Kapitel 2.3.3.). Zu der immer größer werdenden Menge von UBLs gehören unter anderem SUMO-1 (auch bekannt als Sentrin, GMP1, PIC1 und SMT3C), Nedd8/Rub1, ISG15 (Interferon stimulated gene 15) (auch bekannt als UCRP), BAG-1, Apg8 und Apg12, um nur einige aufzuzählen (siehe Review Schwartz & Hochstrasser 2003, Jentsch & Pyrowolakis, 2000, Lüders et al., 2000). Die UDPs enthalten hingegen Domänen, die das typische Ubiquitin-Faltungsmotiv aufweisen. Sie zeigen dabei aber nicht unbedingt eine Sequenzähnlichkeit zu Ubiquitin. Diese UDPs enthalten ansonsten keinerlei Verwandtschaft zueinander und werden im Gegensatz zu den UBLs nicht an Proteine gekoppelt.

1.2. SUMO

Zu den wohl am meisten erforschten UBLs gehört SUMO-1 (small ubiquitin-related modifier), das als UBL von RanGAP1, dem GTPase-aktivierenden Protein der GTPase Ran entdeckt wurde (Matunis et al., 1996, Majahan et al., 1997). Das aus 101 Aminosäuren bestehende Protein besitzt nur 18% Sequenzidentität zu Ubiquitin, zeigt aber die Ubiquitin-typische $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ -Faltung (Bayer et al., 1998). Die Hauptunterschiede zwischen beiden Proteinen bestehen zum Einen in der unterschiedlichen Oberflächenladung, wodurch die spezifische Interaktion mit ihren jeweiligen Enzymen gewährleistet wird (siehe Kapitel 1.3) und zum anderen in der SUMO-spezifischen N-terminalen Domäne (Bayer et al., 1998).

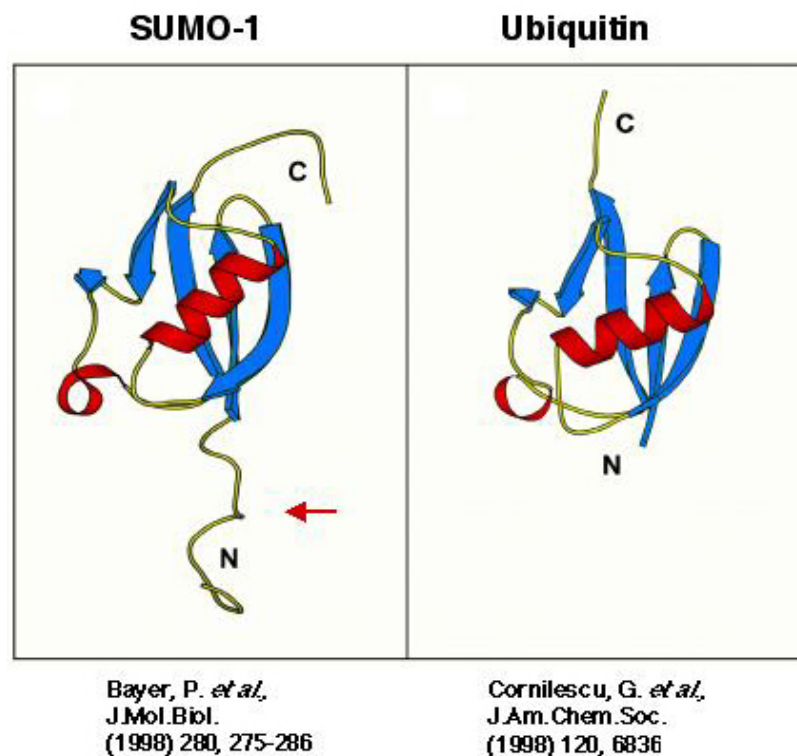


Abbildung 1.1: $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Faltung von SUMO-1 und Ubiquitin

α -Helices sind in rot, β -Faltblätter in blau angegeben. Der flexible N-Terminus von SUMO-1 ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.

SUMO ist in allen Eukaryoten zu finden. Während aber Invertebraten nur ein SUMO-Gen besitzen, gibt es in Vertebraten 3 Familien-Mitglieder (Kamitani et al., 1998, Saitoh & Hinchev, 2000, Tatham et al., 2001), SUMO-1, 2 und 3. SUMO-2 und SUMO-3 zeigen zueinander 95% Sequenzübereinstimmung, während ihre Homologie zu SUMO-1 nur etwa 50% beträgt, was der Homologie von SUMO-1 zu Smt3, dem Hefe-Homolog, entspricht (siehe Abbildung 1.2).

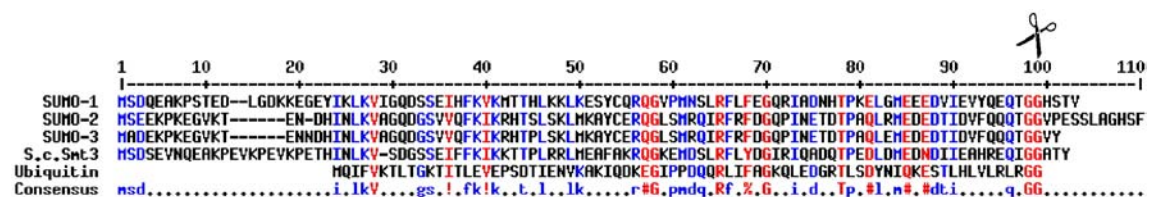


Abbildung 1.2: Sequenzvergleich der SUMO-Familienmitglieder mit Ubiquitin.

Die Sequenzen von humanem SUMO-1, -2 und -3 werden verglichen mit der Sequenz von SMT3 aus *Saccharomyces cerevisiae* und humanem Ubiquitin. Identitäten sind in rot dargestellt, Ähnlichkeiten in blau. Die Vorläufer-Prozessierung verläuft C-terminal vom Doppel-Glycine-Motiv (Scheren Symbol).

Tatsächlich scheint es auch eine funktionale Heterogenität zwischen SUMO-1 auf der einen und SUMO-2 und -3 auf der anderen Seite zu geben. So wird verstärkte

SUMO-2 und -3 Konjugation durch Stress induziert, SUMO-1-Konjugation hingegen bleibt davon unbeeinflusst (Saitoh & Hinchev, 2000).

1.3. Enzymatik der SUMO- Konjugation

1.3.1. E1 und E2-Enzyme

Die Konjugation von SUMO, auch SUMOylierung genannt, verläuft enzymatisch analog zur Ubiquitinierung. SUMO wird wie Ubiquitin als inaktives Vorläufer-Protein hergestellt. Das zur Konjugation nötige C-terminale Glycin-Glycin-Motiv wird erst bei der Prozessierung durch eine spezifische Cystein-Protease, genannt „UBL specific protease“ (ULP), freigelegt. Danach erfolgt die SUMOylierung des Zielproteins in einem enzymatischen 3 Schritte-Prozeß (Hochstrasser, 2000, Müller et al., 2001). Der 1. Schritt, die Aktivierung von SUMO, erfolgt durch das E1-Enzym, welches dann SUMO im 2. Schritt auf ein reaktives Cystein des konjugierenden Enzyms (E2) transferiert. In den meisten Fällen wird ein zusätzlicher Faktor, eine sogenannte E3-Ligase, gebraucht, um eine Isopeptidbindung zwischen SUMO und dem Zielprotein zu bilden.

Das E1-Enzym für SUMO ist ein Heterodimer bestehend aus den beiden Proteinen Aos1 und Uba2 (auch bekannt als SAE1 und SAE2) (Johnson et al., 1997). Bei Vergleichen mit dem E1-Enzym von Ubiquitin, UBA1, zeigt sich, daß die enzymatisch aktiven Seiten, welche wichtig für die Aktivierung von SUMO sind, auf beide Proteine aufgeteilt sind. Aos1 formt zuerst in einem ATP-abhängigen Schritt ein Adenylierungs-Intermediat mit dem C-Terminus von SUMO, bevor eine Thioesterbindung zwischen der Carboxylgruppe am C-Terminus von SUMO und dem aktiven Cystein in Uba2 gebildet werden kann (Kim et al., 2002). Aos1 zeigt dementsprechend auch Sequenzähnlichkeit zum N-Terminus von UBA1, der nötig ist für die Adenylierung von Ubiquitin, während Uba2 Sequenzähnlichkeit zur C-terminalen Region von UBA1 zeigt, die das aktive Cystein trägt (Johnson, et al., 1997, Desterro et al., 1998, Okuma et al., 1999, Gong et al., 1997). SUMO hat im Gegensatz zu Ubiquitin nur ein E2-Enzym, genannt Ubc9. Ubc9 bindet an den E1-SUMO Komplex über eine Interaktion mit dem E1-Enzym und mit SUMO (Tatham et al., 2003). In diesem Komplex wird SUMO von dem E1-Enzym auf das E2

übertragen und bildet eine Thioesterbindung mit dem aktiven Cystein in Ubc9 (Cys93). Ubc9 ist hierbei spezifisch für SUMO und kann keinen Thioester mit Ubiquitin formen (Desterro et al., 1997, Johnson & Blobel 1997, Schwarz et al., 1998). Die Erklärung hierfür ergibt sich daraus, daß trotz genereller Ähnlichkeiten zwischen Ubc9 und den bekannten E2-Enzymen von Ubiquitin, es wichtige Unterschiede gibt, die essentiell für die Spezifität der Enzyme sind. So ist die Ubc9-Oberfläche, die mit SUMO interagiert, positiv geladen. Dadurch ist eine spezifische Interaktion mit SUMO gewährleistet, da SUMO im Gegensatz zu Ubiquitin eine negative Oberflächenladung besitzt (Giraud et al., 1998, Liu et al., 1999). Die entsprechenden Regionen bei den E2-Enzymen für Ubiquitin sind dementsprechend negativ oder neutral geladen. Das E1- und E2-Enzym von SUMO ist sowohl im Kern als auch im Zytoplasma der Zelle lokalisiert.

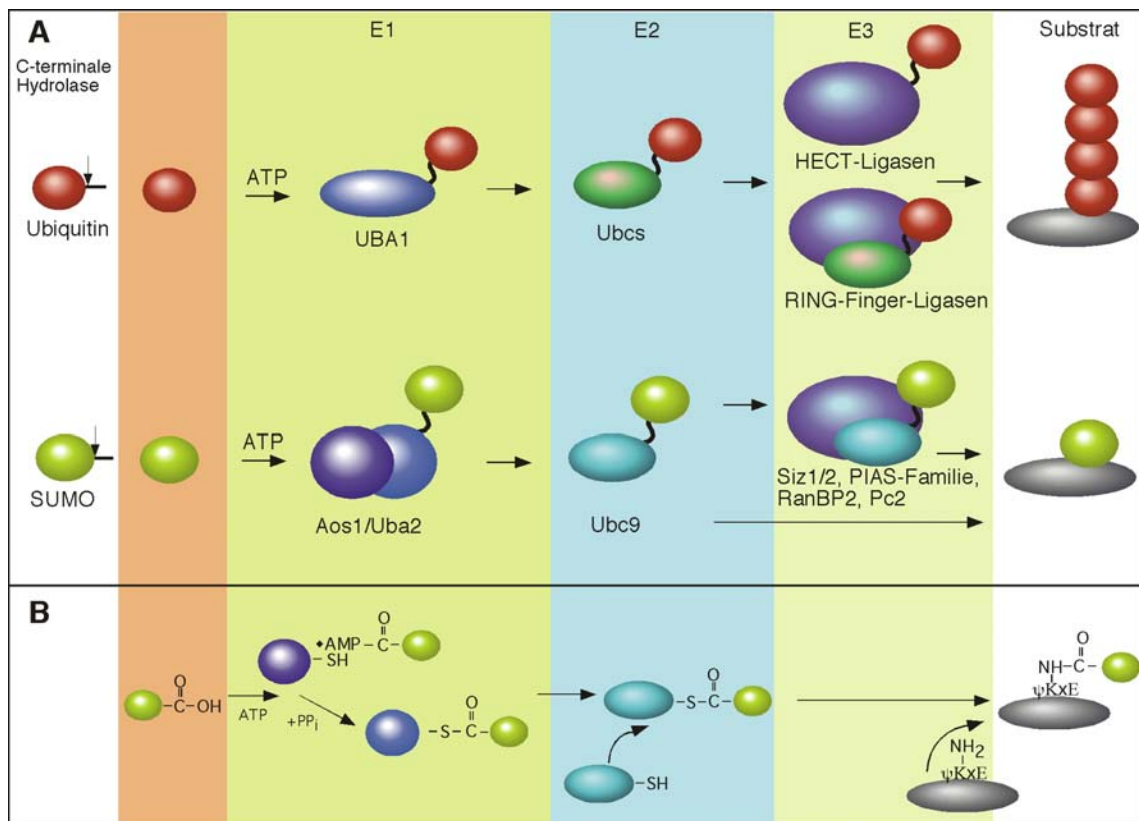


Abbildung 1.3: Enzymatik von Ubiquitinierung und SUMOylierung.

- (A)** Ubiquitin und SUMO werden als Vorläuferproteine synthetisiert und C-terminal durch eine Protease prozessiert (vertikaler Pfeil). Danach werden sie mit Hilfe von aktivierendem Enzym E1 und konjugierendem Enzym E2 an Zielproteine gehängt (oftmals über die Wirkung von E3 Ligasen).
- (B)** Der Carboxyterminus von SUMO wird unter ATP-Verbrauch durch Adenylierung aktiviert und auf ein aktives Cystein in Uba2 übertragen, wo es mit dem Enzym eine Thioesterbindung eingeht. Danach erfolgt die Übertragung auf ein Cystein des E2 Enzymes Ubc9 mit erneuter Thioester-Bindung. Abschließend wird SUMO direkt, oder mittels einer E3 Ligase auf das Zielprotein übertragen, wo es mit einem Lysin eine Isopeptidbindung formt (Abbildung modifiziert nach Müller et al., 2001).

Im Gegensatz zu Ubiquitinierung, wo die Auswahl der Ubiquitinierungs-Stelle kaum mehr als den Lysin-Rest benötigt, konnte bei den SUMO-Zielproteinen eine Konsensussequenz für die SUMOylierung festgestellt werden. Es handelt sich dabei um die Sequenz ψKxE , wobei ψ eine große hydrophobe Aminosäure bezeichnet (bevorzugt Isoleucin oder Leucin), K den zu modifizierende Lysinrest, x eine beliebige Aminosäure und E Glutamat (Sampson et al., 2001)(siehe Abbildung 1.3).

1.3.2. E1 und E2-Enzyme sind für die Modifikation einiger Proteine ausreichend

Bei der SUMOylierung war lange unklar, ob E3-Ligasen überhaupt notwendig sind, da *in vitro* E1- und E2-Enzym, zumindest in hoher Konzentration, für die Modifikation von Zielproteinen ausreichen. Dies konnte unter anderem für RanGAP1 und I κ B α gezeigt werden (Melchior, 2000, Okuma et al., 1999). Dies impliziert, daß Ubc9 bis zu einem bestimmten Grad die Substrat-Spezifität bestimmt. Tatsächlich konnte durch Struktur- und Bindungs- Analysen gezeigt werden, daß die Konsensussequenz ψKxE direkt von Ubc9 erkannt wird und das Ubc9 auch direkt über andere Sequenzen mit dem Zielprotein interagieren kann (Bernier-Vilamor et al., 2002, Liu et al., 2002, Sampson et al., 2001). Die Tatsache, daß zwar einige Proteine *in vitro* mit E1 und E2 modifizierbar sind, aber eine große Anzahl nicht, deutet darauf hin, daß weitere Faktoren dafür benötigt werden.

1.3.3. E3-Ligasen

Eine E3 Ligase wurde definiert, als „ein Enzym, das direkt oder indirekt spezifische Proteinsubstrate bindet und direkt oder indirekt den Transfer von einem Thioester-Zwischenprodukt zu einer Isopeptidbindung mit einem Protein oder einer Ubiquitin-Kette fördert“ (Hershko & Ciechanover, 1998) Es gibt bei der Ubiquitinierung verschieden E3-Ligase Typen, die diese Verknüpfung durch verschiedene Mechanismen ausführen oder fördern. Bei der Familie der HECT-Ligasen (homologous to the E6-AP carboxyl terminus) wird Ubiquitin direkt vom E2-Enzym auf die E3-Ligase übertragen und bildet mit einem aktiven Cystein-Rest in der HECT-Domäne eine Thioesterbindung. Der N-Terminus enthält die Substrat-

Bindungsstelle. Die größte Klasse der Ubiquitin-E3-Ligasen sind die RING-Finger Ligasen (really interesting new gene). Diese Proteine zeichnen sich durch eine spezifische Domäne, den RING-Finger aus. Dieser besteht aus einem Oktet von Cystein- und Histidin-Resten, die 2 Zink-Ionen komplexieren und so eine globuläre Domäne formen. Diese große Klasse wurde wiederum in 4 Unterklassen unterteilt: SCF-Komplexe (Skip-Cullin-F-box-complex), CBC-Komplexe (Cul2-Elongin B-Elongin C complex), APC-Komplexe (Anaphase-Promoting Complex) und letztendlich die SPRF (Single-polypeptide RING-Finger). Wie die Namen schon zeigen, handelt es sich bei den ersten 3 Unterklassen um große Proteinkomplexe, während die SPRF-Ligasen nur aus einem Protein bestehen. Alle diese RING-Finger Ligasen binden sowohl das Zielprotein, als auch das E2-Enzym, welches dann Ubiquitin selbst auf das Substrat überträgt. Sie fungieren als nicht-enzymatische Adapterproteine. Es wird diskutiert, ob sie darüberhinaus eine allosterische Wirkung auf das E2-Enzym haben (Pickart, 2001). Die letzte Familie der Ubiquitin E3-Ligasen stellen die U-box Proteine dar. Sie funktionieren ebenfalls als nicht-enzymatische Adapterproteine und sind gekennzeichnet durch die U-box Domäne, welche trotz fehlender Metallbindender Reste bei Strukturanalysen eine verblüffende Ähnlichkeit zu RING-Finger Ligasen aufweist (Ohi et al., 2003). Man kann sie deshalb auch als modifizierte RING-Finger-Ligasen betrachten, weshalb sie größtenteils als Untergruppe zu ihnen gerechnet werden.

In den letzten Jahren konnte die Frage nach den E3-Ligasen für SUMO geklärt werden. In Säugern wurden die Mitglieder der PIAS-Familie, sowie RanBP2 und Pc2 isoliert. In Hefe wurden Siz1(Ull1) und Siz2 (Nfi1) als E3-Ligasen für SUMO identifiziert, welche ebenfalls Mitglieder der PIAS-Familie sind (siehe Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1 Auflistung der SUMO-E3-Ligasen und ihrer bisher bekannten Substrate

E3 Ligase	Substrat	Ref.
PIAS-Familie (SP-RING)		
Säuger		
PIAS1	GRIP1 CtBP1 Androgen Rezeptor Sp3 c-Jun/p53	Kotaya et al., 2002 Kahyo et al., 2001 Nishida et al. 2002 Sapetschnig, et al. 2002 Schmidt & Müller 2002
PIAS3	IRF-1	Nakagawa et al. 2002

PIASx α	Androgen Rezeptor / c-Jun STAT1	Kotaja et al. 2002 Nishida et al. 2002 Rogers et al. 2003
PIASx β	c-Jun / p53	Schmidt & Müller 2002
PIASy	LEF1 GATA-2 Cmyb Smad3 SMAD4 C/EBPalpha Tcf-4	Sachdev et al., 2001 Chun et al., 2003 Dahle et al., 2003 Imoto et al., 2003 Lee et al., 2003 Subramanian et al., 2003 Yamamoto et al., 2003
Hefe		
Siz1	Septins	Johnson et al., 2001 Takahashi et al., 2001
Siz2	Septins	Johnson et al., 2001 Takahashi et al., 2001
RanBP2	HDAC4 HDAC1, -6, MITR Sp100	Kirsh et al., 2002 Kirsh et al., 2002 Pichler et al., 2002
Pc2	CtBP1 CtBP2	Kagey et al., 2003

Die größte Klasse der bekannten SUMO E3-Ligasen besteht aus Mitgliedern der PIAS-Familie (protein inhibitors of activated STAT) PIAS1, PIAS3, PIASx α , PIASx β , PIASy, Siz1 und Siz2. Alle bisher bekannten Substrate der PIAS-Familie in Säugern sind eng mit transkriptionaler Regulation verknüpft (siehe Review Schmidt & Müller, 2003). Die PIAS-Proteine ähneln sich im N-terminalen-, sind aber sehr verschieden im C-terminalen-Bereich. Sie zeichnen sich durch eine konservierte RING-Finger-ähnliche Domäne aus, den sogenannten SP-RING (Siz/PIAS-RING) (siehe Reviews Hochstrasser, 2001, Jackson, 2001). Obwohl in diesem SP-RING zwei bei RING-Finger Proteinen konservierte Cysteine fehlen und noch geklärt werden muß, ob sie Zink-Ionen komplexieren können, liegt es nahe, daß sie zur selben Familie der E3-Ligasen gehören, wie die RING-Finger Proteine. Ein weiterer Hinweis in diese Richtung ist die Aufklärung der Kristallstruktur der Ubiquitin-E3-Ligase c-Cbl im Komplex mit dem E2-Enzym UBCH7 und einem Substrat-Peptid. Die Strukturanalyse hat gezeigt, daß die RING-Finger E3-Ligasen nicht nur Substrat und E2 rekrutieren, sondern auch als Plattform dienen, um sie optimal für den Ubiquitin-Transfer zu positionieren (Zheng et al., 2000). Dabei scheint ein Tryptophan-Rest eine Rolle zu spielen, der in vielen RING-E3-Ligasen zwischen

den Cysteinen an 5. und 6. Stelle der RING-Domäne konserviert ist. Dieser Tryptophan-Rest bildet bei c-Cbl einen Teil der RING-Oberfläche, die mit dem E2 interagiert. Wird dieser Tryptophan-Rest mutiert, geht damit auch die E3-Aktivität verloren (Zheng et al., 2000). Alle PIAS Proteine enthalten ebenfalls einen konservierten Tryptophan-Rest in ihrer zentralen Cystein-reichen Region. Bei einer Tryptophan- zu Alanin-Mutation in PIASx α (W383A) und PIAS1 (W372A) zerstört man ihre E3-Ligase Aktivität (Kotaja et al., 2002). Ähnlich der Automodifikation von RING-Finger E3-Ligasen (Nuber et al., 1998) werden auch die PIAS-Proteine in Säugern und in Hefe mit SUMO modifiziert, was eine Rolle in der Selbstregulation spielen könnte (Kotaja et al., 2002, Takahashi et al., 2003). Durch Strukturanalysen muß gezeigt werden, ob der SP-RING die gleiche Struktur hat wie die klassische RING-Finger Domäne, was aber durch das Beispiel der U-box Proteine, die ebenfalls keine Metall-bindenden Eigenschaften besitzen, sehr wahrscheinlich ist. Für die Mitglieder der PIAS-Familie in Säugern konnten bereits eine Reihe spezifischer Substrate identifiziert werden. Sie kommen alle aus dem Bereich der transkriptionalen Regulation (siehe Tabelle 2.1), wie z.B. p53, c-Jun und LEF1. Für die Hefe E3-Ligasen Siz1 und Siz2 konnten bisher nur die Septine und PCNA als Zielproteine identifiziert werden (Johnson & Gupta, 2001, Hoege et al., 2002).

Eine weitere, bisher unbekannte Klasse von E3-Ligasen ist das als Komponente der Kernporen-Komplexe bekannte 358 kDa große Protein RanBP2/ Nup358 (Ran Binding Protein 2). Es ist Teil der nucleo-zytoplasmatischen Transport-Maschinerie (siehe Review Görlich et al., 1999) und dient als Andockstelle für Transportkomplexe auf ihrem Weg in und aus dem Kern. Der E3-katalytisch aktive Bereich ist in einer 30kDa großen C-terminalen Domäne lokalisiert, die von Bindungsstellen für Kern-Transport-Rezeptoren flankiert wird (Pichler et al., 2002). Kerntransport und SUMOylierung könnten durch diese E3-Ligase miteinander verknüpft werden. Diese duale Rolle in Kern-Transport und als E3-Ligase stimmt mit der Beobachtung überein, daß eine intakte NLS (nuclear localisation sequence) für die SUMOylierung verschiedener Zielproteine *in vivo* nötig ist. (Rodriguez et al., 2001). RanBP2 stimuliert *in vitro* die SUMOylierung von Sp100 und HDAC1, -4 und -6, sowie MITR und wird selbst wie die anderen SUMO-E3-Ligasen SUMOyliert (Saitoh et al., 1998, Pichler et al., 2002, Kirsh et al., 2002).

Eine ebenfalls neue Klasse von E3-Ligasen, die keine Ähnlichkeit zu bisher bekannten E3-Ligasen aufweist, wird durch das 558aa große Protein Pc2 (poly comb protein 2) gebildet. Polycomb group (PcG) Proteine formen große multimere Chromatin bindende Komplexe (PcG bodies) im Kern, die an der stabilen Repression von Gen-Expression beteiligt sind. Pc2 rekrutiert CtBP und Ubc9 zu diesen PcG bodies und stimuliert *in vitro* und *in vivo* die SUMOylierung von CtBP1 und CtBP2 (Kagey et al., 2003). Pc2 wird ebenfalls mit SUMO modifiziert, was einen Mechanismus der Autoregulation darstellen könnte. Es besteht auch die Möglichkeit, daß andere PcG Proteine Teil eines Pc2-enthaltenden Komplexes sind (Kagey et al., 2003) und das es sich dabei um eine multimere E3-Ligase handelt.

1.3.4. Isopeptidasen oder ULPs

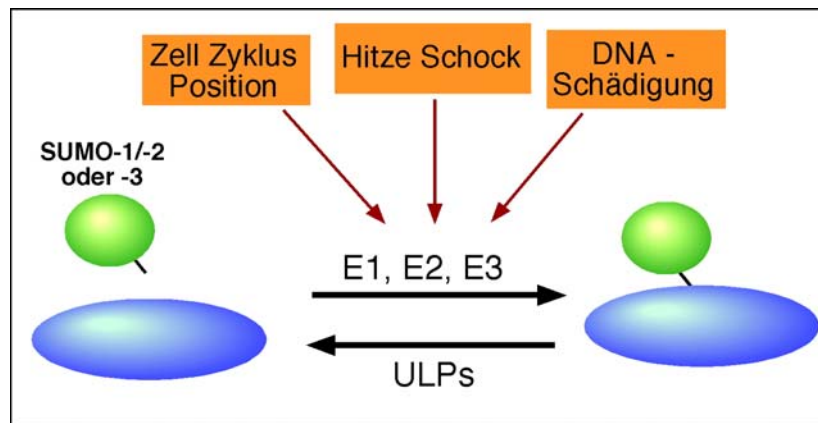


Abbildung 1.3: Stimuli die zu SUMOylierung führen

Verschiedene Stimuli führen zur SUMOylierung von Zielproteinen, die wieder aufgehoben werden muß, sobald der Stimulus verschwunden, oder die Aufgabe der Modifikation erfüllt ist.

Die Modifikation eines spezifischen Zielproteins kann konstitutiv sein, Zell-Zyklus-reguliert, oder durch Stress oder DNA-Beschädigung induziert werden. Diese Modifikation muß wieder aufgehoben werden, sobald der Stimulus verschwunden ist und die Proteinmodifikation und die damit verbundene Funktions- oder Lokalisations-Änderung obsolet ist. Letztere Funktion übernehmen SUMO-spezifische Isopeptidasen. Darüberhinaus sind sie für die Prozessierung von SUMO verantwortlich, zur Freilegung des Doppel-Glycin Motivs. SUMO-Isopeptidasen zeigen weder Sequenz- noch Strukturähnlichkeit zu Ubiquitin-Isopeptidasen und C-terminalen Hydrolasen, obwohl sie ebenfalls zu der Cystein-Proteasen Superfamilie gehören. Datenbank-Abgleiche ergaben, daß sie überraschenderweise Homologie zu Adenovirus Proteasen zeigen (Li & Hochstrasser, 1999). Die ersten Isopeptidasen

konnten in Hefe identifiziert werden. Dort gibt es 2 Mitglieder dieser Familie, Ulp1 und Ulp2 (auch bekannt als Smt4), die unterschiedliche Wirkungsorte in der Zelle haben (Li & Hochstrasser 1999, Li & Hochstrasser, 2000, Schwienhorst et al., 2000). Sie zeichnen sich durch eine etwa 200 Aminosäure lange Sequenz aus, der sogenannten ULP Domäne, die die katalytisch aktive Region enthält und dieser ganzen Gruppe von Isopeptidasen ihren Namen gab. Während Ulp1 an den Kernporenkomplexen lokalisiert, ist Ulp2 im Kern zu finden. Ulp2 scheint im Gegensatz zu Ulp1 nicht essentiell zu sein, sie kann aus der Zelle entfernt werden (Panse et al., 2003).

Auch in Säugern konnten mehrere ULP-Homologe identifiziert werden. Diese Enzyme wurden SENPs oder SUSPs benannt, nach sentrin/SUMO-specific Protease. Wie Ulp1 konnte auch SENP1 an den Kernporen-Komplexen detektiert werden (Hang & Dasso, 2002). Die Isopeptidasen SENP2/Axam sind im Kern lokalisiert, Smt3IP1/SEN3 im Nucleolus während der Interphase und SUSP1/SEN6 und Smt3IP2 im Zytoplasma (Gong et al., 2000, Kim et al., 2000, Nishida et al., 2000, Nishida et al., 2001). Sie besitzen alle die C-terminale katalytische ULP-Domäne, aber ihre N-Termini sind unterschiedlich. Dementsprechend zeigen diese ULPs neben unterschiedlicher Lokalisation auch unterschiedliche Substrat-Spezifitäten (Li & Hochstrasser 2003).

1.4. Funktion der SUMO-Modifikation

Es hat sich gezeigt, daß SUMOylierung bei einer Vielzahl von Proteinen aus den verschiedensten Signalwegen und Reaktionsketten stattfindet. Zu diesen Proteinen gehören Transkriptionsfaktoren, Signalketten-Proteine, Enzyme und virale Proteine (siehe Tabelle 1.2). Die Konsequenzen dieser Modifikationen scheinen so verschieden zu sein wie die SUMO-Zielproteine selbst. Die Auswirkungen von SUMOylierung, die bisher gefunden werden konnten, liegen unter anderem in Änderungen von Protein-Protein oder Protein-DNA Interaktionen (Mahajan et al., 1997, Matunis et al., 1998, Goodson et al., 2001; Hong et al., 2001), und in der Funktion als Antagonist zu Ubiquitin (Desterro et al., 1998, Hoege et al., 2002). Diese Änderungen haben Auswirkungen auf die verschiedensten Proteinfunktionen in der Zelle (siehe Abbildung 1.4).

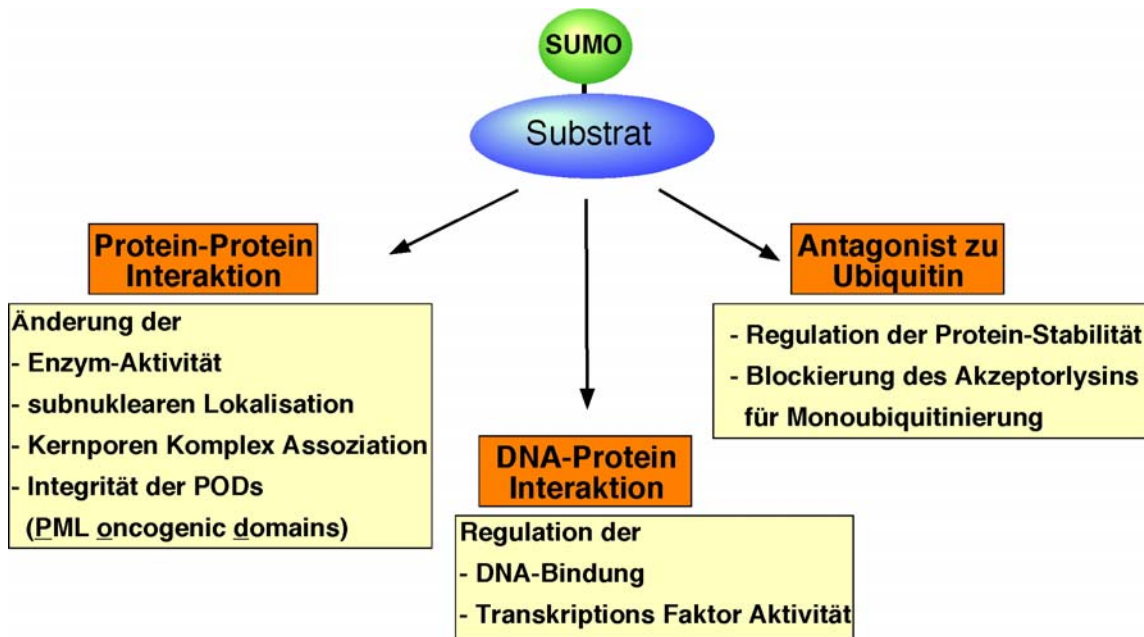


Abbildung 1.4: Bisher bekannte Effekte der SUMOylierung.

SUMOylierung beeinflusst je nach Zielprotein die Protein-Protein Interaktionen, DNA-Protein Interaktionen oder kann als Antagonist zu Ubiquitin wirken.

1.4.1. Änderung der Protein-Protein Interaktion durch SUMOylierung

Die Änderung der Protein-Protein Interaktion moduliert die verschiedensten Protein-Funktionen. Die bisher bekannten Funktionen sind in Tabelle 1.2 zusammengefaßt. SUMOylierung kann dabei sowohl die Interaktion von Proteinen mit ihren Bindungspartner(n) ermöglichen, als auch unterbinden. Resultate davon sind unter anderem Lokalisationsänderungen, und Änderung von Enzym-Aktivitäten. Co-Repressoren und Co-Aktivatoren von Transkriptionsfaktoren ändern durch die SUMOylierung ihre Bindungsaffinität zu ihren Bindungspartnern und erlauben so eine Regulation transkriptionaler Prozesse. Ein Beispiel für die Vermittlung einer Protein-Protein Interaktion, die mit einer subzellularen Lokalisationsänderung einhergeht, ist die SUMOylierung von PML (promyelocytic leukemia protein). Hier ist die Modifikation mit SUMO nötig für den korrekten Zusammenbau der PODs (PML oncogenic domains), auch bekannt als „Nuklear bodies“ (NBs), oder „Nuklear domain 10“ (Müller et al.,1998, Duprez et al.,1999). Sie ist auch für die Rekrutierung anderen Proteine zu diesen Kernstrukturen nötig, wie zum Beispiel des ebenfalls SUMOylierten Sp100 (Seeler et al., 2001).

1.4.2. Änderung der Protein-DNA Interaktion durch SUMOylierung

SUMOylierung beeinflusst bei einer Anzahl von Proteinen die DNA-Bindungsaffinität. Die Mehrzahl der bisher gefundenen SUMO-Substrate aus diesem Bereich spielt eine Rolle in der transkriptionalen Regulierung. Ein Beispiel hierfür ist der PODs assoziierte Hitzeschockfaktor HSF2. Er wird konstitutiv mit SUMO-1 modifiziert (Hong et al., 2001) und die SUMOylierte Form entspricht bei diesem Transkriptionsfaktor der aktiven DNA bindenden Form.

1.4.3. SUMO als Antagonist zu Ubiquitin

SUMO kann als Antagonist zu Ubiquitin wirken, indem es das Lysin, welches normalerweise ubiquitiniert wird, besetzt und so unzugänglich für die Ubiquitinierung macht. Auswirkungen dieser Blockierung des Akzeptorlysins sind zum Einen der Schutz vor Polyubiquitinierung und damit vor der Degradation und zum Anderen als Blockade der Monoubiquitinierung. Ein hypothetisches Beispiel für den Degradationsschutz durch SUMOylierung ist $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, das in einem Heterokomplex mit NF- κB vorliegt und dieses dadurch inhibiert. Die Aktivierung von NF- κB wird durch die Ubiquitinierung und den nachfolgenden Abbau von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ erreicht. SUMOylierung des Ubiquitin-Akzeptor-Lysins führt zu einer Inhibierung der NF- κB -abhängigen Transkription (Desterro et al., 1998). Im Fall von PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) wirkt eine SUMOylierung durch die Blockade des Akzeptorlysins der Monoubiquitinierung entgegen (Hoegge et al., 2002). Während die Monoubiquitinierung durch DNA-Schädigung ausgelöst wird und elementar für die DNA-Reparatur ist, scheint die SUMOylierung mit der normalen DNA-Replikation verknüpft zu sein.

Tabelle 1.2 Bekannte SUMO Substrate und die Rolle ihrer SUMOylierung

Protein	Funktion	Rolle der SUMOylierung	Referenz
Säuger			
RanGAP1	Kerntransport	Vermittelt Interaktion mit RanBP2	Matunis et al.,1996 Majahan et al.,1997
Sp100	PODs assoziiertes Chromatin remodelling?	Lokalisation zu den PODs, vermittelt Interaktion mit HP1	Seeler et al.,2001 Sternsdorf et al., 1999
PML	Tumorsupressor	Bildung von PODs und Rekrutierung von Daxx/p53 zu den PODs	Ishov et al.,1999 Müller et al.,1998
p53	Transkriptions-aktivierung Tumorsupressor	Aktiviert p53 Transaktivierung	Schmidt & Müller, 2002
p73 α	p53 Homolog	Subnukleare Relokalisation	Minty et al.,2000
Smad4	Tumorsupressor	erhöht Stabilität, Kernlokalisierung	Lin et al., 2003
c-Jun	Transkriptions-aktivierung	leichte Reduzierung der Transkriptions-Aktivität	Müller et al., 2000, Schmidt & Müller, 2002
Androgen Receptor	Transkriptions-aktivierung	Reduzierung der Transkriptions-Aktivität	Poukka et al., 2000
Progesteron e Receptor	Transkriptions-aktivierung	Involviert in Auto-Inhibition und Transrepression	Abdel-Hafiz et al., 2002
Glucocorticoid Receptor	Transkriptions-aktivierung	Reduzierung der Transkriptions-Aktivität	Tian et al., 2002
LEF-1	Transkriptions-aktivierung	unterdrückt LEF-1 Aktivität durch Zerstreuung in Kern Dots	Sachdev et al., 2001
c-Myb	Transkriptions-aktivierung	Reduzierung der Transkriptions-Aktivität	Bies et al.,2002
AP-2	Transkriptions-aktivierung	Reduzierung der Transkriptions-Aktivität	Eloranta & Hurst, 2002
Sp3	Transkriptions-aktivierung	Reduzierung der Transkriptions-Aktivität	Ross et al., 2002 Sapetchnig et al., 2002
C/EBP α C/EBP β -1 C/EBP δ C/EBP ϵ	Transkription-saktivierung	reguliert den Repression Effekt der regulatorischen Domäne von C/EBP Proteinen	Kim et al., 2002
ARNT	Transkription-saktivierung	ändert ARNT Transkriptions Aktivität und blockiert Interaktion mit PML	Tojo et al., 2002
GATA-2	Transkription-aktivierung	Reduzierung der Transkriptions-Aktivität	Chun et al., 2003
SRF	Transkriptions-aktivierung	aktiviertes SRF wird unterdrückt	Matsuzaki et al., 2003
Elk-1	Transkriptionsaktivierung	Reduzierung der Transkriptions-Aktivität	Yang et al., 2003
STAT1	Transkriptions-aktivierung Signaltransduktion	Reduzierung der Transkriptions-Aktivität	Ungureanu et al., 2003
TEL	Transkriptions Repressor	Lokalisation zu Kern Dots	Chakrabarti et al., 1999, 2000
GRIP-1	Co-Aktivator	Aktiviert Zusammenarbeit mit dem Androgen Rezeptor	Kotaja et al., 2002a
CtBP	Co-Repressor	ändert subzelluläre Lokalisation, moduliert CtBP Aktivität	Lin et al., 2003
HDAC1	Co-Repressor	erhöht Aktivität	David et al., 2002
HDAC4	Co-Repressor	erhöht Aktivität	Kirsh et al., 2002

HIPK2	Co-Repressor	Lokalisation in Kern dots	Kim et al., 1999
Tcf-4	unbekannt	unbekannt	Yamamoto et al., 2003
Daxx	Transkriptionaler Aktivator JNK-Aktivator	unbekannt	Jang et al., 2002
I κ B α	Signaltransduktion NF- κ B Inhibierung	blockiert Ubiquitinierung von I κ B α blockiert NF- κ B Aktivität	Desterro et al., 1998
Mdm2	E3 Ubiquitin Ligase für p53	blockiert Ubiquitinierung von Mdm2, aktiviert E3 Funktion von Mdm2	Buschmann et al., 2000
PCNA	DNA Reparatur	blockiert Ubiquitinierung und DNA Reparatur	Hoege et al., 2002
Topo I	DNA Replikation DNA Reparatur	unbekannt, induziert nach DNA Schädigung mit Camptothecin	Mao et al., 2000a,b
Topo II	DNA Replikation DNA Reparatur	unbekannt, induziert nach DNA Schädigung mit Teniposide	mo et al.,????
TDG	DNA Reparatur	entläßt die DNA Glycosylase von der abasischen Seite	Hardeland et al., 2002
HSF1	Hitze Schock Faktor	Stimuliert DNA Bindung und Hitze-aktivierte HSF1 Aktivität	Hong et al., 2001
HSF2	Hitze Schock Faktor	stimuliert DNA Bindung	Goodson et al., 2001
WRN	DNA Helicase (RecQ Familie)	unbekannt	Kawabe et al., 2000
RanBP2	SUMO E3 Ligase Komponente des Kern-Poren Komplexes	unbekannt	Saitoh et al., 1998
GLUT 1	Glucose Transport	unbekannt, GLUT1 Protein-Level werden von Ubc9 hochreguliert	Giorgino et al., 2000
GLUT4	Glucose Transport	unbekannt, GLUT4 Protein-Level werden von Ubc9 hochreguliert	Giorgino et al., 2000
Drosophila			
Ttk 69	Transkriptionale Repression	unbekannt	Lehembre et al., 2000
Dorsal	Signal Transduktion	Transport in den Kern und reguliert Dorsal-vermittelte Aktivierung	Bhaskar et al., 2000
CaMK	Calcium/Calmodulin abhängige Kinase	unbekannt	Long & Griffith, 2000
Hefe			
Septine	Bud-Neck Bildung	reguliert Dynamik des Neck Rings	Johnson & Blobel,1999
Viren			
Cytomegal-virus IE2	Immediate-early Viraler Regulator	vermindert Transaktivierungspotential	Lee et al., 2003
Epstein-Barr virus BLZF1	Immediate-early Viraler Regulator	unbekannt, korreliert mit dem Verlust der PML SUMOylierung	Adams & Kenney, 2001
Human / Bovine papilloma virus E1	DNA Helicase, leitet virale Replikation ein	reguliert Kerntransport und intranukleäre Akkumulation	Rangasamy & Wilson, 2000 Rangasamy et al., 2000
IP2p86	viraler Regulator	benötigt für das transaktivierende Potential von IE2	Hofmann et al.,2000
Herpesvirus 6 IE-1	nukleares Phosphoprotein	Ko-Lokalisation mit PODs	Gravel et al., 2002

1.5. Ziele dieser Arbeit

In den letzten Jahren rückte die posttranslationale Modifikation von Proteinen durch das Ubiquitin-verwandte Protein SUMO in den Blickpunkt der Forschung. Es wurde erkannt, daß SUMOylierung eine wichtige Rolle in der Regulation zellulärer Abläufe spielt. Die Effekte der SUMOylierung sind dabei so verschieden, wie die SUMO-Substrate selbst. Um mehr über die Funktion der SUMOylierung zu erfahren, ist es daher essentiell neue SUMO-Substrate zu identifizieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung neuer Verfahren, die die Identifizierung neuer SUMO-Substrate ermöglichen.

2. 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 Biologie* (1995) abgeleitet.

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

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

2.1.1.1. Materialien zur Filtration und Dialyse

Centricon 5, 10 und 30	Amicon, Witten
MF-Millipore Membranfilter	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Spectra-Por, Dialyseschläuche	The Spectrum Companies, Gardena, USA
UH 100/10 und 30 Ultrahülsen	Schleicher & Schüll, Dassel
Whatman 3 MM, Filterpapier	Maidstone, UK
Zentrifugen Filtereinheiten 5K, 10K und 30K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.1.2. Chromatographische Matrices und fertig gepackte Chromatographiesäulen

Affi-Gel10	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CNBr-Sepharose 4B	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutathione Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
ProBond Nickel-Chelating Resin	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Protein A Sepharose CL-4B	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein G Sepharose 4 „fast flow“	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Sepharose-Q „fast flow“	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Superdex 200 analytical

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.1.1.3. Molekulargewichts- und Längenstandards

BenchMark Protein Ladder, Protein-Größenstandard

Life Technologies,
Karlsruhe

Prestained Protein Marker

Bio-Rad Laboratories GmbH,
München

GeneRuler 100bp Ladder Plus, DNA-Größenstandard

MBI Fermentas, St. Leon-
Rot

GeneRuler 1kb Ladder Plus, DNA-Größenstandard

MBI Fermentas, St. Leon-
Rot

MW-GF-200, Gelfiltrations Marker 12-200kDa

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.1.4. Komplexe Reagenzien und Reaktions-Sets („Kits“)

Big Dye Terminator Cycle Sequencing RR-Mix

Applied Biosystems, Foster City,
USA

Desoxynukleotid-Set

MBI Fermentas, St.Leon-
Rot

Effectene, Transfektions Reagenz

QIAGEN, Hilden

Freund's Adjuvant, incomplete

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Glow, Mounting Medium

Energene, Regensburg

Micro BCA Protein Assay Reagent Kit

Pierce, Rockford, USA

QIAGEN Plasmid Kit (Mini, Midi)

QIAGEN, Hilden

QIAquick PCR Purification Kit

QIAGEN, Hilden

QIAquick Gel Extraction Kit

QIAGEN, Hilden

Rotiphorese Gel 30

Roth, Karlsruhe

Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate

Pierce, Rockford, USA

Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate

Pierce, Rockford, USA

TiterMax Gold, Adjuvant

SIGMA-Aldrich, Taufkirchen

2.1.1.5. Verbrauchsmaterial

Kunststoffware:

Einmalkunststoffwaren 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 Gewebekulturgefäße waren die Firmen Becton Dickinson (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen) und Nunc (Wiesbaden).

Einmalkanülen wurden von der Firma Terumo (Frankfurt), Einmalhandschuhe von der Firma Semperit (Wien) geliefert.

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

Transfermembran:

Proton Nitrocellulose Transfer Membrane	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
PVDF-Membran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Röntgenfilme:

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

2.1.2. Puffer und Lösungen

ATP	100mM ATP, 100mM Mg(OAc) ₂ , 20mM HEPES, pH 7,4 eingestellt mit NaOH
Blocklösung	2% (w/v) BSA in PBS
B 1a	6M Guanidiniumchlorid, 0,1M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH 8,0
B 1b	6M Guanidiniumchlorid, 0,1M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH 5,8
Coomassie-Färbelösung	50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,1% (w/v) SERVA Blue R (SERVA)

DNA-Auftragspuffer, 6 x	10 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, 1% SDS (w/v), 30% (w/v) Glycerin, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, pH 8,0
Einfrierpuffer	50mM Tris/HCl, pH 7,9, 30% Glycerol, 1mM EDTA, 0,5mM DTT
Gluthatione-Puffer	50 mM Tris/HCl, 20 mM Gluthatione, 150 mM NaCl, pH 8,0
Hochsalzpuffer	50mM Tris/HCl, pH 7,5, 10% (w/v) Sucrose, 0,42 M KCl, 5mM MgCl ₂ , 0,1mM EDTA, 20% (v/v) Glycerol, 2mM DTT
Hypotonischer Puffer	10mM Tris/HCl pH 7,9, 10mM KCL, 0,1mM EDTA, 0,1mM EGTA, 2mM DTT
IP-Puffer	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,2% Tween-20, Proteaseinhibitoren, pH 7,5
Karbonatpuffer	0,2 M Na ₂ HPO ₄ , pH 8.9
Mito I	10mM Tris pH7,4, 0,6 M Mannitol, 0,1% BSA, 1mM PMSF
Mito II	10mM Tris pH7,4, 0,5 M Mannitol, 0,1% BSA, 1mM PMSF
P1	50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0
P2	200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS
P3	3 M K-Azetat, pH 5,5
Paraformaldehyd-Lösung	6% (w/v) Paraformaldehyd mit 10 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt; dunkel bei 4°C gelagert; Arbeitslösung 3% Paraformaldehydlösung in PBS
PBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,5 eingestellt mit NaOH
PBS-0,2T	0,2% (w/v) Tween-20 in PBS
PBS-0,05T	0,05% (w/v) Tween-20 in PBS
Puffer 1	50 mM Tris/HCl pH 8,0, 300mM NaCl, 1mM EDTA, 2 mM DTT + Proteaseinhibitoren

Puffer A	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 150 mM NaCl, 10 mM Imidazol+ Proteaseinhibitoren
RIPA-Puffer	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0,25% (w/v) Natriumdesoxycholat, 0,1% (w/v) SDS, pH 7,5
SDS-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,05% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer, 10x	209 mM Tris/HCl, 41% (w/v) Glyzerin, 7,7% (w/v) SDS, 0,003% (w/v) Bromphenolblau, 17 % (v/v) b-Mercaptoethanol, pH 6,8
SDS-Probenpuffer, 2x	100 mM Tris/HCl, 20 % (w/v) Glyzerin, 4% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) Bromphenolblau, 200mM DTT, pH 6,8
SDS-Probenpuffer, 1x	50mM Tris/HCl, 2% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 10%(w/v) Glycerin, 100mM DTT, pH 6.8
TAE, 50x	2M Tris, 57,1% (v/v) Essigsäure, 0,05M EDTA, pH 7,7
TB	20mM HEPES, 110mM KOAc, 2mM Mg(OAc) ₂ , 1mM EDTA, pH7,3 eingestellt mit KOH
TE	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
Triton-X-100-Lösung	0,2% (w/v) Triton-X-100 in PBS
Transferpuffer	47,9 mM Tris, 38,6 mM Glycin, 0,037% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol
TSS	10% (w/v) Polyethylenglykol 6000, 5% (v/v) DMSO, 50 mM MgCl ₂ in LB-Medium

2.1.3. Medien und Medienzusätze für die Gewebekultur

2.1.3.1. Medienbestandteile und Medienzusätze

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	LifeTechnologis, Karlsruhe
---	-------------------------------

mit 4500 mg/l Glucose, ohne Natrium-Pyruvat	
DMEM mit 4500 mg/ml Glucose, ohne L-Glutamin,	LifeTechnologies,
Natriumpyruvat, L-Cystein, L-Methionin	Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS) und	Sigma-Aldrich,
Neugeborenen Kälberserum (NCS)	Taufkirchen
L-Glutamin (100 x)	LifeTechnologies,
Joklik's Medium	Karlsruhe
Natriumpyruvat (100 x)	LifeTechnologies,
Penicillin/Streptomycin (100 x)	Karlsruhe
Trypsin/EDTA (10 x)	LifeTechnologies,
	Karlsruhe

2.1.3.2. Medienzusammensetzung

Standardmedium	
für adhärente HeLa, 293T	DMEM mit 4500 mg/l Glucose,
und NIH3T3	10% (v/v) FCS, 100U/ml
	Penicillin,
	100 µg/ml Streptomycin, 1 mM
	Natriumpyruvat
HeLa-Suspensionszellen	Joklik's-Medium, 5% (v/v)
	NCS, 100 U/ml Penicillin, 100
	µg/ml Streptomycin

2.1.4. Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium	1% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl
Superbroth-Medium	3,5% (w/v) Bactotrypton, 2% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl
SOC-Medium	2% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose

Festmedien wurden durch Zugabe von 1,5% (w/v) Agar hergestellt. Selektionsmedien enthielten 100 µg/ml Ampicillin oder 60 µg/ml Kanamycin.

2.1.5. Antikörper

primäre Antikörper:

Bezeichnung	Antigen	Spezies	Herkunft
Anti-Aos1	humanes Aos1	Ziege	Labor Frauke Melchior
Anti-GAPtail	murines RanGAP	Kaninchen	Labor Frauke Melchior
Anti-GFP	GFP-tag	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-GMP1	humanes SUMO-1	Maus	Zymed Laboratories, South San Francisco, USA
Anti-GST	GST-Tag	Kaninchen	Labor Ludger Hengst
Anti-HA(Klon16B12)	HA-tag	Maus	BabCo, Richmond, USA
Anti-HIS (H-15)	His-Tag	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Myc	myc-tag	Maus	Alexis Biochemicals
Anti-SUMO-1	humanes SUMO-1	Ziege	Labor Frauke Melchior
Anti-SUMO2/3	humanes SUMO2/3	Ziege	diese Arbeit
Anti-p53	humanes p53	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-PUF60	humanes PUF60	Kaninchen	diese Arbeit
Anti-RanGAP1	murines RanGAP	Ziege	Labor Melchior
Anti-SNIP1	humanes SNIP1	Kaninchen	diese Arbeit
Anti-Tim23	humanes Tim23	Maus	Transfection Laboratories
Anti-Uba2	humanes Uba2	Ziege	Labor Frauke Melchior
Anti-Ubc9	humanes Ubc9	Ziege	Labor Frauke Melchior
Anti-UP	humanes UP	Kaninchen	diese Arbeit

Sekundäre Antikörper:

Bezeichnung	gekoppelt mit	Spezies	Herkunft
Anti-mouse IgG, (H+L)	Peroxidase	Ziege	Pierce, Rockford, USA
Anti-rabbit IgG, (H+L)	Peroxidase	Ziege	Pierce, Rockford, USA
Anti-goat IgG, (H+L)	Peroxidase	Esel	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Anti-mouse IgG, (H+L)	Cy TM 3	Esel	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Anti-mouse IgG, (H+L)	Alexa Fluor	Ziege	MoBiTec
Anti-mouse IgG, (H+L)	FITC	Ziege	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Anti-mouse IgG, (H+L)	Rhodamine	Ziege	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Anti-rabbit IgG, (H+L)	Cy TM 3	Esel	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Anti-rabbit IgG, (H+L)	Cy TM 2	Esel	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Anti-rabbit IgG, (H+L)	FITC	Ziege	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Anti-rabbit IgG, (H+L)	Rhodamine	Ziege	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Anti-goat IgG, (H+L)	Alexa Fluor TM	Esel	MoBiTec

2.1.6. Enzyme

Enzyme wurden 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.

2.1.7. Plasmide**Eukaryotische Expressionsvektoren**

Bezeichnung	Tag	Herkunft
pCruzHA	HA	Santa Cruz, Heidelberg
pEGFP-C2	GFP	CLONTECH Laboratories, Heidelberg
pEYFP-C1	YFP	CLONTECH Laboratories, Heidelberg
pcDNA3myc	myc	

Prokaryotische Expressionsvektoren

Bezeichnung	Tag	Herkunft
pET11a	-	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
pET23a	His	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
pET28a	His	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
pGEX-6P1	GST	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pGEX-2TK	GST	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pQE30NST	His	RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Berlin

2.1.8. DNA-Oligonukleotide

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

DNA-Oligonukleotide zur Mutagenese von SUMO-1 Δ C4

Primer	DNA-Sequenz
5SUMO-1Cys9	5'-CAGGAGGCCAAACCTTGTACTGAGGACTTGGGG-3'
3SUMO-1Cys9	5'-CCCCAAGTCCTCAGTACAAGGTTTGGCCTCCTG-3'

DNA-Oligonukleotide zur Amplifikation und Mutagenese von PUF60

Primer	DNA-Sequenz
5'-SacII-PUF60 (pcDNA3myc)	5'-TCCCCGCGGTACCATGGCGACGGCGACCATAGC-3'
3'-EcoRI-PUF60 (pcDNA3myc)	5'-CCGGAATTCTCACGCAGAGAGGTCAGT-3'
5'-BamHI-PUF60 (pGEX6P1)	5'-CGGGATCCATGGCGACGGCGACCATAGC-3'
3'-HindIII-PUF60 (pGEX6P1)	5'-CCCAAGCTTCGCAGAGAGGTCAGTGTATC-3'
5'-PUF60-LysA	5'-GGGCACAGACTCGATCAGGATGGAGAACGGGC-3'
3'-PUF60-LysA	5'-GCCCCGTTCTCCATCCTGATCGAGTCTGTGCCC-3'
5'-PUF60-Lys1	5'-GGTCTCTGGAGCCGAGGAAGGAGAAGGAAGAGG-3'
3'-PUF60-Lys1	5'-CCTCTTCTTCTTCTCCTTCCTCGGCTCCAGGAGACC-3'
5'-PUF60-Lys2	5'-GCAGAAGCTGCTCCGCCGAGGAGTCTACAGTGATGG-3'
3'-PUF60-Lys2	5'-CCATCACTGTAGACTCCTGCCGGCGGAGCAGCTTCTGC-3'

DNA-Oligonukleotide zur Amplifikation von STAF65 γ und SNIP1

Primer	DNA-Sequenz
5'-STAF65-EcoRI (pET28a, pEGFP-C2)	5'-CGGAATTCAATCTCGAAAGATACTGG-3'
3'-STAF65-SalI (pET28a, pEGFP-C2)	5'-ACGCGTCGACTTATATTTTCCTCATCCTC-3'
5'-SNIP1-EcoRI (pEGFP-C2)	5'-CGGAATTCAAGGCGGTGAAGAGCGAAG-3'
3'-SNIP1-BamHI (pEGFP-C2)	5'-CGGGATCCCTAGCTGTCAGACACTTCTTCC-3'

DNA-Oligonukleotide zur Amplifikation von UP62

Primer	DNA-Sequenz
5'-SalI-pGEX-UP62 (pGEX-6P1)	5'-ACCGTCGACTATGGGATCGCGGAACAGC-3'
3'-NotI-pGEX-UP62 (pGEX-6P1)	5'-ATTTGCGGCCGCCTACTGGGGTGAGGAAAAGG-3'

DNA-Oligonukleotide zur Plasmid-Sequenzierung

Primer	DNA-Sequenz
T7-Promotor Primer	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
pGEX5' seq.primer	5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'
pGEX3' seq.primer	5'-CCGGGAGCATGTGTCAGAGG-3'

2.1.9. Bakterienstämme

BL21(DE3)	Stamm Epicurian coli B; F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> λ DE3 (Stratagene)
BL21(DE3)	
CODONplus	Stamm Epicurian coli <i>argU, ileY, leuW, proL</i> tRNA genes (Stratagene)
DH5 α	F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44</i> λ <i>thi-1</i> <i>gyrA96 relA1</i>
SCS1	E.coli (Stratagene)

2.1.10. Eukaryontische Zelllinien

HeLa, Suspensionzellen	menschliche Cervix-Karzinomzelllinie
HeLa, adhärenzte Zellen	menschliche Cervix-Karzinomzelllinie
HS68	menschliche diploide Fibroblasten aus Neugeborenen- Vorhaut, ATCC-Nummer CRL-1635
293T	humane embryonale Nierenzellen 293 (ATTC- Nummer CRL-1573) zusätzlich mit dem großem T-Antigen des SV-40 Virus transformiert
NIH3T3	Murine embryonale Fibroblasten (ATCC-Nummer CRL-1658)

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Nukleinsäure-Fällung

Eine wäßrige DNA-Lösung wurde mit 3 M Natriumazetat-Lösung (pH 5,2) auf eine Endmolarität von 0,3 M eingestellt und mit dem 2,5fachen Volumen Ethanol oder dem 0,7fachen Volumen Isopropanol versetzt. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte für mindestens 30 min bei -20°C. Das Präzipitat wurde durch 20minütige Zentrifugation bei 13000 g pelletiert und mitausgefallenes Salz wurde durch Behandlung mit 70% Ethanol aus dem DNA-Präzipitat entfernt. Die durch erneute Zentrifugation pelletierte Nukleinsäure wurde an der Luft oder unter Vakuum (Membran Vakuumpumpe MD8C, Vakuubrand, Wertheim) getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH₂O oder Puffer aufgenommen.

2.2.2. Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die DNA-Konzentration einer wäßrigen Lösung wurde 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 DNA. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm zu 280 nm ist ein Maß für die Reinheit einer Nukleinsäurelösung und sollte für DNA bei etwa 1,8 liegen (gilt für Lösungen mit pH 8,0).

2.2.3. Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA aus *E.coli* wurden 4 ml Superbroth-Medium in einem 15 ml Falcon-Gefäß mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µl Puffer P1 resuspendiert und in ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 400 µl alkalischer Lösung P2 wurde durch 4-6maliges Invertieren gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 400 µl 1 eisgekühlter Puffer P3 zugegeben. Der Ansatz wurde wiederum durch Invertieren vorsichtig gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die ausgefallenen Proteine und die Bakteriendebris wurden abzentrifugiert (20 min, 13000g, 4°C) und die Plasmid-DNA mit 900 µl Isopropanol aus dem Überstand ausgefällt. Die Plasmid-DNA wurde durch 20minütige Zentrifugation bei 13000 g und RT sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 25 µl TE gelöst.

Zur Isolierung größerer Mengen reiner Plasmid-DNA wurde der „Midi-Plasmid Purification Kit“ der Firma QIAGEN nach den Empfehlungen des Herstellers eingesetzt. Diese DNA wurde zur Transfektion von Gewebekulturzellen eingesetzt.

2.2.4. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionspaltungen von DNA erfolgten unter der vom Hersteller, für die jeweilige Nuklease angegebenen Puffer- und BSA-Konzentration. Pro 1 µg DNA wurden 2 bis 5 U Restriktionsenzym eingesetzt. Um unspezifische Spaltaktivität der Endonuklease zu verhindern, wurde darauf geachtet, daß das Reaktionsvolumen mindestens das 10fache der in Glyzerin gelösten Enzyme betrug. Die Dauer der Restriktionsspaltung betrug, bei der vom Hersteller für das jeweilige Enzym angegebenen optimalen Temperatur, mindestens 2 h. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/5 Volumen 6 x DNA-Auftragspuffer beendet. DNA-Doppelspaltungen erfolgten nach den Angaben des Herstellers oder wurden, falls dies nicht möglich war, seriell durchgeführt.

2.2.5. Dephosphorylierung von DNA-Enden mit CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase)

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

2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0,8- bis 2,5%ige Agarose-Gele verwendet. Zur Präparation des Gels wurde die erforderliche Menge Agarose mit TAE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle aufgekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die flüssige Agarose wurde in eine Gießkammer gegossen und ein Kamm zur Aussparung der Geltaschen eingesetzt. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit TAE überschichtet. Die mit 1/5 Volumen 6 x DNA-Auftragspuffer versetzten DNA-Proben wurden in die Geltaschen pipettiert und bei 5 V/cm aufgetrennt (Elektrophoresis Power Supply EPS300, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die aus der Gelelektrophorese resultierenden DNA-Banden wurden mit einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml Ethidiumbromid in TAE) für 15 min inkubiert. Die DNA wurden im UV-Durchlicht sichtbar gemacht und digital aufgenommen (ImageMaster VDS 1D, Amersham Pharmacia Biotech).

2.2.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die DNA-Bande wurde im UV-Durchlicht (365 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Cup überführt. Anschließend wurde die DNA mit dem „Qiagen Gel Extraction“-Kit nach den Angaben des Herstellers eluiert. Die gesammelte DNA-TE-Lösung wurde direkt weiterverwendet (z.B. Ligation).

2.2.8. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung eines DNA-Fragments mit einem Plasmidvektor über kohäsive DNA-Enden wurden 50 bis 100 ng Plasmid-DNA und ein dreifacher molarer Überschuß des DNA-Fragments mit 2 µl 10 x Ligasepuffer, 2,5 U T4-DNA-Ligase und ddH₂O zu einem Endvolumen von 20 µl pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde bei RT eine Stunde inkubiert. 5 µl der Ligationsreaktion wurden zur Transformation von Bakterien eingesetzt.

2.2.9. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde eine Polymerase Kettenreaktion (*PCR*) durchgeführt. Für einen Standardreaktionsansatz mit einem Endvolumen von 50 µl wurden 100 ng Plasmid, je 10 pmol der beiden Primer-Oligonukleotide, je 10 nmol der vier dNTPs, 5 µl 10 x Pfu-Polymerasepuffer, 1,5 U Pfu-DNA-Polymerase und das erforderliche Volumen ddH₂O gemischt. Nach einer dreiminütigen Inkubation bei 94°C durchlief der Reaktionsansatz 25 bis 30 Zyklen, jeweils bestehend aus einer Denaturierungsphase von 30 s bei 94°C, einer Hybridisierungsphase von 45 s bei 52-58°C und einer Synthesephase von 2 min/kb des zu amplifizierenden Plasmids bei 73°C. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt. Die jeweiligen *PCR*-Fragmente wurden anschließend über Agarosegelelektrophorese, oder über den Qiagen "PCR purification" Kit aufgereinigt.

2.2.10. 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 über PCR durchgeführt. Das Plasmid, in das die Mutation eingeführt werden sollte, diente dabei als Matrize für die Synthese des zu mutagenisierenden Plasmids. Die dabei verwendeten Primer-Oligonukleotide waren zueinander komplementär und enthielten die gewünschten Sequenzänderungen. Für einen Standardreaktionsansatz mit einem Endvolumen von 25 µl wurden 25 ng Plasmid, je 5 pmol der beiden Primer-Oligonukleotide, je 5 nmol der vier dNTPs, 2,5 µl 10 x Pfu-Polymerasepuffer, 1,5 U Pfu-DNA-Polymerase und das erforderliche Volumen ddH₂O gemischt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 94°C durchlief der

Reaktionsansatz 12 bis 16 Zyklen, jeweils bestehend aus einer Denaturierungsphase von 30 s bei 95°C, einer Hybridisierungsphase von 1 min bei 55°C und einer Synthesephase von 2 min/kb des zu amplifizierenden Plasmids bei 68°C. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt, mit 10 U *DpnI* versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Dadurch wurde die methylierte DNA des Stammpasmids selektiv abgebaut. 5 µl dieses Reaktionsansatzes wurden direkt in kompetente Bakterien transformiert.

2.2.11. Herstellung kompetenter *E. coli*

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 dann bei 4°C und 2000 g abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 2 ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 500 µl 87% (w/v) Glycerin vorsichtig gemischt. Die Suspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.12. Transformation kompetenter Bakterien

2.2.12.1. Transformation zur DNA-Extraktion

200 µl gefrorene kompetente Bakterien (DH5α) wurden langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden entweder 5 µl einer Ligationsreaktion oder einer Mutagenesereaktion zu den Bakterien gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Das Bakterien/DNA-Gemisch wurde für 60 s bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und danach sofort für 2 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 1ml SOC-Medium zugegeben und für 45 bis 60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde kurz abzentrifugiert (1min, 5000 rpm) und das Bakterienpellet auf vorgewärmten Agar-Selektionsplatten ausplattiert. Die Inkubation der Selektionsplatten erfolgte bei 37°C bis zum Erscheinen von Bakterienkolonien.

2.2.12.2. Transformation zur Protein-Expression

200 µl gefrorene kompetente Bakterien des Stammes BL21(DE3)CODONplus wurden langsam auf Eis aufgetaut. Die Bakterien wurden dann mit 0.5-1µl Plasmid-DNA wie oben beschrieben inkubiert. Nach abgeschlossenem Hitzeschock und anschliessender Inkubation bei 37°C wurde die Bakteriensuspension direkt zum Animpfen von 500ml LB oder Superbroth unter Zugabe von Antibiotika verwendet.

2.2.13. Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977)

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem „Big Dye Terminator Cycle Sequencing RR-Mix“ der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Dieses Reagenz enthält *Taq*-Polymerase, dNTPs und mit unterschiedlichen Fluorophoren markierte ddNTPs. Zu einem Standardansatz wurden 4 pmol Primer-DNA-Oligonukleotid, 0,5 µg DNA, 4 µl Mix und das zum Endvolumen von 10 µl fehlende Volumen ddH₂O gemischt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 96°C durchlief der Reaktionsansatz 40 Zyklen, jeweils bestehend aus einer Denaturierungsphase von 30 sec. bei 96°C, einer Hybridisierungsphase von 15 sec. bei 50°C und einer Synthesephase von 4 min bei 60°C. Die Auftrennung und Detektion der Reaktionsprodukte wurde von einem hausinternen Service oder einem kommerziellen Service-Anbieter durchgeführt.

2.3. Zellbiologische Methoden

2.3.1. Kultivierung humaner Zelllinien

Adhärente Zelllinien (HeLa, 293T, HS68 und NIH3T3) wurden in Standardmedium mit 1 mM Natriumpyruvat bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit (Hera cell, Zellkulturinkubator, Heraeus, Hanau) in Zellkulturschalen variabler Größe kultiviert. Die Zelllinien wurden alle zwei bis drei Tage (vor Erreichen der Konfluenz) passagiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, mit 10 x Trypsin/EDTA von der Kulturschale abgelöst und in einer Verdünnung von 1:3 bis 1:6 auf neuen Kulturschalen ausgesät. Zellzahlen wurden im allgemeinen mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. HeLa-Suspensionszellen wurden in Joklik's-Medium bei 37°C in Spinner-Flaschen unter konstantem Rühren kultiviert. Die

Zelldichte der Kulturen wurde durch tägliches Verdünnen mit frischem Medium zwischen $2,5 \times 10^5$ und 10^6 Zellen pro ml gehalten.

2.3.2. Einfrieren und Auftauen von Gewebekulturzellen

Die Zellen wurden aus einer logarithmisch wachsenden Population eingefroren. Dazu wurden entweder Suspensionszellen abgenommen oder adhärente Zellen mit Trypsin behandelt, in Medium aufgenommen und abzentrifugiert (300 g, 5 min) und in Einfriermedium (90% FCS und 10 % DMSO) resuspendiert. Je 1 ml der Suspension wurden in ein Einfrierröhrchen abgefüllt, langsam auf -80°C abgekühlt und zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Das Auftauen der Zellen erfolgte schnell bei 37°C im Wasserbad. 1 ml aufgetaute Zellsuspension wurde mit 15 ml Standardmedium verdünnt, in eine 15cm Zellkulturschale überführt und weiterkultiviert.

2.3.3. Transiente Transfektion von Gewebekulturzellen

Adhärente HeLa-Zellen wurden mit dem “Effectene Transfection Reagent”-Kit der Firma QIAGEN transfiziert.

24 h vor der Transfektion wurden die Zellen mit einer Konfluenz von 40% ausgesät. Die Mengen von zur Transfektion eingesetzter DNA, EC-Verdünnungspuffer, Verstärkerreagenz, Effectene und die Medienmengen richtete sich dabei nach der jeweiligen Zellkulturgefäßgröße:

Platten- größe Ø	DNA- Menge	EC- Puffer	Verstärker	Effectene	DMEM-Menge zum Mix	DMEM-Menge auf der Platte
3,5 cm	0,4 µg	100 µl	3,2 µl	2,0 µl	600 µl	1,6 ml
6 cm	1,0 µg	150 µl	8,0 µl	5,0 µl	1,0 ml	4,0 ml
10 cm	2,0 µg	300 µl	16 µl	10 µl	3,0 ml	7,0 ml
15 cm	5,6 µg	840 µl	44,8 µl	28 µl	8,5 ml	15 ml

Die zu transfizierende DNA wurde in einer geeigneten Menge des EC-Verdünnungspuffers aufgenommen und mit Verstärker-Reagenz versetzt. Diese Reaktion wurde durch „vortexen“ gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von Effectene-Reagenz wurde erneut 15 min inkubiert, die jeweilige Menge DMEM-Standardmedium zum Mix pipettiert und vorsichtig gemischt. Diese Mischung wurde sofort auf die vorbereitete Platte mit einer geeigneten Menge DMEM-Standardmedium überführt und über Nacht auf den Zellen belassen.

Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 12 h- 48 h in Standardmedium kultiviert.

2.4. Biochemische Methoden

2.4.1. Grundlegende Standardmethoden

2.4.1.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach drei alternativen Methoden. Die Proteinkonzentration von Gesamt-Zellysaten wurde durch Messung der Extinktion bei 280 nm ermittelt (1 OD₂₈₀ entspricht dabei 1 mg/ml). Die Konzentration von gereinigten, rekombinanten Proteinen wurde auch mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung des Gels abgeschätzt. Als Standard diente BSA, das in definierten Mengen auf das Gel aufgetragen worden war. In allen übrigen Fällen wurden Proteinkonzentrationen mit Hilfe des „Micro BCA Protein Assay Reagent Kit“-der Firma Pierce nach den Angaben des Herstellers bestimmt.

2.4.1.2. Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) werden Proteine zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und anschließend in einem höherprozentigen Trenngel nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Eingesetzt wurden homogene Trenngele (8%, 10%, 12% und 15 %). Das Trenngel war jeweils mit einem 1 cm hohen 4%igen (w/v) Sammelgel überschichtet. Nach Polymerisation wurde das Gel in eine Vertikal-Elektrophoresekammer eingebaut und die Reservoirs mit SDS-Elektrophoresepuffer gefüllt. Vor dem Auftragen wurden die zu ladenden Proteinlösungen mit 1 x, 2 x oder 10 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min gekocht. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 bis 20 V/cm.

2.4.1.3. Coomassie-Färbung von Proteingelen

Das Gel wurde zum Färben der aufgetrennten Proteine 20 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert, anschließend in 25% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure entfärbt und digital dokumentiert.

2.4.1.4. Silberfärbung von Proteingelen

Zur Fixierung der Proteine wurde das Gel nach PAGE-Auftrennung der Proteine mindestens 3 h in 50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Essigsäure, 0,0185% (w/v) Formaldehyd inkubiert. Anschließend wurde das Gel dreimal 20 min mit 50% Ethanol gewaschen. Es folgte eine einminütige Inkubation in 0,02% (w/v) Natriumthiosulfat. Das Gel wurde mit ddH₂O gewaschen (dreimal jeweils 20 s), anschließend 20 min in 0,2% (w/v) Silbernitrat, 0,028% (w/v) Formaldehyd inkubiert und nach erneutem Waschen mit ddH₂O (zweimal jeweils 20 s) zum Auslösen der Silberabscheidung mit 6% (w/v) Natriumcarbonat, 0,0185% (w/v) Formaldehyd versetzt. Nach dem Sichtbarwerden der Proteinbanden wurde das Gel kurz mit ddH₂O gespült und die Reaktion mit 50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Essigsäure abgestoppt. Zur Lagerung wurde das Gel in 25% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure überführt und dokumentiert.

2.4.2. Immunologische und immunobiochemische Methoden

2.4.2.1. Immunoblot-Analyse: Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot) und Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern

Die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden über Elektrottransfer („Semi-dry“) auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Auf die Anode der Blot-Apparatur wurden drei Lagen mit Transferpuffer gesättigtes Whatman 3MM-Papier, die Membran, das Trenngel, drei weitere Lagen Whatman 3MM-Papier und die Kathode geschichtet. Der Transfer erfolgte für 90 min bei 1,5 mA pro cm² Trenngelfläche. Zur Sichtbarmachung der transferierten Proteine wurde die Membran einige Minuten in Ponceau-Färbelösung inkubiert und anschließend in 1% (v/v) Essigsäure entfärbt. Zur anschließenden spezifischen Proteindetektion wurde die Membran in PBS-0,2T mit 5 % (w/v) Magermilchpulver für mindestens 60 min bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in einer geeigneten Verdünnung des ersten Antikörpers in PBS-0,2T mit 5 % Magermilchpulver inkubiert. Der Filter wurde dreimal für je 10 min in PBS-0,2T gewaschen und mit einem, gegen den ersten Antikörper gerichteten, an Peroxidase gekoppelten ZweitAntikörper (Verdünnung 1:5000 in

PBS2-0,T, 5 % (w/v) Magermilchpulver) für 60 min inkubiert und anschließend zweimal 15 min in PBS-0,2T gewaschen. Die Sichtbarmachung der spezifischen Proteine erfolgte über Chemolumineszenz durch Inkubation der Blotmembran mit Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, USA) und anschließender Exposition gegen einen Röntgenfilm. Bei sehr schwachen Signalen wurde die Detektion mit dem Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, Rockford, USA) wiederholt.

2.4.2.2. Immunopräzipitation von Proteinen

Präzipitationen mit spezifischen Antikörpern wurden durchgeführt um ein bestimmtes Protein aus Gesamtzellextrakten aufzureinigen oder um in Koimmunopräzipitationen die *in vivo* an das präzipitierte Protein assoziierten Proteine zu identifizieren. Alle Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis unter Verwendung vorgekühlter Lösungen ausgeführt.

Der spezifische Antikörper (1-3 µg) wurde an 20 µl 50% (v/v) Protein-A-Sepharose oder 20 µl 50% (v/v) Protein-G-Sepharose gebunden (1 h auf einem Überkopffrotator). Nach zweimaligem Waschen in IP-Puffer wurde die Suspension zur Bildung der Antigen-Antikörper-Komplexe 1-3 h mit dem Proteinextrakt inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit IP-Puffer wurden die Sepharosebeads in 25 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und nach 5 minütigem Kochen mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

2.4.2.3. Immunozytologie

Adhärenente Säugerzellen, untransfiziert ebenso wie transfizierte Säugerzellen (24h nach der Transfektion), wurden auf sterile Deckgläschen in „6-Loch“-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 40% kultiviert. Die Zellen wurden direkt nach Absaugen des Standardmediums bei RT mit je 4 ml Paraformaldehydlösung pro Loch für 7 min auf den Deckgläsern fixiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen, mit 4 ml einer Triton-X-100-Lösung pro Loch für 5 min auf Eis permeabilisiert und anschließend zweimal mit Blocklösung gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Verdünnung 1:50 – 1:1000, je nach eingesetztem Antikörper, in Blocklösung) erfolgte für 1 h bei RT. Die Zellen wurden zweimal mit Blocklösung gewaschen und 1 h mit dem Farbstoff-markierten

sekundären Antikörper (in Blocklösung) bei RT im Dunklen inkubiert. Abschließend wurden die Deckgläschen zweimal mit PBS gewaschen, kurz abgetropft und mit 10 µl „Glow-mounting medium“ überschichtet und eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte an einem Axioskop 2- Fluoreszenzmikroskop (Zeiss).

2.4.2.4. Herstellung von Antiseren und Affinitätsreinigung von Antikörpern

Zur Herstellung des Antigens wurden die jeweiligen Proteine als GST- oder His-Fusion rekombinant in *E.coli* exprimiert und über diverse Methoden bis zur höchstmöglichen Homogenität gereinigt. Das gereinigte Protein (1 mg/ml) wurde für die erste Injektion im Verhältnis 1:1 mit TiterMax Gold über eine Doppelkanüle intensiv emulgiert. Zur Immunisierung von Kaninchen wurde 250 µg, für Ziegen 500 µg Protein subkutan injiziert. Nach 6 Wochen wurden jeweils, im Abstand von 14 Tagen, weitere Injektionen vorgenommen. TiterMax Gold wurde dabei durch Freund's Adjuvant ersetzt.

Das abgenommene Blut wurde zur Gerinnung 2 h bei RT belassen und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Gewinnung des Serums wurde für 15 min bei 5500 rpm abzentrifugiert. Das Serum wurde bei -20°C gelagert oder direkt zur Affinitätsreinigung von Antikörpern verwendet.

Zur Affinitätsreinigung des spezifischen Antikörpers wurden 5 mg des Antigens wurden mit Karbonatpuffer versetzt (1.5) und kovalent an CNBR-Sepharose 4B, nach den Angaben des Herstellers gekoppelt. Anschließend wurde mehrmals mit Karbonatpuffer gewaschen. Das Serum wurde nach Ultrazentrifugation 1:1 mit PBS verdünnt und über Nacht mit dem immobilisierten Antigen auf einem Überkopfröter bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wurde fünfmal mit 0,5 M NaCl in PBS gewaschen und in eine Säule überführt. Die Elution des Antikörpers erfolgte mit 0,2 M Essigsäure, 0,5 M NaCl. Der Säulendurchfluß wurde zu je 0,5 ml Fraktionen aufgefangen und sofort mit 100 µl 1 M Tris pH 9,0 pro Fraktion neutralisiert. Die einzelnen Fraktionen wurden durch Aufspotten von 1 µl auf eine Nitrocellulose-Membran und anschließende Ponceau-färbung getestet. Die Antikörperhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, gegen PBS dialysiert und eingengt (UH 100/1 Ultrahülsenapparatur, Schleicher & Schüll, Dassel). Die Antikörperlösung wurde zur Lagerung bei -20°C 1:1 mit Glycerol versetzt. Die

Qualität der gereinigten Antikörper wurde mit einer Konzentrationstitration gegen das spezifische Antigen und Totalzellextrakt von HeLa-Zellen im Immunoblot getestet.

2.4.3. Präparation von Gesamt-Zellysaten

Zur Präparation von Gesamt-Zellysaten aus Gewebekulturzellen wurden Suspensions-HeLa-Zellen benutzt oder adhärenente Zellen wurden durch Behandlung mit Trypsin von der Unterlage gelöst, 2 min bei 1500 rpm abzentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Das Zellpelett wurde in IP- oder RIPA-Puffer resuspendiert und mit Ultraschall (Labsonic U, Ultraschallhomogenisator, B. Braun, Melsungen) auf Eis aufgeschlossen. Alternativ wurden Gewebekulturzellen direkt, nach zweimaligem Waschen mit PBS, mit IP- oder RIPA-Puffer versetzt und durch Abschaben mit einem Zellschaber in den Puffer überführt. Auch hierbei wurden die Zellen mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde anschließend für 15 min bei 13000 g und 4°C abzentrifugiert.

Zur Western-Blot Analyse wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS (RT) direkt auf der Schale mit 95°C heißem 2x SDS-Probenpuffer versetzt und nach dem Abschaben in eine Eppendorfgefäß überführt. Nach 10 min Kochen wurden die Proben einer Ultraschall-Behandlung unterzogen und nach Zentrifugation (13000 g, 15 min) auf ein Gel aufgetragen.

2.4.4. Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Expression von rekombinanten Proteinen wurden die entsprechenden Plasmid-Konstrukte in den *E. coli* Stamm BL21(DE3), oder BL21(DE3)CODONplus transformiert und eine Einzelkolonie auf 200 ml bis 10 l Superbroth-Medium überimpft, oder im Fall von BL21(DE3)CODONplus direkt in 500ml Flüssigkultur gegeben, die am darauf folgenden Tag 1:4 mit Superbroth verdünnt wurde. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,8 mit 1 mM IPTG die Proteinexpression induziert. Nach 4 bis 5 h bei 20°C - 30°C wurden die Zellen abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen, direkt weiter aufgearbeitet oder bei -80°C gelagert.

2.4.5. Native Affinitätsreinigung von Histidine-Fusionsproteinen

Das Bakterienpellet wurde in kaltem Puffer A resuspendiert (25ml / 1l Bakterienkultur) und auf Eis mittels Ultraschall (Labsonic U, Ultraschallhomogenisator, B. Braun, Melsungen) aufgebrochen (4-5 min). Die aufgebrochenen Bakterienzellen wurden zur Abtrennung der bakteriellen Zelltrümmer 35 min bei 100 000g zentrifugiert. Der Zentrifugationsüberstand wurde mit ca. 1 mg „ProBond Nickel-Chelating Resin“ pro 10 mg rekombinantem Protein versetzt und 2 h bei 4°C auf einem Überkopffrotator inkubiert. Die Sepharose wurde dann dreimal mit kaltem Puffer A gewaschen und die Proteine anschließend mit Puffer A+ 350 mM Imidazol eluiert. Das Eluat wurde dialysiert (gegen PBS), gegebenenfalls eingeeengt (Centricon, Zentrifugenfiltereinheiten, Ultrafiltration mit Amicon Ultrafiltrationszelle) oder, falls eine höhere Reinheit der Proteine erforderlich war, weiteren Reinigungsschritten unterzogen.

2.4.6. Aufreinigung von Glutathione-Fusions-Proteinen

Das Bakterienpellet wurde in kaltem Puffer 1 resuspendiert (25ml / 1l Bakterienkultur) und auf Eis mittels Ultraschall aufgebrochen. Die aufgebrochenen Bakterienzellen wurden zur Abtrennung der bakteriellen Zelltrümmer 35 min bei 100 000g zentrifugiert. Der Zentrifugationsüberstand wurde mit ca. 1 mg Glutathione-Sepharose pro 10 mg rekombinantem Protein versetzt und 2 h bei 4°C auf einem Überkopffrotator inkubiert. Die Sepharose wurde dann dreimal mit kaltem Puffer 1 gewaschen und die Proteine anschließend mit glutathione-Puffer eluiert. Je nach Konzentration wurden die Proteine dialysiert (gegen PBS), oder in einem Centricon eingeeengt.

2.4.7. SUMO-Aufreinigung durch Ionenaustauscherchromatographie und Gelfiltration

Das Bakterienpellet von rekombinant exprimiertem SUMO-1 wurde in 50 mM Tris/HCl pH 8, 50 mM NaCl, 2 mM DTT + Proteaseinhibitoren resuspendiert (20 ml / 1l Bakterienkultur). Anschließend erfolgte das Aufbrechen der Zellen durch Ultraschall. Die aufgebrochenen Bakterienzellen wurden zur Abtrennung der

bakteriellen Zelltrümmer 45 min bei 100 000g zentrifugiert. Der Zentrifugationsüberstand wurde 1:2 mit spharose-Q versetzt und 5 h bei 4°C auf einem Überkoprotator inkubiert. SUMO-1 bindet durch seine Ladung nicht an die Q-Sepharose. Der Überstand wurde in einem Centrikon (10K) aufkonzentriert und zur weiteren Aufreinigung über eine FPLC- Anlage (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) gegeben (Säule: Superdex 200 analytical).

2.4.8. Aufreinigung His-SUMO-1ΔC4-modifizierter Proteine aus 293T-Zellen

Die Zellen wurden 36h nach Transfektion zweimal mit PBS (RT) gewaschen und direkt auf der Platte mit B1-Puffer (+ 5mM Imidazol + Proteaseinhibitoren) lysiert. Das Lysat wurde abgenommen und durch Ultraschallbehandlung weiter aufgebrochen. Die aufgebrochenen Zellen wurden 30 min bei 4°C und 100 000g zentrifugiert. Der erhaltenen Überstand wurde mit Nickiel-Sepharose (Qiagen) versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose mit den unten aufgelisteten Schritten gewaschen, wobei die Puffer jeweils mit 5mM Iodoacetamid und Proteaseinhibitoren versetzt waren. Angegeben Volumen stehen für zwei P15-Platten.

- | | |
|--------|------------------------|
| 1) 1ml | B1/ pH 8.0 |
| 2) 2ml | B1/ pH 6.3 |
| 3) 1ml | B1/ pH 8.0 |
| 4) 2ml | B1/ pH 8.0 // B2 (1:1) |
| 5) 2ml | B1/ pH 8.0 // B2 (1:3) |
| 6) 2ml | B2 |
| 7) 1ml | B2 + 10mM Imidazol |

Die Elution erfolgte durch Zugaben von B2 + 300mM Imidazol. Die Proben wurden mit 10x Laemmli-Probenpuffer versetzt und zur weiteren Analyse auf eine 8% SDS-Page aufgetragen.

3. Ergebnisse

Es existieren bereits einige Methoden zur Identifizierung neuer SUMO-Substrate, So z.B. Co-Immunopräzipitationen mit SUMO-Antikörpern, sowie die Transfektion von Zellen mit His-SUMO und anschließender Aufreinigung der modifizierten Proteine durch über Nickel-Sepharose. Diese Verfahren haben alle den Vorteil auf die endogenen SUMO-Enzyme zurückzugreifen und damit auch auf die E3-Ligasen. Es können aber dabei nur SUMO-Substrate identifiziert werden, die sehr abundant in der Zelle vorliegen. Kurzzeitige SUMO-Modifikationen oder seltene SUMO-Substrate können damit nicht identifiziert werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation neuer SUMO-Zielproteine. Zwei neu entwickelte Verfahren kamen dabei zur Anwendung, zum Einen das „In-Lösung-Modifikations-Verfahren“ und zum anderen das „Filter Modifikations-Verfahren“.

3.1. Identifikation neuer SUMO-Substrate und Interaktoren durch ein „In-Lösung-Modifikations-Verfahren“

Ziel war es ein einfaches, reproduzierbares Verfahren zu entwickeln, das es möglich macht unterschiedliche Zelllinien auf ihre SUMOylierbaren Proteine hin zu untersuchen. Das entwickelte Verfahren basiert darauf, daß in Zell-Lysaten sowohl modifizierende, als auch demodifizierende Enzyme von SUMO noch aktiv sind und somit die Substrate im Zell-Lysat durch Modifikations-und Demodifikations-Zyklen gehen (siehe Abbildung 4.1A). Eine Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung Modifikation wird durch Zugabe großer Mengen von rekombinantem GST-SUMO-1 Δ C4 und zusätzlicher Zugabe von ATP erreicht. Dadurch erreicht man eine Verdrängung des endogenen SUMOs aus dem Modifikations-Zyklus (siehe Abbildung 3.1B). Der Vorteil besteht dabei in der Benutzung der endogenen Enzyme. In dem Extrakt sind nicht nur E1- und

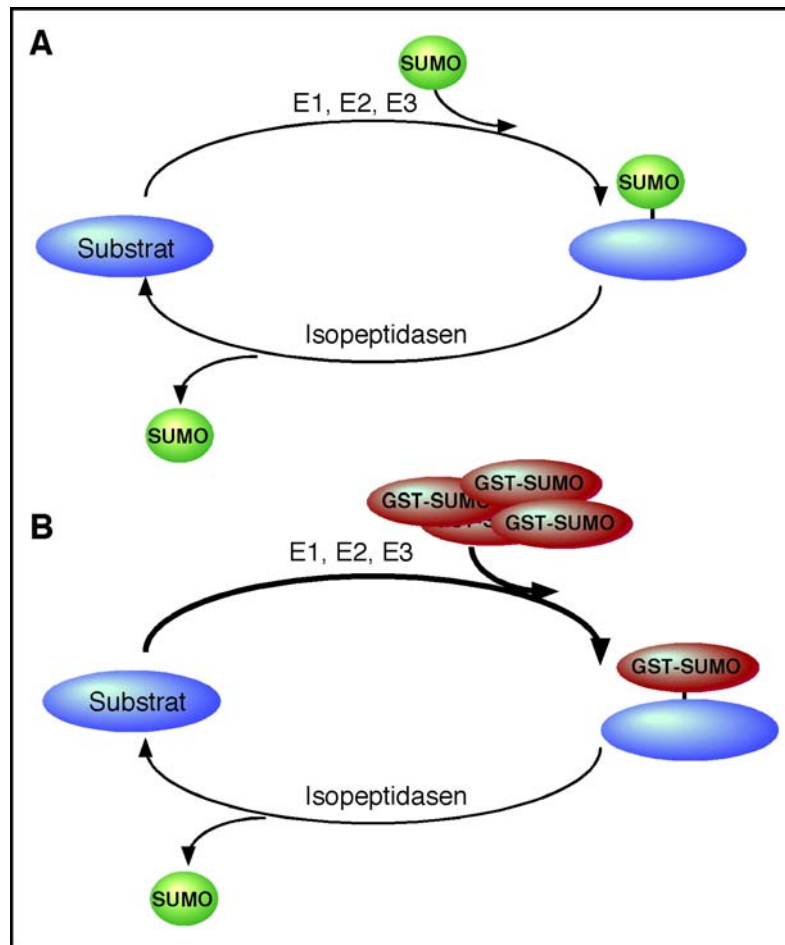


Abbildung 3.1: SUMO-Modifikation und -Demodifikation in Zell-Extrakten

- (A)** SUMO-Substrate gehen durch Modifikations- und Demodifikations-Zyklen in Zell-Lysaten, da sowohl die modifizierenden Enzyme (E1, E2, E3), als auch die demodifizierenden Enzyme (Isopeptidasen) aktiv sind.
- (B)** Durch Zugabe großer Mengen von rekombinantem SUMO-1Δ4 als GST-Fusionsprotein und zusätzlichem ATP kann das Gleichgewicht zugunsten der Modifikation verschoben werden. Dabei wird endogenes SUMO durch GST-SUMO ersetzt und die Substrate können so aus dem Lysat mittels Gluthation-Sepharose entfernt werden.

E2-Enzyme vorhanden, sondern auch eine Reihe spezifischer SUMO-E3-Ligasen, was die Identifikation neuer Substrate erlaubt, die eben diese E3-Ligasen für deren Modifikation benötigen. Ebenso enthält es andere Enzyme wie Phosphatasen und Kinasen, deren Aktivität vielleicht für spezielle SUMO-Modifikationen notwendig sind. Die modifizierten GST-SUMO-Substrate werden mittels Gluthation-Sepharose aus dem Lysat isoliert und somit angereichert und anschließend durch Massenspektrometrie identifiziert. Zusätzlich werden Proteine isoliert, die stark mit SUMO-1 interagieren. Das „In-Lösung-Modifikations Verfahren“ ist geeignet, um unterschiedliche Gewebe und damit verschiedene Proteinsysteme auf SUMOylierung hin zu untersuchen.

3.1.1. SUMOylierung von Proteinen in HeLa-Zell-Extrakten: „In-Lösung-Modifikations-Verfahren“

Um ein Lysat herzustellen, das immer noch Enzymaktivität zeigt, wurden HeLa-Suspensions-Zellen benutzt, da sie einfach in Flüssigkultur in großen Mengen kultiviert werden können. Nach Abzentrifugation der Zellen bei 300g wurde das Zell-Pellet zweimal mit PBS gewaschen und anschließend eingefroren. Durch Auftauen der Zellen in PBS brachen die Zellen auf. Nach Zentrifugation (100 000g, 4°C, 45min) wurde der Überstand mit GST-SUMO-1 Δ C4 nach Zugabe von ATP für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle wurde Lysat unter ATP-Zugabe mit GST inkubiert. Beide Ansätze wurden anschließend mit Gluthation-Sepharose versetzt, um GST, bzw. GST-SUMO-1 Δ C4 und die modifizierten Proteine aus dem Lysat herauszuziehen. Nach stringendem Waschen (PBS/ 500mM NaCl/ 0,1% NP-40) wurde die Sepharose in 2x Lämmli-Puffer gekocht, die Proben auf ein 8% Gel aufgetragen, und im Immunoblot mit Anti-SUMO-1 und anschließend nach „Strippen“ des Immunoblottes mit Anti-RanGAP1 inkubiert (siehe Abbildung 3.2). Es werden eine Reihe modifizierter Proteine spezifisch mit GST-SUMO-1 Δ C4 herausgezogen, während die Kontrolle mit GST kein Signal gibt (siehe Abbildung 3.2A). RanGAP1 wird komplett aus dem Lysat depletiert und in die GST-SUMO-1 Δ C4 modifizierte Form umgewandelt (siehe Abbildung 4.2B). Eine kleine Menge unmodifiziertes RanGAP1 im GST-SUMO-1 Δ C4-„Pull-Down“ stammt entweder von einer Demodifikation während des Waschens, oder von der Bindung von RanGAP1 an Ubc9, welches ebenfalls herausgezogen wird. Um festzustellen, ob die Modifikations-Effizienz

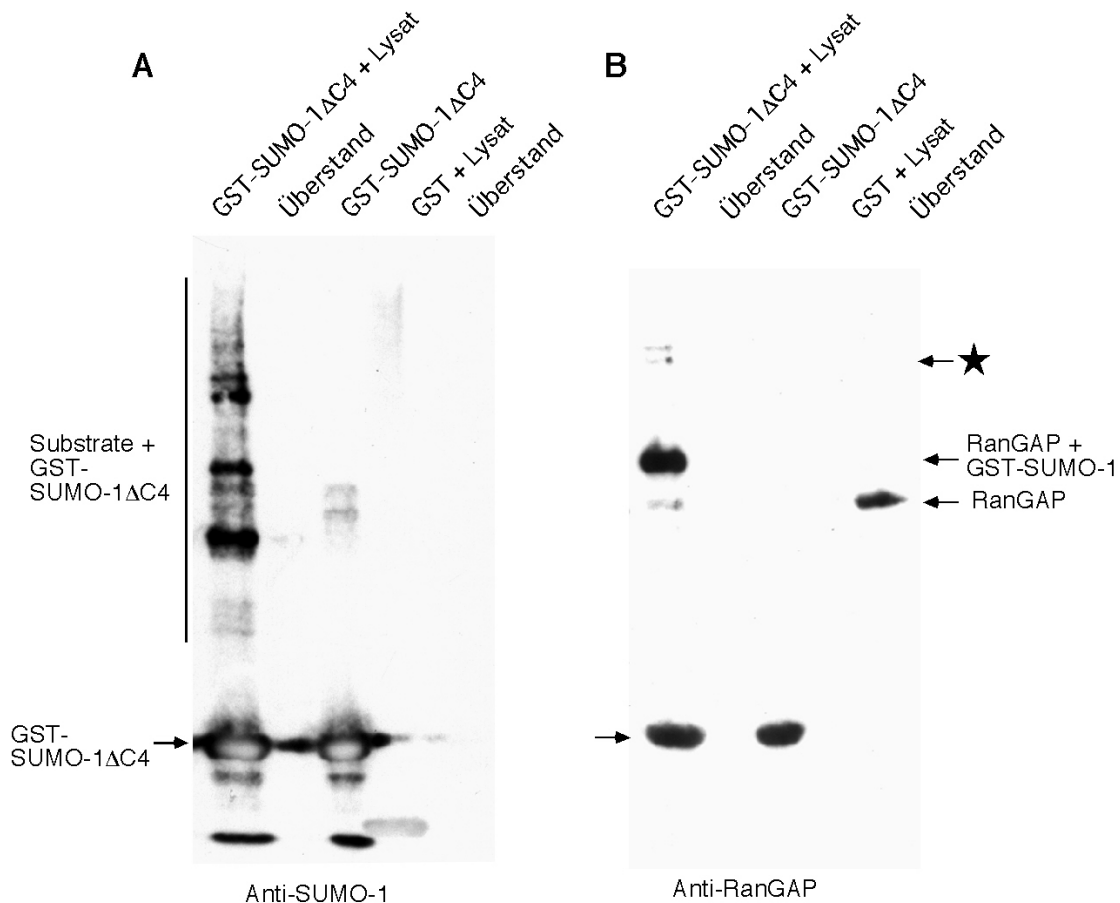


Abbildung 3.2: SUMOylierung von Proteinen mit rekombinantem GST-SUMO-1ΔC4 in HeLa-Zell-Extrakten

- (A)** HeLa-Suspensions-Zellen wurden nach Waschen mit PBS eingefroren. Nach Auftauen in PBS wurde der Extrakt bei 100 000g zentrifugiert und der Überstand mit GST-SUMO-1ΔC4 und ATP versetzt. Als Kontrolle wurde GST in der selben Menge zu einem Parallel-Ansatz gegeben und ebenfalls mit ATP inkubiert. GST und GST-SUMO-1ΔC4 wurden anschließend mit Gluthation-Sepharose aus dem Extrakt heraus gezogen und somit auch alle modifizierten Proteine. Nach stringendem Waschen wurden die Proben in Lämmli-Puffer gekocht und auf ein 8% Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde noch rekombinantes GST-SUMO-1ΔC4 aufgetragen, um die Sauberkeit des Proteines zu überprüfen. Der Immunoblot mit Anti-SUMO-1 zeigt eine Reihe hochmolekularer Banden, die auf GST-SUMO-1-modifizierte Proteine hinweisen. Die GST-Kontrolle zeigt kein Signal.
- (B)** Der Blot wurde anschließend gestrippt und mit Anti-RanGAP1 inkubiert. RanGAP1 wird vollständig bei dem Ansatz mit GST-SUMO-1ΔC4 aus dem Lysat entfernt und in eine GST-SUMO-1-modifizierte Form umgewandelt, während im Überstand der GST-Kontrolle RanGAP1 vollkommen in der unmodifizierten 70kDa-Form vorliegt. Die Detektion einer schwachen RanGAP1-Bande bei 70kDa in dem GST-SUMO-1ΔC4 + Lysat-Ansatz kann durch Demodifikation während des Waschens, oder möglicherweise durch Bindung an Ubc9 herkommen. Unspezifisches Binden ist auszuschließen, da die Kontrolle kein Signal zeigt. Freies GST-SUMO-1ΔC4 wurde im ersten Blot so stark markiert, das nicht alle Antikörper entfernt werden konnten und das Signal

von den SUMO-1-Antikörpern noch unspezifisch durchkommt. Die mit einem Stern gekennzeichnete Bande ist ebenfalls als unspezifisches Signal zu werten.

abhängig ist vom Zellzyklus, wurden HeLa-Suspensions-Zellen in verschiedenen Zell-Zyklus-Stadien arretiert: mit Mimosin in G1/S, mit Thymidin in der frühen S-Phase, sowie mit Nocodazol in G2/M. Thymidin- und Nocodazol- Lysate zeigen die gleiche Modifikations-Effizienz wie der Extrakt aus normal wachsenden Zellen (siehe Abbildung 3.3). Bei dem Arrest mit Mimosin in G1/S kommt es scheinbar zu einer Verringerung der modifizierten Substrate. Die Ursache dafür ist aber noch unklar. Für die weiteren Versuche wurden daher normal wachsende HeLa-Zellen benutzt.

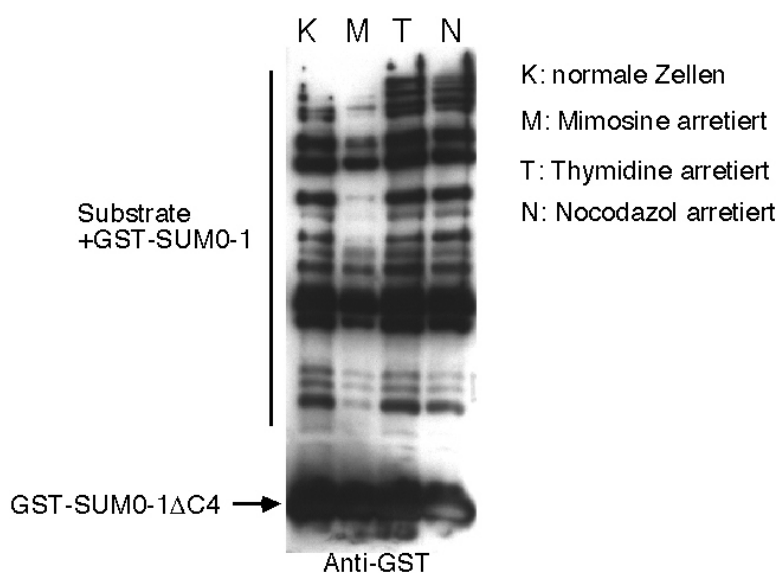
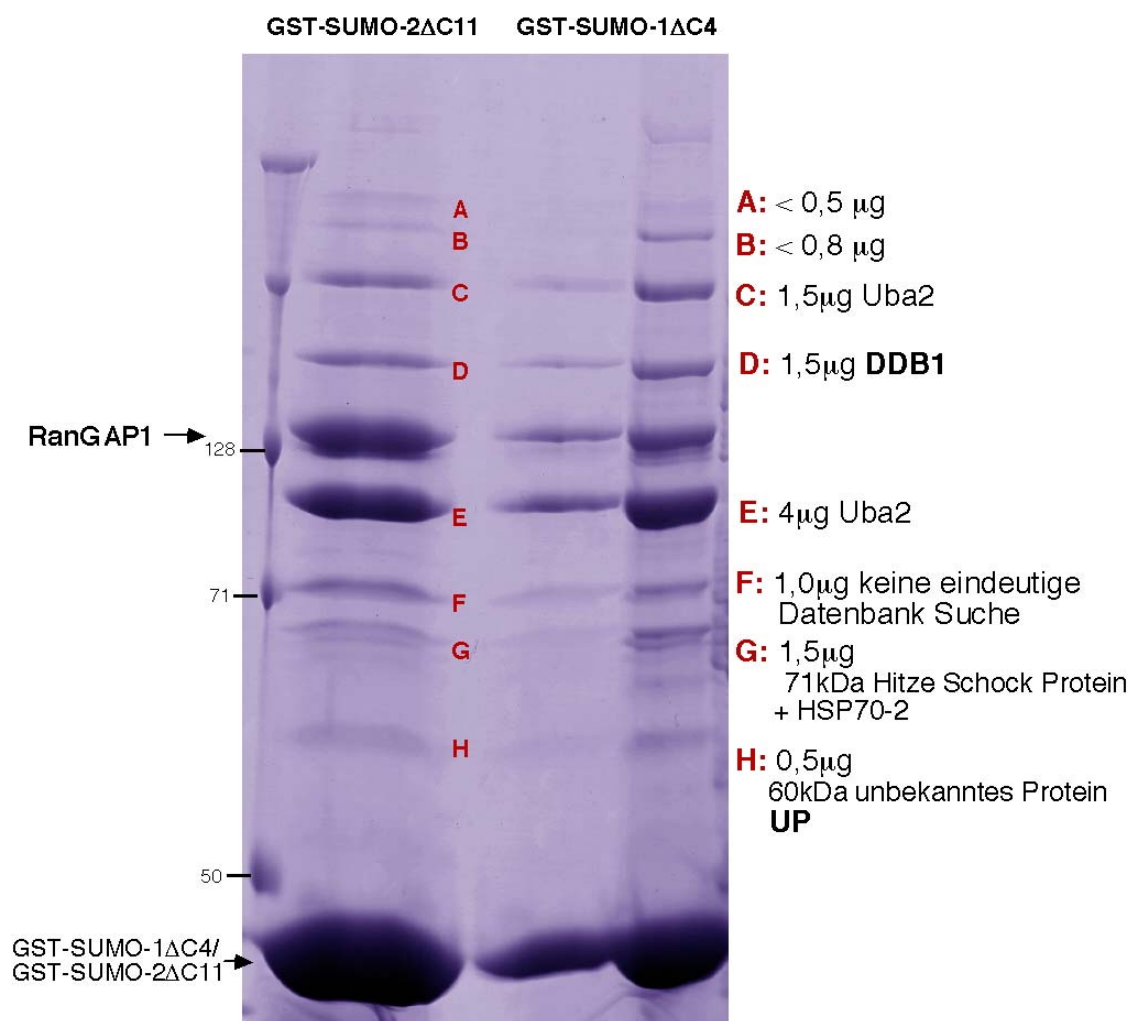


Abbildung 3.3: Die SUMO-Modifikations-Effizienz und Modifikationsmuster des Lysats ändert sich nicht signifikant in Abhängigkeit von Zellzyklus-Inhibitoren.

Jeweils 50ml HeLa Suspensionskultur wurden jeweils mit Mimosin (G1/S), Thymidin (S-Phase) und Nocodazol (G2/M) arretiert. Die Lysate wurden nach mehrmaligen Waschen der Zellen mit PBS wie beschrieben hergestellt, und mit gleichen Mengen GST-SUMO-1 Δ C4 und ATP versetzt, 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und modifizierte Proteine mit Gluthatione-Sepharose angereichert. Nach Auftrag auf ein 8% SDS-Gel wurden die Proteine mit Anti-GST markiert. Die verschiedenen Lysate zeigen etwa ähnliche Modifikations-Effizienzen. Während Thymidin, sowie Nocodazol-Arrest keinen Einfluß auf die Modifikation zeigen, hat der Mimosine-Extrakt eine etwas niedrigere Effizienz.

3.1.2. Identifikation neuer SUMO-Substrate mittels Mikropeptid-sequenzierung

Um die zur Identifikation benötigten Mengen zu erreichen, wurde ein Zell-Pellet von 10 Liter HeLa-Suspensions-Zellen in PBS aufgetaut und mit 250µg rekombinantem GST-SUMO-1ΔC4 und 10mM ATP über Nacht bei 4°C inkubiert. Parallel dazu wurde ein Ansatz mit 250µg GST-SUMO-2ΔC11 und 10mM ATP inkubiert, um eventuell unterschiedliche Substrate beider Proteine identifizieren zu können. Nach Inkubation mit Gluthation-Sepharose (1h, 4°C), wurde die Sepharose mehrmals sehr stringend gewaschen, und die Proteine mit 350mM Gluthation von der Sepharose eluiert. Nach Einengen des Proben-Volumens in einem 10K Centricon wurden die Proben mit dem entsprechenden Volumen an 4x Lämmli-Puffer versetzt, gekocht und auf ein 8% Gel aufgetragen. Das Gel wurde anschließend Coomassie-gefärbt und mit 0,1% Essigsäure entfärbt, bis die Banden sichtbar wurden. Die Analyse der Banden wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Friedrich Lottspeich (MPI für Biochemie, Martinsried) mittels Mikropeptid-Sequenzierung vorgenommen. Die Ansätze mit GST-SUMO-1ΔC4 und GST-SUMO-2ΔC11 brachten kein unterschiedliches Banden-Muster hervor, auch wurden die selben Proteine in beiden Proben identifiziert. Das läßt darauf schließen, daß die Modifizierungs-Maschinerie, wenn sie mit rekombinantem SUMO „überladen“ wird, Spezifität im Bezug auf unterschiedliche Substrate verliert. Das geht konform mit den Resultaten von Saitoh und seinen Mitarbeitern, die feststellten, daß die Überexpression von SUMO-2 oder SUMO-3 zur Modifikation von SUMO-1 Substraten (z.B. RanGAP1) führt (Saitoh + Hinchey, 2000). Bei dem häufigsten Protein, das heraus gezogen wurde, handelt es sich um RanGAP1 in der GST-SUMO-1 modifizierten Form. Die zweitstärkste Bande ergab bei der Sequenzierung die E1-Komponente Uba2, die sowohl unmodifiziert, als auch GST-SUMO-1-modifiziert stark vertreten ist (siehe



Coomassie-Färbung

Abbildung 3.4.: Identifizierung neuer SUMO-Substrate und Bindungspartner für SUMO

Das Zell-Pellet von je 10 Liter HeLa-Suspensions-Zellen wurde in PBS aufgetaut. Nach Zentrifugation (100 000g) wurde der Überstand mit 250 μg GST-SUMO-1ΔC4 bzw. GST-SUMO-2ΔC11, sowie 10mM ATP versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Inkubation mit Gluthation-Sepharose und anschließendem mehrmaligem Waschen wurden die Proteine von der Sepharose mit Gluthation eluiert und in einem 10K Centricon eingengt. Die Proben wurden anschließend mit 4x Lämmli-Puffer versetzt, gekocht und auf ein 8% Gel aufgetragen. Nach Coomassie-Färbung wurden die Banden ausgeschnitten und zur Analyse mittels Peptidsequenzierung gegeben. Dabei gefundene potentielle Substrate oder Interagierer: DDB1 und UP („unknown Protein“). Banden **A** und **B** reichten von der Menge nicht aus. Bande **F** ergab keine eindeutige Datenbanksuche.

Abbildung 3.4 Bande C und E). Neben diesen bereits bekannten Proteinen konnten 2 zusätzliche Proteine indentifiziert werden. Dies ist zum Einen DDB1 (DNA Damage Binding Protein 1) (auch bekannt als p127) (siehe Bande D), welches eine wichtige Rolle in der Zellantwort auf DNA Schädigung spielt. Zum Anderen wurde ein bisher unbekanntes 60 kDa großes Protein identifiziert, das UP („unknown Protein“) genannt wurde (siehe Kapitel 3.5). Überraschenderweise wurden sowohl UP, als

auch DDB1 bei einer Größe gefunden, die ihrem unmodifizierten Molekulargewicht entspricht. Zwei mögliche Erklärungen kommen dafür in Frage: 1. Die Proteine waren modifiziert, die SUMOylierung ging aber durch Isopeptidase-Aktivität verloren. 2. Sie haben eine sehr hohe Affinität zu SUMO, oder einem anderen SUMOylierten Protein. Geringe Mengen zweier Hitzeschockproteine (siehe Abbildung 3.4 Bande G) wurden ebenfalls identifiziert, was aber zu erwarten war, da in einem „pull-down“ Verfahren mit rekombinanten Proteinen stets ein Teil der Proteine nicht oder unzureichend gefaltet vorliegen. Die endogenen Chaperone binden an diese Proteine, um sie in ihrer Funktion als zelleigenes Reparatursystem zu stabilisieren und korrekt zu falten.

3.1.3. SUMO-Modifikation der modifizierenden Enzyme E1 und E2

Uba2 wurde in großer Menge unmodifiziert und auch SUMOyliert isoliert (siehe Abbildung 4.4.). Daher wurde mittels eines Immunoblots mit spezifischen Antikörpern überprüft, ob auch die anderen modifizierenden Enzyme mit dem „In-Lösung Modifikations-Verfahren“ herausgezogen werden. Es werden sowohl beide E1-Untereinheiten Aos1 und Uba2, als auch das E2 Ubc9 modifiziert isoliert. Uba2 wird unmodifiziert in großer Menge herausgezogen (siehe 3.2.2), aber auch einfach modifiziert, wie der Immunoblot zeigt. Aos1 liegt unmodifiziert nicht vor, da es durch das kräftige mehrmalige Waschen seine Bindung zu Uba2 verliert, ist aber einfach und zweifach SUMOyliert zu detektieren. Ubc9 ist ebenfalls mono- und di-SUMOyliert heraus gezogen worden. Überraschend dabei ist, daß es sich bei der di-SUMOylierten Form um Ubc9 handelt, welches mit endogenem SUMO-1 und GST-SUMO-1 modifiziert ist. Unmodifiziertes Ubc9 ist unter diesen SDS-PAGE-Bedingungen wegen seiner Größe nicht detektierbar (siehe Abbildung 3.5). Von E3-Enzymen ist bekannt, daß sie selbst SUMOyliert werden, was eine Art Autoregulation darstellen könnte (siehe Pichler, 2002). Bei E1- und E2-Enzymen könnte es sich um einen ähnlichen Mechanismus handeln.

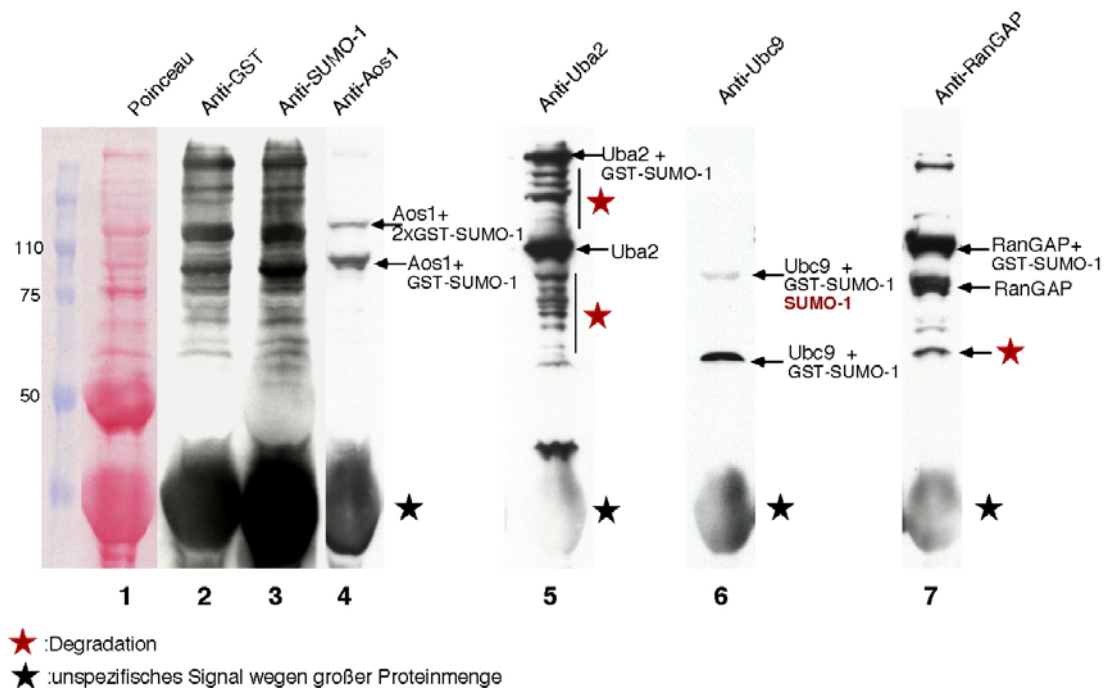


Abbildung 3.5.: Immunoblot mit verschiedenen Antikörpern

- 1) Ponceau-Färbung
- 2) Markierung mit polyklonalem Anti-GST (Kaninchen)
- 3) Markierung mit polyklonalem Anti-SUMO-1 (Ziege)
- 4) Markierung mit polyklonalem Anti-Aos1 (Ziege). Detektion einer mono- und einer schwächeren di-SUMOylierten Form.
- 5) Markierung mit polyklonalem Anti-Uba2 (Ziege). Uba2 wird vornehmlich in der unmodifizierten Form mit Degradations-Produkten detektiert. Darüberhinaus wird Uba2 aber auch in SUMOylierten Formen detektiert.
- 6) Markierung mit polyklonalem Anti-Ubc9. Ubc9 zeigt eine deutliche Mono-SUMOylierung und eine sehr schwache Di-SUMOylierung. Anhand des Laufverhaltens dieser di-SUMOylierten Bande zeigt sich, daß es sich dabei um eine Mischform zwischen endogenem SUMO-1 und GST-SUMO-1 handelt.
- 7) Markierung mit polyklonalem Anti-RanGAP1 (Ziege) als interne Kontrolle. Sowohl die modifizierte, als auch die unmodifizierte Form kann detektiert werden, sowie eine Di-Modifikation.

3.1.4. Charakterisierung des putativen SUMO-Targets UP: ein bisher unbekanntes WD-40-Domänen Protein

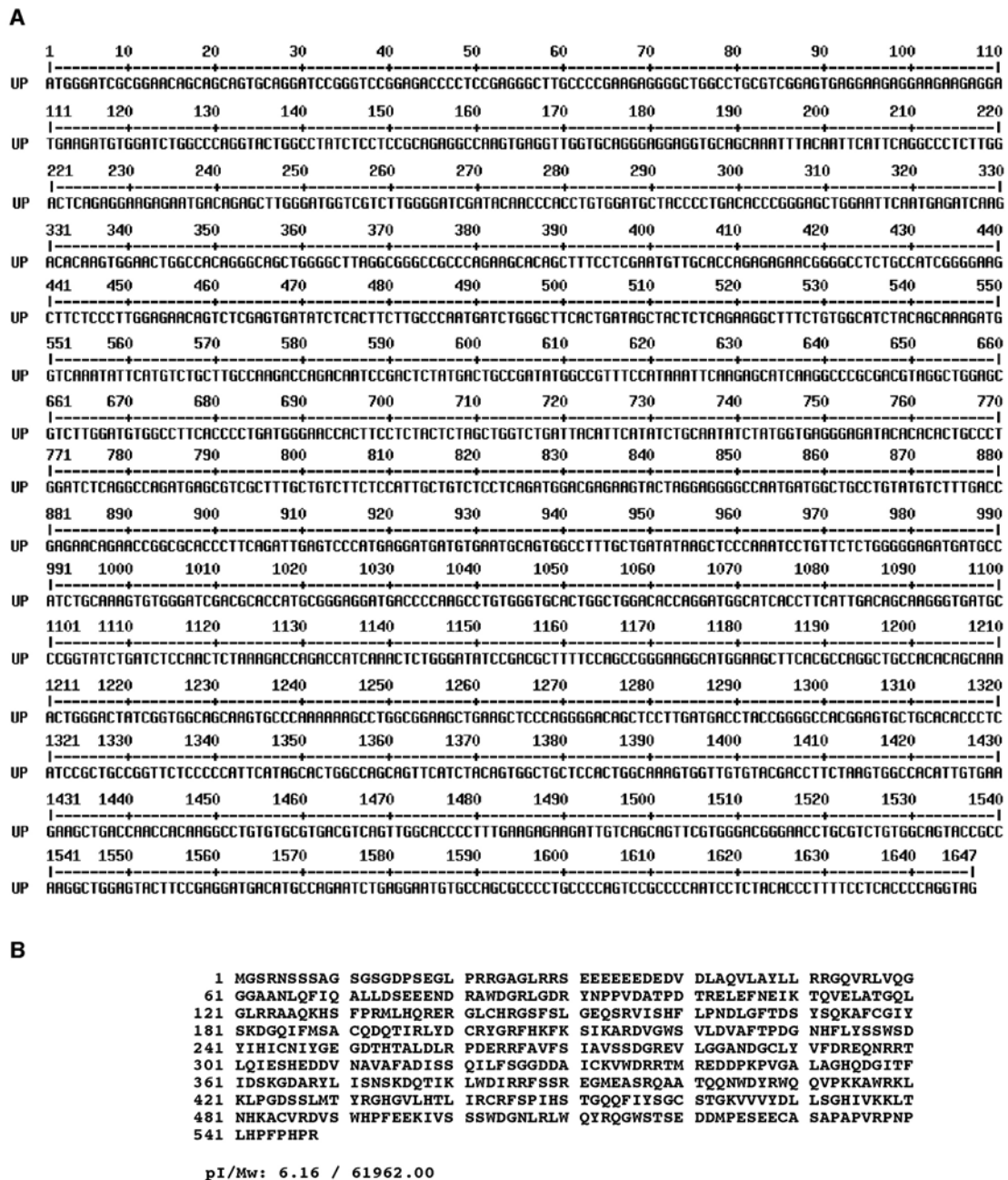


Abbildung 3. 6 Sequenz von UP („unknown Protein“)

(A) DNA Sequenz von UP (GI:12006042)

(B) Protein Sequenz von UP (AF267858.1)

BLAST-Suche (<http://www.elm.eu.org>) nach bekannten Domänen ergab, daß UP sieben „WD-40 repeats“ enthält (siehe Abbildung 3.7 A und B). WD-Domänen sind minimal konservierte Domänen, die zwischen 40-60 Aminosäuren enthalten. Sie werden initiiert durch ein N-Terminales Glycin-Histidin Dipeptid (GH) und enden

mit Tryptophan-Aspartat (WD). WD-40 Proteine finden sich in allen Eukaryoten, und führen verschiedenste essentielle Funktionen aus. Diese Proteine bilden eine Propeller-Struktur aus, die wahrscheinlich als stabile Plattform zur Komplexbildung mit anderen Proteinen dient (Tyers und Willems, 1999).

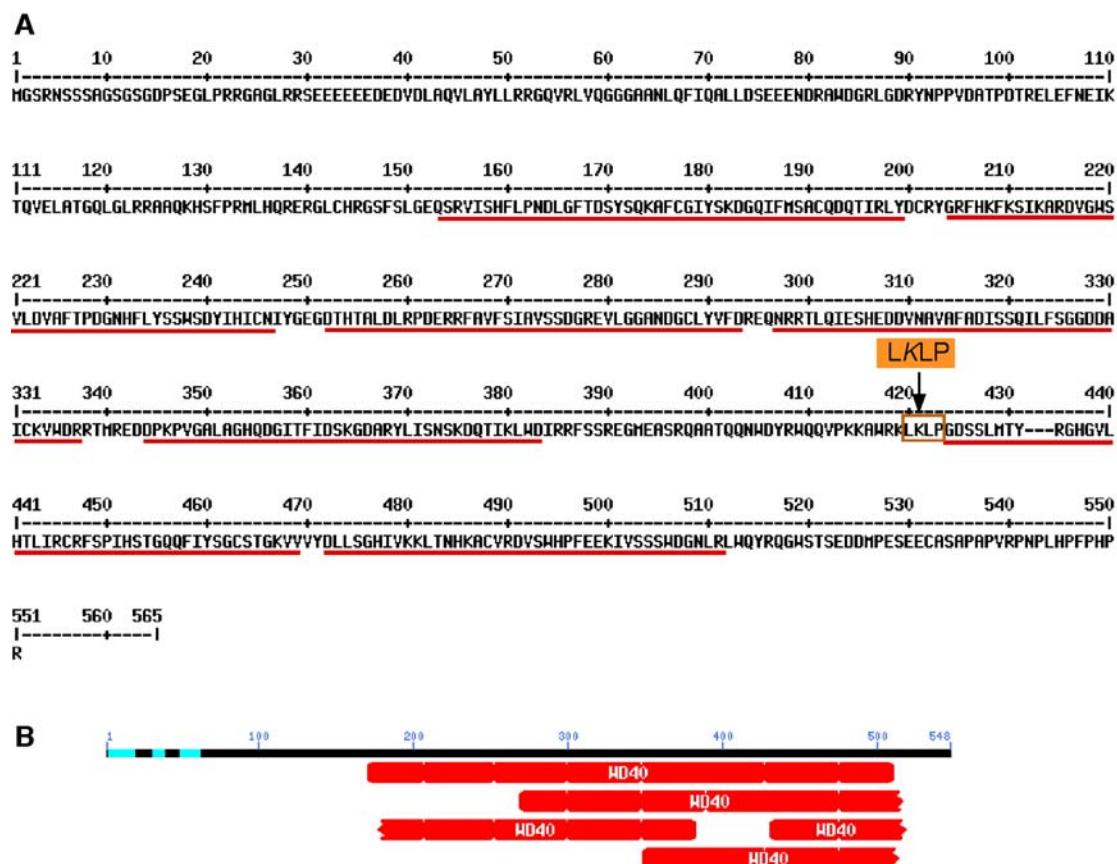
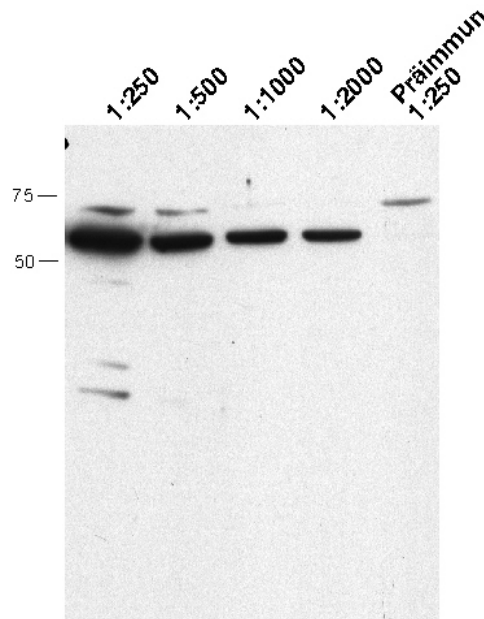


Abbildung 3.7: Lokalisation der WD-40 Domänen und der SUMO-Konsensussequenz in UP nach (<http://www.elm.eu.org>)

- (A) Markierung der WD-40 Domänen durch rote Unterlegung. Die SUMO-Konsensussequenz ist durch einen Pfeil markiert.
- (B) Schematische Darstellung der WD-40 Domänen.

Desweiteren wurde eine SUMO-Konsensus-Sequenz gefunden (<http://www.elm.eu.org>) mit der Sequenz LKLP an Position 420-423 (siehe Abbildung 3.7 A). Weitere BLAST-Suchen in verschiedenen Protein-Datenbanken (SWISS-PROT/TrEMBL) ergaben, daß UP eine Homologie zu den F-box Proteinen pof3 und pof11 aus der Spaltheife (*Schizosaccharomyces pombe*) aufweist. Viele F-box Proteine enthalten WD-Domänen. Diese Klasse von F-box Proteinen wird als FBXW-Proteine bezeichnet, d.h., sie enthalten sowohl eine F-box, als auch WD-Domänen (Kipreos & Pagano, 2000).

3.1.4.1. Erzeugung eines polyklonalen UP-Antikörpers

**Abbildung 3.8: Detektion von endogenem UP in HeLa-Zellen**

Adhärenzte HeLa Zellen wurden in der Zellkultur-Schale einmal mit PBS gewaschen und dann sofort in heißem 2xLämmli Puffer abgeschabt und 10 min gekocht. Vor Auftrag auf das 8% SDS-Gel wurden die Zellen sonifiziert und abzentrifugiert. Der Antikörper erkennt eine deutliche Bande bei der erwarteten Größe von 60kDa. Bei einer Verdünnung von 1:250 werden zusätzlich kleinere Banden detektiert, die Spalt- oder Degradationsprodukte darstellen dürften. Die Bande, die über knapp über UP läuft, ist ein Artefakt, da sie auch durch das Präimmun-Serum detektiert wird.

Für weitere Studien wurde UP mittels PCR aus einer HeLa-cDNA Bibliothek herausamplifiziert und in den prokaryotischen Expressionsvektor pGEX-6P1 kloniert und als GST-Fusionsprotein exprimiert. Die native Aufreinigung erfolgte über Gluthation-Sepharose und anschließend über eine Gelfiltrationssäule (Sephadex 200). Mit dem aufgereinigten Protein wurde laut Protokoll ein Kaninchen immunisiert und das resultierende Antiserum gegen GST-UP affinitäts-gereinigt (siehe Abbildung 3.8).

3.1.4.2. Keine SUMOylierung von UP im *in vitro*-Modifikations Verfahren

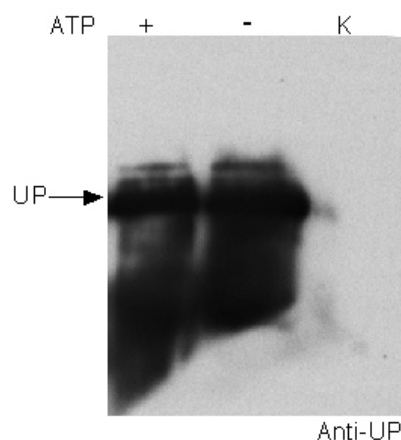


Abbildung 3.9: Keine SUMOylierung von UP im *in vitro*-Modifikations Verfahren

600ng GST-UP wurden mit 57ng E1, 250ng E2, 600ng SUMO-1ΔC4, sowie 3mM ATP inkubiert (30°C, 30min). Nach Abstoppen der Reaktion mit 50% (v/v) 2x SDS-Laemmli, wurden die Proben auf ein 8% SDS-Gel aufgetragen und mittels Immunoblot mit Anti-UP Antikörper analysiert. Es kann keine Bande festgestellt werden, die auf SUMOylierung hinweist.

Rekombinant aufgereinigtes GST-UP wurde mit E1, E2, SUMO-1ΔC4, sowie ATP inkubiert und anschließend mittels Immunoblot mit Anti-UP Antikörper auf SUMOylierung hin getestet. Es konnte keine SUMOylierung des Proteins festgestellt werden (siehe Abbildung 3.9).

3.1.4.3. UP wird unmodifiziert herausgezogen

Der „pull down“ wurde wiederholt und ein Teil mittels Immunoblot mit Anti-UP analysiert. UP wird tatsächlich nur als 60kDa Form herausgezogen. Eine höher laufende modifizierte Form kann nicht detektiert werden (siehe Abbildung 3.10). Seine Bindung kann entweder direkt über eine Interaktion mit SUMO resultieren, oder es ist Bestandteil eines Komplexes, der teilweise SUMOyliert wird.

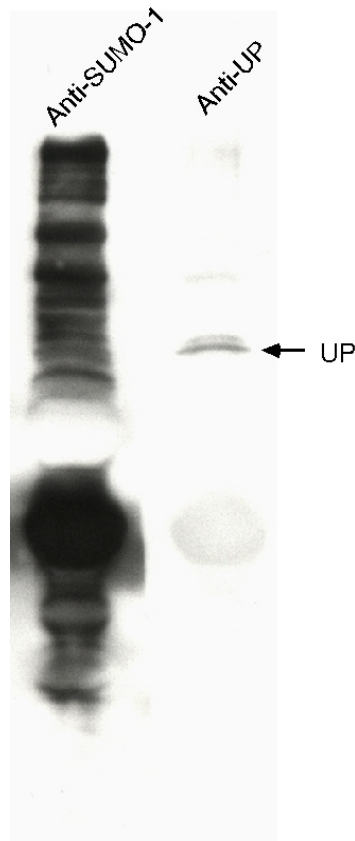


Abbildung 3.10: Immunoblot des „pull downs“ mit polyklonalem Anti-UP

Da Anti-UP gegen GST-UP erzeugt und aufgereinigt wurde, wurde er 30min bei Raumtemperatur mit 250µg rekombinantem GST vorinkubiert, danach wurde diese Mischung auf den Immunoblot gegeben und wie gewohnt inkubiert. Es wird nur die 60kDa Form von UP detektiert.

3.1.4.4. Keine direkte Interaktion von UP und SUMO *in vitro*

Um zu testen, ob UP an SUMO-1 oder Ubc9 bindet, wurde es mit SUMO-1 und Ubc9 inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Proben auf ein Gel aufgetragen. Die Coomassie-Färbung zeigt, daß UP weder direkt an SUMO-1, noch an Ubc9 bindet (siehe Abbildung 3.11).

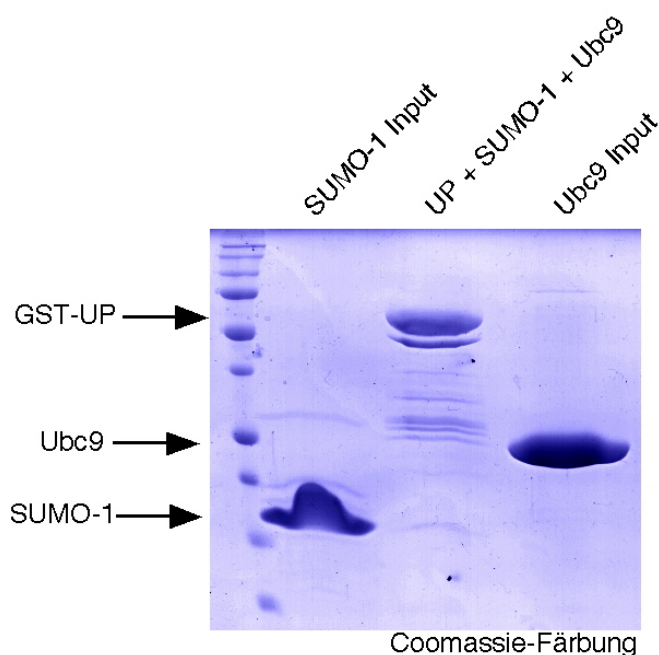


Abbildung 3.11: In-vitro Interaktionstest zwischen UP / SUMO-1 und Ubc9

3µg GST-UP wurden an GSH-Sepharose gebunden und mit je 3µg SUMO-1 und Ubc9 in PBS inkubiert (V=2ml, 1h, RT). Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde die Probe auf ein 15% SDS-Gel geladen. Als Kontrollen dienten der Input von SUMO-1 und Ubc9. Weder SUMO-1 noch Ubc9 binden in diesem Test an UP.

3.1.4.5. Mitochondriale Lokalisation von UP

Eine Immunfluoreszenz-Markierung von endogenem UP mit Anti-UP zeigte neben einer Markierung im Kern eine Markierung von spezifischen Strukturen im Zytoplasma. Dies war sowohl in HeLa, als auch in anderen Zelllinien zu beobachten. Um letztendlich zu ermitteln, mit welchem Zellorganell UP lokalisiert ist, wurden HS68-Zellen benutzt, da sie dank ihrer Größe eine schöne Morphologie besitzen. Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Mitochondrien und Lysosomen wurden mit speziellen Markern, oder mit spezifischen Antikörpern gegen ein internes

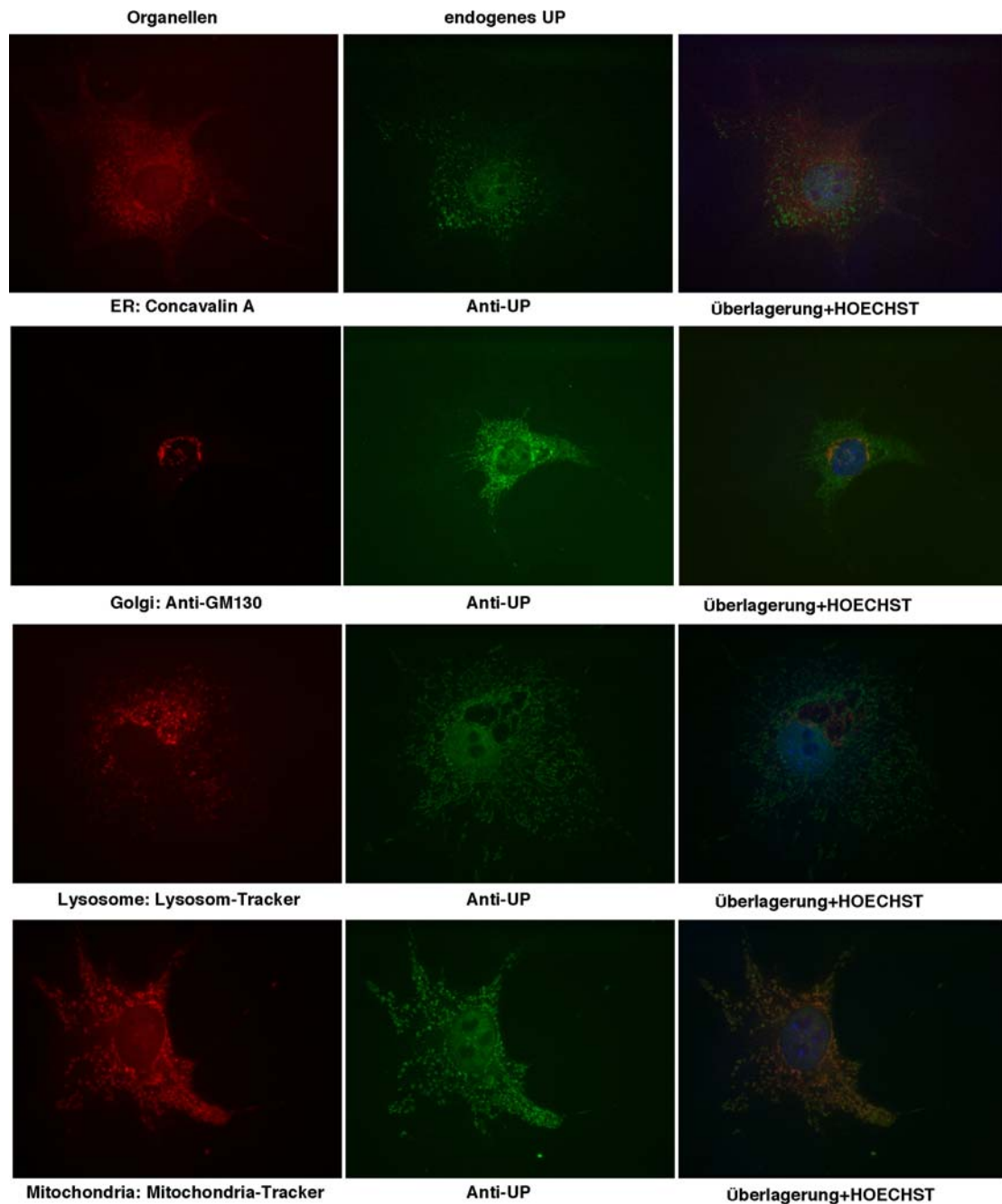


Abbildung 3.12 : Mitochondrale Lokalisation von UP

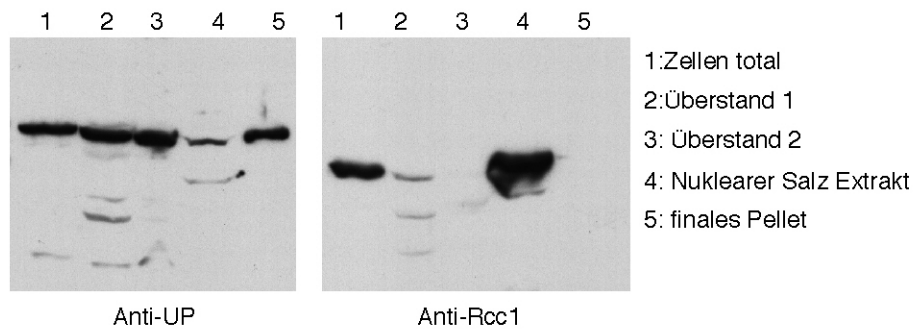
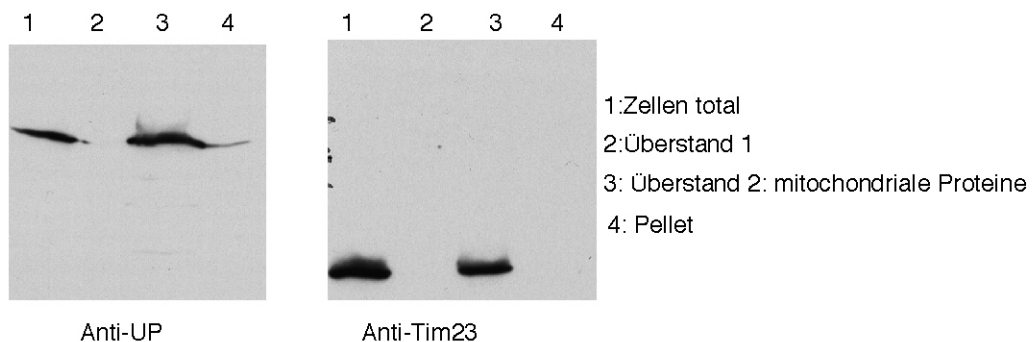
HS68 wurden laut Protokoll mit den verschiedenen Organellen Trackern behandelt und mit Anti-UP markiert (Sekundär Antikörper: Cy3). Der Golgi Apparat wurde mit einem Antikörper gegen ein Golgi-spezifisches Protein (GM130, sekundärer Antikörper Cy2) markiert. UP zeigt eine deutliche Überlagerung mit dem Signal des Mitochondrien-Trackers.

Protein (Golgi: Anti-GM130) markiert. Dieses Signal wurde verglichen mit dem des endogenem UPs, markiert mit Anti-UP (siehe Abbildung 3.12). Deutlich ist zu sehen, das UP spezifisch mit den Mitochondrien lokalisiert ist, und keinerlei Überlappung mit den anderen Organellen zeigt (siehe Abbildung 3.12). Um dies auch biochemisch zu zeigen, wurden Zellfraktionierungen mit HeLa-Zellen

durchgeführt, bei der zum Einen Mitochondrien präpariert wurden, und zum anderen nach hypotonischem Schwellen ein nukleärer Salz-Extrakt hergestellt wurde.

Für die Nukleare Salz-Extraktion (siehe Abbildung 3.13 A) wurden HeLa-Zellen in Einfrierpuffer resuspendiert und zum Aufbrechen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. danach wurden sie auf Eis langsam wieder aufgetaut. Nach Abzentrifugation (1400g, 10min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen (Überstand 1) und das Pellet mit PBS/MgCl₂-Puffer gewaschen. Danach wurde das Pellet in Hypotonischem Puffer resuspendiert und mit dem Douncer homogenisiert. Nach Abzentrifugation (3000g, 8min, 4°C) wird Überstand 2 abgenommen und nochmals mit Hypotonischem Puffer gewaschen. Um die Kerne im Pellet aufzubrechen wird das Pellet in Hochsalzpuffer resuspendiert. Nach dem Zentrifugationsschritt (100 000g, 60 min, 4°C) erhält man den Überstand (Nuklearer Zell Extrakt) und das finale Pellet. Zur weiteren Analyse wurden die erhaltenen Proben auf ein SDS-PAGE aufgetragen und mittels Anti-UP und Anti RCC1-Antikörper analysiert. Das Kernprotein RCC1 dient dabei als Kontrolle. Während das lösliche Kernprotein (nicht Membran-assoziiert) RCC1 nur im Nuklearer Zell Extrakt zu finden ist, ist UP sowohl in den Überständen, als, auch im finalen Pellet zu finden. Das deutet darauf hin, das ein Teil von UP löslich in der Zelle vorliegt und ein anderer Teil Struktur-assoziiert ist. Ein kleiner Teil von UP ist ebenfalls in der Nuklearen Zell Extrakt-Fraktion zu detektieren, was durch die Immunofluoreszenz-Daten unterstützt wird.

Die Mitochondrien-Isolierung erfolgte nach Gawaz et al., 1990. Die HeLa-Zellen wurden in PBS von der Platte geschabt und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zentrifugation (900g, 3min, 4°C) wurden die Zellen in 5Vol. Mito I-Puffer resuspendiert und anschließend im Douncer homogenisiert. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis

A Kern Präparation**B Mitochondrien Präparation****Abbildung 3.13 Fraktionierungen von HeLa Zellen**

- (A)** In einer Kern-Präparation wurden die Zellen wie oben beschrieben behandelt. UP liegt teilweise löslich im Zytoplasma und teilweise assoziiert an Strukturen vor. Ein geringer Teil befindet sich im Kern.
- (B)** Mitochondriale Fraktionierung von HeLa-Zellen. UP liegt in der gleichen Fraktion wie Tim-23, ein mitochondriales Protein vor.

wurde die Probe abzentrifugiert (1000g, 10 min, 4°C). Der Überstand der die Mitochondrien enthält wurde dann bei 9700g für 10min zentrifugiert, um sie zu pelletieren. Dieses Pellet wurde in Mito II-Puffer aufgenommen und 5 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde zentrifugiert (1000 g, 10min) und der Überstand mit den Mitochondrien abgenommen. Dieser wurde dann bei 9700 g für 10min zentrifugiert. Das Pellet enthält die Mitochondrien, während der Überstand davon frei ist (Überstand 1). Zum Aufbrechen der Mitochondrien wurde das Pellet 3 x schockgefroren und aufgetaut und anschließend in 5µl 10% TritonX-100 Puffer resuspendiert. Nach Abzentrifugation erhält man die löslichen mitochondrialen Proteine im Überstand (Überstand 2) und die Membranfragmente, sowie die unlöslichen Komponenten im Pellet. Als Kontrolle diente Tim-23, ein mitochondriales Protein. UP wird wie Tim-23 in der Fraktionen der mitochondrialen Proteine detektiert.

3.2. Identifikation neuer SUMO-Substrate durch ein Filter-Modifikations-Verfahren

Proteine sind in einem „*in-vitro*-Modifikations Verfahren“ mit SUMO modifizierbar. Dabei werden die rekombinant exprimierten und aufgereinigten Modifikations-Enzyme E1, E2, sowie SUMO-1 Δ C4 mit dem zu modifizierenden Protein unter Zugabe von ATP in einem physiologischen Puffer (meist PBS) inkubiert. Die Modifikation kann anschließend über einen Immunoblot mit den passenden Antikörpern nachgewiesen werden. Diese Methode ist aber nicht effizient genug zum „Screenen“ einer Expressionsbibliothek, da dazu die rekombinanten Proteine aufgereinigt vorliegen müßten, was bei der großen Klon-Anzahl einer repräsentativen Bibliothek unpraktikabel ist. In diesem neuen Verfahren wird gezielt eine cDNA (copy DNA) Expressionsbibliothek nach SUMOylierbaren Proteinen abgesucht. Das Prinzip des Verfahrens ist in Abbildung 3.14 dargestellt. Die Expressionsbibliothek liegt dabei aufgespottet auf einer PVDF-Membran vor, auf der die Proteine induziert und exprimiert werden. Durch Lyse der Bakterien auf der Membran werden die Kolonien aufgebrochen und die Proteine freigesetzt. Diese auf der Membran gebundenen Proteine können mit Enzymen und SUMO-1 inkubiert werden und die SUMOylierung kann durch Detektion auf SUMO nachgewiesen werden. Dadurch ist es möglich die 33 000 Klone gleichzeitig unter den selben Bedingungen mit dem Modifikationsmix zu inkubieren. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß die Menge der Proteine auf dem Filter unabhängig ist von der endogenen Proteinmenge. Dadurch können auch seltene SUMO-Substrate identifiziert werden. Durch die gezielte Suche nach SUMOylierten Formen unter diesen cDNA-Klonen, die einen repräsentativen Querschnitt durch die zelleigenen Proteine darstellen, können neue SUMO-Substrate identifiziert und Hinweise gesammelt werden, in welchen Zellprozessen SUMOylierung (neben den bereits identifizierten wie z.B. Transkriptionalen Regulierung), noch eine Rolle spielt. Zur Detektion der auf dem Filter SUMOylierten Proteine wurde das Biotin/Streptavidin-Verfahren gewählt. Dazu mußte zunächst Biotinyliertes SUMO-1 Δ C4 hergestellt werden.

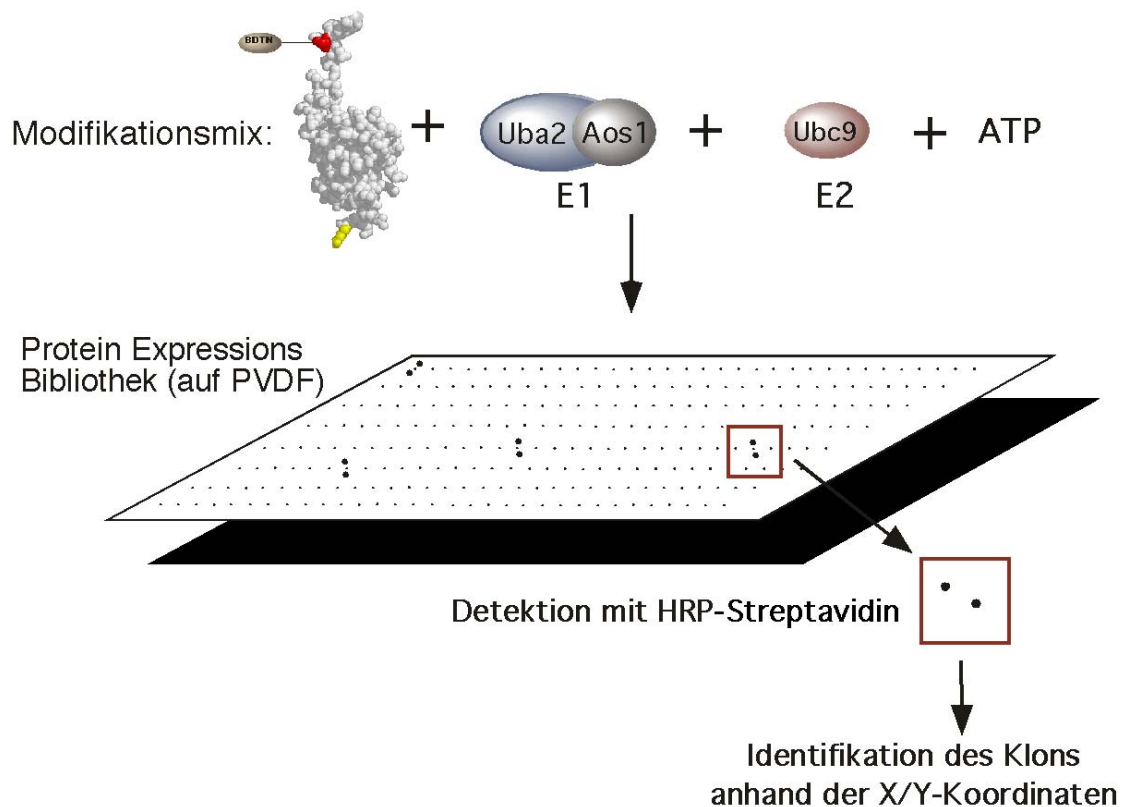


Abbildung 3.14: SUMO-Modifikation einer Protein Expressionsbibliothek auf einer PVDF-Membran

Der Filter wurde nach Blocken mit 5% Milchpulver in PBS/0,05%Tween mit dem Modifikationsmix, (biotinyliertem SUMO-1ΔC4, E1, E2 und ATP in PBS/0,05%Tween) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach intensivem Waschen mit PBS/0,2%Tween wurden die Filter mit HRP-Streptavidin inkubiert und nach wiederholten Waschen wurden die Signale mittels ECL auf einer Membran sichtbar gemacht. Die Klone konnten anschließend anhand der X/Y-Koordinaten identifiziert werden.

3.2.1. Erzeugung von Biotinyliertem SUMO

Zum Zweck auch kleinste SUMO-Mengen nachweisen zu können, wurde das in *E.coli* exprimierte und aufgereinigte SUMO-Protein mit einem Biotin-Crosslinker verknüpft. Die Detektion erfolgt dann mittels „Horse-Radish Peroxidase“ markiertem Streptavidin (HRP-Streptavidin). Dieses besitzt eine extrem hohe Affinität zu Biotin und ist käuflich erwerbbar. Der verwendete Crosslinker (EZ-Link™ Biotin HPDP, PIERCE) bildet eine Disulfidbrücke mit einem Cystein im zu koppelnden Protein (siehe Abb.4.15B). SUMO-1 enthält nur ein Cystein in Position 52 (siehe Abbildung 4.15A), welches sich aber nicht effizient mit dem Crosslinker koppeln ließ. Daher wurde eine Mutante von SUMO-1ΔC4 in pET11a erzeugt, bei der im N-Terminus mittels PCR das Serin an Position 9 durch ein Cystein ersetzt wurde. Der flexible N-Terminus bot sich für den Austausch an, da er für die

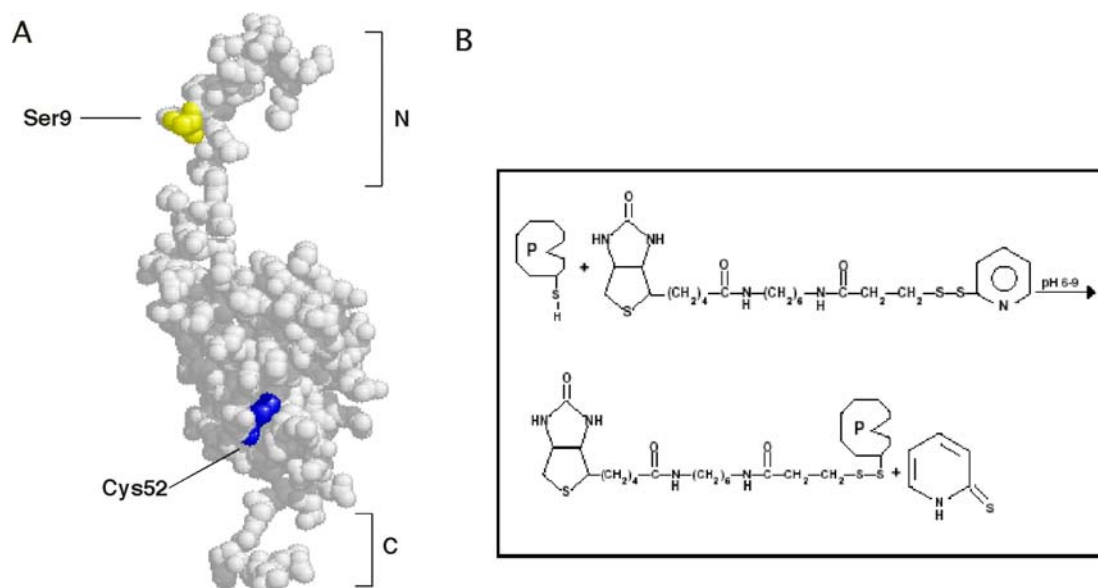


Abbildung 3.15: Lage des eingeführten Cyteins in der Struktur von SUMO-1 zur Biotinylierung

- (A) Erzeugung einer SUMO-Mutante zum Crosslinken mit Biotin über ein Cystein. Mittels PCR wurde das Serin an Position 9 (gekennzeichnet in gelb) durch ein Cystein ersetzt. Das Cystein an Position 52 (gekennzeichnet in blau) liegt für die Markierung durch den Linker ungünstig in einer Art Mulde. N-Terminus und C-Terminus sind jeweils durch N bzw. C markiert.
- (B) Darstellung der chemischen Reaktion zur Biotinylierung eines Proteins mittels EZ-Link™ Biotin-HPDP (PIERCE, Rockford, USA)

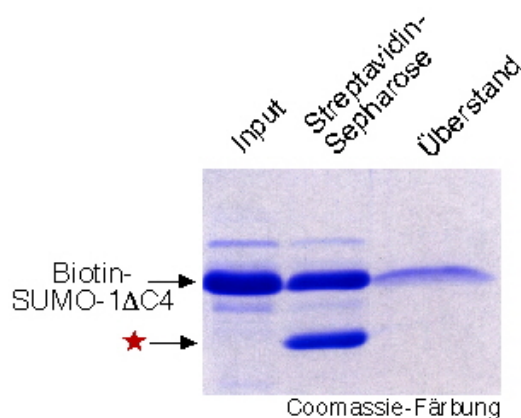


Abbildung 3.16: Test der Crosslink-Effizienz

2 µg biotinyliertes SUMO-1ΔC4 wurden mit 10 µl Streptavidin-Beads (PIERCE) in PBS inkubiert (30min, RT). Danach wurden die Beads mit PBS gewaschen, in 2xLaemmli-SDS ausgekocht und auf ein 15% SDS-Gel aufgetragen. Die Coomassie-Färbung zeigt, daß fast der komplette Input an die Beads gebunden hat. Die durch einen roten Stern markierte Bande entsteht beim Kochen der Streptavidin-Sepharose in Laemmli-Probenpuffer.

Modifikation keine Rolle zu spielen scheint. Eine komplette Deletion des N-Terminus hat keinen Effekt auf die Modifikations-Effizienz (Doktorarbeit Marion Schergaut). Das Protein wurde rekombinant in *E.coli* exprimiert und über Ionenaustauscher und Gelfiltrationssäule (Sepadex200) aufgereinigt. Danach wurde es laut Protokoll (PIERCE) mit dem Cross-Linker inkubiert. Anschließend wurde der

freie Crosslinker über eine Gelfiltrationssäule (Sepadex200) von dem markierten Protein abgetrennt. Die Crosslink-Effizienz wurde durch das Binden des Proteins an Streptavidin-Beads (PIERCE) überprüft (siehe Abbildung 3.16).

3.2.2. Vorversuch: SUMOylierung eines immobilisierten Proteins

Als Vorversuch diente rekombinantes aufgereinigtes RanGAP1 und seine SUMOylierungs-defiziente Mutante RanGAP1K526R, sowie BSA. 250ng dieser Proteine sowie 0.5µg BSA wurden auf eine PVDF-Membran getropft und anschließend mit dem Modifikationsmix, bestehend aus E1, E2, biotinyliertem SUMO-1ΔC4 und ATP, inkubiert. Nach stringendem Waschen wurde die Membran mit HRP-Streptavidin inkubiert und modifiziertes RanGAP1 durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Es konnte ein deutliches Signal für RanGAP1, aber nicht für die Mutante, oder BSA festgestellt werden. (Siehe Abb.3.17). Eine Bindung von SUMO-1 an RanGAP1 ist auszuschließen, da mehrmals und stringend gewaschen wurde. Außerdem bindet RanGAP1 nicht stabil an SUMO-1 (AG Melchior unpublizierte Daten). Somit kann das Signal nur von einer SUMOylierung von RanGAP1 stammen.

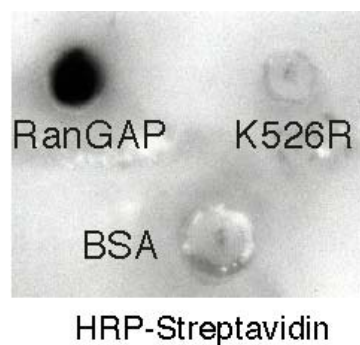


Abbildung 3.17: Modifikation von Proteinen, immobilisiert auf einer PVDF-Membran.

Jeweils 250ng rekombinantes RanGAP1 und RanGAP1K526R, sowie 500ng BSA wurden auf PVDF aufgespottet und nach Blocken mit 5% Milch in PBS / 0,2% Tween mit rekombinantem E1 (300ng), E2 (200ng) und biotinyliertem SUMO-1ΔC4 (600ng) mit 5mM ATP für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen mit PBS/0.2%Tween20 wurde biotinyliertes SUMO-1ΔC4 mit HRP-Streptavidin detektiert und mittels ECL auf einem Film sichtbar gemacht.

3.2.3. Analyse einer humanen cDNA Bank mit dem Filter Modifikations Verfahren

Die vorgetesteten Bedingungen wurden an einem Proteinfilter des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung GmbH (RZPD, Berlin) wiederholt. Auf zwei Filtern sind ca. 33000 Klone einer cDNA-Expressionsbibliothek aus humanem fötalem Gehirn als Doppelspots in einem festgelegten Muster aufgebracht. Dies erleichtert die spätere Identifizierung der Ursprungsklone anhand der X/Y-Koordinaten. Die cDNA-„Inserts“ befinden sich in dem prokaryotischen Expressionsvektor pQE30NST (QIAGEN, Hilden) und werden im Bakterienstamm *E.coli* SCS 1 als Hexahistidin-Fusionsproteine direkt auf der Membran induziert und exprimiert. Nach Erhalt der Filter werden die Bakterienkolonien mittels eines speziellen Protokolls (RZPD) lysiert und auf den Filtern verbleiben die Proteine. Diese Filter wurden mit dem oben genannten Modifikationsmix inkubiert und die positiven Klone mit HRP-Streptavidin detektiert (siehe Abb.3.18). Anschließend wurden die Koordinaten der ca. 110 positiven Signale bestimmt und so bestimmten Klonen zugeordnet (Anleitung siehe www.rzpd.de).

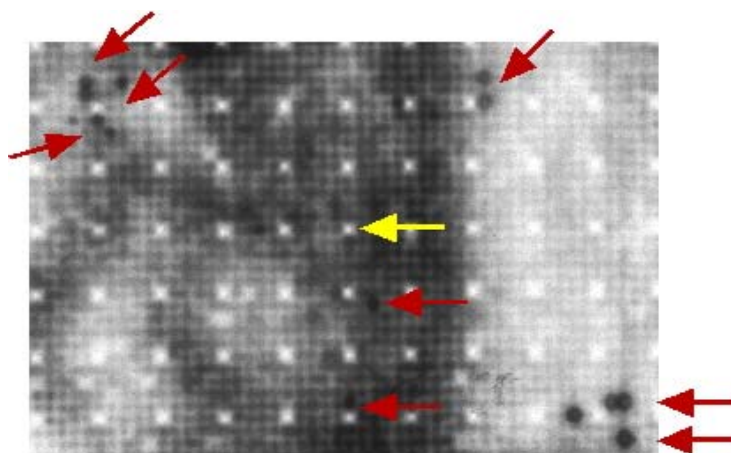


Abbildung 3.18 Ausschnitt aus dem Streptavidin-Blot des inkubierten Filters

Der Filter wurde wie oben beschrieben inkubiert und die SUMOylierten Proteine wurden anschließend mit HRP-Streptavidin detektiert. Die Klone wurden in Doppel-Spots um einen Mittelpunkt aufgetragen (markiert mit gelbem Pfeil). Positive Klone erscheinen als Doppel-Spots und sind mit roten Pfeilen markiert.

3.2.4. Identifizierung der gefundenen Klone

Da die Identität der Proteine, die diese Klone repräsentieren, nicht bekannt ist, wurden 96 dieser Klone sequenziert und mittels BLAST-Suche (SWISS-PROT/TrEMBL) identifiziert. Dies erfolgte im Rahmen einer Kollaboration durch

Phillip Argenent und Dolores Cahill (MPI für Genetik, Berlin). Die erhaltenen Proteine wurden in Tabelle 3.1 zusammengefaßt.

Tabelle 3.1 Liste der sequenzierten und zugeordneten Klone

Klon	Protein	Funktion
A1	adducin 1 (alpha) (ADD1), transcript variant 2	Membranskelett Protein: fördert wahrscheinlich Zusammenbau des Spektrin-Aktin Netzwerkes in Erythrocyten
B1	vesicle amine transport protein 1 synaptic vesicle membrane protein (VAT1)	häufiges integrales Membran Protein Cholinärer Synaptischer Vesikel, gehört zur quinone Oxidoreductase Unterfamilie der Zinc.Finger enthaltenden Alkohol Dehydrogenasen: Vesikel Transport
C1	•zinc finger protein 238 (ZNF238) •translin associated zinc finger protein-1 (RD58)	Assoziiert mit kondensiertem Chromatin und vermittelt Sequenz spezifische transkriptionale Repression
D1	•alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (RAD54 homolog, S. cerevisiae) •putative DNA dependent ATPase and helicase (ATRX), transcript variant 1	gehört zur SWI/SNF Familie der „Chromatin remodelling“ Proteine, enthält ATPase/Helicase Domäne: vermutete Funktion im Bereich der Gen Regulation während Interphase und Chromosomen Trennung während der Mitose
E1	/	/
F1	unconventional myosin IXb (MYO9b)	Regulierung und Organisation der Aktin- Filamente
G1	myosin light chain 1 slow a (MLC1SA)	ATPase, zelluläres Motor Protein
H1	/	/
A2	zinc-finger helicase (hZFH)	Beteiligt an DNA / RNA Entwindung
B2	similar to Nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding) (NASP)	Histon-Bindung
C2	•SPTF-associated factor 65 gamma (STAF65(gamma)) •adenocarcinoma antigen ART1/P17	Untereinheit des STAGA-Komplexes: Funktion als Ko-Repressor transkriptionaler Regulation und bei der Chromatin Acetylierung
D2	NGFI-A binding protein 2 (EGR1 binding protein 2 oder NAB2)	Transkriptionaler Ko-Repressor von NGFI-A
E2	•E2F transcription factor 1 (E2F1) • (E2F-1) pRB-binding protein	Transkriptionsfaktor bindet Zell-Zyklus abhängig pRB (Retinoblastom Protein), kann sowohl Zell- Proliferation, als auch p53-abhängige/- unabhängige Apoptosis fördern
F2	stathmin-like 4 (STMN4)	Mikrotubuli Regulator Bestandteil des Kinesin Komplexes
G2	/	/
H2	squamous cell carcinoma antigen recognised by T cells (SART1)	Beteiligt an Regulation der Proliferation rekrutiert tri-snRNP zu den Prä-Spleißosomen

A3	/	/
B3	ataxin 2 related protein (A2LP), transcript variant 1,	Mitglied der Spinocerebellaren Ataxia (SCAs) Familie interagiert mit der cytoplasmatischen Domäne des Rezeptors Mpl
C3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C member 8	Mitglied der DnaJ-Klasse molekularer Chaperone mit C-terminaler Zink Finger Domäne
D3	surfeit 6 (SURF6)	Kern-Matrix bindendes Protein mit DNA bindenden Eigenschaften
E3	chromosome 20 open reading frame 43 (C20orf43)	/
F3	•zinc finger protein 238 (ZNF238) •translin associated zinc finger protein-1 (RD58)	siehe C1
G3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 8 (DNAJC8),	siehe C3
H3	chromosome 11, clone RP11- 193F22	/
A4	TRAF family member-associated NFκB activator (TANK)	Mitglied der Tumor Nekrosis Rezeptor- assoziiierter Faktor Familie, assoziiert und übermittelt Signale der Mitglieder der Tumor Nekrosis Faktor Rezeptor Superfamilie (TRAF) Vermittelt NFκB Aktivierung
B4	chromosome 14 open reading frame 4 (C14orf4)	/
C4	Similar to hypothetical protein FLJ20378	/
D4	similar to TSG118.1 protein (LOC124151)	/
E4	hypothetical protein DT1P1A10 (DT1P1A10)	/
F4	Similar to RIKEN cDNA	/
G4	hypothetical protein MGC11349 (MGC11349)	/
H4	hypothetical protein MGC2491 (MGC2491)	/
A5	•reticulon 4 a (RTN4) •testis specific reticulon 5 •Nogo-A protein (Nogo gene)	Protein des Endoplasmatischen Retikulums Inhibitoren des Neuriten Wachstums
B5	myelin transcription factor 1 (MYT1)	Mitglied der Familie neuraler spezifischer, Zink- finger enthaltender, DNA-bindenden Proteine Transkriptionale Regulierung von Proteolipid Proteine
C5	•zinc finger protein 238 (ZNF238) •translin associated zinc finger protein-1 (RD58)	siehe C1
D5	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (HnRNPF)	RNA-Transport und Prozessierung
E5	microtubule-associated protein tau (MAPT)	Tubulin Bindung
F5	calcium-response factor CaRF	Transkriptions Faktor aktiviert Transkription von BDNF (brain derived neurotropic factor), Aktivität Ca ²⁺ reguliert

G5	•poly-U binding splicing factor PUF60 (PUF60) •FBP-interacting repressor (FIR) fuse-binding protein-interacting repressor (SIAHBP1)	Splicing Faktor
H5	KIAA0824	/
A6	cytochrome P450, 51 (lanosterol 14-alpha-demethylase) (CYP51)	Mitglied der Cytochrom P450 Enzym-Superfamilie Endoplasmatische Monooxygenases
B6	chromosome 20 open reading frame 43 (C20orf43), HSPC169	/
C6	•IRS-1 PH domain binding protein PHIP (pleckstrin homology domain interacting protein) •WD repeat domain 11 protein (WDR11 gene)	Insulin Rezeptor Substrat-1 (IRS-1), Haupt-Substrat der Insulin Rezeptor Kinase
D6	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (HnRNPF)	siehe D5
E6	CSF-1 receptor (FMS)	Tyrosin Kinase Rezeptor für CSF-1 (colony-stimulating factor)
F6	•Xq28 of high-mobility group protein 17 retropseudogene (psHMG17), •melanoma antigen family A1 (MAGEA1) •Zinc finger protein 275 (ZNF275)	
G6	clone RP11-380J17 on chromosome 10 antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 (MKI67),	/
H6	RUN and FYVE domain-containing 1 RUFY1 (RUFY1)	endosomales Protein Substrat der Etk Tyrosin Kinase
A7	NGFI-A binding protein 2 (ERG1 binding protein 2 oder NAB2)	siehe D2
B7	chromosome 18, clone RP11-9E17	/
C7	KIAA0773 gene product (KIAA0773)	/
D7	/	/
E7	aldehyde dehydrogenase 1 family member B1 (ALDH1B1), aldehyde dehydrogenase 5	mitochondrialer Acetaldehyde Metabolismus
F7	DKFZp434K1421	/
G7	•scaffold attachment factor B (SAFB) •Hsp27 ERE-TATA-binding protein (HET)	•DNA-bindendes Protein mit hoher Spezifität für Scaffold oder Matrix verankernde DNA Elemente (S/MAR DNA) dient wahrscheinlich als molekulare Basis für den Zusammenbau des „Transkriptosom Komplexes“ •Regulation der hsp27 Transkription
H7	SPTF-associated factor 65 gamma (STAF65(gamma)) adenocarcinoma antigen ART1/P17	siehe C2

A8	truncated calcium binding protein (LOC51149)	
B8	tubulin, alpha 3 (TUBA3) hum-a-tub1 alpha-tubulin	Mikrotubuli Protein
C8	Smad nuclear interacting protein (SNIP1)	interagiert mit Smad1 und Smad2 inhibiert den NFκB Signalweg durch Kopetition seiner Bindung zur C/H1 Domäne von CBP/p300
D8	microtubule-associated protein tau (MAPT)	siehe E5
E8	KIAA1183 protein	/
F8	/	/
G8	creatine kinase B	katalysiert die reversible Phosphorylierung von Kreatin mit ATP lokalisiert an der Membran des tubovesikulären Systems
H8	SPTF-associated factor 65 gamma (STAF65(gamma)), adenocarcinoma antigen ART1/P17	Siehe C2
A9	•zinc finger protein 238 (ZNF238) •translin associated zinc finger protein-1 (RD58)	siehe C1
B9	sphingolipid activator protein 1 und 2 (SAP1 und 2)	SAP1: transmembrane Protein-Tyrosin Phosphatase
C9	sphingolipid activator protein 1 und 2 (SAP1 und 2)	siehe B9
D9	Similar to hypothetical protein FLJ20378	/
E9	methyl-CpG binding domain protein 3 (MBD3),	Untereinheit des großen NuRD-Komplexes, der Nucleosome Umbildungs und Histon Deacetylierungs Aktivität besitzt.
F9	myosin light chain 1 slow a (MLC1SA)	siehe G1
G9	serologically defined colon cancer antigen 16 (SDCCFAG16)	Human colon cancer antigen
H9	•scaffold attachment factor B (SAFB) •Hsp27 ERE-TATA-binding protein (HET)	siehe G7
A10	ribosomal protein L15 (RPL15)	Komponente der 60S ribosomalen Untereinheit (cytoplasmatisch)
B10	•islet cell autoantigen 1 (69kD) (ICA1) •IS4 diabetes mellitus type I autoantigen (ICAp69)	Autoantigen assoziiert mit Insulin abhängiger Diabetes Melitus
C10	•zinc finger protein 238 (ZNF238) •translin associated zinc finger protein-1 (RD58)	siehe C1
D10	hypothetical protein MGC21688	/
E10	similar to lymphocyte antigen 6 complex, locus G5B; G5b protein	
F10	•sperm associated antigen 7 (SPAG7) •sperm acrosomal protein	Nuklein Säure bindendes Protein

G10	hypothetical protein MGC21688	/
H10	HMG domain protein HMGX1 (HMGX1)	enthält konservierte DNA-bindende Domäne bezeichnet als HMG-box (High molecular binding group), beteiligt an Regulierung von Transkription und Chromatin Konformation
A11	RAD51 homolog C	Mitglied der RAD51 Familie „strand-transfer“ Proteine, essentiell zur DNA Reparatur durch homologe Rekombination
B11	myosin light chain 1 slow a (MLC1SA)	siehe G1
C11	RAD51 homolog C	siehe A11
D11	myosin light chain 1 slow a (MLC1SA)	siehe G1
E11	A kinase (PKA) anchor protein 6 (AKAP6)	bindet an die regulatorische Untereinheit von Protein Kinase A (PKA) spezifische Lokalisation am Sarkoplasmatischen Retikulum, beteiligt an der Verankerung von PKA an der nuklearen Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums
F11	ribosomal protein S2	beteiligt an tRNA-Bindung an Ribosom, beeinflusst positiv mRNA-Translation
G11	•Similar to RIKEN cDNA proliferation associated •cytokine - inducible protein CIP29 •HCC-1 (HSPCB16)	enthält SAP DNA-bindende Domäne (siehe B9) CIP29: mögliche Beteiligung an transkriptionaler Kontrolle
H11	zinc-finger helicase (hZFH)	siehe A2
A12	block of proliferation 1 (BOP1)	nukleoläres Protein, beteiligt an rRNA Prozessierung und ribosomaler Translation
B12	clone IMAGE:5286843	unbekannt
C12	•Similar to RIKEN proliferation associated •cytokine-inducible protein CIP29 •HCC-1 (HSPCB16)	siehe G11
D12	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1 (102kD) (CTNNA1)	gehört zum Zell-adhäsions-Komplex, nötig für Zell-Zell-Bindung
E12	•lethal giant larvae homolog 1 (Drosophila) (LLGL1), •tumour suppressor protein, HUGL	Teil des Zytoskeletalen Netzwerkes und ist assoziiert mit nicht-muskulärem MyosinII („heavy chain“) und einer Kinase, die es spezifisch an einem Serin phosphoryliert
F12	hypothetical protein MGC10471 (MGC10471)	/
G12	NP220 nuclear protein (NP220)	nukleoplasmatisches Protein, das Cytidin-reiche Sequenzen in doppelsträngiger DNA bindet
H12	/	/

3.2.5. Expression und Aufreinigung der RZPD-Klone

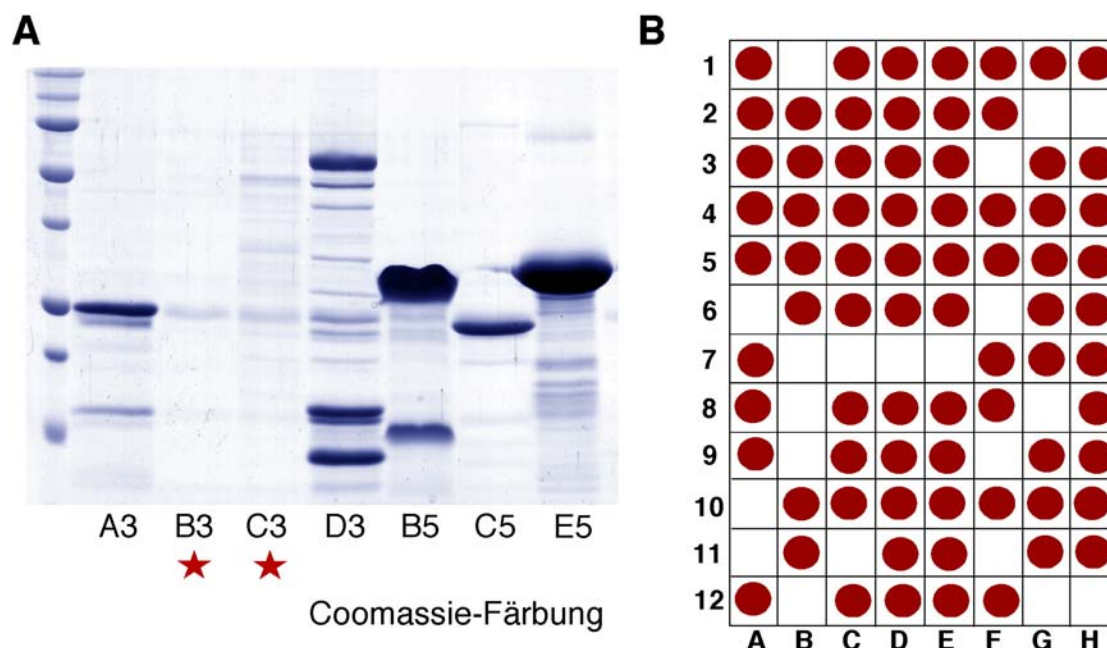


Abbildung 3.19: 75 von 96 Klonen konnten exprimiert und die Protein-Fragmente nativ aufgereinigt werden.

- (A)** Exemplarisches Gel für die Aufreinigung: Die Klonen wurden als Hexahistidin-Fusionsproteine exprimiert und aufgereinigt. Die Proteine wurden anschließend auf ein 15% SDS-Gel aufgetragen und Coomassie-gefärbt. Die mit einem roten Stern markierten Proteine B3 und C3 konnten nach Wiederholung der Expression aufgereinigt werden.
- (B)** Schema der nativ aufgereinigten Proteine. Alle erhaltenen Proteine sind mit einem roten Kreis markiert. 75 der 96 Klonen konnten aufgereinigt werden.

Die als positiv identifizierten Klonen (Expressionsstamm *E.coli* SCS 1) wurden in 250ml Superbroth bis zu einer OD_{600} von ungefähr 0.8 gezogen und dann bei 25°C durch Zugabe von 1mM IPTG für 3,5-4 Stunden exprimiert. Die Hexahistidin-Fusionsproteine wurden danach laut Standardprotokoll (siehe Abschnitt) nativ über eine Nickel-Chelat Matrix aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde anschließend anhand eines Coomassie-Gels überprüft und die Protein-Konzentration mittels der Bradford-Methode nach Angaben des Herstellers bestimmt. Abbildung 3.19A zeigt exemplarisch ein Coomassie-Gel. Da es sich bei den Proteinen nicht um vollständige Proteine, sondern um C-terminale Fragmente handelt, waren nicht alle Proteine löslich, sondern lagen zum Teil in so genannten „Inclusion bodies“ vor. Eine Erniedrigung der Expressions-Temperatur auf 15°C konnte einen Teil der bei 30°C unlöslichen Proteine in den löslichen Zustand überführen. In Abbildung 4.19B sind alle Klonen markiert, die nativ aufgereinigt werden konnten. 75 der 96 Klonen konnten

auf diese Weise exprimiert und aufgereinigt werden. Auf eine denaturierende Aufreinigung mittels 6M Harnstoff wurde verzichtet, da Vorversuche zeigten, daß Proteine aus Harnstoff nicht so gut modifiziert werden.

3.2.6. Unterscheidung zwischen SUMO-Substraten und SUMO-bindenden Proteinen

Der primäre Screen wurde unter Bedingungen durchgeführt, die zur Identifikation von SUMO-Substraten, aber auch zu stabil mit SUMO interagierenden Proteinen führen könnte. Um zu überprüfen, ob die nativ aufgereinigten Proteine modifizierbar sind und um zu unterscheiden, ob es sich bei ihnen um SUMO-Substrate oder um SUMO-bindende Proteine handelt, wurden sie auf 4 Nitrozellulose-Membranen in identischer Anordnung und Menge gespottet. **Filter A** wurde mit rekombinantem E1, E2, biotinyliertem SUMO-1 Δ C4 und ATP inkubiert (15 μ g E1, 10 μ g E2, 33 μ g Biotin-SUMO-1 Δ C4, 4 μ g Ovalbumin, 10mM ATP in PBS/0,05%Tween, 1,5 Stunden, V=2,5ml, RT). Parallel dazu wurde **Filter B** mit E1, E2 und biotinyliertem SUMO-1 Δ C4 ohne ATP, **Filter C** mit E1 und biotinyliertem SUMO-1 Δ C4 unter Zugabe von ATP und **Filter D** nur mit biotinyliertem SUMO-1 Δ C4 inkubiert. Während **Filter A** alle Proteine zeigt, die entweder von SUMO-1 modifiziert werden oder stabil an SUMO-1 binden, zeigt **Filter B** alle Proteine, die an SUMO-1 direkt binden, oder deren Bindung an SUMO-1 über E1 oder E2 in einer ATP unabhängigen Weise vermittelt werden. Dies ist möglich, da Ubc9 alleine, oder in einer Thioesterverbindung mit SUMO-1 vorliegend Substrate bindet und somit eine Interaktion vermitteln kann. Bei **Filter C** geben alle Proteine, die direkt an SUMO-1 binden, oder an den ATP-abhängigen E1-SUMO-1-Komplex binden, ein Signal. **Filter D** zeigt alle Proteine, die direkt an SUMO-1 binden (siehe Abbildung 4.20). Es konnte eindeutig gezeigt werden, daß die Signale Enzym- und ATP-abhängig sind (Vergleich **Filter A** und **Filter B**). Signale, die auf Interaktion von Substraten mit SUMO-1 hinweisen (siehe **Filter B,C,D**), wurden durch Modifikation verstärkt. D.h. alle Proteine, die SUMO-1 binden können, werden auch modifiziert. Zwischen den **Filtern B, C und D** konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Somit ist die Bindung dieser Proteine allein von SUMO-1 abhängig und wird nicht über die Enzyme (E1 oder E2) vermittelt.

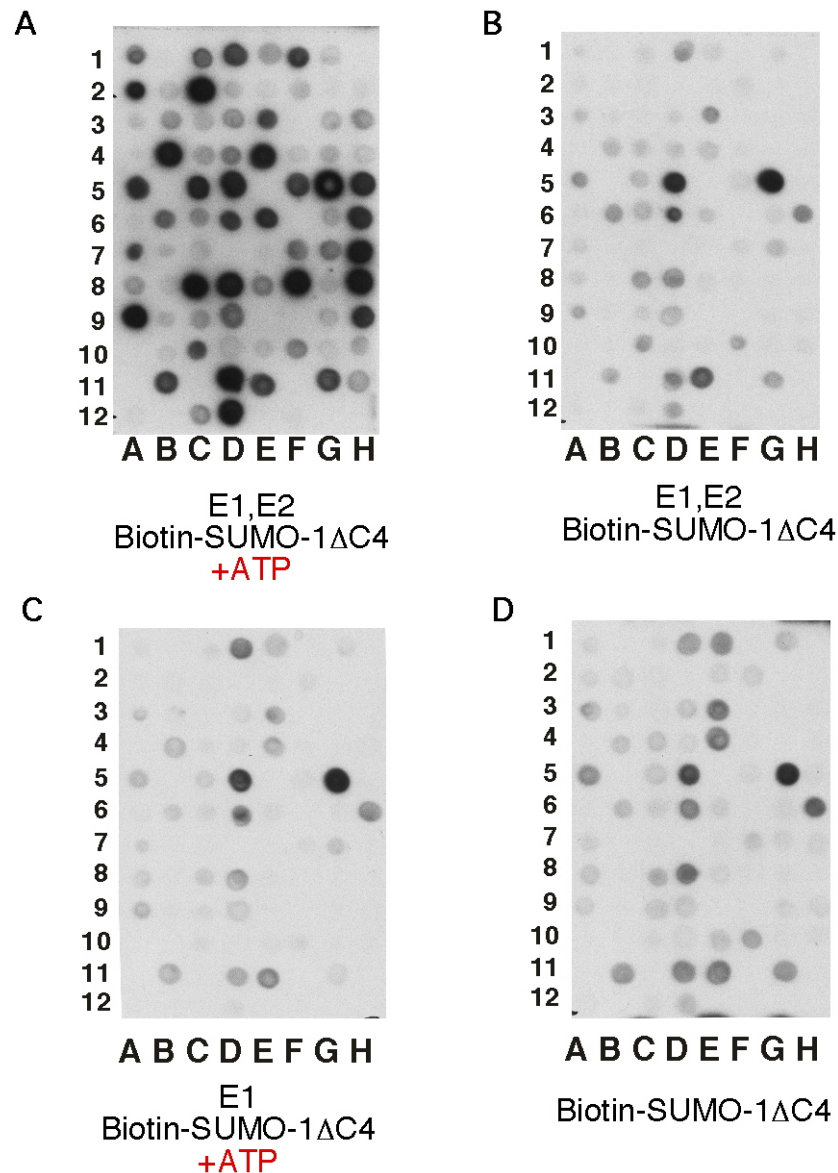


Abbildung 3.20: Inkubation von rekombinanten Hexahistidin-Fusionsproteinen gespottet auf Nitrozellulose

Filter A wurde mit E1, E2, biotinyliertem SUMO-1ΔC4 unter Zugabe von ATP inkubiert und zeigt alle Proteine, die entweder SUMO binden, oder mit SUMO-1 modifiziert werden.

Filter B wurde mit den Enzymen und biotinyliertem SUMO-1ΔC4 ohne ATP inkubiert, um Proteine zu detektieren, die an SUMO-1 durch Vermittlung der Enzyme binden.

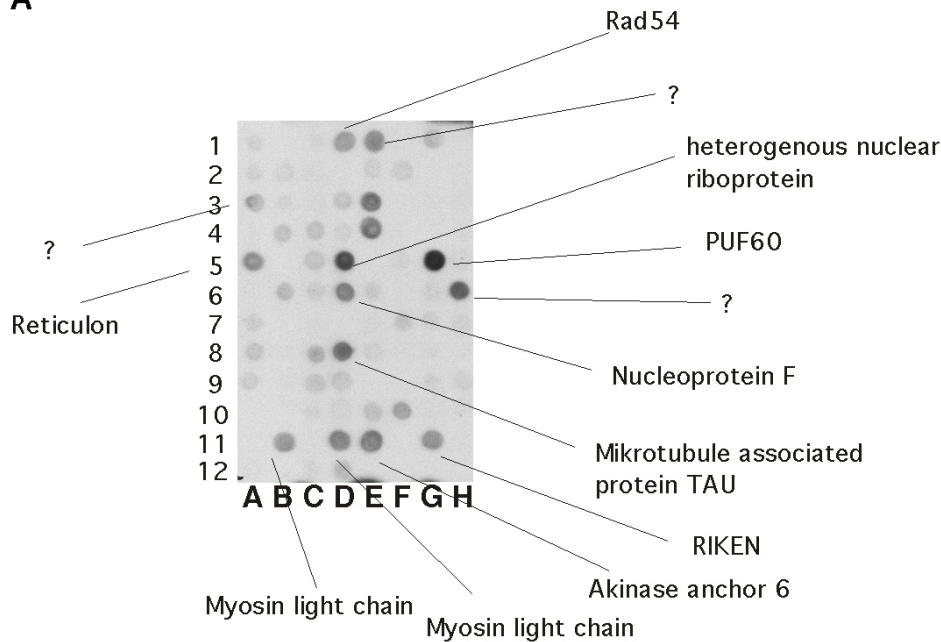
Filter C wurde mit E1 und biotinyliertem SUMO-1ΔC4 unter Zugabe von ATP inkubiert, um Proteine zu detektieren, die über den ATP-abhängigen E1-SUMO-1-Komplex an SUMO-1, oder E1 binden.

Filter D wurde nur mit biotinyliertem SUMO-1ΔC4 inkubiert, um Proteine zu detektieren, die an SUMO-1 binden.

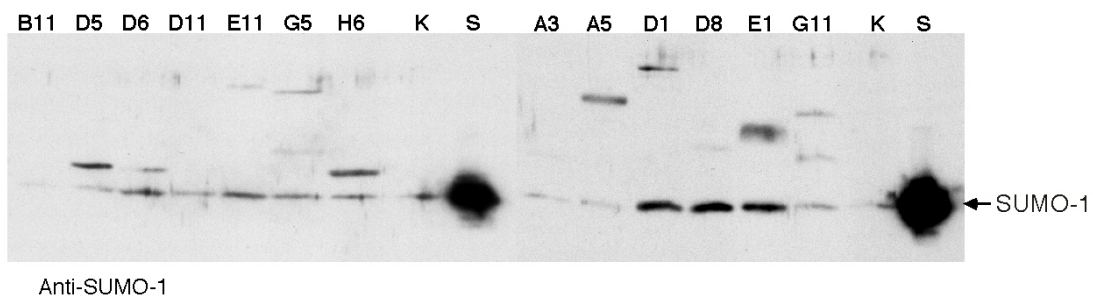
Von den 75 aufgereinigten Proteinen konnten 61 Proteine auf dem Filter SUMOyliert werden. Dies entspricht 81,3% der aufgereinigten Proteine.

3.2.6.1. Test auf nicht-kovalente Bindung mit SUMO-1

A



B

**Abbildung 3.21: Test auf direkte Interaktion von SUMO-1 mit Proteinen**

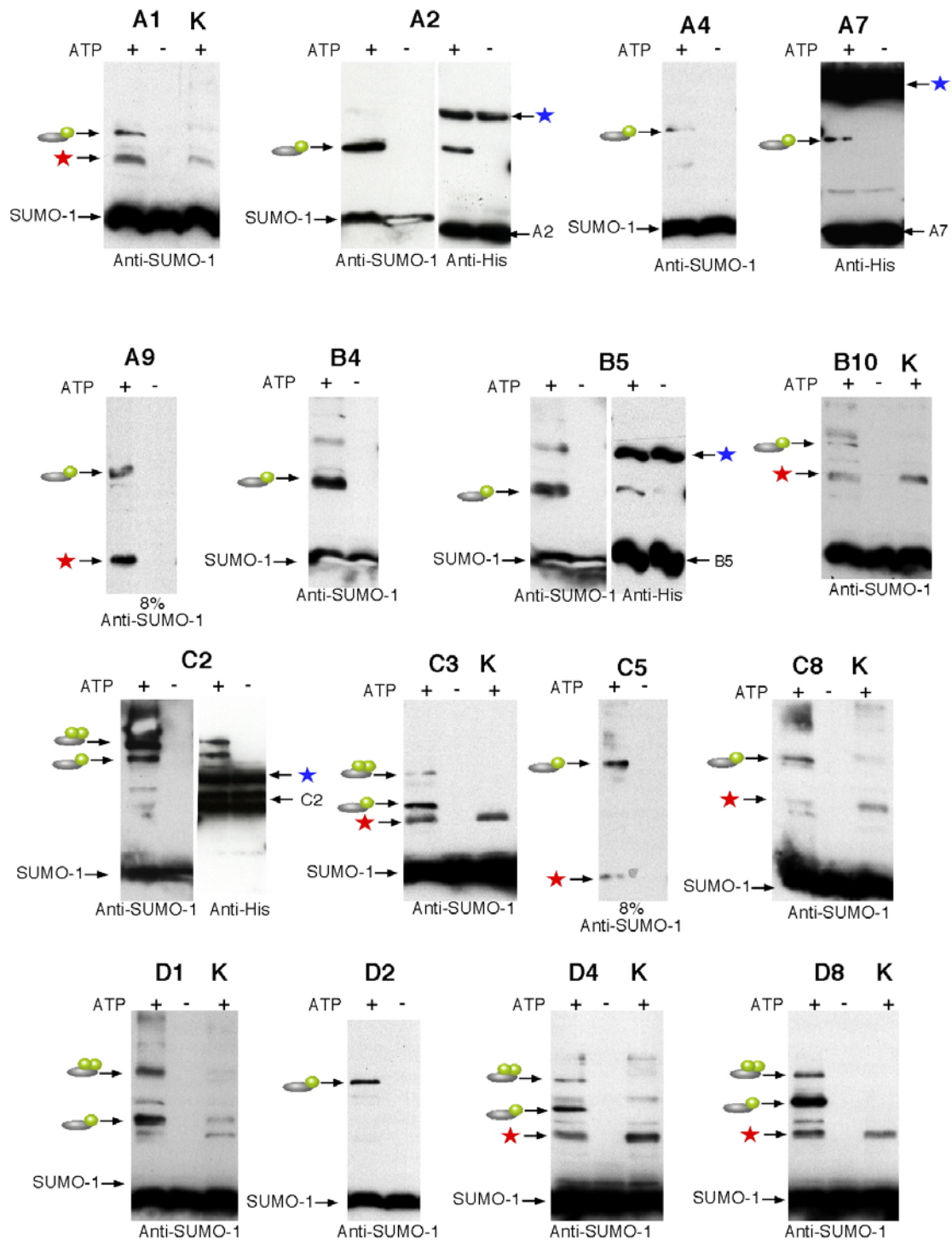
- (A) Filter D, der nur mit Biotin-SUMO-1ΔC4 inkubiert wurde (siehe Abbildung 4.17D). Darauf sind die verschiedenen Proteine markiert, die für den „Pull down“ verwendet wurden.
- (B) 300ng der Hexahistidin-Proteine wurden an Nickel-Sepharose gekoppelt und mit 300ng SUMO-1ΔC4 inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Proteine mit 400mM Imidazol eluiert und auf ein 15%-SDS-Gel aufgetragen. SUMO-1 wurde mit Anti-SUMO-1 markiert. Als Kontrolle diente Nickel-Sepharose, die mit SUMO-1 inkubiert wurde (markiert mit K). In Spur S wurde 1/75 des SUMO-Inputs geladen.

Die Ergebnisse im Filter Experiment deuten darauf hin, daß einige Proteine sehr stabil an SUMO binden können. Um die direkte Interaktion von SUMO-1 in Lösung zu verifizieren, wurde ein „Pull down“ mit den Hexahistidin-Proteinen und rekombinatem SUMO-1ΔC4 durchgeführt. Jeweils 300ng der Proteine wurden eine halbe Stunde mit 300ng SUMO-1ΔC4 und 5µg Ovalbumin bei Raumtemperatur in PBS vorinkubiert. Danach wurden Nickel-Sepharose und 20mM Imidazol hinzugegeben und 45min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem schnellen Waschen mit PBS+20mM Imidazol wurden die Proteine mit 400mM

Imidazol eluiert, mit 2x Lämmli-Puffer versetzt und nach Kochen auf ein 15% SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit polyklonalem SUMO-1 Antikörper (Ziege) (siehe Abbildung 3.21). Die Datenanalyse zeigt, daß die Bindung von SUMO an die Proteine als nicht signifikant zu erachten ist.

3.2.7. *In vitro* Modifikation der aufgereinigten Proteine mit rekombinantem E1, E2, SUMO-1 Δ C4 und ATP

Die einzige Methode SUMOylierung tatsächlich nachzuweisen, ist die SDS-PAGE und anschließender Immunoblot der Proteine. SUMOylierung führt zu einer Änderung im Laufverhalten von etwa 20kDa. Alle aufgereinigten Proteine wurden daher mittels des „*in-vitro*-Modifikations Verfahrens“ mit rekombinantem E1, E2 und SUMO-1 Δ C4 in PBS mit ATP inkubiert und anschließend mittels Immunoblot mit Histidin- und SUMO-Antikörper auf eine SUMO-Modifikation hin getestet (siehe Abbildung 3.22). 600ng der Proteine wurden mit 57ng E1-Enzym, 250ng E2-Enzym, 620ng SUMO-1 Δ C4 unter Zugabe von 0,15% Tween20 und 380ng Ovalbumin in PBS in einem Volumen von 60 μ l für 45min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2x Laemmli-Puffer gestoppt und 1/6 wurde auf 15 % SDS-Gele aufgetragen (in angegebenen Fällen auf 8%).



Zeichenerklärung:

- ★ → Signal von SUMOylierung von E1 oder E2
- ★ → His-Aos1
- einfache SUMOylierung
- doppelte SUMOylierung
- K → SUMO/Enzymmix + ATP

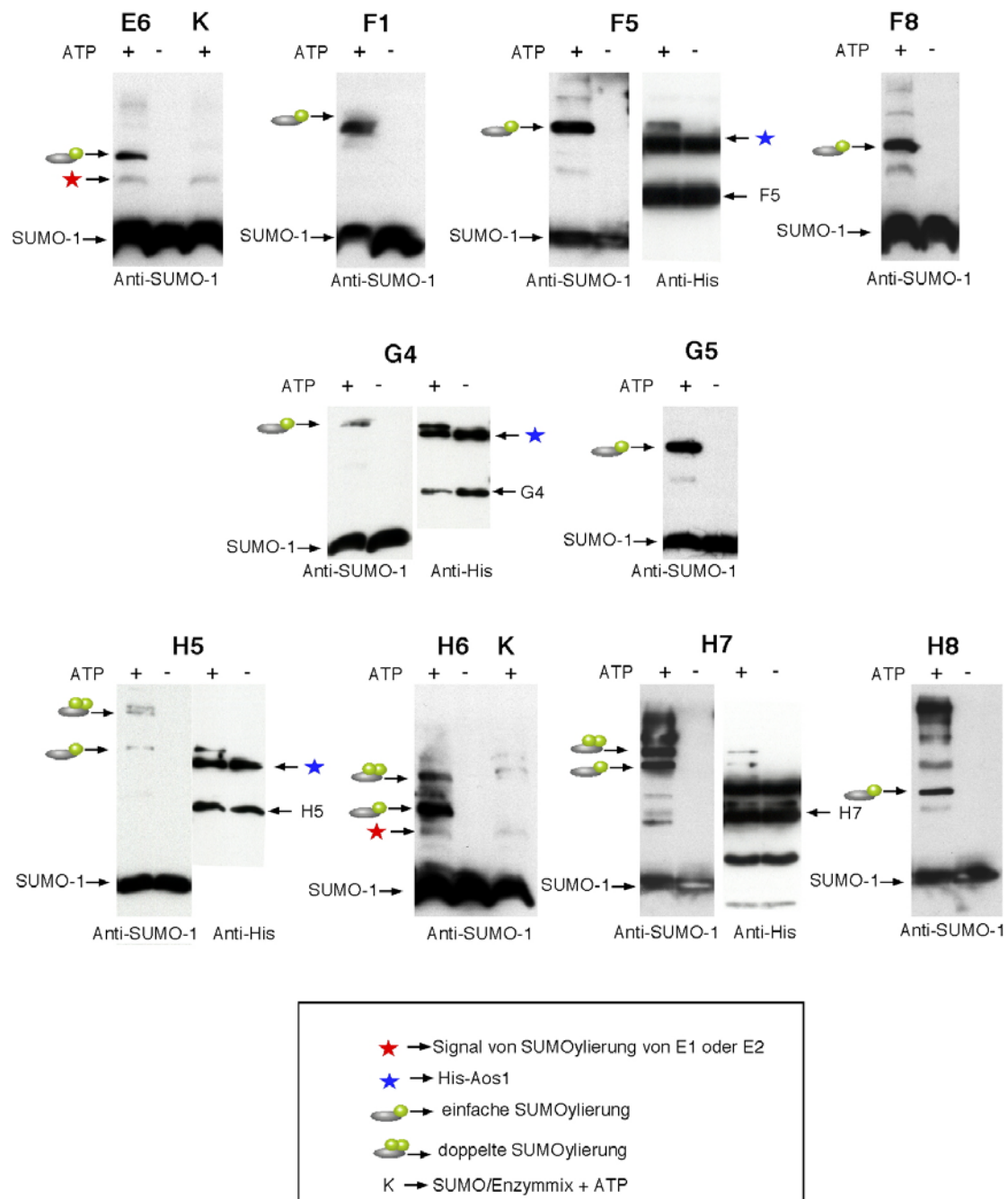


Abbildung 3.22: In-vitro Modifikation der aufgereinigten Proteine

Die Proteine (600ng) wurden mit E1 (57ng), E2 (240ng), SUMO-1ΔC4 (600ng) und ATP (4mM) inkubiert (45 min, 30°C) inkubiert. Anschließend wurden sie auf 8% bzw. 15% SDS-Gele aufgetragen. Die Modifikation wurde mittels Immunoblot mit His- und SUMO-1-Antikörpern analysiert. Als Kontrollen dienten der Inkubationsmix mit dem Protein, aber ohne ATP (gekennzeichnet als ATP -), sowie nur der Inkubationsmix mit ATP, aber ohne Protein, um die Selbst-SUMOylierung der Enzyme bestimmen zu können (gekennzeichnet als K +).

3.2.8. Klonierung und SUMOylierung von kompletten Proteinen

Die Durchschnittsgröße der erhaltenen Proteine sollte bei der Expressionsbibliothek bei ungefähr 50kDa liegen. Die erhaltenen Proteine liegen aber größtenteils zwischen 10-40kDa. Es erfolgte in diesem Screen offensichtlich eine Selektionierung auf kleine Inserts, da sie eher kleine, unabhängig faltbare Domänen ergeben. Es muß überprüft werden, ob auch die kompletten Proteine SUMOylierbar sind. Dazu wurden die aussichtsreichen Kandidaten PUF60 (FIR) (Klon G5), STAF65 (Klon C2, H7, H8), sowie SNIP (Klon C8) ausgewählt. Im folgenden sollten zwei Punkte untersucht werden. 1. Ob sie als komplettes Protein modifizierbar sind und 2. die Untersuchung der Modifikation *in vivo*.

3.2.8.1. PUF60 (Poly U binding factor 60) oder FIR

Das Protein wurde unabhängig voneinander von zwei Arbeitsgruppen identifiziert. Zum einen als Spleißfaktor (PUF60) (Schonleber, et al., 1999, RNA), zum anderen als Transkriptionaler Regulator (FIR). FIR (FBP interacting repressor) blockiert die Aktivator-abhängige, aber nicht die basale Trankription der c-myc Gene durch TFIIH (Liu et al., 2000). Der Einfachheit halber wird es in der folgenden Arbeit als PUF60 bezeichnet. Von dem Protein PUF60 wurde eine 166 Aminosäure lange C-terminale Domäne bei dem „Screen“ gefunden (Klon bezeichnet als G5). In dieser Region liegt die als PUMP-Domäne identifizierte Region des Proteins (Schonleber, et al., 1999, RNA). Sie ist für die Homodimerisierung von PUF60 zuständig (siehe Abbildung 3.23B), zeigt Homologie zu anderen Spleiß-Faktoren, wie U2AF65 (Human) und Mud2p (Hefe) und wurde daher „PUF60-U2AF65, Mud2p protein-protein interaction domain“ (PUMP-Domäne) benannt. Der Klon G5 stellte sich als ausgezeichnetes SUMO-Substrat heraus (siehe Abbildung 3.22).

Um zu testen, ob die Modifikation auch an dem kompletten, richtig gefalteten Protein stattfinden kann, wurde PUF60 komplett aus einer HeLa cDNA Bibliothek mittels PCR amplifiziert, in den prokaryotischen Expressionsvektor pGEX-6P1 kloniert und als Gluthation-Sulfudryl-Transferase-Fusionsprotein exprimiert (GST-Protein). Die Aufreinigung erfolgte zuerst über Gluthation-Sepharose und anschließend über eine Gelfiltrationssäule (Sepadex200) (siehe Abbildung 3.24)

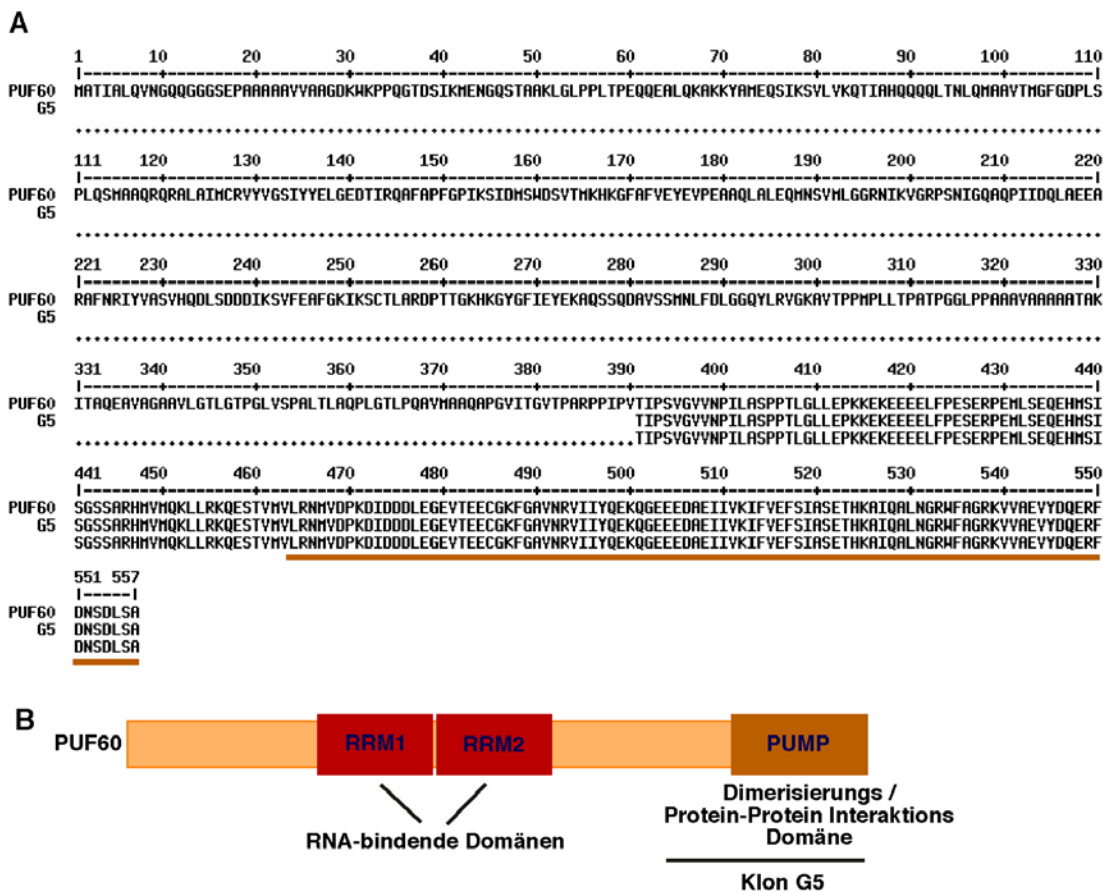


Abbildung 3.23: Sequenzvergleich zwischen PUF60 und dem RZPD-Klon G5

(A) Vergleich der Protein-Sequenzen von PUF60 und dem RZPD-Klon G5. G5 stellt eine 166 Aminosäure lange Domäne im C-terminale Bereich von PUF60 dar. Der Bereich der PUMP-Domäne ist durch den braunen Strich sichtbar gemacht.

(B) PUF60 enthält 3 Domänen: RRM1 und RRM2 (RNA-recognition motif) und einen RRM-ähnlichen, als PUMP-Domäne bezeichneten Bereich. G5 repräsentiert den C-Terminus mit dieser PUMP-Domäne

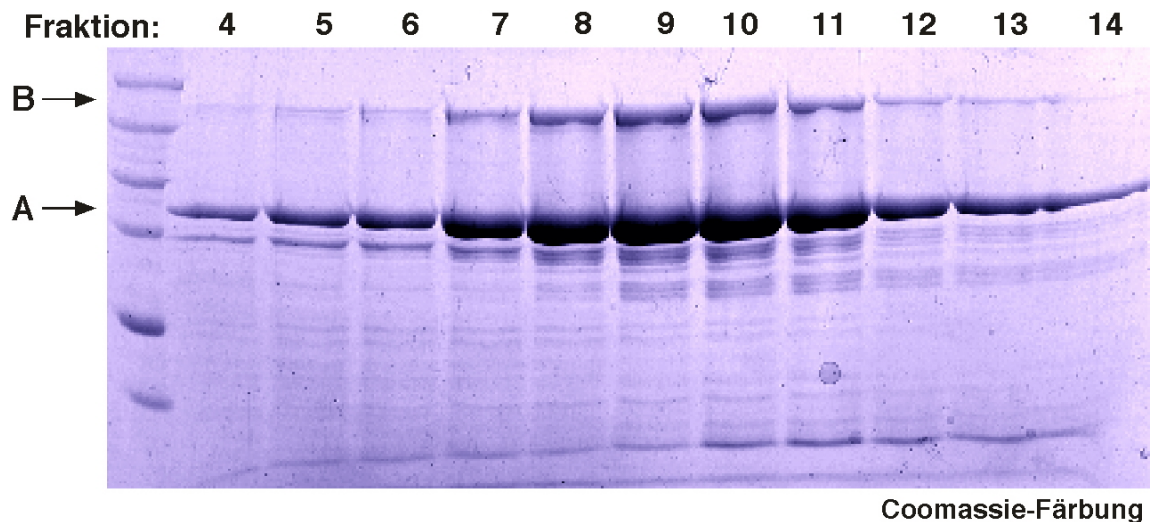


Abbildung 3.24: Aufreinigung von PUF60 über eine Gelfiltrationssäule

PUF60 wurde rekombinant als Gluthation-Sulfudryl-Transferase-Fusionsprotein exprimiert und über Gluthation-Sepharose und anschließend über eine Gelfiltrationssäule (Sephadex200) aufgereinigt. Die Fraktionen wurden anschließend mittels Coomassie-Gelfärbung überprüft. Es wurden jeweils 15µl pro 1ml Fraktion aufgetragen. Mit **A** ist das monomere GST-PUF60 gekennzeichnet, **B** kennzeichnet ein SDS-stabiles GST-PUF60 Dimer.

3.2.8.2. Volle Länge PUF60 wird *in vitro* SUMOyliert

Volle Länge PUF60 kann ebenso wie das C-terminale Fragment (Klon G5) SUMOyliert werden. Beide Proteine werden sowohl einfach, als auch doppelt SUMOyliert (siehe Abbildung 3.25). Die SUMOylierung konnte nicht durch die Zugabe der E3-Ligase RanBP2 verstärkt werden (Daten nicht gezeigt).

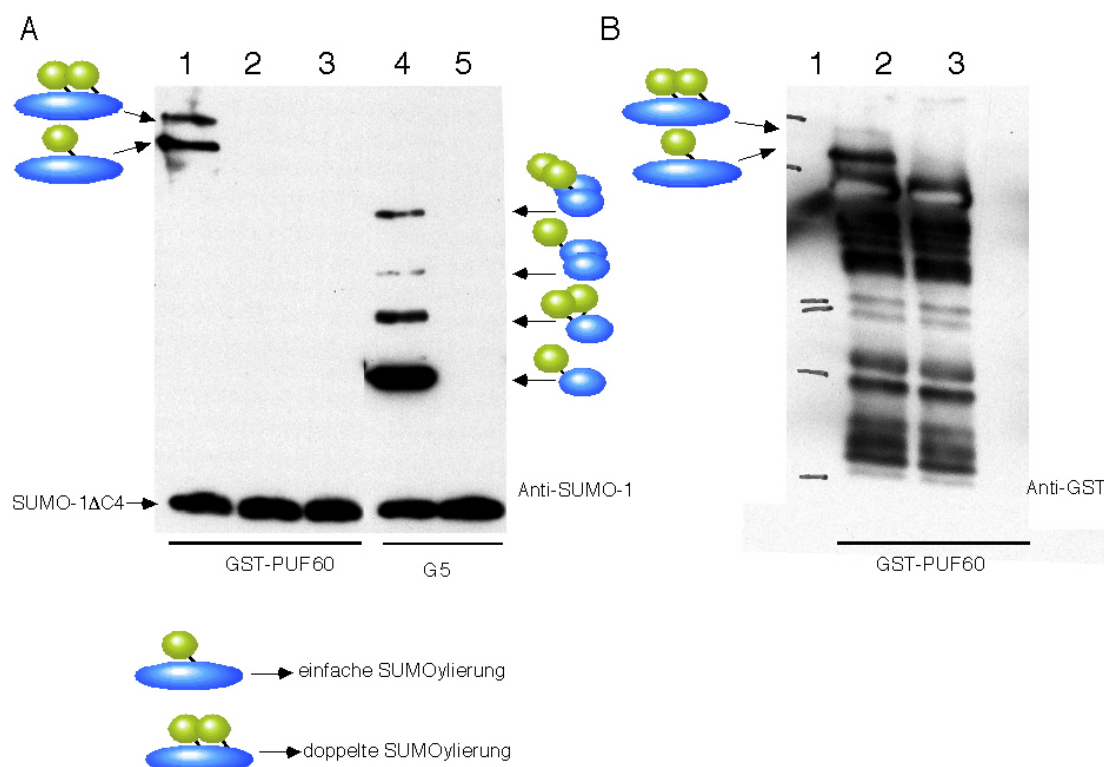


Abbildung 3.25: GST-PUF60 wird wie His-G5 doppelt SUMOyliert

- (A) GST-PUF60 wurde mit dem Modifikationsmix (E1, E2, SUMO-1 Δ C4, ATP) für 45min bei 30°C inkubiert (Spur 1), als Kontrolle dienten GST-PUF60 mit Modifikationsmix, aber ohne ATP (Spur 2) und der Modifikationsmix alleine mit ATP (Spur 3). His-G5 wurde ebenfalls mit dem Modifikationsmix und ATP inkubiert (Spur 4), sowie als Kontrolle ohne ATP (Spur 5). Nach Auftrag auf ein 15% SDS-Gel wurden die SUMOylierten Formen mit Anti-SUMO-1 markiert. PUF60 wird mit zwei SUMO-Molekülen modifiziert, genau wie His-G5.
- (B) Spuren 1-3 wurden mit Anti-GST markiert.

3.2.8.3. Erzeugung eines affinitätsgereinigten polyklonalen PUF60-Antikörpers in Kaninchen

Für weitere biochemische Untersuchungen wurde ein polyklonaler PUF60-Antikörper gegen rekombinantes aufgereinigtes GST-PUF60 (siehe Abbildung 3.23) in einem Kaninchen erzeugt und das Antiserum wurde anschließend gegen GST-PUF60 affinitätsgereinigt. In Immunoblot-Analysen konnte gezeigt werden, daß das gewonnene Antiserum spezifisch endogenes PUF60 bei etwa 60kD erkennt (siehe Abbildung 3.26)

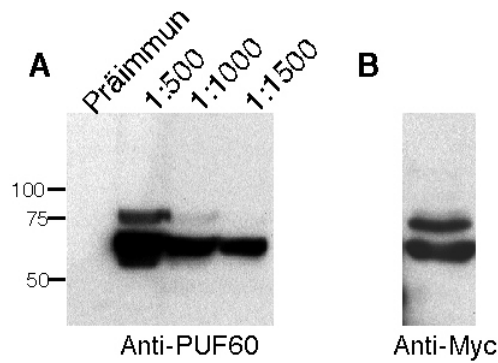


Abbildung 3.26: Analyse von endogenen PUF60 in HeLa-Zellen

- (A)** Adhärenente HeLa Zellen wurden in der Zellkultur-Schale einmal mit PBS gewaschen und dann sofort in heißem 2xLämmli Puffer abgeschabt und 10 Min gekocht. Vor Auftrag auf das 8% SDS-Gel wurden die Zellen sonifiziert und abzentrifugiert. Es wird eine Hauptbande bei den erwarteten 60kDa detektiert. Eine weitere Bande darüber (ca.75kDa) deutet auf eine posttranslationale Modifikation von PUF60 hin.
- (B)** Mit 3myc-PUF60 transfizierte Zellen (HeLa) wurden wie unter (A) beschrieben behandelt und mittels Immunoblot mit monoklonalem Anti-myc analysiert.

Eine weitere Bande die etwa bei 70kD läuft (gekennzeichnet mit Pfeil) konnte als spezifische Form von PUF60 identifiziert werden, da sie auch bei mit 3myc-PUF60 transfizierten Zellen auftritt (siehe Abbildung 3.26B). Es handelt sich hierbei aller Wahrscheinlichkeit nach um eine Posttranslationale Modifikation, wie z.B. Phosphorylierung.

Durch Immunopräzipitation konnte PUF60 komplett aus dem Lysat depletiert werden. Es konnte dabei keine höher laufende Bande, die auf eine SUMOylierung schließen läßt festgestellt werden (siehe Abbildung 3.27). Auch eine Markierung dieser Proben mit Anti-SUMO-1 zeigt keine Bande. Wiederholung der Immunopräzipitation unter denaturierenden Bedingungen (Kochen in RIPA/1%SDS, verdünnen auf RIPA/0,1%SDS + Iodoacetamid) brachten kein anderes Ergebnis. Der Grund kann eine De-SUMOylierung im Extrakt (auch unter diesen harschen Bedingungen) sein, oder das PUF60 nur zu einem kurzen Zeitpunkt SUMOyliert wird.

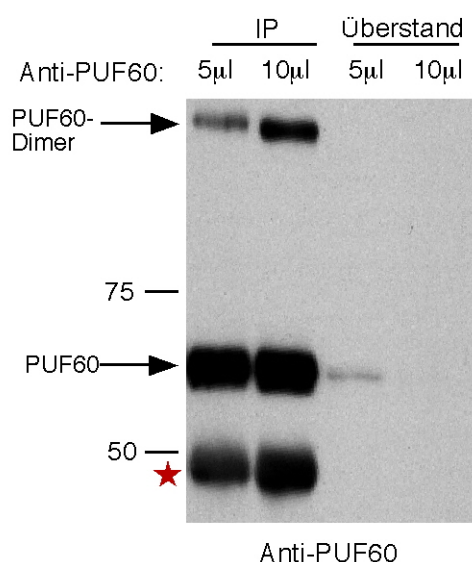


Abbildung 3.27: Immunopräzipitation mit Anti-PUF60 aus HeLa-Zellen

Die Zellen wurden in 1%TritonX100 / 10mMTris und 150mMNaCl pH7.5 lysiert und anschließend mit Antikörper und Protein G-Sepharose inkubiert, nach 3x Waschen mit dem Lysispuffer wurde die IP auf ein 8% Gel aufgetragen und die Banden mittels Immunoblot mit Anti-PUF60 (1:1500) detektiert. Die mit dem roten Stern markierte Bande stellt die schwere Kette der Antikörper dar. Die bei etwa 70kDa etwas höher laufende Bande geht verloren, was auf eine posttranslationale Modifikation deutet, die unter diesen Umständen nicht stabil ist.

3.2.8.4. Subzelluläre Lokalisation von PUF60 ist unabhängig von SUMO-1 Δ C4 Überexpression

Um die Lokalisation von PUF60 festzustellen, wurde es in den eukaryotischen Expressionsvektor 3myc-pcDNA3 kloniert, als Plasmid in 293T-Zellen transfiziert, und anschließend mit monoklonalem Anti-Myc detektiert. Endogenes PUF60 wurde mit dem polyklonalen Anti-PUF60 und endogenes SUMO-1 wurde mit dem monoklonalen Anti-SUMO-1 (Anti-GMP1) Antikörper detektiert. SUMOylierung führt bei einigen Proteinen zu einer Änderung ihrer Lokalisation in der Zelle, so z.B. bei RanGAP1 und PML (siehe Abschnitt 1.4.1) gezeigt.

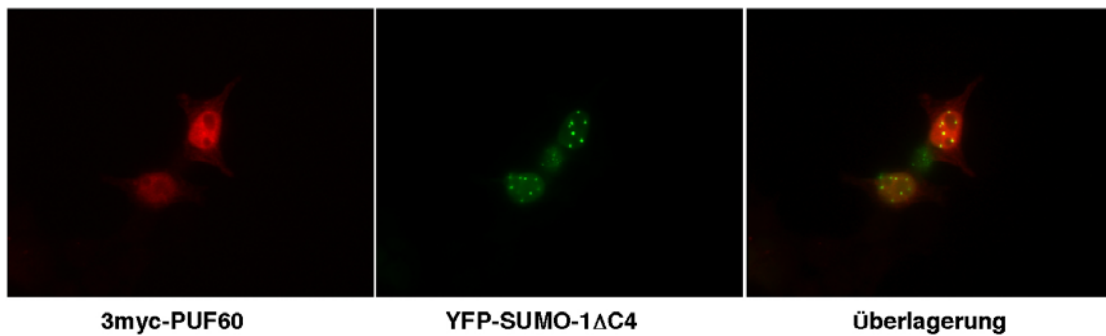
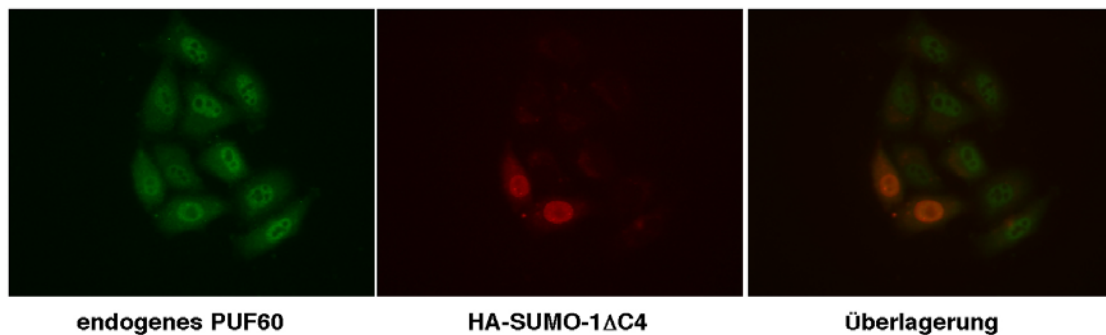
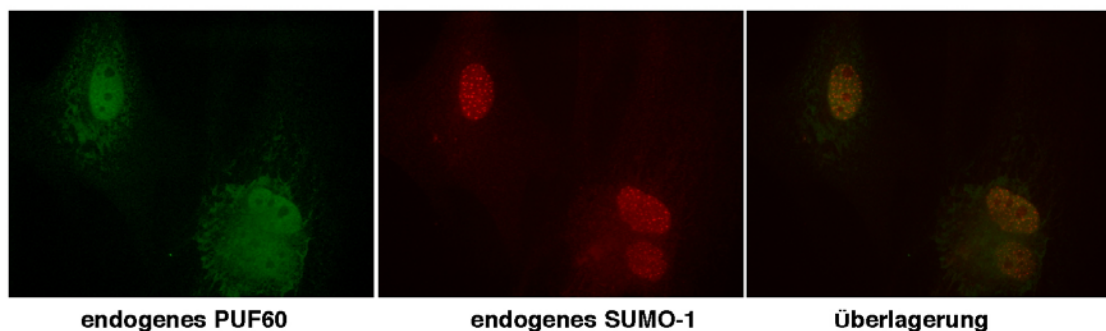
A 293T: Kotransfektion von 3myc-PUF60 und YFP-SUMO-1 Δ C4**B** 293T: Transfektion von HA-SUMO-1 Δ C4**C** HS68: untransfiziert

Abbildung 3.28: Untersuchung zur Lokalisation von PUF60 in HS68- und 293T- Zellen sowie in SUMO-1 kotransfizierten 293T-Zellen

- (A) Kotransfektion von 3myc-PUF60 und YFP-SUMO-1 Δ C4 in 293T-Zellen. Überexprimiertes 3myc-PUF60 wurde mit monoklonalem Anti-Myc (Alexis) Antikörper detektiert.
- (B) Transfektion mit HA-SUMO-1 Δ C4 und Detektion mit polyklonalem Anti-HA Antikörper (Ratte). Überexpression von HA-SUMO-1 Δ C4 zeigt keinen Effekt auf endogenes PUF60. PUF60 wurde mit polyklonalem Anti-PUF60 Antikörper (Kaninchen) detektiert.
- (C) Endogenes PUF60 wurde in HS68-Zellen mit polyklonalem Anti-PUF60 markiert. Das Signal ist, mit Ausnahme der Nukleoli, fast ausschließlich auf den Kern beschränkt, mit einer leichten Verteilung im Zytoplasma. Endogenes SUMO-1 wurde mit dem monoklonalen Antikörper GMPI (Zymed) detektiert.

Um festzustellen, ob Überexpression von SUMO-1 zu einer Änderung der Lokalisation von PUF60 führt, wurde SUMO-1 Δ C4 als N-terminal YFP- oder HA-Epitop markierter Version in die Zellen transfiziert und das endogene Protein beobachtet, oder wahlweise mit 3myc-PUF60 ko-transfiziert (siehe Abbildung 3.28). HA-SUMO-1 Δ C4 wurde dabei mit polyklonalem Anti-HA markiert. Wie SUMO-1 ist PUF60 vorwiegend im Kern lokalisiert, zeigt aber keine nuklearen „Speckels“ wie SUMO-1, sondern eine gleichmäßige Verteilung, mit Ausnahme der Nucleoli, die kein Signal aufweisen. Ein schwaches Signal im Zytoplasma konnte sowohl mit Anti-PUF60, als auch nach Transfektion mit 3myc-PUF60 mit monoklonalem Anti-Myc detektiert werden. HS68-Zellen wurden ebenfalls benutzt, da sie weitaus größer als 293 Zellen und daher eine differenziertere Beobachtung der Lokalisation erlauben. Sie zeigen die selbe Verteilung wie 293T-Zellen. SUMO-Überexpression zeigt keinen Effekt auf die Lokalisation von PUF60, weder auf die nukleare, noch auf die zytoplasmatische.

3.2.8.5. Lysin 419 ist essentiell für die SUMOylierung von PUF60

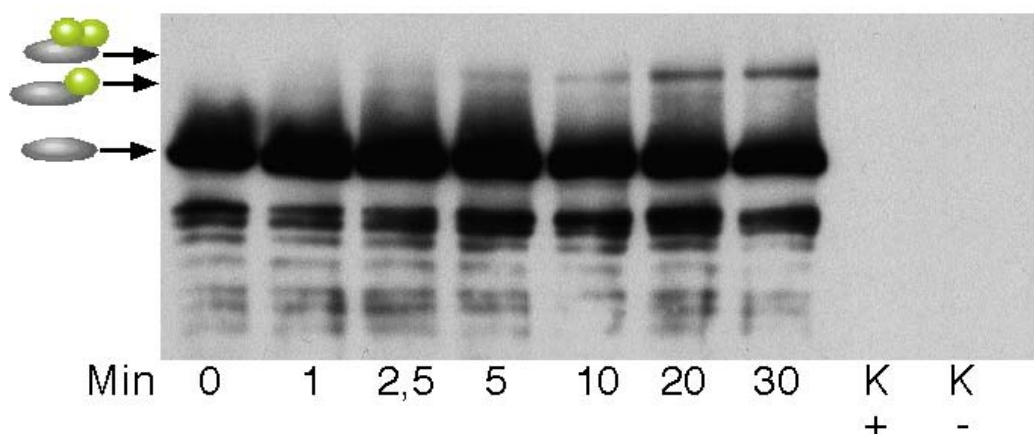


Abbildung 3.29: PUF60 ist doppelt SUMOyliert

PUF60 wurde unter denselben Bedingungen wie bei Abbildung 4.30 inkubiert. Dabei wurden Proben bei verschiedenen Zeitpunkten genommen. Eine einfach-SUMOylierte Form ist sehr schnell zu detektieren (ab 1 Min), parallel dazu tritt die doppelt modifizierte Form auf. Bei Zeitpunkt 30 min ist nur noch die doppelt modifizierte Form zu detektieren.

Abbildung 3.29 zeigt, dass PUF60 doppelt SUMOyliert ist. PUF60 wurde mittels des *in-vitro* Modifikations Verfahrens SUMOyliert. Es wurden Proben beginnend bei 1 Minute genommen und durch Immunoblot analysiert. Nach 1 Minute ist bereits eine

einfache SUMOylierung von PUF60 feststellbar, die mit längerer Inkubation in eine doppelte Modifikation übergeht. Nach 30min ist nur noch die doppelte SUMOylierung detektierbar.

Im Gegensatz zur Ubiquitinierung wurde für die SUMOylierung die Konsensussequenz ϕ KxE gefunden, wobei ϕ eine hydrophobe Aminosäure bezeichnet, K das zu modifizierende Lysin, x eine beliebige Aminosäure und E Glutamat. Da PUF60 doppelt modifizierbar ist, wurde nach mehreren Akzeptorlysinen gesucht. Nur 1 Lysin, als Lysin A gekennzeichnet (Abbildung 3.30), befindet sich innerhalb einer klassischen Konsensussequenz. dieses ist aber im N-Terminus zu finden. Da aber klar gezeigt werden konnte, daß G5 doppelt SUMOyliert ist, muß es auch im c-terminalen Bereich zwei Akzeptorlysine geben. Ein Lysin als Lysin 1 gekennzeichnet entspricht mit seiner Sequenz PKKE noch am ehesten der Konsensussequenz (eine ähnliche Sequenz liegt in PML vor).

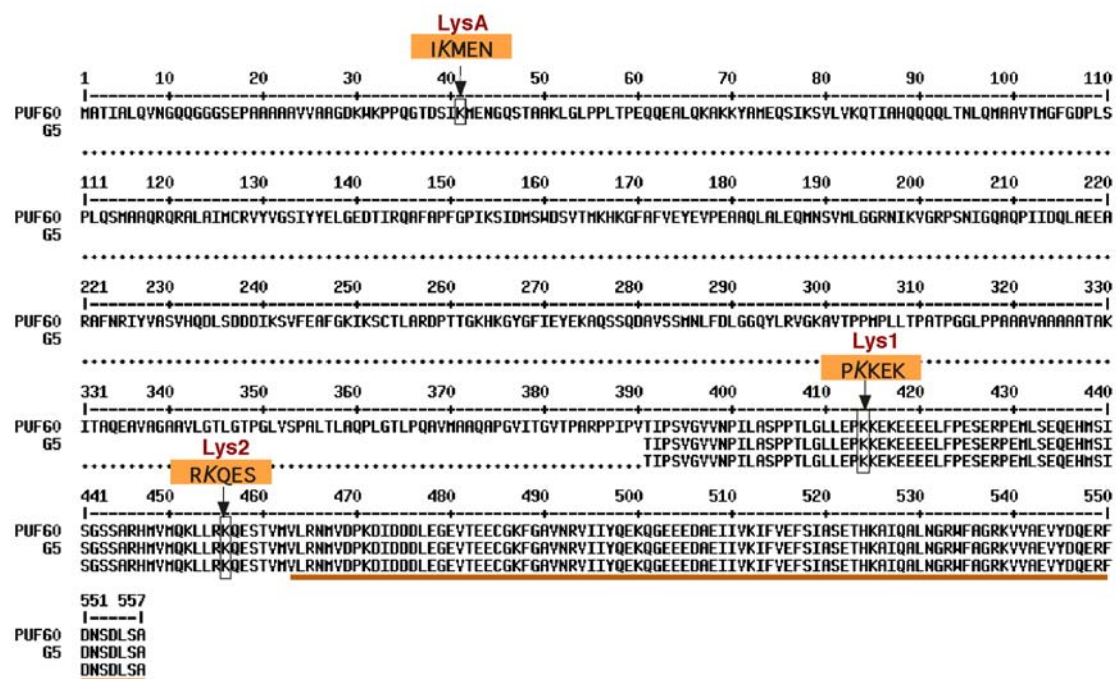


Abbildung 3.30: Drei potentielle Akzeptor-Lysine in PUF60

Lysin 1 (PKKE) und Lysin 2 (RKQE) befinden sich in der C-terminalen Domäne, die als Klon G5, im Filter-Modifikations Verfahren gefunden wurde. Lysin A (IKME) liegt zwar im N-terminus, entspricht aber ebenfalls der klassischen SUMOylierungs-Konsensussequenz. Lys1 und Lys2 liegen direkt vor der PUMP-Domäne (braun unterlegt).

Ein weiteres Lysin (Lysin 2) wurde ausgewählt, da es von den wenigen vorhandenen Lysinen in diesem Bereich noch am ehesten entfernt an eine Konsensussequenz erinnert. Lys1 und Lys2 liegen vor der PUMP-Domäne, die Homologie zur RRM-

Domäne in den Spleißfaktoren U2AF65 (Human) und Mud2p (Hefe) aufweist und für Protein-Protein-Interaktion verantwortlich ist (Schonleber et al., 1999, RNA).

Zur Ermittlung des modifizierten Lysins in PUF60 wurden die Lysine einzeln mittels PCR in dem GST-PUF60-Konstrukt durch ein Arginin ersetzt, rekombinant hergestellt und wie in 4.4 beschrieben aufgereinigt. Nach Abgleich der Proteinkonzentrationen mittels Coomassie-Gel und Bradford-Verfahren wurden die Mutanten in der gleichen Konzentration wie der Wildtyp in einem *in-vitro*-Modifikations Verfahren eingesetzt (siehe Abbildung 3.31). Nach 30 minütiger Inkubation bei 30°C wurde der Mix auf ein 8% SDS-Gel aufgetragen und die Banden mittels Immunoblot mit polyklonalem Anti-GST Antikörper (Kaninchen) detektiert. Mutation des Lysins an Position 414 (Lys1) verhindert komplett die SUMOylierung von PUF60. Überraschenderweise zeigt sowohl Mutation von Lys2, als auch von LysA eine einfache SUMO-Modifikation des Proteins, obwohl Lys1 in beiden Mutanten vorhanden ist. Demzufolge findet die Doppelmodifikation nicht an Lys1, oder seiner direkten Umgebung statt, sondern Modifikation von Lys1 ist Voraussetzung für die Modifikation von Lys2, oder LysA.

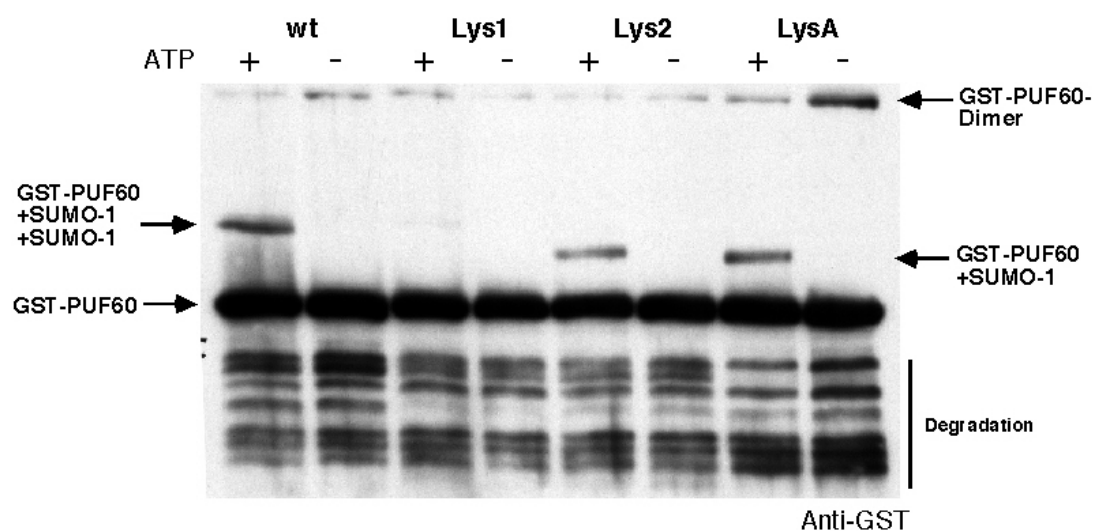


Abbildung 3.31. Bestimmung des SUMOylierten Lysins in PUF60

3 Lysine wurden mittels PCR durch ein Arginin ersetzt (Mutanten bezeichnet als LysA, Lys1 und Lys2) und rekombinant als GST-Fusions-Proteine exprimiert und wie der Wildtyp (wt) aufgereinigt. Die Proteinmengen wurden gegeneinander angeglichen und jeweils 600ng wurden in einem *in-vitro*-Modifikations Verfahren eingesetzt (E1 ng, E2 ng, SUMO-1ΔC4 ng, ATP 3mM, Endvolumen 60μl in PBS) und für 30 min bei 30°C inkubiert. Die Kontrolle ist der Mix ohne ATP (gekennzeichnet + /- ATP). Nach Versetzen mit 50% (v/v) 2x Lämmli-Puffer wurden die Proben gekocht. Ein Drittel davon wurde anschließend auf ein 8% SDS-Gel aufgetragen und die Modifikation mittels Immunoblot mit polyklonalem Anti-GST detektiert. Das unmutierte Proteine (markiert mit wt) zeigt eine deutliche Doppelmodifizierung, während die Mutanten Lys2 und LysA eine einfache SUMO-Modifikation zeigen. Mutation von Lys1 unterbindet die Modifikation komplett.

Durch die SUMOylierung kann es zu einer Konformationsänderung von PUF60 kommen, die SUMOylierung der anderen Lysine ermöglicht. Dadurch ließe sich die SUMOylierung des Proteins über Lysin 419 regulieren. Mutation dieses Lysins, führt zu einer kompletten Verhinderung der SUMOylierung. Eine dreifache SUMOylierung von PUF60 ist prinzipiell denkbar, konnte aber nicht detektiert werden.

3.2.9. STAF65 γ (SPTF-associated factor 65 γ)

STAF65 γ ist Mitglied des großen STAGA-Komplexes (SPT3-TAF_{II}31-GCN5L acetylase), der ein Chromatin Acetylierender Transkriptions-Ko-Aktivator ist und sowohl mit Prä-mRNA Spleiß-Faktoren, als auch mit „DNA-damage binding factors“ interagiert. Dieser Komplex besitzt die Fähigkeit sowohl freie, als auch nukleosomale Histone zu acetylieren. Bisher konnten 18 Untereinheiten dieses Multi-Protein Komplex identifiziert werden. Es konnten darüber hinaus Interaktionen mit dem Spleißosom-assoziierten Protein 130 (SAP130) und dem „DNA damage binding Protein“ DDB1 gezeigt werden (Martinez et al., Molecular and Cellular Biologie, 2001). Im Filter-Modifikations Verfahren wurde STAF65 γ mit drei Klonen herausgezogen (bezeichnet als C2, H7 und H8). Sie stellen Teile des Proteins im C-terminalen Bereich dar.

3.2.9.1. STAF65 γ wird mehrfach *in vitro* SUMOyliert

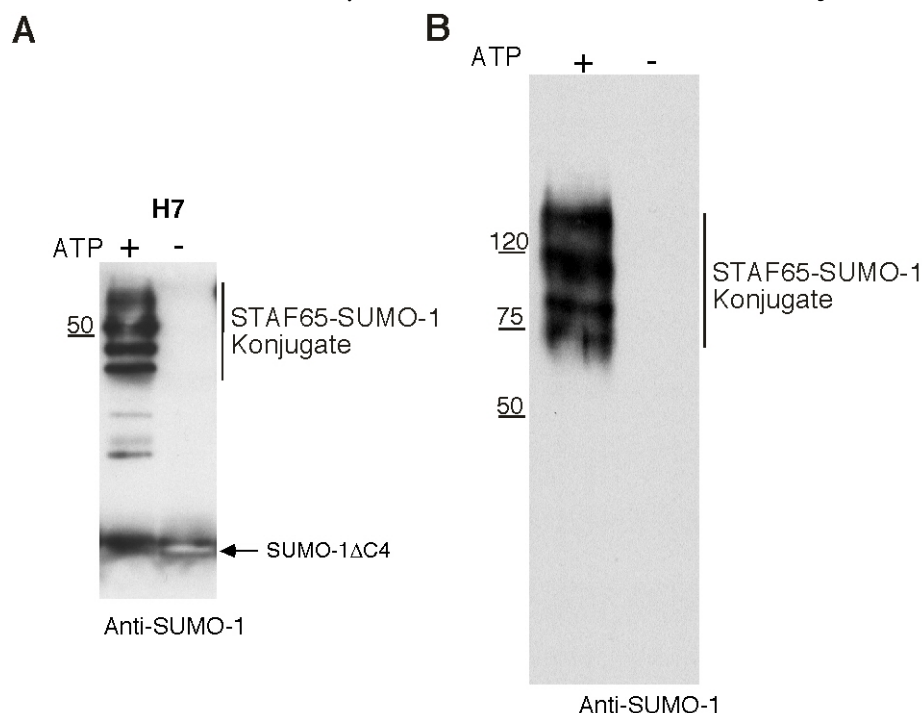


Abbildung 3.32: Mehrfach SUMOylierung von STAF65 γ

- (A) Alle drei C-terminalen Klone von STAF65 γ (C2, H7, H8) werden mehrfach mit SUMO-1 modifiziert. Hier ist exemplarisch H7 gezeigt. Die Größe der unmodifizierten Proteine beträgt für H7 ungefähr 25kDa und für STAF65, 65 kDa. (15% SDS-PAGE)
- (B) Komplettes His-STAF65 γ wird ebenso wie C2, H7 und H8 mehrfach modifiziert. Das Protein wird mit einem, zwei und drei SUMO-Molekülen konjugiert. (8% SDS-PAGE)

Alle drei Klone werden mehrfach mit SUMO modifiziert (siehe Abbildung 3.22 und 3.32A). Um zu testen, ob das komplette Protein auch modifiziert wird, wurde es mittels PCR aus einer HeLa-cDNA Bibliothek herausamplifiziert und in den Vektor pET28a gebracht, um es als Hexahistidin-Fusionsprotein zu exprimieren. Das Protein wurde nach der Expression nativ über Nickel-NTA aufgereinigt. Komplettes His-STAF65 γ wird wie die partiellen Klone mehrfach SUMOyliert (siehe Abbildung 3.32B).

3.2.9.2. Überexpression von SUMO-1 Δ C4 hat keinen Einfluß auf die nukleare Lokalisation von YFP-STAF65 γ

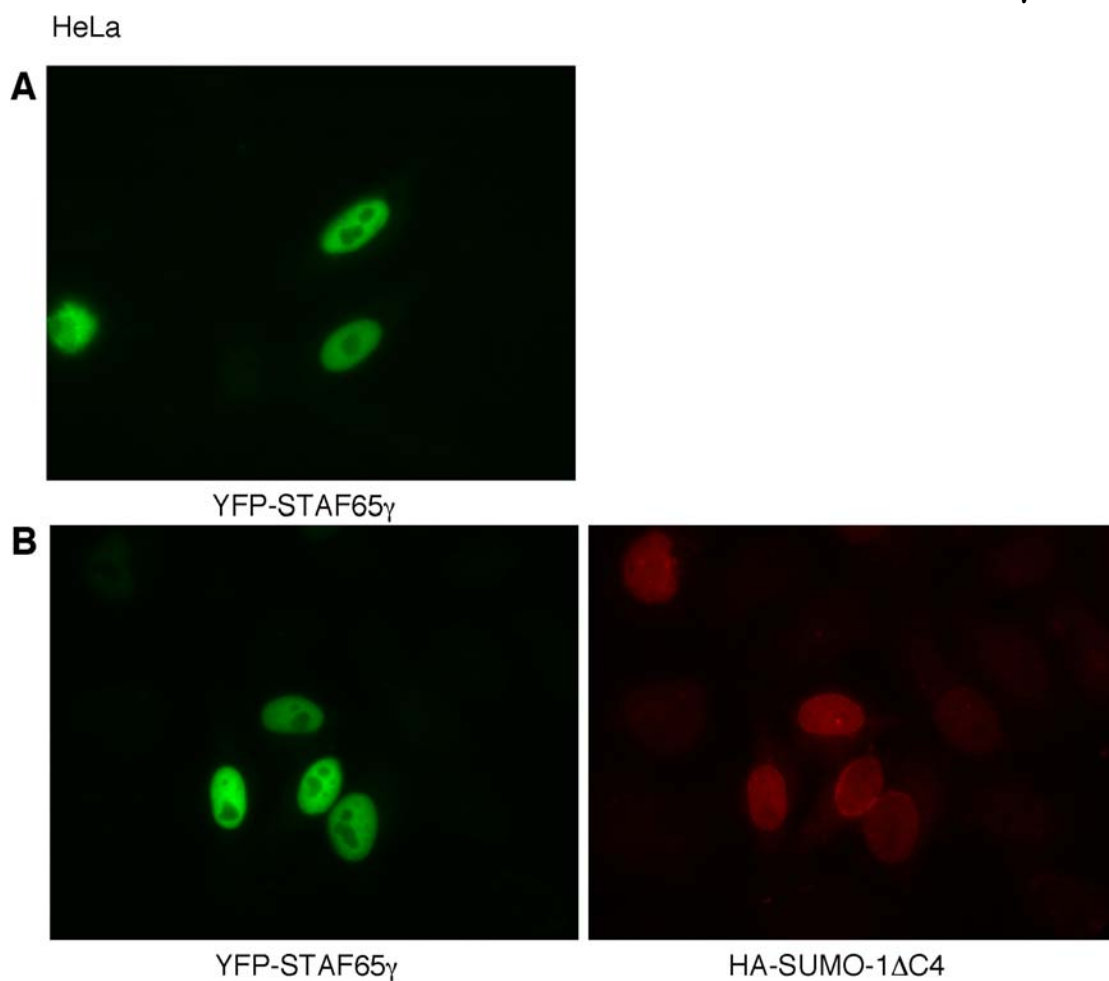


Abbildung 3.33: Lokalisation von YFP-STAF65 γ in HeLa-Zellen

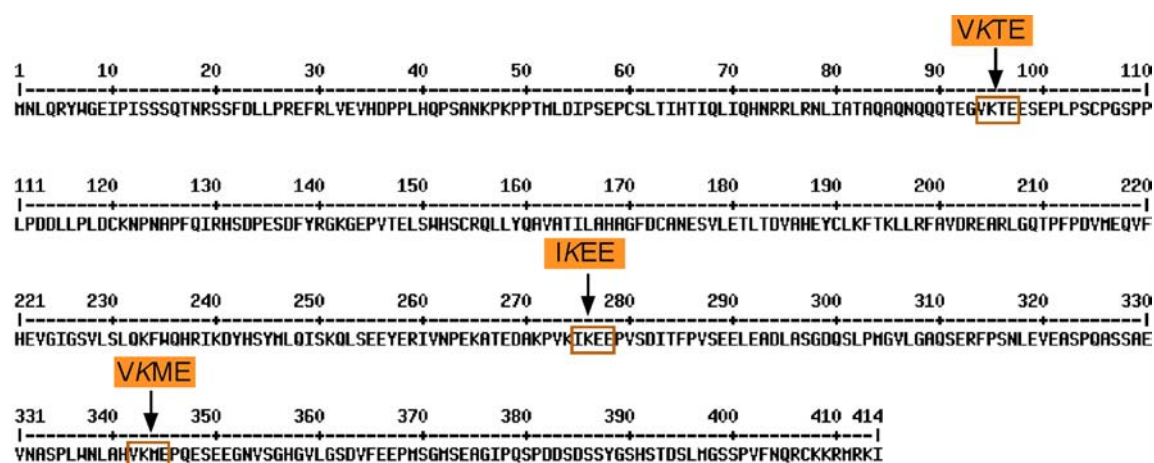
- (A) YFP-STAF65 γ ist rein im Kern lokalisiert, wo es diffus verteilt ist, mit Ausnahme der Nucleoli, die keine Färbung zeigen.
- (B) Die nukleäre Lokalisation von YFP-STAF65 γ ändert sich nicht durch Überexpression von HA-SUMO-1 Δ C4. HA-SUMO-1 Δ C4 wurde mit polyklonalem Anti-HA Antikörper markiert

YFP-STAF65 γ ist rein im Kern lokalisiert (siehe Abbildung 3.33A). Es ist gleichmäßig verteilt, mit Ausnahme der Nucleoli, die kein Färbung aufweisen.

Durch Überexpression von HA-SUMO-1 Δ C4 ändert sich diese Lokalisation nicht. Auch ist keine Änderung des Kernsignals festzustellen, wie z.B. „Speckels“, das YFP-STAF65 γ Signal ist immer noch gleichmäßig im Kern verteilt (siehe Abbildung 3.33B).

3.2.9.3. STAF65 γ besitzt 3 potentielle Akzeptorlysine für die SUMOylierung

Das Auftreten multipler Banden deutet darauf hin, daß alle drei Akzeptorlysine SUMOyliert werden können (siehe Abbildung 3.34). Dies muß aber noch durch Mutanten oder Massenspektrometrie analysiert werden.



Abbildungung 3.34: STAF65 γ besitzt drei potentielle Akzeptor-Lysine

Die Lysine sind unterlegt und mit Pfeilen kenntlich gemacht

3.2.10. SNIP1 (Smad nuclear interacting protein)

SNIP1 interagiert mit dem Smad-Komplex und ist involviert in die transkriptionale Kontrolle. Eine Komponente des Smad-Komplexes wurde bereits als SUMO-Substrat identifiziert. Es handelt sich dabei um Smad4 (Lee et al., 2003, JBC).

3.2.10.1. Erzeugung und Aufreinigung eines Antikörpers gegen SNIP1 in Kaninchen

Rekombinant aufgereinigtes His-SNIP1 wurde laut Protokoll in ein Kaninchen injiziert und das erhaltene Serum wurde mit His-SNIP1 affinitätsgereinigt. Der erhaltene Anti-SNIP1 Antikörper wurde mittels Immunoblot mit HeLa-Zell-extrakt

und rekombinatem SNIP1 auf seine Effizienz hin getestet. Der Antikörper erkennt 20ng rekombinates SNIP1 bis zu einer Verdünnung von 1:1500 ohne Probleme.

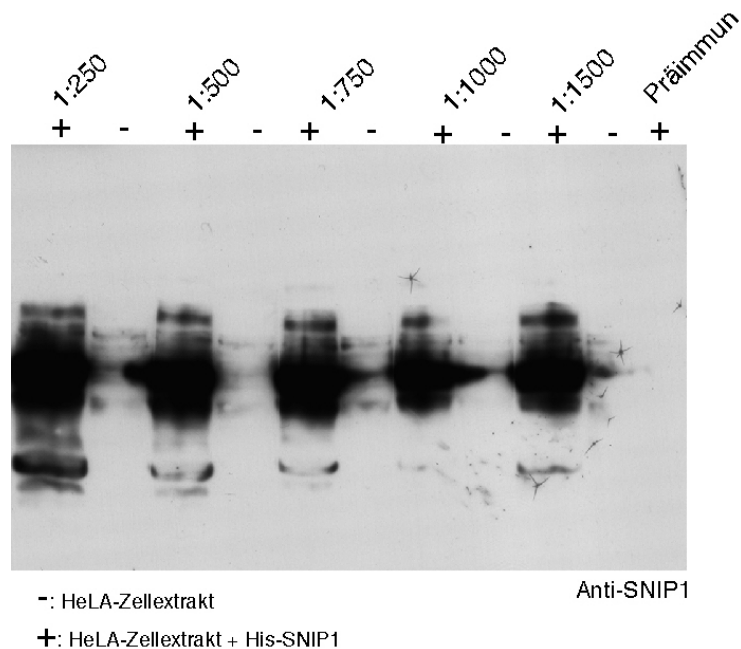


Abbildung 3.35: Test eines polyklonalen Anti-SNIP1 Antikörpers aus Kaninchen

Adhärente HeLa Zellen wurden in der Zellkultur-Schale einmal mit PBS gewaschen und dann sofort in heißem 2xLämmli Puffer abgeschabt und 10 min gekocht. Vor Auftrag auf das 8% SDS-Gel wurden die Zellen sonifiziert und abzentrifugiert. 20ng His-SNIP1 wurden zu dem HeLa-Zellextrakt in der Hälfte der Spuren zugegeben. (markiert durch ein +). Der Antikörper erkennt rekombinates SNIP1.

3.2.10.2. SNIP1 wird *in vitro* einfach SUMOyliert

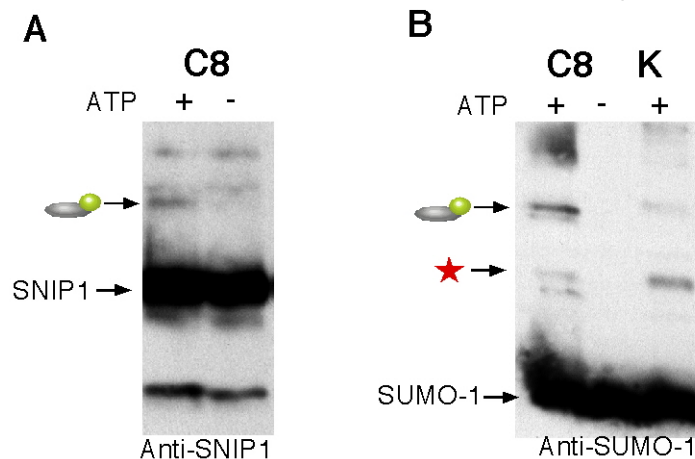


Abbildung 3.36: *In vitro* Modifikation von SNIP1

(A) *In vitro* Modifikation von His-SNIP1 unter den Bedingungen von 4.22

(B) aus Abbildung 4.22

Wie schon in Abbildung 3.22 gezeigt, wird SNIP1 (C8) einfach SUMOyliert.

Es muß überprüft werden, ob die E3-Ligase PIAS γ die Effizienz der Modifikation *in vitro* verstärken kann, wie bei Smad4, oder ob dies durch ein anderes Mitglied der PIAS-Familie zu erreichen ist.

3.2.10.3. Lokalisation von SNIP1 ist unabhängig von SUMO-1 Δ C4 Überexpression

Überexprimiertes YFP-SNIP1 ist nur im Kern zu finden. Die Lokalisation im Kern ist dabei sehr heterogen (Vergleiche Abbildung 3.37 A und B). SNIP1 ist teilweise in „Speckels“ zu finden, die aber nicht ko-lokalisieren mit dem SUMO-Signal. Andererseits ist SNIP1 gleichmäßig verteilt in den Kernen anzutreffen mit Aussparung der Nucleoli, die nicht angefärbt sind (siehe Abbildung 3.37B).

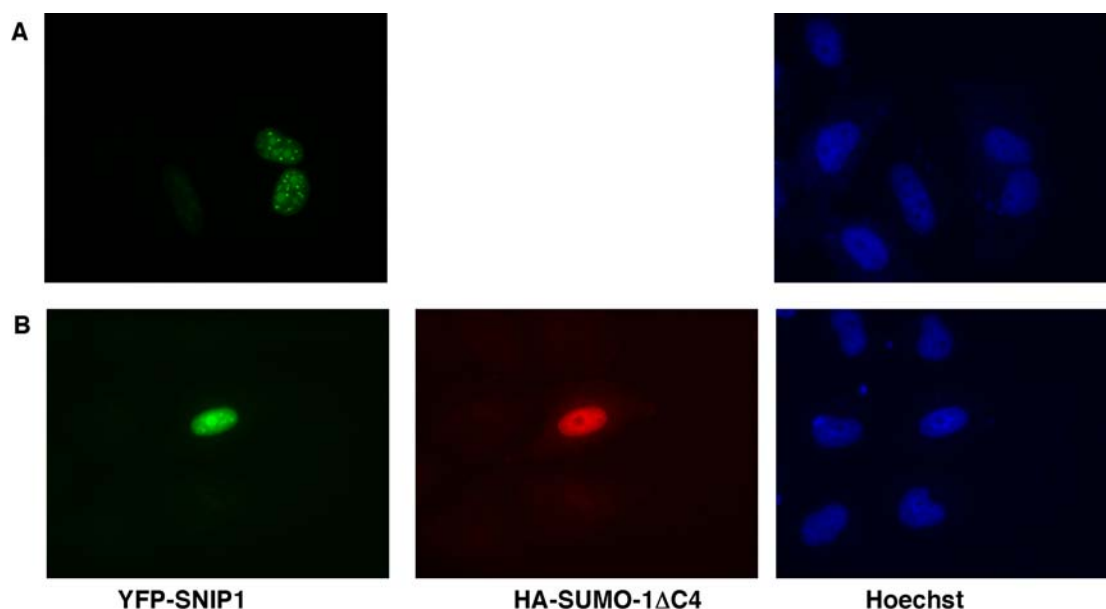


Abbildung 3.38: Lokalisation von YFP-SNIP1 in HeLa-Zellen

- (A) YFP-SNIP1 ist rein im Kern lokalisiert, wo es entweder diffus verteilt ist, mit Ausnahme der Nucleoli, die keine Färbung zeigen, oder in „Speckels“ lokalisiert ist.
- (B) Die nukleäre Lokalisation von YFP-STAF65 γ ändert sich nicht durch Überexpression von HA-SUMO-1 Δ C4. HA-SUMO-1 Δ C4 wurde mit polyklonalem Anti-HA Antikörper markiert

3.2.10.4. SNIP1 besitzt zwei identische Konsensussequenzen zur SUMOylierung

SNIP1 besitzt zwei Lysine, die der klassischen SUMOylierungs-Konsensussequenz entsprechen. Beide Konsensussequenzen sind identisch (VKQE) und liegen etwa 80 Aminosäuren auseinander (siehe Abbildung 3.39). Dies könnte auf eine Doppel-Modifikation von SNIP1 *in vivo* hindeuten. Das Fehlen einer Doppel-Modifikation *in vitro*, so wie der geringe Prozentsatz der Modifikation lassen den Schluß zu, daß *in vivo* die Aktivität einer E3-Ligase benötigt wird. Untersuchungen mit der E3-Ligase PIAS γ bieten sich an, da es sich auch um die E3-Ligase von Smad4, einem anderen Mitglied des Smad-Komplexes handelt.

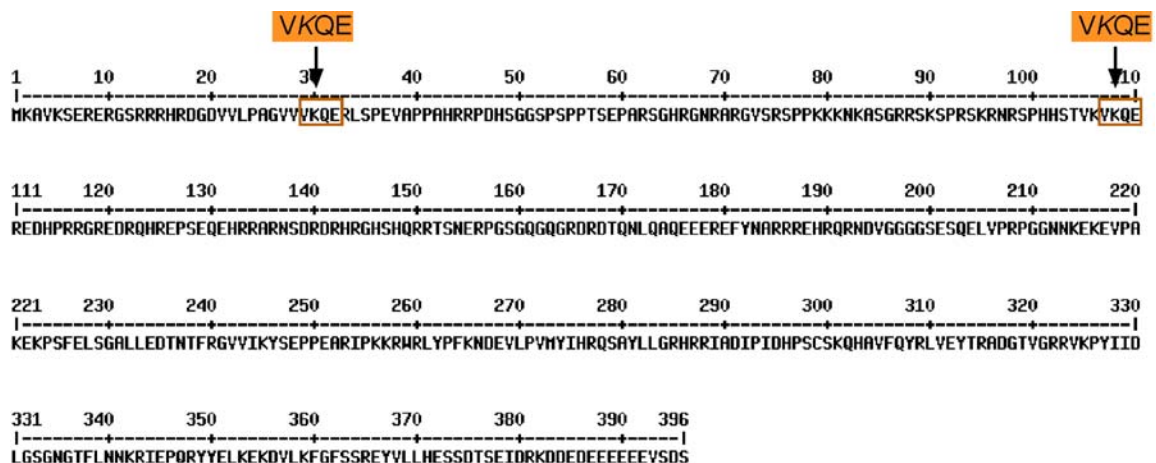


Abbildung 3.39: SNIP1 besitzt zwei Akzeptor-Lysine, die der klassischen Konsensussequenz entsprechen

Die Lysine sind unterlegt und mit Pfeilen kenntlich gemacht

3.2.11. Test auf *in vivo* SUMOylierung bei PUF60, STAF65 γ und SNIP1 durch Aufreinigung His-SUMO-1 Δ C4-modifizierter Proteine aus 293T-Zellen

Um ganz gezielt SUMOylierte Proteine aus Zellen anzureichern und zu untersuchen, wurden 293T-Zellen mit His-SUMO-1 Δ C4 transfiziert. Die Zellen wurden nach 36h in 6M Harnstoff unter Zugabe von Iodoacetamide lysiert und das Lysat nach Zentrifugation auf Nickel-Sephrose gegeben. Nach stringendem Waschen wurde His-SUMO-1 Δ C4 und die davon modifizierten Proteine von der Sepharose eluiert

und auf ein Gel geladen (siehe Abbildung 3.40A). Die Analyse erfolgte mittels verschiedener Antikörper.

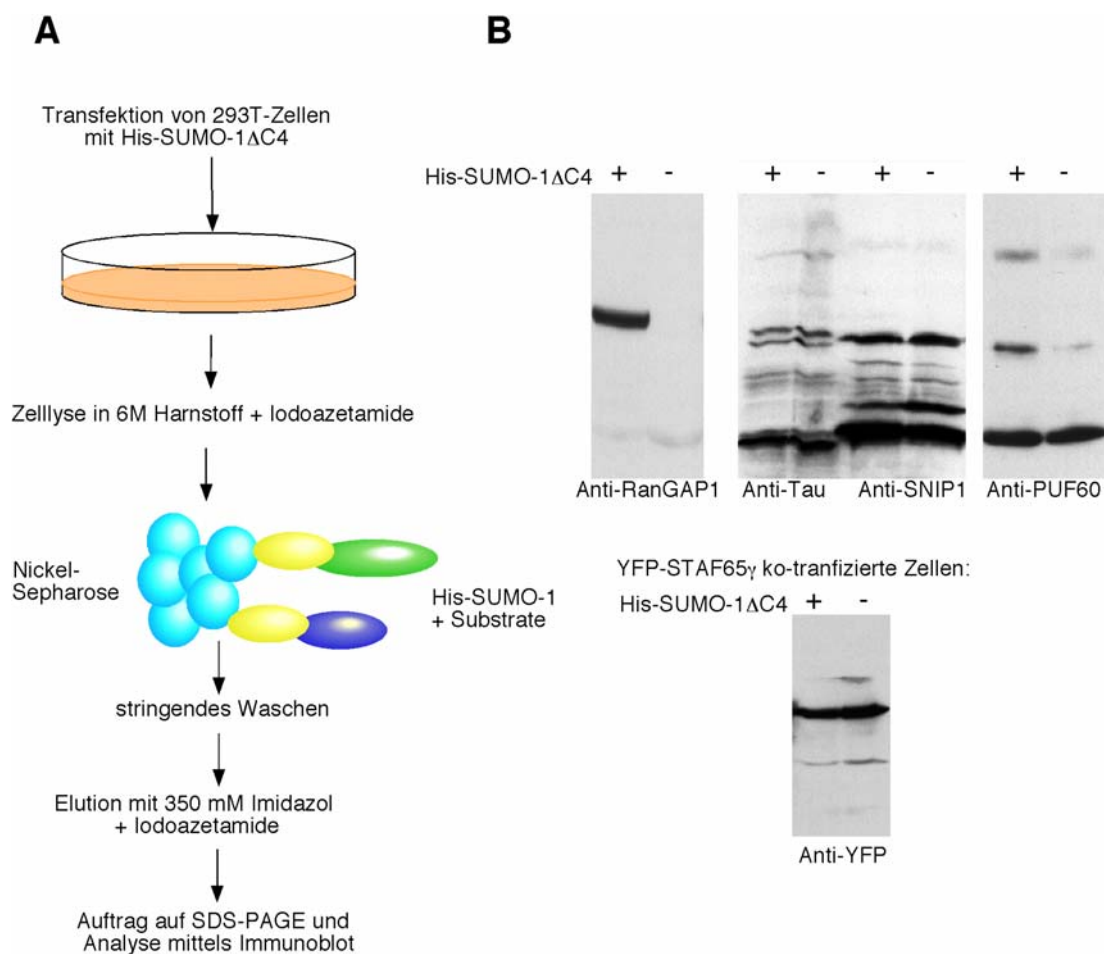


Abbildung 3.40.: Aufreinigung His-SUMO-1ΔC4-modifizierter Proteine aus 293T-Zellen

- (A) Die Zellen wurden wie oben beschrieben transfiziert und lysiert. Nach Inkubation des Lysats mit Nickel-Sepharose wurde stringend gewaschen und die Proteine anschließend eluiert.
- (B) Die Kontrolle zeigt, daß RanGAP1 als His-SUMO-1ΔC4 modifizierte Form herausgezogen wird, während kein Signal in untransfizierten Zellen festzustellen ist (markiert mit einem -)

Obwohl die Kontrolle zeigt, das endogenes RanGAP1 als His-SUMO-1ΔC4 modifizierte Form herausgezogen wurde, konnte kein spezifisches Signal für die anderen Proteine festgestellt werden (siehe Abbildung 3.40B). Auch durch Ko-Transfektion des Plasmids des zu untersuchenden Proteins (3myc-PUF60, YFP-STAF65γ, YFP-SNIP1) brachte kein positives Ergebnis. Es konnten mit den verschiedenen Antikörpern keine spezifischen Banden festgestellt werden. Obwohl die Kontrolle zeigt, das endogenes RanGAP1 als His-SUMO-1ΔC4 modifizierte Form herausgezogen wurde, konnte kein spezifisches Signal für die anderen Proteine festgestellt werden (siehe Abbildung 3.40B). Auch durch Ko-Transfektion des Plasmids des zu untersuchenden Proteins (3myc-PUF60, YFP-STAF65γ, YFP-

SNIP1) brachte kein positives Ergebnis. Es konnten mit den verschiedenen Antikörpern keine spezifischen Banden festgestellt werden.

4. Diskussion

4.1. Identifikation neuer SUMO-Substrate und Interaktoren durch ein „In-Lösungs-Modifikations Verfahren“ und anschließender Peptid-sequenzierung

Das Ziel des neu entwickelten Verfahrens war SUMO-Substrate in Zelllysaten mit GST-SUMO-1 Δ C4 zu modifizieren, um sie anschließend über Gluthatione-Sepharose anzureichern und durch Massenspektrometrie identifizieren zu können. Das bei diesem Verfahren am häufigsten herausgezogene Protein ist RanGAP1. Das war zu erwarten, da es ein ausgezeichnetes SUMO-Substrat und recht abundant in HeLa-Zellen ist. Die zweitstärkste Bande konnte der SUMO-E1-Untereinheit Uba2 zugeordnet werden. Dabei lag Uba2 nicht SUMOyliert vor. Überraschenderweise wurden daneben sowohl die E1-Untereinheiten Aos1 und Uba2, als auch das E2-Enzym Ubc9 SUMO-modifiziert herausgezogen. Neben diesen Proteinen wurden zwei Proteine identifiziert, die vorher noch nicht mit SUMO-1 in Verbindung gebracht werden konnten. DDB1 („DNA-damage binding protein 1“) und ein bisher unbekanntes Protein, benannt UP („Unknown Protein“). Obwohl eine Reihe weiterer Proteine recht abundant vorlagen, führte ihre Sequenzierung zu keinem Ergebnis.

4.1.1. SUMO-Modifikation der modifizierenden Enzyme E1 und E2

Interessanterweise wurden mit diesem Verfahren vor allem die SUMO verknüpfenden Enzyme E1 und E2 als modifizierte Proteine identifiziert. Beide Untereinheiten des E1-Heterokomplexes konnten in diesem Verfahren SUMOyliert mit GST-SUMO-1 Δ C4 gefunden werden. Während Aos1 einfach und doppelt modifiziert vorliegt, wurde Uba2 nur einfach SUMOyliert. Ubc9 konnte ebenfalls einfach und doppelt SUMOyliert identifiziert werden. Die potentiellen Akzeptorlysine sind in Abbildung 4.1. markiert. Aos1 besitzt 2 potentielle Akzeptorlysine, Uba2 und Ubc9 jeweils nur eines, aber mit der identischen Sequenz „FKDD“. Diese Auto-SUMOylierung ist bemerkenswert, da bereits bekannt ist, daß alle bisher identifizierten SUMO-E3-Ligasen selbst Substrat für SUMOylierung sind (z.B. Kagey et al., 2003, Pichler et al., 2002, Saitoh et al., 1997, Schmidt+ Müller, 2002). Daß trotz ihrer Auto-SUMOylierung keine E3-Ligasen in dem Verfahren gefunden wurden, könnte an einem Problem der Nachweisgrenze für diese Proteine liegen. Obwohl nicht ganz auszuschließen ist, daß die SUMOylierung der E1/E2-Enzyme ein Artefakt des Testverfahrens ist (bedingt durch die große SUMO-Menge) könnte das auf einen autoregulatorischen Mechanismus hinweisen. Während bei den SUMO-E3-Ligasen die Funktion der Auto-SUMOylierung noch nicht geklärt wurde, ist bei den Ubiquitin-E3-Ligasen die Selbst-Ubiquitinierung ein gut beschriebenes Phänomen mehrerer Mitglieder der HECT- und RING-Finger Ligasen. So reguliert z.B. die Autoubiquitinierung von IAPs, oder E6-AP deren Stabilität (Nuber et al., 1998, Yang et al., 2000). Es muß in Zukunft getestet werden, ob SUMOylierung der E1- und E2-Enzyme einen Einfluß auf ihre Aktivität, Stabilität und / oder Lokalisation in der Zelle hat.

A Aos1

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
 |-----|
 MVEKEEAGGGISEEEAAQYDRQIRLWGLEAQKRLRASRVLLVGLKGLGAEIAKNLLAGVKGLTMDHEQVTPEDPGAQFLIRTSVSGNRRAESLERAQNLNPHVQVKY

VKVD AKLD

111 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220
 |-----|
 DTEDIEKKPESFFTFQDQVCLTCCSRDVIKVDIICHKNSIKFFTGQVFGYHGYTFANLGEHEFYEEKTKYAKYSQGVEDGPDTKRAKLDSETTHYKKKYVFCPYKEAL

221 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330
 |-----|
 EYDWSSEKAKAALKRTTSDYFLLQVLLKFRDCKGRDPSSDTYEEDSELLQIRNDVLSLGLSPDLLPEDFVRYCFSEHAPVCAVVGGLAQEIYKALSQRDPPHNNFF

331 340 346
 |-----|
 FDGMKNGIIVECLGPK

B Uba2

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
 |-----|
 MALSRGLPRELAEEAVAGGRVLYVGAGGIGCELLKNLVLTFGSHIDLIDLOTIDVSNLRQFLQKKHYGRSKAQVAKESVLFQYPKANIVAYHDSIHNPQYNVEFFRQFI

111 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220
 |-----|
 LVNHALDNRAARNHVNRMCLADYPLIESGTAGYLGQVTTIKKGVTECYECHKPTQRTFPGCTIRNTPSEPIHCIVMAKYLFNQLFGEEDADQEVSPORADPEAMEPT

FKDD

221 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330
 |-----|
 EAEARARASNEGDIKRISTKEWAKSTGYDPVKLFTELKDDIRYLLTHDKLWRKKPPYPLDWAQVQSQGEETNASDQDNEPQLGLKDDQVLDVYSYARLFKSIETLR

331 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440
 |-----|
 YHLAEKGDGAELIMDKDPSANDFYTSANLRHHIFSHNHKSFRDIKSHAGNIIPAIATTNAVIAGLIIVLEGLKILSGKIDQCRTIFLNKQPNPRKLLVPCALOPPNPN

441 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550
 |-----|
 CYYCASKPEVTVRLNVHKYTVLTLQDKIVKEKFAHVAPDVQIEDGKGTILISSEGETEANNHKKLSEFGIRNGSRLQADDFLQDYTLINILHSEDLGKDFEVEYVGDA

551 560 570 580 590 600 610 620 630 640
 |-----|
 PEKVGPKQAEDAAKSITNGSDGAPSTSTAQEQDDVLIVDSDEEDSSNADVSEERSRKRKLDKENLSAKRSRIEQKEELDDVIALD

C Ubc9

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
 |-----|
 MSGIALSRLAQERKAWRKDHFPFGVAVPTKNPDGTHNLNHWCAIPGKKGTPHEGGLFKLRHLFKDDYPSSPPKCKFEPPLFHPNVYPSGTVCLSIIEEDKDWRAITIK

FKDD

111 120 130 140 150 160 170 180 184
 |-----|
 QILLGIQELLNEPNIQDPAQAEYTIYMLVAALAPLVAAPPSPSGRLAGREHSTQAHPRDSQGPRLCGEGRGA

Abbildung 4.1: Potentielle Akzeptorlysine in den E1- und E2-Enzymen von SUMO

(A) Akzeptorlysine in Aos1 (VKVD) (AKLD)

(B) 1 Akzeptorlysin in Uba2 (FKDD)

(C) 1 Akzeptorlysin in Ubc9 (FKDD)

4.1.2. UP (unknown Protein)

Bei dem Verfahren konnte ein bis dahin unbekanntes Protein von ca. 62kDa identifiziert werden. Die sequenzierte Protein-Bande, die dieses Ergebniss erbrachte, lief bei dieser Größe, d.h. das Protein wird un-SUMOyliert herausgezogen. Durch Immunoblotstudien mit einem erzeugten Anti-UP Antikörper wurde gezeigt, daß nur unmodifiziertes UP herausgezogen wird. *In vitro* Studien konnten weder eine SUMOylierung noch eine Bindung an SUMO-1 oder Ubc9 nachweisen. Die Möglichkeit besteht, daß UP kein SUMO-Substrat ist und in einem Komplex mit SUMO, oder mit einem SUMOylierten Protein interagiert. Erstaunlicherweise zeigt UP eine Ähnlichkeit zu F-box-Proteinen aus der Spaltheife. Die Frage stellt sich, ob UP ein Mitglied einer WD-Protein-Familie ist, die an SUMOylierung beteiligt sind. Diese Frage muß in Zukunft durch Identifizierung von Bindungspartnern von UP geklärt werden. Immunofluoreszenz-Studien und Zellfraktionierung zeigten, das UP vor allem an Mitochondrien zu finden ist, wobei ein kleiner Anteil zusätzlich im Kern lokalisiert ist. Führen beide Protein-Populationen unterschiedliche Funktionen aus?

4.1.3. DDB1

Neue Erkenntnisse zeigen, daß DDB1 unspezifisch an Sepharose binden kann (Vordemann und Melchior unpubliziert).

4.2. Identifikation neuer SUMO-Substrate durch ein Filter Modifikations Verfahren

In dieser Arbeit wurden zwei neue biochemische Methoden zur systematischen Identifikation neuer Substrate und Interagierer von SUMO entwickelt. Es sollte dabei vor allem ermittelt werden, in welchen bis dahin noch nicht mit SUMOylierung in Verbindung gebrachten, zellulären Prozessen SUMO noch eine Rolle spielt. In dem zweiten Verfahren wurde versucht, mit rekombinantem biotinyliertem SUMO-1 Δ C4, E1 und E2 unter Zugabe von ATP eine Protein-Expressions-Bibliothek auf einer Membran zu modifizieren, um dadurch neue Substrate zu identifizieren. Ein Vorteil dieses Verfahrens ist, daß die Bibliothek, obwohl sie mit etwa 33000 Klonen vermutlich nicht alle zelleigenen Proteine beinhaltet, einen repräsentativen Querschnitt durch diese Proteine darstellt. Die Abundanz der Proteine auf dem Filter ist unabhängig von der endogenen Protein-Menge, so daß auch Proteine, die auf Protein-Ebene sehr kurzlebig, oder nicht sehr häufig sind, in diesem Verfahren als SUMO-Substrate identifiziert werden können. Darüber hinaus liegen die Proteine einzeln vor, also nicht wie in der Zelle, als Komplex, oder in einem bestimmten zellulären Kompartiment. Dies erlaubt eine Betrachtung des einzelnen Proteins ohne die Einflußnahme anderer zellulärer Faktoren. Der Vorteil ist, daß Proteine dabei gefunden werden, die sonst nur zu einem bestimmten Zeitpunkt, oder in sehr geringer Menge SUMOyliert werden, da die SUMOylierungs-Stelle sonst blockiert ist. Ein Nachteil ist, daß Proteine, die eine zusätzliche posttranslationale Modifikation wie z.B. Phosphorylierung oder eine spezielle E3-Ligase brauchen, um SUMOyliert zu werden, vielleicht nicht in diesem Verfahren identifiziert werden können.

4.2.1. Identifikation der SUMO-Substrate

Auf den Filtern waren über 110 positive Signale. 96 dieser Klone wurden sequenziert und Proteinen zugeordnet. 75 dieser Proteine konnten als Histidin-Fusionsproteine exprimiert und aufgereinigt werden. Beim „Rescreening“ auf Nitrocellulose-Membranen konnten 61 dieser aufgereinigten Proteine SUMOyliert werden. Dies entspricht 81,3% der Proteine. Alle erhaltenen Proteine wurden

ebenfalls in dem „in vitro Modifikations Verfahren“ getestet. Bei 26 der 75 aufgereinigten Proteine konnte dabei eine Modifikation mit SUMO-1 nachgewiesen werden. Das sind 35% der Proteine. Drei Proteine (PUF60, STAF65 γ , SNIP1) wurden volle Länge aufgereinigt und weiter untersucht (siehe Abschnitt 4.3). Alle Proteine aus dem Verfahren, sowie die Resultate der Aufreinigung, vom „Filter-Rescreen“ und der „in vitro Modifikation“ sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Proteine und Resultate aus den Untersuchungen

Klon	Protein	gereinigt	Auf Filter positiv	<i>In vitro</i> positiv
A1	adducin 1 (alpha) (ADD1), transcript variant 2	X	X	X
B1	vesicle amine transport protein 1 synaptic vesicle membrane protein (VAT1)			
C1	•zinc finger protein 238 (ZNF238) •translin associated zinc finger protein-1 (RD58)	X	X	
D1	•alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (RAD54 homolog, S. cerevisiae) •putative DNA dependent ATPase and helicase (ATRX), transcript variant 1	X	X	X
E1	/	X	X	
F1	unconventional myosin IXb (MYO9b)	X	X	X
G1	myosin light chain 1 slow a (MLC1SA)	X		
H1	/	X		
A2	zinc-finger helicase (hZFH)	X	X	X
B2	similar to Nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding) (NASP)	X		
C2	SPTF-associated factor 65 gamma (STAF65(gamma)) •adenocarcinoma antigen ART1/P17	X	X	X
D2	NGFI-A binding protein 2 (EGR1 binding protein 2 oder NAB2)	X	X	X
E2	•E2F transcription factor 1 (E2F1) • (E2F-1) pRB-binding protein	X		
F2	stathmin-like 4 (STMN4)	X	X	
G2	/			
H2	squamous cell carcinoma antigen recognised by T cells (SART1)			
A3	/	X		
B3	ataxin 2 related protein (A2LP), transcript variant 1,	X	X	

C3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C member 8	X	X	X
D3	surfeit 6 (SURF6)	X	X	
E3	chromosome 20 open reading frame 43 (C20orf43)	X	X	
F3	•zinc finger protein 238 (ZNF238) •translin associated zinc finger protein-1 (RD58)			
G3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 8 (DNAJC8),	X	X	
H3	chromosome 11, clone RP11-193F22	X	X	
A4	TRAF family member-associated NFκB activator (TANK)	X		X
B4	chromosome 14 open reading frame 4 (C14orf4)	X	X	X
C4	Similar to hypothetical protein FLJ20378	X	X	
D4	similar to TSG118.1 protein (LOC124151)	X	X	X
E4	hypothetical protein DT1P1A10 (DT1P1A10)	X	X	
F4	Similar to RIKEN cDNA	X	X	
G4	hypothetical protein MGC11349 (MGC11349)	X	X	X
H4	hypothetical protein MGC2491 (MGC2491)	X	X	
A5	•reticulon 4 a (RTN4) •testis specific reticulon 5 •Nogo-A protein (Nogo gene)	X	X	
B5	myelin transcription factor 1 (MYT1)	X		X
C5	•zinc finger protein 238 (ZNF238) •translin associated zinc finger protein-1 (RD58)	X	X	X
D5	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (HnRNPF)	X	X	
E5	microtubule-associated protein tau (MAPT)	X		
F5	calcium-response factor CaRF	X	X	X
G5	•poly-U binding splicing factor PUF60 (PUF60) •FBP-interacting repressor (FIR) fuse-binding protein-interacting repressor	X	X	X
H5	KIAA0824	X	X	X
A6	cytochrome P450, 51 (lanosterol 14-alpha-demethylase) (CYP51)			
B6	chromosome 20 open reading frame 43 (C20orf43), HSPC169	X	X	
C6	•IRS-1 PH domain binding protein PHIP (pleckstrin homology domain interacting protein) •WD repeat domain 11 protein (WDR11)	X	X	

	gene)			
D6	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (HnRNPF)	X	X	
E6	CSF-1 receptor (FMS)	X	X	X
F6	•Xq28 of high-mobility group protein 17 retropseudogene (psHMG17), •melanoma antigen family A1 (MAGEA1) •Zinc finger protein 275 (ZNF275)			
G6	clone RP11-380J17 on chromosome 10 antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 (MKI67),	X	X	
H6	RUN and FYVE domain-containing 1 RUFY1 (RUFY1)	X	X	X
A7	NGFI-A binding protein 2 (ERG1 binding protein 2 oder NAB2)	X	X	X
B7	chromosome 18, clone RP11-9E17			
C7	KIAA0773 gene product (KIAA0773)			
D7	/			
E7	aldehyde dehydrogenase 1 family member B1 (ALDH1B1), aldehyde dehydrogenase 5			
F7	DKFZp434K1421	X	X	
G7	•scaffold attachment factor B (SAFB) •Hsp27 ERE-TATA-binding protein (HET)	X	X	
H7	SPTF-associated factor 65 gamma (STAF65(gamma)) adenocarcinoma antigen ART1/P17	X	X	X
A8	truncated calcium binding protein (LOC51149)	X	X	
B8	tubulin, alpha 3 (TUBA3) hum-a-tub1 alpha-tubulin			
C8	Smad nuclear interacting protein (SNIP1)	X	X	X
D8	microtubule-associated protein tau (MAPT)	X	X	X
E8	KIAA1183 protein	X	X	
F8	/	X	X	X
G8	creatine kinase B			
H8	SPTF-associated factor 65 gamma (STAF65(gamma)), adenocarcinoma antigen ART1/P17	X	X	X
A9	•zinc finger protein 238 (ZNF238) •translin associated zinc finger protein-1 (RD58)	X	X	X
B9	sphingolipid activator protein 1 und 2 (SAP1 und 2)			
C9	sphingolipid activator protein 1 und 2 (SAP1 und 2)	X	X	

D9	Similar to hypothetical protein FLJ20378	X	X	
E9	methyl-CpG binding domain protein 3 (MBD3),	X		
F9	myosin light chain 1 slow a (MLC1SA)			
G9	serologically defined colon cancer antigen 16 (SDCCFAG16)	X	X	
H9	•scaffold attachment factor B (SAFB) •Hsp27 ERE-TATA-binding protein (HET)	X	X	
A10	ribosomal protein L15 (RPL15)			
B10	•islet cell autoantigen 1 (69kD) (ICA1) •IS4 diabetes mellitus type I autoantigen (ICAp69)	X	X	X
C10	•zinc finger protein 238 (ZNF238) •translin associated zinc finger protein-1 (RD58)	X	X	
D10	hypothetical protein MGC21688	X	X	
E10	similar to lymphocyte antigen 6 complex, locus G5B; G5b protein	X		
F10	•sperm associated antigen 7 (SPAG7) •sperm acrosomal protein	X	X	
G10	hypothetical protein MGC21688	X		
H10	HMG domain protein HMGX1 (HMGX1)	X	X	
A11	RAD51 homolog C			
B11	myosin light chain 1 slow a (MLC1SA)	X	X	
C11	RAD51 homolog C			
D11	myosin light chain 1 slow a (MLC1SA)	X	X	
E11	A kinase (PKA) anchor protein 6 (AKAP6)	X	X	
F11	ribosomal protein S2			
G11	•Similar to RIKEN cDNA proliferation associated •cytokine -inducible protein CIP29 •HCC-1 (HSPCB16)	X	X	
H11	zinc-finger helicase (hZFH)	X	X	
A12	block of proliferation 1 (BOP1)	X		
B12	clone IMAGE:5286843			
C12	•Similar to RIKEN proliferation associated •cytokine-inducible protein CIP29 •HCC-1 (HSPCB16)	X	X	
D12	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1 (102kD) (CTNNA1)	X	X	
E12	•lethal giant larvae homolog 1 (Drosophila) (LLGL1),	X		

	•tumour suppressor protein, HUGL			
F12	hypothetical protein MGC10471 (MGC10471)	X		
G12	NP220 nuclear protein (NP220)			
H12	/			

4.2.2. Machen die erhaltenen SUMO-Substrate Sinn?

Bei diesem Verfahren wurden unter anderem Proteine aus dem Bereich der transkriptionalen Kontrolle und Chromatin-assoziierte Faktoren erwartet. Das sind diejenigen Bereiche, aus denen die bisher meisten bekannten SUMO-Substrate identifiziert wurden. Tatsächlich konnten mit dem „Filter Modifikations Verfahren“ zahlreiche neue Proteine aus diesen Wirkungsbereichen gefunden werden.

4.2.2.1. Neue SUMO-Substrate in der Transkriptionsregulation

PUF60 (FIR) (G5) und STAF65 γ (C2, H7, H8) stellten sich sowohl auf dem Filter als auch *in vitro* als ausgezeichnetes Substrat heraus. Der Transkriptions-Ko-Repressor NGF1-A (A7) ist ebenfalls sowohl auf dem Filter als auch *in vitro* sehr gut modifizierbar. Das gleiche gilt für die Transkriptionsfaktoren CaRF (C5) und MYT1 (B5). Auf dem Filter sehr gut modifizierbar waren die Faktoren HET (G7/H9), ZNF238 (C1) sowie HMGX1 (H10). Die gefundenen Transkriptionsfaktoren stellen 18% der positiven Klone auf dem Filter und 27% der positiven Proteine im „in vitro Modifikations Verfahren“ dar.

4.2.2.2. Neue SUMO-Substrate assoziiert mit Chromatin und DNA

Das Rad54 Homolog (D1) wird sowohl auf dem Filter als auch *in vitro* sehr gut modifiziert. Das bereits erwähnte STAF65 γ (C2/H7/H8) kann auch hier erwähnt werden, da es auch eine Rolle in der Chromatin-Acetylierung spielt. Ein weiteres gutes Substrat ist die Zinc Finger Helicase (hZFH) (A2/H11). Zwei weitere Proteine sollten hier erwähnt werden, die leider als C-terminale Fragmente nicht aufreinigbar waren. Es handelt sich hier um NP220 (G12), sowie das humane Rad51 Homolog C

(A11/C11). Letzteres sollte vor allem nochmals untersucht werden, da Rad51 in Hefe SUMOyliert wird.

4.2.2.3. SUMOylierung und das Zytoskelett

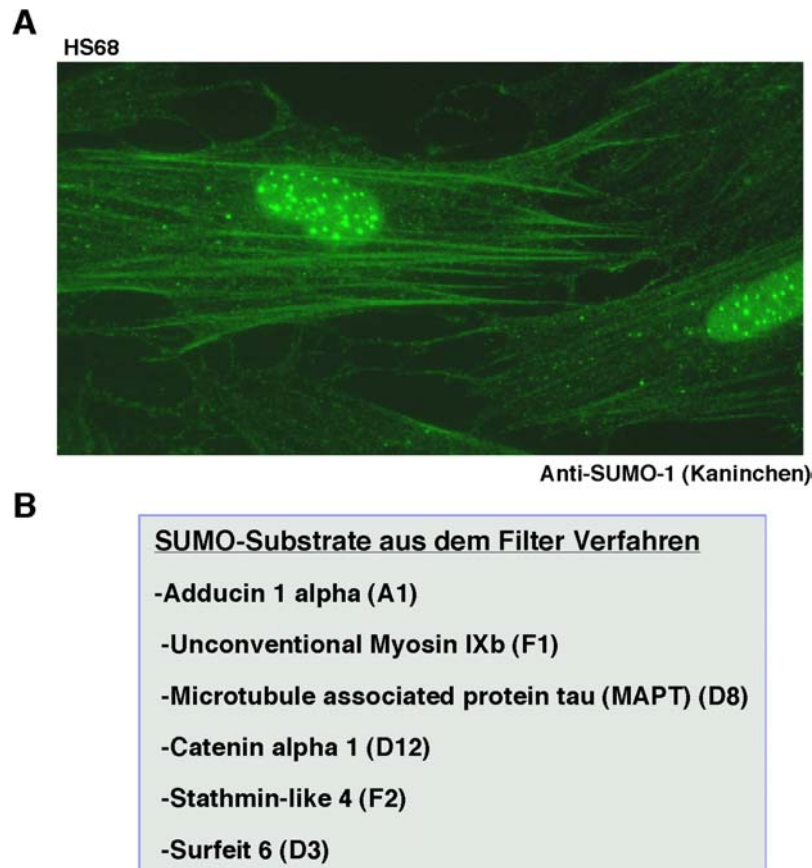


Abbildung 4.2: SUMOylierung und Zytoskelett

(A) Immunofluoreszenz von HS68-Zellen mit Anti-SUMO-1 Antikörper (Kaninchen). Es ist eine deutliche Anfärbung des Zytoskelettes mit dem Antikörper zu erkennen.

(B) Auflistung der SUMO-Substrate aus dem Zytoskelett-Bereich.

Überraschenderweise stellte eine sehr große Gruppe der gefundenen SUMO-Substrate Proteine dar, die mit dem Membranskelett assoziiert sind. Adducin 1 alpha (A1) ist sowohl auf dem Filter als auch *in vitro* sehr gut modifizierbar. Das gilt ebenfalls für das „Unconventional Myosin IXb“, sowie das „Microtubuli associated protein tau“ (MAPT) (D8). Auf dem Filter gut modifizierbar waren Catenin alpha 1, Stathmin-like 4 (F2) und Surfeit 6 (D3). Diese Assoziation zwischen SUMOylierung und Zytoskelett ist vollkommen neu und demzufolge sehr interessant. Vorläufige Fluoreszenzstudien mit dem SUMO-1 Antikörper deuten darauf hin, daß SUMO-1 mit dem Zytoskelett assoziiert sein könnte (Büsgen und Melchior, vorläufige Daten)

(siehe Abbildung 4.2). Dies alles zusammen genommen könnte auf ein neues spannendes Wirkungsgebiet der SUMOylierung deuten.

4.2.2.4. Verbindung zwischen SUMOylierung und Signaltransduktion

Einige wenige Proteine, die Bestandteil von Signaltransduktionswegen sind, wurden bereits mit SUMOylierung in Verbindung gebracht (siehe Tabelle 2.1). Bisher schien aber nichts darauf hinzuweisen, daß SUMOylierung eine weitreichende Steuerungsfunktion in diesen Abläufen zufällt. Im „Filter Modifikations Verfahren“ konnten einige neue Proteine gefunden werden, die sich als ausgezeichnete SUMO-Substrate herausstellten. Dies sind der Tyrosin-Kinase-Rezeptor für CSF-1 (E6), das Substrat RUFY1 (H6) der Etk-Tyrosin-Kinase und das TRAF-Rezeptorassoziierte Protein TANK (A4), die sowohl auf dem Filter als auch in Lösung modifiziert werden. Die SUMOylierung auf dem Filter gelang für die transmembrane Phosphatase SAP1 (C9), PHIP (interagiert mit dem Insulin-Rezeptor) (C6) und das Mpl-Rezeptor-assoziierte Protein A2LP (B3). Diese Klone machen 10% der positiven Proteine auf dem Filter aus. Obwohl ein *in vivo* Beweis noch aussteht, deuten diese Ergebnisse an, daß SUMOylierung stärker in die Signaltransduktion involviert ist, als bisher angenommen.

4.2.3. „Filter Modifikations Verfahren“- ein probates Mittel zur Identifizierung neuer SUMO-Substrate

Mit diesem neuen Verfahren konnten eine Vielzahl potentieller SUMO-Substrate identifiziert werden. Es konnten nicht alle positiven Proteine und ihre Funktion in der Zelle im Einzelnen besprochen werden. Sie wurden in den Tabellen 4.1 und 5.1 zusammengefasst. Neben SUMO-Substraten aus bekannten SUMO-beeinflußten Zellprozessen, wie transkriptionale Regulation, konnte SUMOylierung zum ersten Mal mit dem Zytoskelett in Verbindung gebracht werden. Die Rolle der SUMOylierung in der Signaltransduktion sollte ebenfalls näher untersucht werden. Da die Klone durch verschiedene Verifikations-Schritte gehen, können falsche Klone sehr effizient aussortiert werden. Ein Beispiel hierfür ist das Enzym Cytochrom P450 (Klon A6), das im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, und daher wohl

kaum *in vivo* SUMOyliert ist. Dieses Protein fiel jedoch durch seine Unlöslichkeit aus dem „Rescreen“ heraus.

4.2.4. Untersuchung von volle Länge Proteinen auf ihre SUMOylierung

Drei Proteine, die in dem „*In vitro* Modifikations Verfahren“ SUMOyliert wurden, wurden ausgewählt, um sie weiter zu untersuchen. Es handelt sich dabei um PUF60 (FIR) (G5) und STAF65 γ (C2/H7/H8), die wegen ihrer starken Modifikation ausgewählt wurden, sowie um SNIP1 (C8), das bereits aus dem „Screen“ als volle Länge Protein vorlag.

4.2.4.1. PUF60

In dem „Filter-Modifikations-Verfahren“ wurde ein etwa 20kDa großes Fragment von PUF60 (poly-U binding factor 60), auch bekannt als „FBP interacting repressor“ (FIR), herausgezogen. Das Protein wurde von zwei unterschiedlichen Arbeitsgruppen als Faktor mit verschiedenen Funktionen identifiziert. Zum einen als Spleißfaktor und Interaktor mit p54 (Schonleber et al, 1999), zum anderen als transkriptionalen Regulator der c-myc Gene (Liu et al., 2000). Das komplette Protein ist ebenso wie das C-Terminale Teilstück ein ausgezeichnetes Substrat und benötigt *in vitro* nicht die Hilfe einer E3-Ligase. Die SUMOylierung findet an mehreren Lysinen statt (siehe Abbildung 4.5). Zwei SUMOylierte Formen (Mono- und Di-SUMOyliert) konnten mittels Immunoblot Analyse sowohl bei dem kompletten Protein, als auch bei dem C-terminalen Teilstück (Klon G5) identifiziert werden.

4.2.4.2. STAF65 γ

Bei dem „Screen“ wurden drei Klone dieses Proteins gefunden (C2/H7/H8). Alle werden mehrfach *in vitro* mit SUMO modifiziert. Auch das komplette Protein wird mit mindestens drei SUMO-Molekülen *in vitro* modifiziert. Solch eine Tripel-Modifikation konnte schon für PML gezeigt werden und deutet auf eine wichtige Rolle der SUMOylierung dieses Proteins hin. STAF65 γ besitzt drei potentielle Akzeptorlysine. Es muß durch Mutation-Analysen und Massenspektroskopie geklärt

werden, welches die Akzeptorlysine sind. STAF65 γ ist Teil des STAGA-Komplexes. Dieser Komplex ist an Chromatin-Acetylierung und Ko-Repression transkriptionaler Repression beteiligt. In Zukunft gilt es mehrere interessante Fragen zu beantworten: Wo liegt STAF65 γ innerhalb des Komplexes? Kann es eine Interaktion von anderen Proteinen mit dem STAGA-Komplex vermitteln? Wenn ja, beeinflusst SUMOylierung die Bindung an diese Proteine? Ist die SUMOylierung Zellzyklus-, oder Stimulus-abhängig und wird durch SUMOylierung die Komplex-Zusammensetzung verändert? Ist STAF65 γ die einzige Untereinheit die SUMOyliert wird??

4.2.4.3. SNIP1

Der Rezeptor-aktivierte Smad-Komplex geht in den Kern, wo er mit anderen Transkriptions-Faktoren und Ko-Repressoren interagiert. Einer dieser Faktoren ist SNIP1 (Smad nuclear interacting protein 1). Der Smad-Komplex selbst wird durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Ubiquitinierung reguliert. Smad4 eine Komponente dieses Komplexes, wird SUMOyliert, was zur Lokalisation von Smad4 in den sogenannten „nuclear speckles“ führt (Lee et al., 2003). SNIP1 wurde volle Länge aus dem „Screen“ herausgezogen. Es wird *in vitro* einfach SUMOyliert. Hat diese SUMOylierung von SNIP1 eine ähnliche Funktion für SNIP1?

SNIP1 besitzt zwei klassische Konsensussequenzen für die SUMOylierung. *In vitro* war aber nur eine einfache SUMOylierung feststellbar. Es ist vorstellbar, daß SNIP1 *in vivo* doppelt modifiziert wird, welches jedoch die Aktivität einer E3-Ligase benötigt. Die verschiedene Lokalisation von SNIP1 in den Zell-Kernen wird nicht durch SUMO-1-Überexpression beeinflusst. Es muß überprüft werden, ob eine Überexpression verschiedener E3-Ligasen (z.B. Mitglieder der PIAS-Familie) Einfluß auf die Lokalisation und Modifikation von SNIP1 haben.

4.2.5. Probleme des *in vivo* Nachweises für SUMOylierte Proteine

SUMOylierung ist keine stabile Modifikation, sondern sie unterliegt Zyklen von Modifikation und Demodifikation. Ein SUMO-Substrat ist vielleicht nur zu einem kurzen Zeitpunkt während des Zellzykluses modifiziert, oder wenn es mit bestimmten Proteinen interagiert. Die Modifikation kann auch nur einen Bruchteil des Proteins in der Zelle ausmachen, da diese Menge ausreicht, um eine bestimmte Funktion auszuüben. In Abbildung 5.4 sind verschiedene Mechanismen dargestellt, die SUMOylierung gezielt steuern können. *In vitro* kann ein Protein wie PUF60, STAF65 γ und SNIP1 deshalb ohne Problem modifiziert werden, da die inhibierenden Faktoren nicht vorhanden sind. In der Zelle braucht es jedoch eine ganz bestimmte Kombination von Faktoren, die zur SUMOylierung führen. Wenn die SUMOylierung eine ganz bestimmte Funktion wie z.B. Änderung der Lokalisation oder Interaktion mit anderen Bindungspartnern auslöst, muß sie wenn diese Funktionen nicht benötigt wird, unterbunden werden. Das kann durch Blockierung des Akzeptorlysins (siehe Abbildung 5.4 A-C), oder durch die Aktivität von Isopeptidasen (Abbildung 5.4 D) gewährleistet werden. Dementsprechend schwierig wird es, diese Modifikation *in vivo* nachzuweisen. Aus diesen Schwierigkeiten heraus wurde ja das „Filter Modifikations Verfahren“ entwickelt, um auch Substrate identifizieren zu können, die *in vivo* nicht abundant sind. Wäre der *in vivo* Nachweis für diese Proteine einfach, wären sie bereits als SUMO-Substrate identifiziert worden.

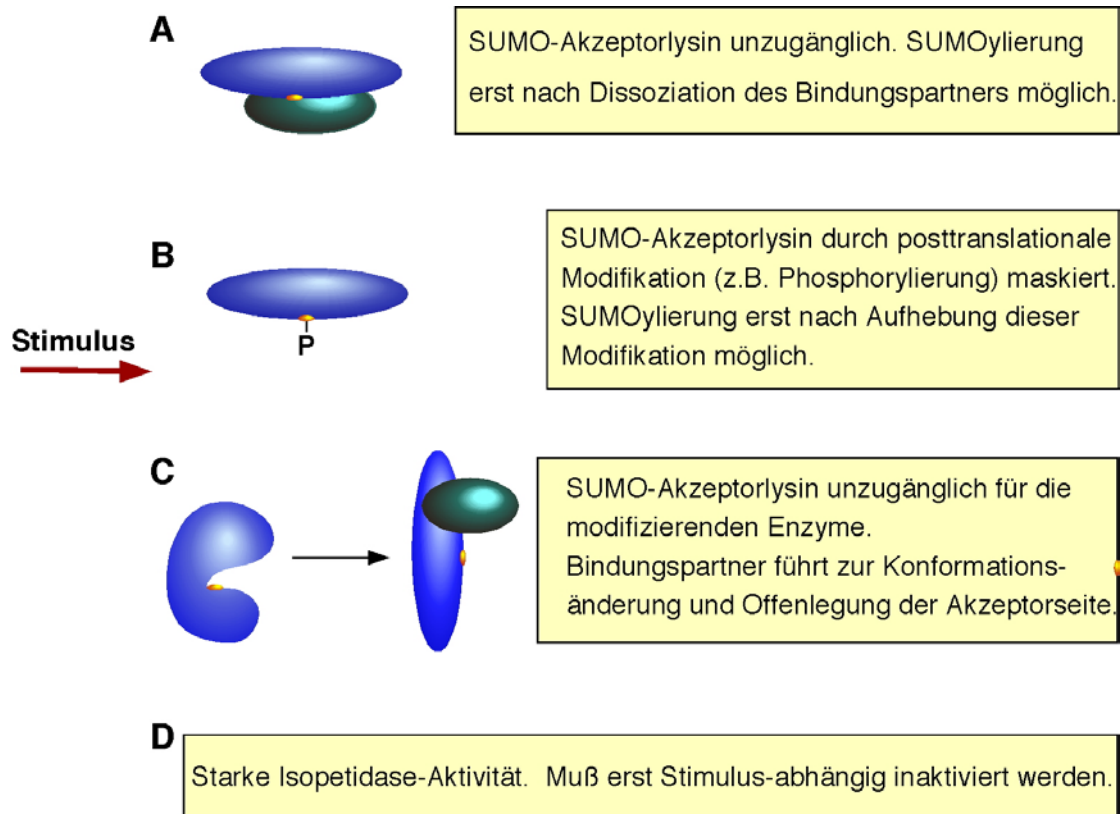


Abbildung 4.4: Verschiedene Stimulie führen zur SUMOylierung von Proteinen.

Die Akzeptorseite in Proteinen kann durch verschiedene Mechanismen blockiert sein, wenn dieser Stimulus fehlt. Das Akzeptorlysin ist dargestellt als roter Punkt.

4.2.6. Vergleich der beiden neuen Verfahren

Beide Verfahren ermöglichen es neue SUMO-Substrate zu identifizieren. Trotzdem besitzen beide Verfahren Vor- und Nachteile, sie wurden in Abbildung 4.5 zusammen- und gegenübergestellt. Während das Filter-Modifikations-Verfahren eine Fülle neuer Substrate erbrachte, kann man das In-Lösung-Modifikations-Verfahren eher als gutes Werkzeug zur Verifikation bereits vermuteter SUMOylierungen ansehen. Beide Verfahren sind neu und funktionieren. Wenn man aber SUMOylierung als eine Art Proteomix-Ansatz untersuchen will, ist dafür nur das Filter-Modifikations-Verfahren geeignet, da es klare Vorteile durch das „Screenen“ von Expressionsbibliotheken besitzt.

In-Lösung-Modifikations-Verfahren	Filter-Modifikations-Verfahren
Vorteile	
- Benutzung der endogenen Enzyme - Vorhandensein der E3-Ligasen - Proteine liegen in natürlichen Komplexen vor - ermöglicht Untersuchung verschiedenster Zellsysteme - Posttranslationale Modifikationen (z.B. Phosphorylierung), die vielleicht für die SUMOylierung benötigt werden, liegen vor.	- Leichte Identifizierung des Proteins - Unabhängigkeit von Abundanz in der Zelle - Ermöglicht Untersuchung ganzer Expressionsbibliotheken - Modifizierung des Verfahrens durch Zugabe von rekombinanten E3-Ligasen möglich - Proteine liegen einzeln vor - keine Isopeptidase-Aktivität: somit Erfassung transienter SUMOylierungen möglich
Nachteile	
- Identifikation durch Protein-Sequenzierung - nur Identifizierung abundanter SUMO-Substrate möglich - starke Auto-SUMOylierung von E1 und E2: erschwert Identifikation neuer Substrate durch Sequenzierung - Kann keine SUMO-Substrate erfassen, deren SUMOylierung transient ist - Aktivität der Isopeptidasen im Lysat	- Proteine liegen als Fragmente vor - <i>In vivo</i> Nachweis der SUMOylierung nötig

Abbildung 4.5: Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile beider Verfahren

5. Zusammenfassung

Die posttranslationale Modifikation mit dem Ubiquitin-verwandten Protein SUMO hat Auswirkungen auf viele zelluläre Abläufe. Die Funktion der SUMOylierung kann hierbei nur durch die Auswirkungen auf ihre Zielproteine erforscht werden. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Verfahren entwickelt, die es ermöglichen neue SUMO-Substrate zu identifizieren. Mit dem „In-Lösungs-Modifikations-Verfahren“, das auf der Aktivität von modifizierenden und demodifizierenden Enzymen in Zelllysaten beruht, gelang die Identifikation der E1- und E2-Enzyme als potentielle SUMO-Substrate. Desweiteren wurde ein bisher unbekanntes WD 40-Protein (UP) identifiziert, und nach Antikörper-Gewinnung zellbiologisch charakterisiert. Es konnte zwar keine SUMOylierung und direkte Interaktion von UP mit SUMO gezeigt werden, seine Ähnlichkeit zu F-box Proteinen aus Spaltheefe macht es aber trotzdem interessant für weitere Forschung.

Das „Filter-Modifikations-Verfahren“, bei dem eine ganze Expressions Biobibliothek auf einem Filter auf SUMOylierung hin untersucht werden kann, erbrachte die Identifizierung von 110 potentiellen SUMO-Substraten. 75 Klone konnten nativ als Histidin-Fusionsproteine aufgereinigt werden. 26 dieser Proteine zeigten *in vitro* eine deutliche SUMOylierbarkeit. Drei Proteine (PUF60, STAF65 γ , SNIP1) wurden zur weiteren Untersuchung als vollständige Proteine aufgereinigt. Diese Proteine konnten dabei ebenso wie ihre C-terminalen Fragmente SUMOyliert werden. PUF60 und STAF65 γ zeigten dabei eine mehrfache Modifikation mit SUMO-1 *in vitro*. Zur weiteren Charakterisierung wurden PUF60- und SNIP1-Antikörper erzeugt. *In vivo* SUMOylierung konnte weder durch Ko-Transfektion mit SUMO-1 Δ C4 (PUF60, STAF65 γ , SNIP1), Immunopräzipitation (PUF60), noch durch Ko-Transfektion mit His-SUMO-1 Δ C4 mit anschließender denaturierender Aufreinigung über Nickel-Sepharose aus 293T-Zellen nachgewiesen werden. Zusammengenommen mit der effizienten *in vitro* Modifikation dieser Proteine läßt dies vermuten, daß diese Proteine *in vivo* z.B. durch eine starke Isopeptidase-Aktivität nur transient modifiziert werden. Durch das „Filter-Modifikations Verfahren“ ist es daher anscheinend möglich sowohl transiente, als auch nicht abundante SUMO-Substrate zu identifizieren.

6. Referenzen

Adamson, A. L. & Kenney, S., **2000** The epstein-barr virus immediate-early protein BZLF1 is SUMO-1 modified and disrupts promyelocytic leukemia (PML) bodies. *J. Virol.* 74, 1224-1233

Andres, G., Alejo, A., Simon-Mateo, C. & Salas, M. L., **2000** African swine fever virus protease: A new viral member of the SUMO-1-specific protease family. *J. Biol. Chem.* 276, 780-787

Abdel-Hafiz H, Takimoto G. S., Tung L, Horwitz K. B., **2002** The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression. *J Biol Chem.* Sep 13;27: 33950-6.

Bayer, P. et al. **1998** Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J. Mol. Biol.* 280, 275-286.

Bernier-Villamor, V. et al., **2002** Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* 108, pp. 345–356.

Bhaskar, V., Valentine, S. A. & Courey, A. J., **2000** A functional interaction between dorsal and components of the Smt3 conjugation machinery. *J. Biol. Chem.* 275, 4033-4040

Bies J, Markus J, Wolff L., **2002** Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity. *J Biol Chem.* Mar 15;277: 8999-9009.

Buschmann, T., Fuchs, S. Y., Lee, C. G., Pan, Z. Q. & Ronai, Z., **2000** SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell* 101, 753-762

Chakrabarti, S. R. et al., **1999** Modulation of TEL transcription activity by interaction with the ubiquitin-conjugating enzyme UBC9. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 7467-7472

Chakrabarti, S. R., Sood, R., Nandi, S. & Nucifora, G., **2000** Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 13281-13285

Chun TH, Itoh H, Subramanian L, Iniguez-Lluhi JA, Nakao K., **2003** Modification of GATA-2 transcriptional activity in endothelial cells by the SUMO E3 ligase PIASy. *Circ Res.* Jun 13;92:1201-8.

Dahle O, Andersen T.O., Nordgard O, Matre V, Del Sal G, 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.* Mar;270(6):1338-48.

David G, Neptune MA, DePinho R.A., **2002** SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC1) modulates its biological activities. *J Biol Chem.* Jun 28;277(26):23658-63.

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

Desterro, J. M., Rodriguez, M. S. & Hay, R. T., **1998** SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol. Cell* 2, 233-239

Desterro, J. M., Rodriguez, M. S., Kemp, G. D. & Hay, R. T., **1999** Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *J. Biol. Chem.* 274, 10618-10624

Duprez, E. et al. **1999** SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localization. *J. Cell Sci.* 112, 381-393

Eloranta J.J., Hurst H.C., **2002** Transcription factor AP-2 interacts with the SUMO-conjugating enzyme UBC9 and is sumoylated in vivo. *J Biol Chem.* Aug 23;277(34):30798-804.

Everett, R. D., Lomonte, P., Sternsdorf, T., van Driel, R. & Orr, A., **1999** Cell cycle regulation of PML modification and ND10 composition. *J. Cell Sci.* 112, 4581-4588.

Fang, S., Jensen, J. P., Ludwig, R. L., Vousden, K. H. & Weissman, A. M., **2000** Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J. Biol. Chem.* 275, 8945-8951

Gawaz M, Douglas M.G., Klingenberg M., **1990** Structure-function studies of adenine nucleotide transport in mitochondria. II. Biochemical analysis of distinct AAC1 and AAC2 proteins in yeast. *J Biol Chem.* Aug 25;265(24):14202-8.

Gill G., **2003** Post-translational modification by the small ubiquitin-related modifier SUMO has big effects on transcription factor activity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, pp. 108–113.

Giorgino, F. et al. **2000** The sentrin-conjugating enzyme mUbc9 interacts with GLUT4 and GLUT1 glucose transporters and regulates transporter levels in skeletal muscle cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 1125-1130

Giraud, M. F., Desterro, J. M. & Naismith, J. H. **1998** Structure of ubiquitin-conjugating enzyme 9 displays significant differences with other ubiquitin-conjugating enzymes which may reflect its specificity for sumo rather than ubiquitin. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 54, 891-898

Gong, L., Kamitani, T., Fujise, K., Caskey, L. S. & Yeh, E. T. **1997** Preferential interaction of sentrin with a ubiquitin-conjugating enzyme, Ubc9. *J. Biol. Chem.* 272, 28198-28201

Gong, L., Li, B., Millas, S. & Yeh, E. T. **1999** Molecular cloning and characterization of human AOS1 and UBA2, components of the sentrin-activating enzyme complex. *FEBS Lett.* 448, 185-189

Gong, L., Millas, S., Maul, G. G. & Yeh, E. T. **2000** Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease. *J. Biol. Chem.* 275, 3355-3359

Goodson M.L., Hong Y., Rogers R., Matunis M.J., Park-Sarge O.K., Sarge K.D.. **2001** Sumo-1 modification regulates the DNA binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor. *J Biol Chem.* May 25;276:18513-8.

Görllich D, Kutay U. **1999** Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* ;15:607-660.

Gravel A, Gosselin J, Flamand L. **2002** Herpesvirus 6 immediate-early 1 protein is a sumoylated nuclear phosphoprotein colocalizing with promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies. *J Biol Chem.* May 31;277:19679-87.

Hardeland U, Steinacher R, Jiricny J, Schar P. **2002** Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *EMBO J.* Mar 15;21:1456-64.

Hang, J. and Dasso, M., **2002** Association of the human SUMO-1 protease SENP2 with the nuclear pore. *J. Biol. Chem.* 277, pp. 19961–19966.

Hershko A, Ciechanover A. **1998** The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.*;67:425-79. Review.

Hicke, L. **2001** Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, pp. 195–201.

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. *Nature Cell Biol.* 2, E153-E157

Hochstrasser, M. **2001** SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell* 107, pp. 5–8.

Hoege, C. et al., **2002** RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, pp. 135–141.

Hofmann, H., Floss, S. & Stamminger, T. **2000** Covalent modification of the transactivator protein IE2-p86 of human cytomegalovirus by conjugation to the ubiquitin-homologous proteins SUMO-1 and hSMT3b. *J. Virol.* 74, 2510-2524 .

Hong Y, Rogers R, Matunis M.J., Mayhew C.N., Goodson M., Park-Sarge O.K., Sarge K.D. **2001** Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem*;276:40263-40267.

Imoto S, Sugiyama K, Muromoto R, Sato N, Yamamoto T, Matsuda T. **2003** Regulation of transforming growth factor-beta signaling by protein inhibitor of activated STAT, PIASy through Smad3. *J Biol Chem.* Sep 5;278(36):34253-8.

Ishov, A. M. et al. **1999** PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein Daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J. Cell Biol.* 147, 221-234

Jackson P. K.. **2001** A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev.* Dec 1;15:3053-8. Review.

Jang M.S., Ryu S.W., Kim E. **2002** Modification of Daxx by small ubiquitin-related modifier-1. *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 12;295:495-500.

Jentsch, S. & Pyrowolakis, G. **2000** Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol.* 10, 335-342

Johnson, E. S. & Blobel, G. **1997** Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J. Biol. Chem.* 272, 26799-26802

Johnson, E. S., Schwienhorst, I., Dohmen, R. J. & 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, E. S. & Blobel, G. **1999** Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J. Cell Biol.* 147, 981-994

Johnson E.S., Gupta A.A. **2001** An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* ;106:735-744.

Kagey, M.H. et al., **2003** The Polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* 113, pp. 127-137.

Kahyo, T. et al., **2001** Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol. Cell* 8, pp. 713-718.

Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H.P., Fukuda-Kamitani, T. & Yeh, E.T. **1998** Characterization of a second member of the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *J. Biol. Chem.* 273, 11349-11353

- Kamitani, T., Nguyen, H.P., Kito, K., Fukuda-Kamitani, T. & Yeh, E.T. **1998** Covalent modification of PML by the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *J. Biol. Chem.* 273, 3117-3120
- Kamitani, T. et al. **1998** Identification of three major sentrinization sites in PML. *J. Biol. Chem.* 273, 26675-26682
- Kawabe, Y. et al. **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. et al., **2000** A new SUMO-1-specific protease, SUSP1, that is highly expressed in reproductive organs. *J. Biol. Chem.* 275, 14102-14106
- Kim, K.I. et al., **2002** Versatile protein tag, SUMO: its enzymology and biological function. *J. Cell. Physiol.* 191, pp. 257–268.
- Kim J, Cantwell C.A., Johnson P.F., Pfarr C.M., Williams S.C., **2002** Transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding proteins is controlled by a conserved inhibitory domain that is a target for sumoylation. *J Biol Chem.* Oct 11;277(41):38037-44.
- Kipreos E.T., Pagano M., **2000** The F-box protein family. *Genome Biol.* ;1(5):REVIEWS3002. Review
- Kirsh, O. et al., **2002** The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *EMBO J.* 21 , pp. 2682–2691.
- Kotaja, N. et al., **2002** PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol. Cell. Biol.* 22, pp. 5222–5234.
- Kovalenko, O.V. et al., **1996** Mammalian ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 interacts with Rad51 recombination protein and localizes in synaptonemal complexes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 2598-2563
- Laemmli U.K., **1970** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* Aug 15;227:680-5.
- Lee J.M., Kang H.J., Lee H.R., Choi C.Y., Jang W.J., Ahn J.H., **2003** PIAS1 enhances SUMO-1 modification and the transactivation activity of the major immediate-early IE2 protein of human cytomegalovirus. *FEBS Lett.* Dec 4;555:322-8.
- Lee, P.S. et al., **2003** Sumoylation of Smad4, the common Smad mediator of transforming growth factor-small beta, Greek family signaling. *J. Biol. Chem.* 278 , pp. 27853–27863.
- Lehembre, F. et al., **2000** Covalent modification of the transcriptional repressor tramtrack by the ubiquitin-related protein Smt3 in *Drosophila* flies. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1072-1082

Lethbridge K.J., Scott G.E., Leppard K.N., **2003** Nuclear matrix localization and SUMO-1 modification of adenovirus type 5 E1b 55K protein are controlled by E4 Orf6 protein. *J Gen Virol.* Feb;84:259-68.

Li, S.J. & Hochstrasser, M., **1999** A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* 398, 246-251

Li, S.J. & 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. & Hochstrasser, M., **2003** The Ulp1 SUMO isopeptidase: distinct domains required for viability, nuclear envelope localization and substrate specificity. *J. Cell Biol.* Mar 31; 160: 1069-81

Lin, X. et al., **2003** Opposed regulation of corepressor CtBP by sumoylation and PDZ binding. *Mol. Cell* 11 , pp. 1389–1396.

Lin, X. et al., **2003** Activation of transforming growth factor-small beta, Greek signaling by SUMO-1 modification of tumor suppressor Smad4/DPC4. *J. Biol. Chem.* 278 , pp. 18714–18719.

Liu, Q. et al., **1999** The binding interface between an E2 (UBC9) and a ubiquitin homologue (UBL1). *J. Biol. Chem.* 274, 16979-16987

Liu J., He L., Collins I., Ge H., Libutti D., Li J., Egly J.M., Levens D., **2000** The FBP interacting repressor targets TFIIF to inhibit activated transcription. *Mol Cell.* Feb;5(2):331-41.

Long, X. & Griffith, L. C., **2000** Identification and characterization of a SUMO-1 conjugation system that modifies neuronal CaMKII in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 275, 40765-40776

Lüders, J., Demand, J. and Höhfeld, J. **2000**. The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J. Biol. Chem.* 275, 4613-4617.

Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. & 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. & 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

Martinez E., Palhan V.B., Tjernberg A., Lyman E.S., Gamper A.M., Kundu T.K., Chait B.T., Roeder R.G., **2001** Human STAGA complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo. *Mol Cell Biol* Oct;21:6782-95.

- Matunis, M.J., Coutavas, E. & 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. & 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
- Matsuzaki K, Minami T, Tojo M, Honda Y, Uchimura Y, Saitoh H, Yasuda H, Nagahiro S, Saya H, Nakao M., **2003** Serum response factor is modulated by the SUMO-1 conjugation system. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 20;306:32-8.
- Mao, Y., Sun, M., Desai, S.D. & Liu, L.F., **2000** SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: a possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 4046-4051
- Mao, Y., Desai, S.D. & Liu, L.F., **2000** SUMO-1 conjugation to human DNA topoisomerase II isozymes. *J. Biol. Chem.* 275, 26066-26073
- Melchior F., **2000** SUMO – nonclassical ubiquitin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16 , pp. 591–626.
- Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M. & Caput, D., **2000** Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J. Biol. Chem.* 275, 36316-36323
- Müller, S., Matunis, M.J. & Dejean, A., **1998** Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J.* 17, 61-70
- Müller, S. et al., **2000** c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.* 275, 13321-13329
- Müller S., Hoege C., Pyrowolakis G., Jentsch S. **2001** SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, Mar;2: 202-10
- Mo Y.Y., Yu Y., Shen Z., Beck W.T., **2002** Nucleolar delocalization of human topoisomerase I in response to topotecan correlates with sumoylation of the protein. *J Biol Chem.* Jan 25;277:2958-64.
- Nakagawa, K. and Yokosawa, H., **2002** PIAS3 induces SUMO-1 modification and transcriptional repression of IRF-1. *FEBS Lett.* 530 , pp. 204–208.
- Nishida, T., Tanaka, H. & 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, Kaneko F, Kitagawa M, 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. and Yasuda, H., **2002** PIAS1 and PIASxsmall alpha, Greek function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* 277, pp. 41311–41317.

Nuber U., Schwarz S.E., Scheffner M., **1998** The ubiquitin-protein ligase E6-associated protein (E6-AP) serves as its own substrate. *Eur J Biochem.* Jun 15;254:643-9.

Ohi, M.D. et al., **2003** Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination. *Nat. Struct. Biol.* 10 , pp. 250–255.

Okuma T, Honda R, Ichikawa G, Tsumagari N, Yasuda H., **1999** In vitro SUMO-1 modification requires two enzymatic steps, E1 and E2. *Biochem Biophys Res Commun*; 254:693-698.

Panse, V.G. et al., **2003** Unconventional tethering of Ulp1 to the transport channel of the nuclear pore complex by karyopherins. *Nat. Cell Biol.* 5 , pp. 21–27.

Pickart, C.M., **2000** Ubiquitin in chains. *Trends Biochem. Sci.* 25 , pp. 544–548.

Pichler A., Gast A., Seeler J.S., Dejean A., Melchior F., **2002** The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* ;108:109-120.

Poukka, H., Karvonen, U., Janne, O.A. & Palvimo, J.J., **2000** Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 14145-14150

Rangasamy D., Wilson V.G., **2000** Bovine papillomavirus E1 protein is sumoylated by the host cell Ubc9 protein. *J Biol Chem.* Sep 29;275:30487-95.

Rangasamy, D., Woytek, K., Khan, S.A. & Wilson, V.G., **2000** SUMO-1 modification of bovine papillomavirus E1 protein is required for intranuclear accumulation. *J. Biol. Chem.* 275, 37999-38004

Rodriguez M.S., Dargemont C., Hay R.T., **2001** SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* ;276:12654-12659.

Rogers R.S., Horvath C.M., Matunis M.J., **2003** SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation. *J Biol Chem.* Aug 8;278: 30091-7.

Ross, S. et al., **2002** SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol. Cell* 10, pp. 831–842.

- Sachdev S., Bruhn L., Sieber H., Pichler A., Melchior F., 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., Pu, R., Cavenagh, M. & Dasso, M., **1997** RanBP2 associates with Ubc9p and a modified form of RanGAP1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94, 3736-3741
- Saitoh, H. et al., **1998** Ubc9p and the conjugation of SUMO-1 to RanGAP1 and RanBP2. *Curr. Biol.* 8, 121-124
- Saitoh H, 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, Pizzi MD, Wang J., **2001** Perturbation of SUMOylation enzyme Ubc9 by distinct domain within nucleoporin RanBP2/Nup358. *J Biol Chem*;277:4755-4763.
- Sampson, D.A. et al., **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, pp. 21664–21669.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., **1977** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology.*;24:104-8.
- Sapetschnig, A. et al., **2002** Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *EMBO J.* 21, pp. 5206–5215.
- Schmidt D., 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 USA*; 99:2872-2877.
- Schonleber Page-McCaw P., Amonlirdviman K, Sharp P.A., **1999** PUF60: a novel U2AF65-related splicing activity. *RNA*. Dec;5(12):1548-60.
- Schwarz, S.E., Matuschewski, K., Liakopoulos, D., Scheffner, M. & Jentsch, S., **1998** The ubiquitin-like proteins SMT3 and SUMO-1 are conjugated by the UBC9 E2 enzyme. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 560-564
- Schwartz D.C., Hochstrasser M., **2003** A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem Sci.* Jun;28(6):321-8. Review.
- Schwienhorst, I., Johnson, E.S. & Dohmen, R.J., **2000** SUMO conjugation and deconjugation. *Mol. Gen. Genet.* 263, 771-786
- Spengler M.L., Kurapatwinski K., Black A.R., Azizkhan-Clifford J., **2002** SUMO-1 modification of human cytomegalovirus IE1/IE72. *J Virol.* Mar;76: 2990-6.
- Sternsdorf, T., Jensen, K., Reich, B. & Will, H., **1999** The nuclear dot protein SP100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers. *J. Biol. Chem.* 274, 12555-12566

Subramanian, L. et al., **2003** A synergy control motif within the attenuator domain of CCAAT/enhancer-binding protein small alpha, Greek inhibits transcriptional synergy through its PIASy-enhanced modification by SUMO-1 or SUMO-3. *J. Biol. Chem.* 278, pp. 9134–9141.

Takahashi, Y., Mizoi, J., Toh, E.A. & Kikuchi, Y., **2000** Yeast Ulp1, an Smt3-specific protease, associates with nucleoporins. *J. Biochem.* 128, 723–725

Takahashi Y, Toh-E A., Kikuchi Y., **2003** Comparative analysis of yeast PIAS-type SUMO ligases in vivo and in vitro. *J Biochem (Tokyo)*. Apr;133: 415–22.

Tatham, M.H. et al., **2001** Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J. Biol. Chem.* 276, pp. 35368–35374.

Tatham, M.H., Kim S., Yu B., Jaffray E., Song J., Zheng J., Rodriguez M.S., Hay R.T., Chen Y., **2003** Role of an N-terminal site of Ubc9 in SUMO-1, -2, and -3 binding and conjugation. *Biochemistry*. Aug 26;42: 9959–69.

Tian S., Poukka H., Palvimo J.J., Janne O.A., **2002** Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor. *Biochem J.* Nov 1;367: 907–11.

Tojo M., Matsuzaki K., Minami T., Honda Y., Yasuda H., Chiba T., Saya H., Fujii-Kuriyama Y., Nakao M., **2002** The aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter is modulated by the SUMO-1 conjugation system. *J Biol Chem.* Nov 29;277: 46576–85.

Ungureanu D., Vanhatupa S., Kotaja N., Yang J., Aittomaki S., Janne O.A., Palvimo J.J., Silvennoinen O., **2003** PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1. *Blood*. Nov 1;102:3311–3.

Weissman, A.M., **2001** Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 , pp. 169–178.

Yamamoto, H. et al., **2003** Sumoylation is involved in small beta, Greek-catenin-dependent activation of Tcf-4. *EMBO J.* 22 , pp. 2047–2059.

Yang S.H., Jaffray E., Hay R.T., Sharrocks A.D., **2003** Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol Cell.* Jul;12:63–74.

Zhang H., Saitoh H., Matunis M.J., **2002** enzymes of SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex. *Mol Cell Biol.* Sep; 22: 6498–508

Zheng N., Wang P., Jeffrey P.D., Pavletich N.P., **2000** Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell.* Aug 18;102: 533–9

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und dabei nur die angegeben Hilfsmittel verwendet habe. Von mir verwendete Quellen sind als solche gekennzeichnet.

München, den