

**SUMOylierung von NFYA -  
Einfluss auf Interaktionen und Kerntransport**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
*Tina Lampe*  
aus Alfeld (Leine)

Göttingen 2008

Referent: Prof. Dr. Frauke Melchior

Zentrum für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Abteilung Biochemie I  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

Korreferent: Prof. Dr. Detlef Doenecke

Zentrum für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Abteilung Molekularbiologie  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2009

Für meine liebe Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Posttranslationale Modifikation mit SUMO</b>	<b>1</b>
1.1.2 Mechanismus der SUMO Konjugation und Dekonjugation	2
1.1.3 Funktion und Regulation der SUMOylierung	4
<b>1.3 SUMOylierung im nukleozytoplasmatischen Transport</b>	<b>10</b>
<b>1.4 Der Transkriptionsfaktor NF-Y - ein Modellsubstrat zur Funktionsanalyse der SUMOylierung</b>	<b>12</b>
<b>1.5 Zielsetzung dieser Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>2. MATERIALIEN</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Chemikalien, Enzyme und Reagenzien</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Allgemeine Puffer &amp; Medien</b>	<b>17</b>
<b>2.3 Verbrauchsmaterial</b>	<b>18</b>
<b>2.4 Kit-Systeme</b>	<b>19</b>
<b>2.5 Technische Geräte</b>	<b>19</b>
<b>2.6 Software</b>	<b>20</b>
<b>2.7 Antikörper</b>	<b>20</b>
<b>2.8 siRNAs</b>	<b>21</b>
<b>2.9 Oligonukleotide</b>	<b>22</b>
<b>2.10 Vektoren &amp; Plasmide</b>	<b>23</b>
<b>2.11 Proteine</b>	<b>25</b>
<b>2.12 Zelllinien</b>	<b>26</b>
<b>2.13 Bakterienstämme (E.coli)</b>	<b>26</b>
<b>3. METHODEN</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Molekularbiologische Techniken</b>	<b>27</b>
3.1.1 Herstellung kompetenter E. coli	27

3.1.2	Transformation kompetenter Bakterien	27
3.1.3	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	28
3.1.4	Präparation von Plasmid-DNA	28
3.1.5	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	29
3.1.6	Agarose-Gelelektrophorese	29
3.1.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	29
3.1.8	Ligation von DNA-Fragmenten	30
3.1.9	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	30
3.1.10	Gerichtete <i>in vitro</i> Mutagenese	31
3.1.11	Sequenzierung von DNA	32
<b>3.2</b>	<b>Biochemische Techniken</b>	<b>32</b>
3.2.1	Nachweis und Trennung von Proteinen	32
3.2.2	Präzipitation von Proteinen	34
3.2.3	Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen aus <i>E.coli</i>	34
3.2.4	Beladen des Ran-Proteins mit GTP	36
3.2.5	<i>In vitro</i> SUMOylierung	37
3.2.6	Massenspektrometrieanalyse der SUMO-Akzeptorstellen im NFYA	37
3.2.7	Anreicherung von His-SUMO-modifizierten Proteinen nach Transfektion	38
<b>3.3</b>	<b>Zellbiologische Techniken</b>	<b>39</b>
3.3.1	Kultivierung adhärenter humaner Zelllinien	39
3.3.2	Kultivierung humaner Suspensionszellen	39
3.3.3	Einfrieren und Auftauen von Gewebekulturzellen	40
3.3.4	Herstellung von HeLa Zytosol	40
3.3.5	Indirekte Immunfluoreszenz	41
3.3.6	Nukleozytoplasmatischer Transport <i>in vitro</i>	42
3.3.7	Transfektion von DNA in Säugerzellen	43
3.3.8	siRNA-vermittelte RNA Interferenz	43
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>46</b>
4.1	NFYA ist ein SUMO Substrat <i>in vitro</i>	47
4.2	NFYA SUMOylierung erfordert <i>in vitro</i> RanBP2 als E3 Ligase	48
4.3	NFYA wird bevorzugt mit SUMO-1 modifiziert	50
4.4	NFYA ist ein SUMO Substrat <i>in vivo</i>	51

<b>4.5 NFYA ist ein RanBP2-abhängiges SUMO Substrat in vivo</b>	<b>53</b>
<b>4.6 Identifikation von SUMO-Akzeptorstellen in NFYA</b>	<b>55</b>
4.6.1 Analyse der SUMOylierung von NFYA Mutanten nach Transfektion	56
4.6.2 Identifikation der SUMO-Akzeptor-Lysine mittels Massenspektrometrie	57
4.6.3 Analyse des Lysin-freien NFYA Proteins 9KR	60
<b>4.7 SUMOylierung von NFYA ist von einer SIM-Sequenz abhängig</b>	<b>61</b>
<b>4.8 NFYA kolokalisiert partiell mit SUMO in HeLa-Zellen</b>	<b>66</b>
<b>4.9 SUMO beeinflusst Interaktionen des NFYA Proteins</b>	<b>69</b>
4.9.1 Interaktion von SUMO-modifiziertem NFYA mit NFYB/C	69
4.9.2 Interaktion von SUMO-modifiziertem NFYA mit Importin $\beta$	72
<b>4.10 SUMOylierung ist für NFYA Kernlokalisierung nicht essentiell</b>	<b>78</b>
<b>4.11 Lysin-freies NFYA wird schneller importiert als Wildtyp</b>	<b>81</b>
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>86</b>
<b>5.1 NFYA ist ein Substrat für die Modifikation mit SUMO</b>	<b>86</b>
5.1.1 Variable SUMO-Akzeptorstellen im NFYA Protein	86
5.1.2 Ist NFYA ein Ziel für die Konjugation mit SUMO1 oder SUMO2?	89
5.1.3 NFYA ist ein <i>in vivo</i> Substrat für die SUMO E3-Ligase RanBP2	91
<b>5.2 Auswirkungen der SUMOylierung von NFYA</b>	<b>93</b>
5.2.1 SUMOylierung als negativer Regulator für Kerntransport?	93
5.2.2 Einfluss der SUMOylierung auf die Transkriptionsaktivität des NF-Y Komplexes	96
<b>5.3 Perspektiven</b>	<b>98</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>100</b>
<b>7. SUMMARY (ENGL.)</b>	<b>101</b>
<b>8. LITERATUR</b>	<b>102</b>
<b>9. ANHANG</b>	<b>112</b>
<b>9.1 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>112</b>

<b>9.2 Symbole für Aminosäuren</b>	<b>114</b>
<b>9.3 Liste der NFYA Mutanten</b>	<b>115</b>
<b>10. DANKSAGUNG</b>	<b>116</b>
<b>Curriculum Vitae</b>	<b>117</b>

## 1. Einleitung

Neben der Regulation der Transkription und Degradation gehören reversible posttranslationale Modifikationen zu den wichtigsten Mechanismen, um Proteine in ihrer Funktion, Aktivität oder Lokalisation zu beeinflussen. Zu den prominentesten posttranslationalen Modifikationen zählen die Phosphorylierung, die Acetylierung, die Methylierung, das Anheften von Zucker- oder Fettresten und die Verknüpfung von Ubiquitin oder anderen kleinen Proteinen aus der Gruppe der Ubiquitin-ähnlichen Proteine. Im nachfolgenden Abschnitt wird die Konjugation mit dem Ubiquitin-ähnlichen Protein SUMO (small ubiquitin-related modifier) näher vorgestellt.

### 1.1 Posttranslationale Modifikation mit SUMO

Wird ein Protein mit dem Ubiquitin-ähnlichen Protein SUMO modifiziert, so spricht man von SUMOylierung. SUMO ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von ~11kDa, das ähnlich wie Ubiquitin posttranslational mit Lysinresten bestimmter Proteine kovalent verknüpft wird. SUMO wurde zuerst als posttranslationale Modifikation von RanGAP1 in Säugerzellen entdeckt (Matunis et al., 1996; Mahajan et al., 1997). SUMO und Ubiquitin weisen kaum Ähnlichkeit in ihrer Sequenz auf (~18% Identität), zeigen jedoch eine sehr ähnliche Tertiärstruktur. In menschlichen Zellen existieren vier SUMO Paraloge (SUMO1-4). SUMO1-SUMO3 sind ubiquitär exprimiert, wohingegen SUMO4 vermutlich hauptsächlich in der Leber, Lymphknoten und der Milz exprimiert wird (Guo et al., 2004). SUMO2 und SUMO3 (im Folgenden als SUMO2/3 zusammengefasst) weisen mit 97% eine hohe Sequenzhomologie auf, sie sind aber nur zu 47% identisch zu SUMO1. Über das vierte Mitglied der SUMO Protein Familie, SUMO4, ist bisher erst wenig bekannt. Es ist auch bis heute unklar, ob SUMO4 an Substrat Proteine konjugiert werden kann. Die Aminosäuresequenz ist zu 87% homolog mit SUMO2. Diesem SUMO Paralog wird neben anderen Funktionen eine Rolle bei Diabetes vom Typ I zugesprochen (Bohren et al., 2004; zusammengefasst in Wang und She 2008).

Für SUMO1 und SUMO2/3 wurden unterschiedliche Funktionen aufgezeigt, dies wird deutlich, wenn man betrachtet, dass sie *in vivo* an unterschiedliche Substrate konjugiert werden (Saitoh und Hinchey, 2000; Vertegaal et al., 2006). Weiterhin

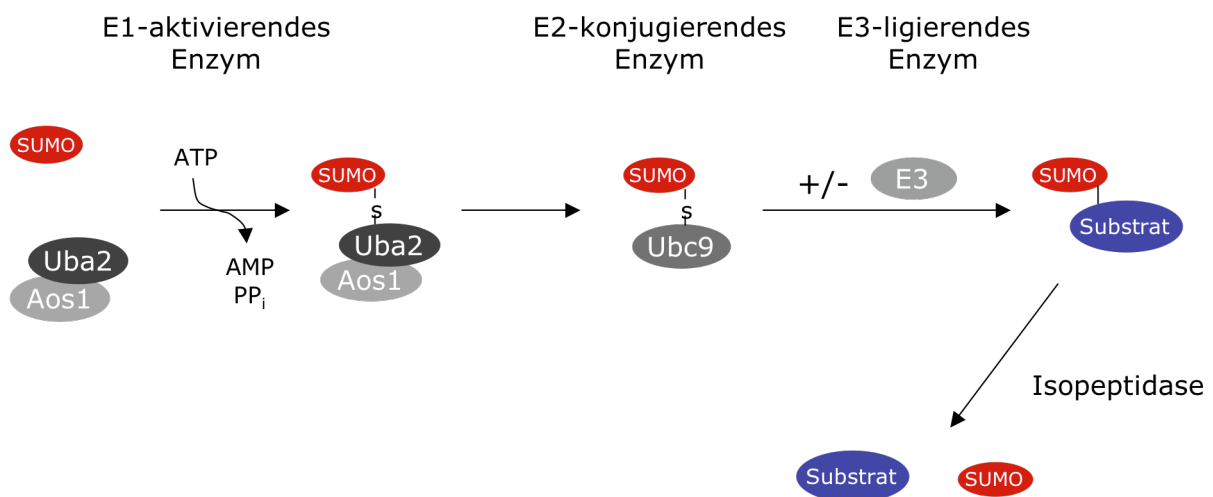


unterscheiden sich SUMO2/3 von SUMO1 in der Fähigkeit SUMO-Ketten zu formen. (zusammengefasst in Ulrich 2008).

### 1.1.2 Mechanismus der SUMO Konjugation und Dekonjugation

Die kovalente Anheftung von SUMO und anderen Ubiquitin-ähnlichen Proteinen erfordert in der Regel drei enzymatische Schritte. Im Folgenden wird der Mechanismus der SUMOylierung eingehender erläutert (zusammengefasst in Hay 2005; Johnson 2004), wie auch in Abbildung 1 veranschaulicht.

SUMO wird als Vorläuferprotein gebildet. Die aktive Form von SUMO wird durch Prozessierung des C-Terminus von einer Gruppe von SUMO-spezifischen Cysteinproteasen (siehe unten) gebildet. Hierdurch wird ein C-terminales Glycin-Glycin-Motiv freigesetzt, welches für die Isopeptidbindung an die Zielproteine erforderlich ist.



#### Abb. 1: Die Enzymatik der SUMO Konjugation und Dekonjugation

Das SUMO E1 Enzym ist ein Heterodimer, bestehend aus Aos1 und Uba2. Es aktiviert das prozessierte SUMO, indem es einen Thioester mit SUMO formt. Im zweiten Schritt wird das aktivierte SUMO auf das SUMO E2 Enzym Ubc9 transferiert. Im finalen Schritt wird SUMO an eine ε-Aminogruppe eines Lysins in einem Substrat übertragen. Dieser Schritt kann durch Ubc9 allein katalysiert werden oder durch die Aktivität von SUMO E3-Ligasen unterstützt werden. Die Modifikation mit SUMO ist ein reversibler und hochdynamischer Prozeß. Das SUMO Protein kann durch die Aktivität von SUMO Isopeptidasen wieder vom Substrat abgespalten werden.

Das prozessierte SUMO wird durch das heterodimere E1 Enzym, bestehend aus den Untereinheiten Aos1 und Uba2, unter ATP-Verbrauch aktiviert. Im folgenden Schritt entsteht eine Thioesterbindung zwischen dem katalytischen Cystein des Uba2 und

SUMO. Anschließend wird SUMO auf das konjugierende E2 Enzym übertragen. Im Gegensatz zur Ubiquitinierung, wo man mehr als 20 E2 Enzyme kennt, ist für die Modifikation mit SUMO bisher erst ein einziges E2 Enzym, das Ubc9, beschrieben worden. Im letzten Schritt der SUMOylierung kommt es zur Bildung einer Isopeptidbindung zwischen der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins des Akzeptorproteins und dem C-terminalen Glycin in SUMO. In den meisten Fällen wird für diesen Schritt eine E3-Ligase benötigt.

In höheren Eukaryoten wurden verschiedene Klassen von SUMO E3-Ligasen nachgewiesen: Zu der Gruppe der SP-RING-Ligasen gehören die PIAS Proteine (engl. „*Protein inhibitor of activated STAT*“; Johnson und Gupta, 2001) und Mms21/Nse2 (Zhao & Blobel, 2005; Andrews *et al.*, 2005; Potts & Yu, 2005). Andere E3 Ligasen sind RanBP2 (Ran binding protein 2; Pichler *et al.*, 2002) und Pc2 (engl. „*Polycomb group protein*“; Kagey *et al.*, 2003). Für manche Substrate, wie RanGAP1 und Sp100, ist die Übertragung von SUMO zumindest *in vitro* auch ohne E3-Ligase möglich (Melchior 2000; Sternsdorf *et al.*, 1999).

Die Verknüpfung eines Proteins mit SUMO kann durch proteolytische Spaltung durch SUMO Isopeptidasen reversiert werden. Alle bekannten SUMO Isopeptidasen gehören zur Familie der Ulp/SEN1 Cystein Proteasen (engl. Ulp: „*Ubiquitin like proteases 1*“; SENP: „sentrin-specific protease“). Säugetiere haben sechs verschiedene Gene, die für SUMO-Proteasen der Ulp1 Familie (SEN1-3, SENP5-7) kodieren. Neben ihrer Isopeptidase-Funktion besitzen SENP Proteine eine C-terminale Hydrolase-Aktivität, welche zur Prozessierung des neu synthetisierten SUMO Proteins benötigt wird (siehe oben). Die Mitglieder der SENP Familie variieren in ihrer Aktivität der Prozessierung im Vergleich zu ihrer Isopeptidase-Aktivität, genauso wie in ihrer Funktion gegenüber den verschiedenen SUMO Subtypen. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass SENP3 und SENP5 präferentiell SUMO2/3 Substrate dekonjugieren (Di Bacco *et al.*, 2006; Gong, L. und Yeh, E.T. 2006). Darüber hinaus zeigen diese deSUMOylierenden Enzyme unterschiedliche subzelluläre Lokalisation. In der Zelle gibt es ein hochdynamisches System zwischen DeSUMOylierung und SUMOylierung. Die kovalente Anheftung von SUMO findet zumeist an spezifischen Verknüpfungsstellen statt. Durch den Vergleich vieler bekannter SUMOylierungsstellen von unterschiedlichen Substraten wurde eine Konsensussequenz definiert. Dabei handelt es sich um die Aminosäuresequenz  $\psi$ KxE.  $\psi$  steht für eine große hydrophobe und x für eine beliebige Aminosäure

(Desterro et al., 1998; Melchior 2000). Ubc9 erkennt dieses Motiv, sofern es sich in einer zugänglichen Konformation befindet, und kann anschließend aktiviertes SUMO auf das Akzeptorlysine (K) des Substrats übertragen (Sampson et al., 2001; Bernier-Villamor et al., 2002). Allerdings gibt es verschiedene Beispiele für Akzeptorlysine, die nicht Bestandteil eines solchen Motivs sind. In diesen Fällen entscheiden offensichtlich andere Faktoren über die SUMOylierung. Beispielsweise wird in *S. cerevisiae* PCNA (engl. „*proliferating cell nuclear antigen*“) das Lysin 164 modifiziert, welches als Teil einer Haarnadel- (engl. „*hairpin*“) Struktur vorliegt. Daneben wird das humane Protein E2-25K hauptsächlich am K14 modifiziert, welches in einer  $\alpha$ -Helix eingebettet ist (Hoege et al., 2002; Pichler et al., 2005).

Eine Möglichkeit, um SUMOylierung an Lysinen auch ohne Konsensussequenz zu gewährleisten, ist ein SUMO-interagierendes Motiv (SIM). Dieses Motiv setzt sich aus hydrophoben Aminosäuren zusammen (V/I-X-V/I-V/I), welche zumeist von sauren Aminosäuren oder Serin-Resten flankiert werden. Das klassische SIM ist das einzige bisher bekannte Motiv, das eine nicht-kovalente Interaktion mit SUMO ermöglicht (Minty et al., 2000; Song et al., 2004; Hecker et al., 2006). Verschiedene Studien über TDG, Daxx, USP25 und BLM zeigen, dass eine Mutation in dem SIM zu einem Verlust der SUMOylierung führt (Takahashi et al., 2005; Lin et al., 2006; Meulmeester et al., 2008; Zhu et al., 2008). Ein SIM ermöglicht im Fall von USP25 und BLM darüber hinaus die Diskriminierung zwischen SUMO Isoformen (Meulmeester et al., 2008; Zhu et al., 2008). Durch seine SIM bindet USP25 beispielsweise präferentiell an SUMO2/3 und wird daher effektiver mit SUMO2/3 als mit SUMO1 modifiziert (Meulmeester et al., 2008). Weiterführende Analysen werden Aufschluss geben, inwiefern es sich hier um einen allgemeinen Mechanismus handelt, oder ob es noch weitere Möglichkeiten gibt, um eine Paralog-spezifische Konjugation zu erzielen.

### 1.1.3 Funktion und Regulation der SUMOylierung

Die kovalente Modifikation mit SUMO kann diverse Auswirkungen haben. SUMOylierung kann die Funktion von Zielproteinen regulieren, indem sie ihren Aufenthaltsort in der Zelle, ihre Stabilität und/oder ihre Fähigkeit, andere Proteine oder DNA zu binden, verändert. SUMOylierung hat einen Einfluss auf Prozesse wie die Translokation zwischen Zellkern und Zytoplasma, Reparatur von DNA,

Chromatin-Modellierung und Repression der Transkription (zur Übersicht siehe Geiss-Friedlander und Melchior, 2007; Zhao, 2007).

Viele der bisher identifizierten Zielproteine der SUMOylierung sind nukleäre Proteine, welche als Transkriptionsfaktoren oder Ko-Regulatoren wirken (zusammengefasst von Lyst und Stancheva, 2007). Bei den meisten bekannten Transkriptionsfaktoren führt eine SUMOylierung zu einer Repression der Transkriptionsfaktoraktivität (zusammengefasst in Gill 2005). Es gibt mehrere Möglichkeiten, wie diese Repression reguliert werden kann. In einigen Fällen scheint die DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren durch eine SUMOylierung inhibiert zu werden (Anckar et al., 2006). Eine andere Möglichkeit ist, dass durch die SUMOylierung, wie oben schon erwähnt, die subzelluläre Lokalisation der Proteine verändert wird. Ein Beispiel ist die Akkumulation des Transkriptionsfaktors Lef1 in Kerndomänen (sog. „PML bodies“) durch die Konjugation mit SUMO (Sachdev et al., 2001). Ein anderes Modell schlägt vor, dass modifizierte Transkriptionsregulatoren Ko-Repressoren rekrutieren, welche Veränderungen in der Chromatinstruktur herbeiführen und somit die Transkription unterdrücken (Hay 2005; Geiss-Friedlander und Melchior, 2007). Konform mit diesem Modell wurde gezeigt, dass Histon-Deacetylasen (Gridwood et al., 2003; Yang und Sharrocks, 2004) und der Korepressor Daxx (Chang et al., 2005; Kuo et al., 2005) zu SUMO modifizierten Transkriptionsfaktoren rekrutiert werden. Kürzlich gelang es Dr. Guntram Suske und seinen Kollegen in einem Genom-übergreifenden RNA Interferenz Versuch in *Drosophila Melanogaster* Zellen SUMO-abhängige Faktoren zu identifizieren, die entweder Transkriptionsrepression vermitteln oder regulieren (Stielow et al., 2008).

Auf der anderen Seite kann aber die SUMOylierung auch zu einer Aktivierung der Transkription führen. Dies wurde zum Beispiel für den Transkriptionsfaktor Oct4 gezeigt. Die SUMOylierung von Oct4 resultiert in einer verstärkten DNA-Bindung und die Aktivität des Transkriptionsfaktors wurde durch die Lysin zu Arginin Mutationen der SUMO-Akzeptorlysine reduziert (Wei et al., 2007).

Häufig wird von einer antagonistischen Rolle von SUMO und Ubiquitin ausgegangen. Jüngere Studien haben allerdings gezeigt, dass SUMO und Ubiquitin auf vielfältige Art und Weise miteinander in Wechselwirkung treten können. So wurde kürzlich eine neue Proteinfamilie von Ubiquitin E3-Ligasen entdeckt, welche spezifisch SUMOylierte Proteine ubiquitinieren und deren Degradation einleiten (Prudden et al., 2007; für einen Überblick siehe Perry et al., 2008).

In der Regel sind drei molekulare Mechanismen die Grundlage der zuvor beschriebenen Auswirkungen. Auf der einen Seite kann das verknüpfte SUMO Protein ein vorher vorhandenes Bindemotiv maskieren. Weiterhin kann die Anheftung von SUMO zur Erschaffung einer neuen Bindestelle führen. Die dritte Möglichkeit ist eine SUMOylierungs-abhängige Konformationsänderung des Proteins.

Die Mechanismen, mit denen die Anheftung von SUMO reguliert werden, sind größtenteils unbekannt. Kürzlich wurde gezeigt, dass Phosphorylierung eine Rolle in der Regulation der SUMOylierung spielen kann (Hietakangas et al., 2006). Eine „globalere“ Methode der Regulation ist auf der Basis der konjugierenden oder dekonjugierenden Enzyme möglich. Bei der Untersuchung eines viralen Proteins namens Gam1 wurde herausgefunden, dass es an den E1 Heterodimer bindet und seine Degradation herbeiführt. Dies führt zu einem kompletten Ausfall der SUMOylierungs-Maschinerie (Boggio et al., 2007). Alternativ kann die reversible Oxidation der SUMO-konjugierenden Enzyme als regulatorischer Mechanismus dienen. Die Oxidation von E1 und E2 führt in Säugerzellen zu einer Verknüpfung der beiden Enzyme, welche daraufhin nicht mehr zur Konjugation zur Verfügung stehen (Bossis und Melchior 2006). Interessanterweise führen vielfältige Formen von Stress zu globalen Änderungen in der SUMOylierung. Neben Befall mit Viren und oxidativem Stress gehören dazu auch osmotischer Stress, Hypoxie und genotoxischer Stress (zusammengefasst in Tempé et al., 2008).

Inzwischen gibt es immer mehr Hinweise, die den Prozess der SUMOylierung mit menschlichen Krankheiten wie Krebs, neurodegenerativen Krankheiten (zum Beispiel Alzheimer, Parkinson und Huntington) oder auch mit Diabetes und der Lippen-Kiefer-Gaumenspalte in Verbindung bringen. Aus diesem Grund könnte SUMO, beziehungsweise die SUMO Maschinerie, auch ein Ziel für therapeutische Ansätze sein (zusammengefasst in Zhao 2007).

## ***1.2 Mechanismen des nukleozytoplasmatischen Transports***

Um Transkription und Translation räumlich voneinander zu trennen und zu verhindern, dass ungespleißte mRNA translatiert wird, ist evolutionär die Kernhülle entstanden. Diese Kompartimentierung eukaryotischer Zellen erfordert einen kontrollierten Austausch von Molekülen zwischen Kern und Zytoplasma (zur Übersicht siehe: Pemberton und Paschal 2005; Cook et al., 2007). Es gibt einige

Proteine, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren, ribosomale Proteine oder Histone, die in den Kern importiert werden, während ribosomale Untereinheiten, verschiedene RNA-Typen in Form von Ribonukleotidpartikeln (mRNA, tRNA, snRNA, etc.) und ausgewählte Proteine ins Zytoplasma exportiert werden müssen. Während Proteine unterhalb einer bestimmten Größe (etwa 50kDa) frei zwischen Zytoplasma und Nukleoplasma hin und her diffundieren können, benötigen größere Moleküle die Hilfe von löslichen Rezeptorproteinen, die einen aktiven Transport vermitteln. Diese aktiven Transportmechanismen sind in der Regel signal- und energieabhängig und erfolgen durch die Kernporenkomplexe („nuclear pore complexes“, kurz NPC), die in der Kernhülle verankert sind. Der Kernporenkomplex besteht aus etwa 30 verschiedenen Proteinen, den Nukleoporinen, die alle in mehrfacher Kopienzahl vorliegen (Cronshaw et al., 2002). Etwa ein Drittel aller Nukleoporine besitzt als charakteristisches Merkmal Wiederholungen der Aminosäuren Phenylalanin-Glycin (sog. „FG-repeats“), über die sie mit hydrophoben Bereichen auf der Oberfläche von Transportrezeptoren interagieren können. Die Familie dieser Transportrezeptoren wird, abhängig von ihrer Aufgabe in der Zelle, in Importine und Exportine eingeteilt (zur Übersicht siehe Fried & Kutay 2003; Weis 2003).

Aktiver Protein-Transport wird initiiert durch das jeweilige Erkennen der Kernlokalisationssequenz („nuclear localization signal“; NLS) oder der Kernexportsequenz („nuclear export signal“; NES). Kernlokalisationssequenzen bestehen meist aus einer Anhäufung basischer Aminosäuren. Diese werden von verschiedenen Importrezeptoren erkannt, die der Importin  $\beta$ -Familie angehören. Hierzu zählen beispielsweise Importin  $\beta$ , Importin 5, Importin 7 oder Importin 9. Ein Beispiel für ein anderes Kernlokalisierungssignal wird von dem Importrezeptor Transportin erkannt. Dies besteht aus einer Glycin-reichen NLS (M9-Sequenz) und vermittelt beispielsweise den Import von hnRNP-Proteinen (Siomi et al., 1997; Nakielnny et al., 1996).

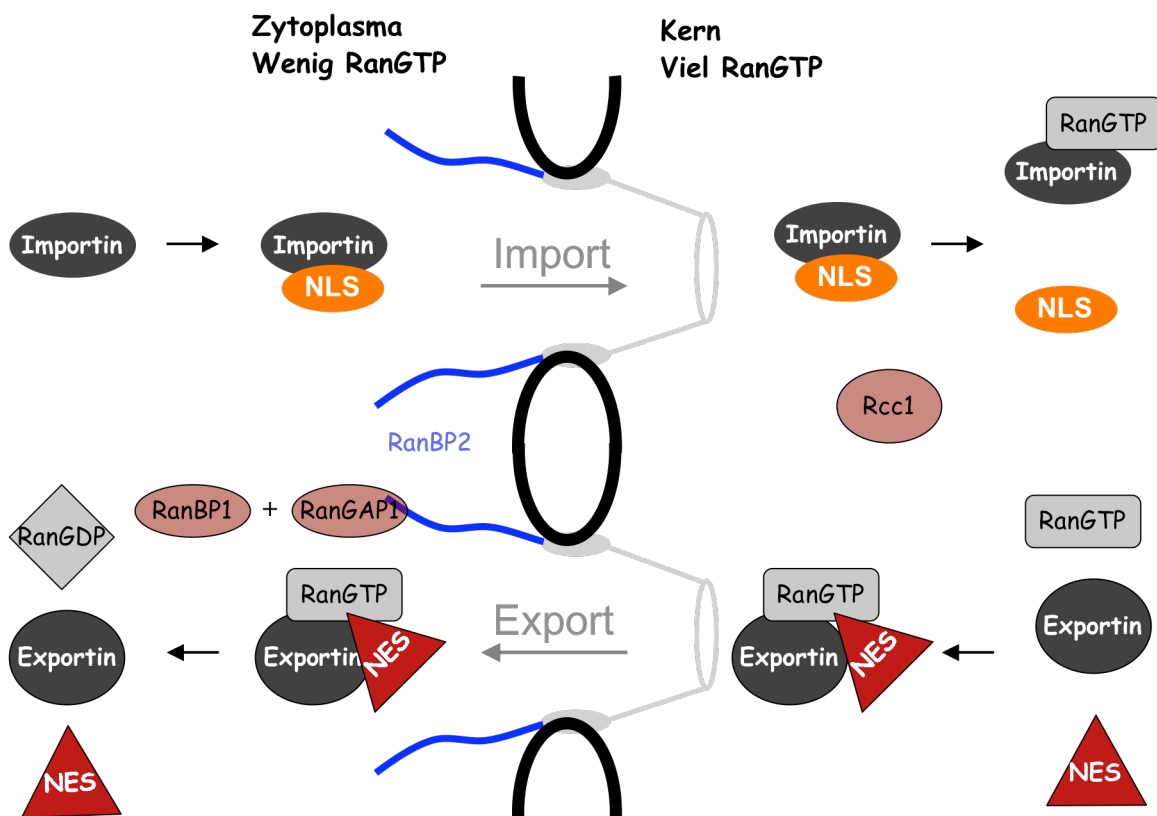
Das am besten charakterisierte Importsignal in Proteinen ist die klassische NLS (classical NLS, cNLS). Sie wird von dem Adapterprotein Importin  $\alpha$  erkannt, das wiederum über eine IBB-Domäne (Importin  $\beta$ -binding domain) an den eigentlichen Transportrezeptor Importin  $\beta$  bindet. Neben indirekter Erkennung einer NLS durch Adaptermoleküle gibt es auch Adaptor-unabhängigen Import. Dies wurde zum Beispiel für die A Untereinheit des heterotrimeren Transkriptionsfaktor NF-Y beschrieben, welcher allein durch Importin  $\beta$  importiert wird (Kahle et al., 2005).

Für die nachfolgende Translokation von Importrezeptor und Substrat durch den NPC ist die kleine Ras-verwandte GTPase Ran notwendig (Melchior et al., 1993; Moore und Blobel 1993; Bischoff & Ponstingl, 1991b). Die Interaktion von Ran mit Transportrezeptoren begünstigt entweder die Bildung oder die Zerstörung eines Transportrezeptor-Substrat-Komplexes. Der RanGTP-Zyklus bestimmt die Richtung des Transportvorgangs. Die GTP gebundene Form des Ran Proteins liegt sehr stark angereichert im Kern vor. Diese Lokalisation von RanGTP wird durch spezifische Regulatoren von Ran, dem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor RCC1 (engl. „*regulator of chromosome condensation 1*“) und dem GTPase aktivierenden Protein, RanGAP, erzeugt (zusammengefasst in Izaurralde und Adam 1998; Cole und Hammell 1998). RCC1 befindet sich im Kern und erleichtert den Austausch des Ran-gebundenen GDP mit GTP. Im Gegensatz dazu stimuliert das zytoplasmatische RanGAP1 (GTPase-aktivierende Protein) zusammen mit RanBP1 (Ran-bindendes Protein 1) oder den Ran-bindenden Domänen von RanBP2 die Hydrolyse von GTP zu GDP.

Der Importrezeptor und das Substrat binden nach dem Durchtritt durch die Kernpore die kleine GTPase Ran in ihrer GTP-gebundenen Form. Es bildet sich ein Importin- $\beta$ :RanGTP Komplex und zeitgleich lösen sich das zu transportierende Protein und das eventuell gebundene Importin  $\alpha$  (Görlich et al., 1996b; Rexach und Blobel, 1995). Importin  $\alpha$  wird dann vom Kernexport Faktor CAS und RanGTP gebunden. Sowohl Importin- $\beta$ :RanGTP als auch CAS:RanGTP:Importin- $\alpha$  gelangen zurück ins Zytoplasma und werden dort durch die Hydrolyse von RanGTP durch RanGAP getrennt (siehe Abbildung 2). Dadurch stehen die Importrezeptoren einem weiteren Importzyklus zur Verfügung.

Der Hauptexportweg für Proteine wird durch Exportin1, welches auch CRM1 (engl. „*chromosome region maintenance 1*“) genannt wird, vermittelt (Fornerod et al., 1997a; Stade et al., 1997; zur Übersicht siehe Hutten und Kehlenbach, 2007). CRM1 erkennt Proteine mit kurzen, Leucin-reichen Sequenzen, den Kernexportsignalen (NES). Diese Leucin-reichen Kernexportsequenzen wurden ursprünglich im viralen HIV-1 Rev Protein (Fischer et al., 1995) und in dem cAMP-abhängigen Proteinkinaseinhibitor PKI (Wen et al., 1995) beschrieben. Der trimere Exportkomplex, bestehend aus CRM1, Transportsubstrat und RanGTP, wandert durch die Kernpore ins Zytoplasma. Der Exportkomplex kann nur in Anwesenheit hoher Konzentrationen von RanGTP, im Kern gebildet werden. Im Zytoplasma

hydrolysiert Ran mit Hilfe von RanGAP1 und RanBP1 als Kofaktoren das RanGTP zu RanGDP und zerstört damit den Komplex, so dass alle Faktoren freigesetzt werden (siehe Abbildung 2). Der NES-CRM1-abhängige Export kann durch Leptomycin B (LMB) inhibiert werden. Dieses Antimykotikum bindet an CRM1 und verhindert so die Bildung des trimeren Exportkomplexes (Kudo et al., 1998; Nishi et al., 1994).



**Abb. 2: Transportvorgänge über die Kernmembran in Abhängigkeit von Ran**

Oben: Import. Unten: Export. Die Lokalisation von Rcc1 im Kern und RanGAP1, RanBP1 und RanBP2 im Zytoplasma bestimmt, ob das Ran Protein im GTP- und GDP-gebundenen Zustand vorliegt. In Abhängigkeit des Ran Zustandes können sich Im- oder Exportkomplexe formen.

Durch den Exportprozess gelangt ein Ran Molekül aus dem Kern hinaus. Daher benötigt der Kern-Zytoplasma-Transport für den Re-Import von Ran einen eigenen Ran-Transporter. Diese Aufgabe übernimmt das NTF2 (engl. „*nuclear transport factor 2*“) (Ribbeck et al., 1998; Smith et al., 1998). NTF2 bindet RanGDP im Zytoplasma und entlässt es nach erfolgtem Nukleotidaustausch als RanGTP im Kern.



Manche Proteine besitzen sowohl eine NLS als auch eine NES. Diese Proteine können mehrmals im- oder exportiert werden. Posttranslationale Modifikationen, wie zum Beispiel Phosphorylierung und/oder die Assoziation von Kofaktoren, können einen Einfluss auf die Zugänglichkeit dieser Lokalisationssignale haben und somit die Verteilung eines solchen Proteins in der Zelle beeinflussen (zusammengefasst in Fabbro und Henderson 2003; Terry et al., 2007).

### ***1.3 SUMOylierung im nukleozytoplasmatischen Transport***

Die Modifikation mit SUMO kann sowohl im Zytoplasma als auch im Kern erfolgen, wobei der Großteil der bisher beschriebenen SUMO-Substrate Kernfunktionen erfüllt. In Frauke Melchior's Labor wurde im Jahr 2002 gezeigt, dass das Kernporenprotein RanBP2, auch bekannt als Nup358, eine SUMO E3-Ligase Aktivität besitzt (Pichler et al., 2002). RanBP2 ist der Hauptbestandteil der zytoplasmatischen Filamente der Kernpore und bildet in der Zelle einen Komplex mit der SUMOylierten Form des RanGAP1. RanGAP1 ist per se ein lösliches, zytoplasmatisches Protein; allerdings wird es nach Modifikation mit SUMO zu den zytoplasmatischen Filamenten des Kernporenkomplexes rekrutiert. Das GTPase aktivierende Protein RanGAP1 ist das erste identifizierte SUMO Substrat (Matunis et al., 1996; Mahajan et al., 1997). Beide, RanGAP1 und RanBP2, sind Komponenten der Kern-Zytoplasma-Transportmaschine (zusammengefasst in Fried und Kutay 2003; Pemberton und Paschal 2005). Interessanterweise wurde ebenfalls gezeigt, dass das E2 konjugierende Enzym Ubc9 in einem Komplex mit SUMO1-modifiziertem RanGAP1 und RanBP2 vorkommt (Lee et al., 1998; Saitoh et al., 1997).

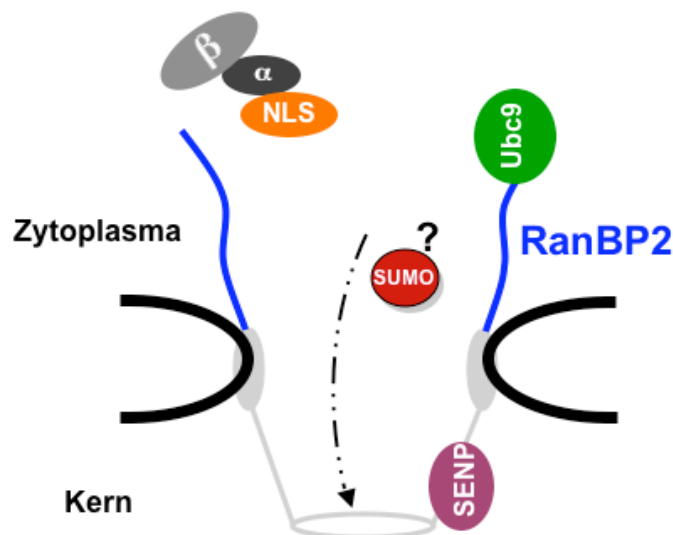
Neben RanBP2, RanGAP1 und Ubc9 ist auch von einer SUMO Isopeptidase bekannt, dass sie am Kernporenkomplex lokalisiert. Humanes SENP2 befindet sich durch eine Interaktion mit dem nukleären Kernporenprotein Nup153 auf der Kerninnenseite des NPC's (Hang und Dasso, 2002; Zhang et al., 2002). Diese Lokalisation von SENP2 scheint sehr wichtig zu sein, da seine Misslokalisierung zu einer verstärkten DeSUMOylierung von SUMO1-Konjugaten führt (Zhang et al., 2002).

Die Tatsache, dass so viele verschiedene Proteine, die an dem Prozess der (De-)SUMOylierung beteiligt sind, am Kernporenkomplex lokalisieren, deutet auf einen Zusammenhang zwischen SUMOylierung und Kerntransport hin (zusammengefasst

in Pichler und Melchior 2002). Diese Hypothese wird durch verschiedene Veröffentlichungen gestützt:

So wurde für den Transkriptions-Korepressor CtBP1 gezeigt, dass die SUMO defiziente Mutante weniger im Kern lokalisiert als der Wildtyp. Dies deutet darauf hin, dass SUMOylierung von CtBP1 entweder den Import beschleunigt oder das Protein im Kern zurückhält (Lin et al., 2003). In einer Publikation über den Transkriptionsfaktor Elk1 wird spekuliert, dass SUMOylierung von Elk1 den Kern-Zytoplasma-Transport beeinflusst und zu einer Akkumulation von Elk1 im Kern führt (Salinas et al., 2004). Ein Beispiel, in dem SUMOylierung den Export beeinflusst, ist der Transkriptionsfaktor TEL. TEL wird posttranslational mit SUMO an Lysin 99 modifiziert. Die Mutation des SUMO-Akzeptorlysins 99 zu Arginin beeinträchtigt den Kernexport von TEL (Wood et al., 2003).

Auch Transport von Preribosomen aus dem Kern ins Zytoplasma wird durch SUMOylierung beschleunigt. Sowohl SUMOylierung als auch DeSUMOylierung werden für diesen Exportprozess benötigt (Panse et al., 2006). Allerdings scheint SUMOylierung keinen generellen Einfluss auf alle Transportwege zu haben, da für einige Proteine gezeigt wurde, dass sich SUMOylierung nicht auf den Kern-Zytoplasma-Transport auswirkt (siehe zum Beispiel MDMX; Pan et al., 2005).



### Abb. 3: Verbindungen zwischen Kern-Zytoplasma-Transport und SUMOylierung

Die Kernpore vereint mehrere Proteine der SUMOylierungs-Maschine. Auf der zyttoplasmatischen Seite befindet sich die SUMO E3-Ligase RanBP2 und das daran gebundene E2 Enzym Ubc9. Auf der Innenseite des Kerns ist die Isopeptidase SENP2 lokalisiert. Dieses Modell zeigt einen möglichen Zusammenhang zwischen Kern-Zytoplasma-Transport und SUMOylierung.

Aufgrund der Lage von RanBP2 in den zytoplasmatischen Filamenten der Kernpore wäre es möglich, dass spezifische Substrate, welche ein Kernlokalisierungssignal besitzen, an der Kernpore durch die SUMO E3-Ligase Aktivität SUMOyliert werden. Dies kann unter Umständen während des Transportprozesses oder zur Verhinderung einer Translokation durch den NPC geschehen (Pichler et al., 2002; Modell siehe Abbildung 3). Diese Hypothese wird durch die Entdeckung unterstützt, dass Mutationen in der NLS von mehreren Proteinen deren SUMOylierung verhindern. Beispiele sind Sp100, HDAC4, Smad4 und MDM2 (Sternsdorf et al., 1999; Kirsh et al., 2002; Miyauchi et al., 2002; Lin et al., 2003).

Andererseits wurde in Hefe, welches weder NPC-assoziiertes RanBP2 noch RanGAP besitzt, gezeigt, dass die Abwesenheit von SUMO Konjugation den klassischen Kernimport beeinträchtigt. In den verwendeten Hefe-Stämmen konnte eine Akkumulation von Importin  $\alpha$  im Kern beobachtet werden (Stade et al., 2002). Diese Beobachtung könnte möglicherweise auf ein Importin  $\alpha$  Recycling-Problem zurückzuführen sein.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass es viele Hinweise für eine Verbindung zwischen SUMOylierung und Kern-Zytoplasma-Transport gibt.

#### **1.4 Der Transkriptionsfaktor NF-Y - ein Modellsubstrat zur Funktionsanalyse der SUMOylierung**

Zu Beginn meiner Doktorarbeit konnte ich zeigen, dass die A Untereinheit des NF-Y Transkriptionsfaktors ein Substrat für SUMOylierung *in vitro* und *in vivo* ist (siehe Ergebnissteil, Abschnitt 4.1 und 4.4). Deshalb soll der Transkriptionsfaktor NF-Y und insbesondere die NFYA Untereinheit hier näher vorgestellt werden.

Der hochkonservierte Transkriptionsfaktor NF-Y, der auch als CBF (engl. „CCAAT binding factor“) bezeichnet wird, bindet mit hoher Spezifität an das CCAAT-Element, das in ungefähr 60% aller Promotoren vorkommt. Der Holo-Komplex, der aus drei Untereinheiten (NFYA, NFYB und NFYC) besteht, hat eine sehr hohe Affinität zu DNA. Die Dissoziationskonstante von NF-Y liegt zwischen  $10^{-10}$  und  $10^{-11}$  M und ist eine der niedrigsten von allen gemessenen Transkriptionsfaktoren (Kim et al., 1990 und Bi et al., 1997). NF-Y kann sowohl als Aktivator als auch als Repressor wirken (Peng und Jahroudi 2002), ein Befund der auch für eine Reihe von SUMOylierten

Transkriptionsfaktoren beschrieben wurde (zum Beispiel Sp3; zusammengefasst in Valin und Gill 2007).

Die Hauptaufgabe von NF-Y ist, synergetisch mit anderen Transkriptionsfaktoren auf Promoterelemente einzuwirken (Zusammenfassung in Maity und de Crombrughe, 1998; Mantovani 1999). Zu den Genen, welche durch den Transkriptionsfaktor NF-Y reguliert werden, gehören Gene, die während der Entwicklung reguliert werden, Gene die nur in bestimmten Geweben exprimieren (Berry et al., 1992; Ronchi et al., 1996), Zellzyklus-regulierte Gene (Caretti et al., 2003), induzierbare sowie viele andere konstitutiv exprimierte Gene (Marziali et al., 1997; Roy und Lee 1995).

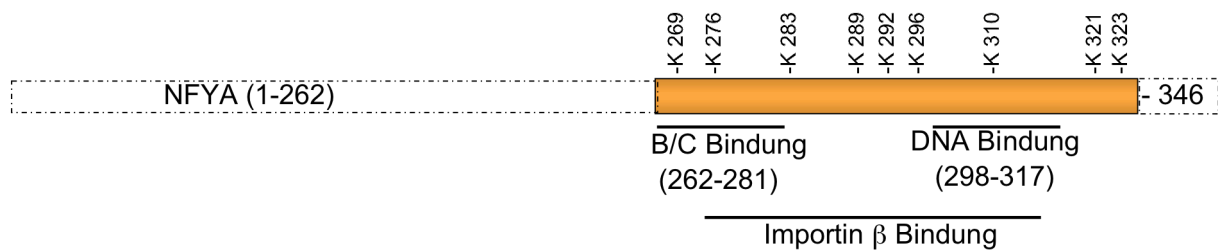
Nur der Komplex aus allen drei Untereinheiten hat eine Funktion als Transkriptionsfaktor. Er wird durch Assoziation von NFYA an den Heterodimer NFYB/NFYC gebildet. NFYB und NFYC gehören zu einer Familie von Proteinen die ein Histon-Falt-Motiv als Strukturelement enthalten (Kim et al., 1996; Sinha et al., 1996).

Im Jahr 2003 wurde gezeigt, dass die Deletion von NFYA (-/-) in Mäusen bereits in frühen embryonalen Stadien letal ist (Bhattacharya et al., 2003). Auch mit einer dominant-negativen Mutante von NFYA, die nicht mehr an DNA binden kann, konnte eine Hemmung des Zellwachstums von Fibroblasten beobachtet werden (Hu et al., 2000). Die Expression von NFYA variiert in Abhängigkeit der Phasen des Zellzyklus und ist in post-mitotischen Zellen herunterreguliert. Dabei handelt es sich um eine posttranslationale Regulation, da die NFYA mRNA relativ konstant bleibt. Die Proteinmengen von NFYB und NFYC sind dagegen unverändert (Bolognese et al., 1999, Farina et al., 1999). Laut Dr. Roberto Mantovani liegen die B und die C Untereinheit des Komplexes im Vergleich zu NFYA im Überschuss vor (Ceribelli et al., 2008). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die A Untereinheit des Komplexes eine regulatorische Funktion übernimmt.

Einige Beispiele für posttranslationale Modifikationen von NFYA werden im Folgenden beschrieben. Im Jahr 2003 wurde publiziert, dass NFYA ein Substrat für Phosphorylierung ist (Yun et al., 2003). Diese Phosphorylierung ist Zellzyklus-abhängig und beeinflusst nicht den Proteinlevel von NFYA. In der Veröffentlichung wurde auch gezeigt, dass Cdk2 die Kinase für die NFYA Phosphorylierung ist. Die Phosphorylierung hat keinen Effekt auf die Bildung des Heterotrimers, ist aber notwendig für effiziente DNA-Bindung von NF-Y. Diese Ergebnisse passen zu der

Lokalisation der beiden Phosphorylierungsstellen (Serin 320 und 326) in der Nähe der DNA-Bindungs-Domäne (AS 298-317) von NFYA.

Neben der Phosphorylierung wurde kürzlich postuliert, dass die regulatorische NFYA Untereinheit ein Substrat für Ubiquitinylierung und Acetylierung ist (Manni et al., 2008). Alle diese posttranslationalen Modifikationen finden in einer hochkonservierten Domäne im C-terminalen Teil des NFYA Proteins statt. Dieser Bereich enthält die einzigen Lysinreste des Proteins, neun an der Zahl. Er kann in zwei funktionelle Hälften unterteilt werden, in der jeder Teil etwa 20 Aminosäuren lang ist. Diese beiden Bereiche sind durch ein 16 Aminosäuren langes Verbindungsstück voneinander getrennt. Der N-terminale Teil des konservierten Bereichs wird zur Bindung des B/C Dimers benötigt, und der C-terminale Bereich enthält die DNA Bindungsdomäne (siehe Abbildung 4).



**Abb. 4: Schematische Darstellung des NFYA Proteins**

Darstellung des C-Terminus von NFYA, Bindungsdomäne für NFYB und NFYC, sowie der Bereich, an den Importin β bindet. Die Position der neun Lysine im NFYA ist ebenfalls graphisch dargestellt.

Detlef Doenecke und seine Kollegen konnten zeigen, dass sich das Kernlokalisierungssignal von NFYA ebenfalls im konservierten C-Terminus befindet und mit der NFYB/C- und der DNA-Bindungsdomäne überlappt. Konsistent mit diesem Befund wird NFYA unabhängig von NFYB/C in den Zellkern transportiert. Während NFYB und NFYC als Heterodimer durch Importin 13 in den Kern gelangen, wird monomeres NFYA durch Importin β transportiert (Kahle et al., 2005).

### ***1.5 Zielsetzung dieser Arbeit***

Das 358kDa Protein RanBP2/Nup358 ist Teil der Kern-Zytoplasma-Transportmaschinerie und dient als Andockstelle für Transportkomplexe auf ihrem Weg aus oder in den Kern. Neben dieser Funktion im Transport besitzt RanBP2 auch eine SUMO E3-Ligase Aktivität. Abgesehen von RanBP2 lokalisieren auch das SUMO E2 konjugierende Enzym und eine SUMO Isopeptidase an der Kernpore. Diese Befunde legen eine Verbindung zwischen Kerntransportprozessen und der SUMOylierung von Transportsubstraten nahe. Denkbar ist beispielsweise, dass ein Transportsubstrat durch seinen Importrezeptor zur Kernpore rekrutiert wird, um dort durch die E3-Ligase Aktivität von RanBP2 mit SUMO modifiziert zu werden.

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Zusammenhänge zwischen SUMOylierung und Kern-Zytoplasma-Transport zu untersuchen. Dazu war es nötig, zunächst ein RanBP2-abhängiges kernständiges SUMO-Substrat zu identifizieren. Nachdem dies gelang, sollte dieses Protein zunächst generell als SUMO-Substrat charakterisiert werden und anschließend auf seine Transportfähigkeit in Abhängigkeit von der SUMOylierung hin untersucht werden.

## 2. Materialien

### 2.1 Chemikalien, Enzyme und Reagenzien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Standard-Chemikalien und Puffersubstanzen wurden über die Firmen AppliChem (Darmstadt), CARL ROTH GmbH (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Merck (Darmstadt) bezogen. Die Bezugsquellen von Spezialreagenzien sind im Folgenden aufgelistet:

[ $\gamma^{32}\text{P}$ ]GTP	Amersham
Acrylamid (30%)	AppilChem
Aprotinin	Biomol
ATP	Sigma
BSA	PAA
Creatinphosphat	Calbiochem
Creatinphosphokinase	Calbiochem
Digitonin	Calbiochem
DNA-Marker	Fermentas
dNTPs	Fermentas
ECL	Pierce
FCS	Gibco
FuGENE6	Roche
GDP	Sigma
Hoechst 33258	Sigma
IPTG	Fermentas
Leptomycin B (LMB)	Geschenk von Dr. M. Yoshida (Tokio, Japan)
Leupeptin	Biomol
Mounting Medium PermaFluor	Beckmann Coulter
Oligofectamin	Invitrogen
OptiMEM	Invitrogen
Pepstatin	Biomol
Phusion Polymerase	New England Biolabs
PMSF	Sigma

Polyfect	Qiagen
Poly-L-Lysin	Sigma
Restriktionsenzyme	Fermentas, New England Biolabs
RNase Inhibitor	Fermentas
Sequenziermix, -puffer	Applied Biosystems
T4-DNA-Ligase	Fermentas
Vent-Polymerase	New England Biolabs

## 2.2 Allgemeine Puffer & Medien

ATP	100 mM ATP, 100 mM Mg-Acetat, 20 mM HEPES pH 7.4
Coomassie-Färbelösung	50% (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 2.5% (w/v) Brilliant Blue R250
Coomassie-Entfärber	50% (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure
DMEM high (Gibco)	High Glucose (4500 mg/ml), 10% (v/v) FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
DNA-Probenpuffer (10x)	50% (v/v) Glycerin, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 0,1% (w/v) Xylencyanol
Geltrockner	20% (v/v) Ethanol, 1% (v/v) Glycerin
GuHCl	6M Guanidinium HCl, 0.1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 8.0, 1 mM Tris/HCl
Laemmli-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 0,1% (w/v) SDS
OptiMEM (Gibco)	ohne weitere Zusätze verwendet
P1	50 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
P2	200 mM NaOH, 1% (v/v) SDS
P3	3 M Kaliumacetat pH 5.5
PBS (10x)	140 mM NaCl pH7.0, 2,7 mM KCl, 9 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS-Tween	0.2% (v/v) Tween in PBS
Ponceau-S Lösung	0,5% (w/v) Ponceau-S, 1% (v/v) Essigsäure



Proteinprobenpuffer (4x)	4% (w/v) SDS, 125 mM Tris pH 6,8, 10% (v/v) Glycerin, 0,02% (w/v) Bromphenolblau, 10% (v/v) DTT
SAB ("SUMO assay buffer")	1x Transportpuffer, 0,05% (v/v) Tween 20, je 1 µg/ml Aprotinin und Leupeptin/Pepstatin, 1 mM DTT
SOC-Medium	2% (w/v) Trypton, 5% (w/v) Hefe-Extrakt, 50 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub>
TAE (50x)	2 M Tris, 0,05 M EDTA pH 8, 5,8% Essigsäure
TE (1x)	10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA
TFB-I-Puffer	100mM RbCl <sub>2</sub> , 50mM MnCl <sub>2</sub> , 30mM KAc, 10mM CaCl <sub>2</sub> , 15% Glycerin, 0,5mM LiCl, pH mit 10% Essigsäure auf pH 5,8 einstellen (steril filtriert)
TFB-II-Puffer	10mM MOPS, 10mM RbCl <sub>2</sub> , 75mM CaCl <sub>2</sub> , 15% Glycerin, pH mit 0,1 N NaOH auf pH 7 einstellen (steril filtrieren)
Transportpuffer (1x)	20 mM Hepes pH 7,3, 110 mM KOAc, 2 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> , 1 mM EDTA, 2 mM DTT, je 1 µg/ml Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin
Harnstoffpuffer	8M Harnstoff, 0.1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 8.0, bzw. pH 6.3 , 1 mM Tris/HCl
Western Blot-Puffer	25 mM Tris/HCl, 193 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,036% (v/v) SDS

### **2.3 Verbrauchsmaterial**

Autoradiographie-Filme	Amersham; BioMax
Filterpapier (Whatman)	Biometra, Göttingen
Glasplättchen (10 oder 12mm)	Marienfeld, Bad Mergentheim
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
PD10-Säulen	GE Healthcare, München
PROTRAN-Nitrocellulose	Schleicher & Schuell, Dassel
Reagenzgefäße	Sarstedt, Eppendorf
Zellkultur-Produkte	Sarstedt, Greiner

## 2.4 Kit-Systeme

NucleoBond® PC100, PC500	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Extract	Macherey-Nagel, Düren
QIAquick® Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden

## 2.5 Technische Geräte

Bakterienschüttler Innova 4230	New Brunswick Scientific, Edison, NJ (USA)
Brutschrank	Thermo Fischer (Heraeus)
Chromatographiesystem Äkta Purifier	GE Healthcare, München
Digital-pH-Meter CG843	Schott, Mainz
Durchflusszytometer (FACS Calibur)	Beckman Coulter, München
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrophorese und Blot Kammern	Werkstatt MPI für Biochemie, München
EmusliFlex-C3	Avestin, Mannheim
Entwicklermaschine CURIX60	AGFA, Köln
Feinwaage Extend	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenz-Mikroskop Axioskop II	Carl Zeiss, Jena
Fluoroskan Ascent	Thermo Electron, Vantaa, Finnland
Image Reader LAS-3000	Fuji, Düsseldorf
Konfokal Mikroskop LSM 510 Meta	Carl Zeiss, Jena
Mischgerät Vortex Genie 2	Scientific, Bohemia (USA)
Netzgerät PowerPac200	Biorad, München
Netzgeräte EPS301 und EPS 300	GE Healthcare, München
Pipetten	Gilson, Middleton (USA)
	Brand, Wertheim
Reinst-Wasseranlage	SG, Hamburg-Barsbüttel
Spektralphotometer	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank	Thermo Fischer (Heraeus)
Thermocycler	Perkin Elmer,
Tischautoklav Tuttnauer 3870 EL	Systec, Wetttenberg
Tisch-Ultrazentrifuge (5415C)	Beckman Coulter, München
Ultraschall Sonopuls HD2070	Bandelin, Berlin

Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, München
Waagen PE 3600/PC 4400	Mettler-Toledo, Giessen
Wärmeblöcke	Werkstatt MPI für Biochemie, München

Weitere Geräte stammten unter anderem von den Firmen: Amersham Biosciences, Bachofer, BioRad, Eppendorf, Gilson, Heraeus, Heidolph, Krannich, Liebherr, New Brunswick Scientific, Sartorius, Scaltech, Schütt und Störktronic, sowie von der für das Institut zuständigen hauseigenen Werkstatt.

## 2.6 Software

AxioVision (LE) Rel. IV.5	Zeiss
BLAST	Altschul et al., 1997
Image Reader LAS 3000	Fuji
IPLab 3.5.5	Visitron Systems Princeton Instruments
Photoshop® 6.0	Adobe®
siRNA Target Finder und Design Tool	Ambion, Dharmacon
DNA Strider 1.4	Basierend auf Christian Marck (1988)

## 2.7 Antikörper

### 2.7.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Herkunft	Verdünnung a) WB, b) IF
NFYA	Maus	Becton Dickinson (BD)	a) 1:1000 b) 1:50
NFYB (CBF-A)	Kaninchen	Santa Cruz (FL-207)	a) 1:1000
NFYC (CBF-C)	Kaninchen	Santa Cruz (H-120)	a) 1:1000
YFP	Kaninchen	Santa Cruz (FL)	a) 1:1000
Importin $\beta$	Kaninchen (GLORIA)	AG Kehlenbach	a) 1:1000
HA.11	Maus	Covance	a) 1:2000 b) 1:1000

Flag	Maus	SIGMA	a) 1:1000 b) 1:400
RanGAP1	Ziege	AG Melchior (Pichler et al., 2002)	a) 1:3000 b) 1:2000
RanBP2 ( $\Delta$ FG)	Ziege	AG Melchior (Hutten et al., 2008)	a) 1:1000
SUMO1	Ziege	AG Melchior	b) 1:250
SUMO2	Ziege	AG Melchior	b) 1:250

### 2.7.2 Sekundärantikörper

In der Immunfluoreszenz wurden anti-Kaninchen Alexa-Fluor® 488/568, anti-Maus Alexa-Fluor® 488/594 sowie anti-Ziege Alexa-Fluor® 488/568/594 von Molecular Probes in einer Verdünnung von 1:1 000 eingesetzt.

Im Western Blot wurden HRP-gekoppelte anti-Ziege IgG, anti-Kaninchen IgG sowie anti-Maus IgG der Firma Dianova in einer Verdünnung von 1:10 000 verwendet.

### 2.8 siRNAs

Alle siRNAs wurden mittels der Software *siDesign Center* (Dharmacon) ausgewählt und automatisch mittels BLAST auf ihre Spezifität überprüft. Anschließend wurden diese über die Firma Ambion bezogen (Reinheitsgrad: Standard). Sie wurden einzelsträngig gekauft und gemäß den Angaben des Herstellers miteinander hybridisiert.

Bezeichnung	siRNA-Sequenz 5' → 3'	Zielsequenz	Referenz
Uba2	AUAGACCAGUGCAGAACA <u>Auu</u>		Diese Arbeit
Ubc9	CAAAAUCCCGAUGGCAC <u>uu</u>		Diese Arbeit
non targeting	CACGUACGCGAAUACUUCGA <u>Auu</u>		-
RanBP2	CACAGACAAAGCCGUUGAA <u>Auu</u>	nct. 351-369 accession no. NM_006267	Hutten & Kehlenbach , 2006

## 2.9 Oligonukleotide

### 2.9.1 Oligonukleotide für Sequenzierung (Sequenz 5' → 3')

T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
CMV Promotor	ACGGTGGGAGGTCTATATAAGC
NFYA (zum Sequenzieren des N-Terminus)	TGGCCTGAGGCGGATGCCAC
GFP	GCAGTGCTTCAGCCGCTA C

### 2.9.2 Oligonukleotide für Klonierungen (Sequenz 5' → 3')

#### His-YFP-Sp100

#1	GGAATTCGACATTTCCATTCCTCGAGG
#2	CGCGTCGACGCTAATCTTCTTTACCTG
#3	TCCTGTTCTGTGCGACTGGTGGATAT
#4	ATATCCACCAGTCGCACAGAACAGGA

#### YFP-NFYA-His

Nde1 forward	GTGCGCGGCAGCCATATGGCTAGC
Not1 rev ohne STOP	ACGCGGCCGCGGACACTCGGATGATCTG

#### NFYA-His ohne SIM (I343A/V345A)

SIM o. Stop	GTGGAGCTCGAAGCTCGGGCGATCTGTGTCATGGCTTCTTCGTC
-------------	--

#### NFYA-His ohne 5 AS

Delta 5AS	GTGGAGCTCTGTGTCATGGCTTCTTCGTCAGC
-----------	----------------------------------

### 2.9.3 Oligonukleotide für Mutagenesen (Sequenz 5' → 3' ; nur Forward Primer)

#### NFYA

K269R	CTGTATGTGAATGCCAGACAGTATCACCGCAT
K276R	ATCACCGCATCCTTAGGAGGAGACAAGCACG
K283R	CAAGCACGGGCTAGGCTAGAGGCAG
K283/289R	TAGAGGCAGAAGGGAGAATCCCAAAGGAACG
K292R	AGGGAAAATCCCAAGGGAACGAAGGA

---

K296R GGAACGAAGGAGATACCTCCATGAGTCTCGG  
 K310R ACGCGATGGCACGGAGGCGTGGGGAAGGG  
 (NcoI Schnittstelle zerstört)  
 K321/323R TTCTTCTCTCCAAGAGAAAGGGACAGTCCTC  
 Rückmut K283/289 GCACGGGCTAAGCTAGAGGCAGAAGGGAAAATCCCAA  
 K292R auf Mut GAAGGGAGAATCCCAAGGGAACGAAGGAGA  
 I343A/V345A GTGGAGCTCGAAGCTCGGGCGATCTGTGTCATGGCTTCTTCGTC  
 E285A GCACGGGCTAAGCTAGCGGCAGAAGGGAAA

Im Anhang befindet sich eine Liste aller NFYA Lysin-Mutanten.

## 2.10 Vektoren & Plasmide

### 2.10.1 Vektoren für bakterielle Expression

pET28a	Novagen
pET29b	Novagen
pET11a	Novagen
pET21b	Novagen

### 2.10.2 Vektoren für Säugereexpression

pCS2-JK	Kahle et al., 2005
pcEGFP	Kahle et al., 2005

### 2.10.3 Plasmide

#### 2.10.3.1 Zur Verfügung gestellte Plasmide

NFYA-His <sub>6</sub> in modifiziertem pET21b (pJK 48)	Kahle et al., 2005
pET28a-His-Aos1	Pichler et al., 2002
pET11d-Uba2	Pichler et al., 2002
pET23a-Ubc9	Pichler et al., 2002
pGex-3X-RanBP2ΔFG	Pichler et al., 2002

pET11a-SUMO1 $\Delta$ C4	Pichler et al., 2002
pET11a-SUMO2 $\Delta$ C11	Meulmeester et al., 2008
His-YFP-pET28a	Dr. Andrea Pichler
His <sub>6</sub> -zz-NFYB (pJK1)	Kahle et al., 2005
Gst-NFYC (pJK97)	Kahle et al., 2005
GST-PIAS-1	Dr. Guntram Suske
Flag-NFYA (pJK158)	Flag statt myc siehe Kahle et al., 2005
GFP-NFYA (pJK 108)	Kahle et al., 2005
His <sub>6</sub> -SUMO1 (pcDNA3)	Dr. Andrea Pichler
His <sub>6</sub> -SUMO2 (pcDNA3)	Dr. Ron Hay

Die Plasmide von Jörg Kahle sind mit der originalen Plasmidnummer (pJK Nummer) bezeichnet. Alle NFYA Konstrukte enthalten murines NFYA, wohingegen es sich bei NFYB und NFYC um humane Sequenzen handelt.

### 2.10.3.2 In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

#### His<sub>6</sub>-YFP-Sp100

Das durch PCR Amplifikation gewonnene Sp100A (Dr. Jakob Seeler, Paris; 6031, ein Qiagen pQE60-Derivat) ohne N-Terminus (Primer siehe oben: #1/2) wurde in pBlueScript II KS eingesetzt. Der entstandene Vektor wurde mit EcoRI und Sall geschnitten und das Insert in den von Dr. Andrea Pichler hergestellten His-YFP-pET28a kloniert. Nach Sequenzierung wurde festgestellt, dass in dem Originalkonstrukt von Jakob Seeler eine Punktmutation existierte, welche aus dem fertigen Konstrukt durch Rückmutation bei 51,6°C mit der Phusion Polymerase entfernt wurde (Primer: #3/4).

#### HA-NFYA

Als Ausgangsvektor diente der pCS2-JK Vektor (Flag-NFYA pJK158 ohne das NFYA Insert) von Jörg Kahle. Die N-terminale Flag Markierung wurde über NcoI und EcoRI aus dem leeren Vektor herausgeschnitten und statt dessen wurden zwei vorher zusammengefügte Primer mit gleichen Überhängen, die ein HA-Peptide (YPYDVPDYAG) codieren, eingefügt (catggactat**catatg**acgtcccagactctgccggaagg und aattccttccggcagagtctgggacgtcatatggatagtc). Um zu kontrollieren, ob die Ligation erfolgreich war, wurde eine NdeI Schnittstelle (fett markiert) in die Primer eingefügt.

Anschließend konnte das NFYA Insert durch EcoRI und StuI Schnittstellen aus dem Flag-NFYA umklontiert werden.

### YFP-NFYA-His

Zuerst wurde ein Vektor mit dem Insert His-YFP-NFYA hergestellt. Dies erfolgte analog zum His-YFP-Sp100 mit folgenden Primern (gcgaattcgagcagtatacgacaaacag und acgcgccgcttaggacactcggatgatctg). Als Vorlage für die PCR diente Flag-NFYA. Anschließend wurde das YFP-NFYA über PCR mit folgenden Primern (gtgcgccgagccatattggctagc und acgcgccgccgacactcggatgatctg) amplifiziert, und mit NdeI und NotI ohne Stop Codon in pET28b (Novagen) kloniert.

## 2.11 Proteine

### 2.11.1 Zur Verfügung gestellte Proteine

Falls nicht besonders ausgewiesen sind diese Proteine aus einem gemeinsam benutzten Laborbestand und werden abwechseln von den Labormitgliedern aufgereinigt.

GST-hRanBP2 $\Delta$ FG (AS 2553-2838) pGEX-3x	AG Melchior
hSUMO1 $\Delta$ C4 (AS 1-97) pET11a	AG Melchior
hSUMO2 $\Delta$ C11 (AS 1-92) pET11a	AG Melchior
mUbc9 (AS 1-158) pET23a	AG Melchior
His <sub>6</sub> -zz-hNFYB (AS 1-204) pQE70-zz	AG Doenecke, Jörg Kahle
GST-hNFYC (AS 1-334) pGEX 4T1	AG Doenecke, Jörg Kahle
Ran (AS 1-216) pET11d	AG Kehlenbach
GST-PIAS-1	AG Melchior

### 2.11.2 Aufgereinigte Proteine

His <sub>6</sub> -YFP-Sp100 (AS 1-411)	wie im Methodenteil beschrieben
mNFYA-His <sub>6</sub> (AS 1-346)	wie im Methodenteil beschrieben
mNFYA-His <sub>6</sub> mSIM (I343A/V345A)	siehe mNFYA-His <sub>6</sub>
mNFYA-His <sub>6</sub> $\Delta$ 5AS (AS-1-341)	siehe mNFYA-His <sub>6</sub>
YFP-mNFYA-His <sub>6</sub> (AS 1-346)	wie im Methodenteil beschrieben



His<sub>6</sub>-S-Importin β (AS 1-876) wie im Methodenteil beschrieben

Das SUMO E1 Heterodimer wird von zwei unterschiedlichen Plasmiden kodiert (hUba2 (AS 1-660) pET11d und hAos1 (AS 1-380) pET28a), jedoch in Bakterien ko-exprimiert und als Dimer aufgereinigt. Eine genaue Beschreibung der Aufreinigungsprozedur befindet sich in Methods in Molecular Biology (Werner et al., 2009)

## 2.12 Zelllinien

HeLa (adhärent)	menschliche Cervix-Karzinomzelllinie
HeLa Suspensionszellen (CSH Stamm)	menschliche Cervix-Karzinomzelllinie

## 2.13 Bakterienstämme (*E.coli*)

Die Kulturen wuchsen in Luria-Bertani (LB) Nährmedium für Bakterien (1% (w/v) Bactotrypan, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl) oder auf LB Agar Platten (LB plus 1,5 % (w/v) Bacto-Agar). Wahlweise mit 60 µg/ml Kanamycin, 100 µg/µl Ampicillin oder 34 µg/ml Chloramphenicol als Antibiotikum.

BL21 (DE3)	F- ompT gal [dcm] [lon] hsdSB (r <sub>B</sub> -m <sub>B</sub> -) λ(DE3)
BL21 (DE3) pLysS	F- ompT gal [dcm] [lon] hsdSB (r <sub>B</sub> -m <sub>B</sub> -) λ(DE3) pLysS(Cm <sub>R</sub> )
DH5α	F- Φ80lacZΔM15 (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (r <sub>K</sub> - m <sub>K</sub> + ) supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1

## 3. Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Techniken

Alle molekularbiologischen Standardmethoden wie Plasmidpräparation, Spaltung durch Restriktionsendonukleasen, gelelektrophoretische Auftrennung, Sequenzierung, PCR usw. wurden nach Maniatis und Sambrokk et al. (1989) oder dem jeweiligen Protokoll des Herstellers durchgeführt.

#### 3.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli*

Um kompetente Bakterien (durch Hitzeschock transformierbar) zu gewinnen, wurden 2 ml einer stationären Kultur von *E. coli* DH5 $\alpha$  bzw. BL21(DE3) mit 200 ml LB-Medium verdünnt und in einem Schüttelinkubator bis zu einer OD 550 von 0,5 kultiviert. Die Bakterien wurden bei 4°C und 3500 g abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 200 ml eiskalter TFB-I-Puffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde zwei Stunden auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 3500 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 8 ml sterilem und gekühltem TFB-II-Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde zu je 100  $\mu$ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 3.1.2 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden in dieser Arbeit ausschließlich *E. coli* Bakterien (Ligation und Plasmidpräparation: DH5 $\alpha$ , Proteinaufreinigung: BL21-DE3) verwendet. Diese durch Rubidium chemisch kompetent gemachten Zellen werden auf Eis aufgetaut und mit der Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Bei diesem Inkubationsschritt soll sich die DNA an die Bakterien anlagern. Durch den nachfolgenden Hitzeschock von 90 sec bei 42 °C wird die DNA in die Bakterien aufgenommen. Nach 2 min Inkubationszeit auf Eis werden 500  $\mu$ l SOC-Medium hinzugegeben. Es folgt eine Regeneration der Bakterien für 1 Stunde bei 37°C, bevor sie auf LB-Platten mit entsprechender Antibiotika Resistenz ausplattiert werden.

### 3.1.3 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dabei wurde eine Verdünnung gewählt, welche eine OD zwischen 0,1 und 1 ergab. Nur diese Werte liegen im zuverlässigen Messbereich des Photometers (SmartSpec™Plus, BioRad). Die Nukleinsäure-konzentration in µg/ml errechnete sich aus der gemessenen OD, dem Verdünnungsfaktor und einem für DNA spezifischen Multiplikationsfaktor von 50. Aus dem zusätzlich gegebenem Verhältnis der OD bei 260 nm und der OD bei 280 nm konnte man auf den Reinheitsgrad der DNA schließen. Im Idealfall liegt das Verhältnis bei 1,8.

### 3.1.4 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Präparation kleiner Mengen an Plasmid-DNA aus *E.coli* DH5α-Zellen wurde eine Übernachtskultur im Volumen von 4 ml LB-Medium aus einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft. Diese Kultur wurde in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße umgefüllt und jeweils für 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Die DNA-Preparation erfolgte durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly 1979) und anschließender Präzipitation der DNA. Hierfür wurde das Bakterienpellet in 300 µl P1 Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl des alkalischen P2 Puffers wurde mehrmals invertiert und exakt 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen werden mittels SDS und NaOH vollständig lysiert und die DNA denaturiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Bakterienlysat durch Zugabe von 300 µl des sauren Kaliumacetat-Puffers (Puffer P3) neutralisiert, die Plasmid-DNA renaturiert und mittels des im Puffer enthaltenen SDS wurden die Proteine und chromosomale DNA präzipitiert. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (30 min, 14000g, 4°C) und die Plasmid-DNA mit 640 µl Isopropanol aus dem entstandenen Überstand ausgefällt. Die Plasmid-DNA wurde durch 15minütige Zentrifugation bei 13000 g bei Raumtemperatur sedimentiert, einmal mit 70% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 30-50 µl Wasser gelöst.

Zur Isolierung größerer Mengen reiner Plasmid-DNA wurde ein Kit zur Plasmid-DNA Aufreinigung von der Firma Machery-Nagel nach den Empfehlungen des Herstellers eingesetzt. Die so aufgereinigte DNA wurde zur Transfektion von Zellkulturzellen eingesetzt.

### 3.1.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme kann sowohl einem analytischen oder präparativen Zweck dienen.

Für die enzymatische Spaltung mit Restriktionsendonukleasen wurden die von dem Hersteller (Fermentas) der verschiedenen Enzyme angegebenen Reaktionsbedingungen einschließlich der speziellen Puffer angewendet. Für einen analytischen Verdau wurden 0,2-1,0 µg DNA (Plasmid-DNA oder DNA-Fragment) in einem 10-20 µl Ansatz gespalten. Das Ansatzvolumen eines präparativen Verdaues ist von der Konzentration der zu spaltenden DNA abhängig. Zur Spaltung von Plasmiden wurden für 1 µg DNA die 1 bis 4-fache Menge an Enzymeinheiten ('Units') eingesetzt. Der Anteil des Enzyms sollte 10% des Reaktionsvolumens nicht überschreiten, da das in dem Aufbewahrungspuffer des Enzyms enthaltene Glycerol die Enzymaktivität inhibiert oder eine unspezifische Aktivität (die sogenannte „star-activity“) verursachen kann. Der Reaktionsansatz wurde für 1 bis 6 Stunden bei der vorgegeben Temperatur, welche in der Regel bei 37°C liegt, inkubiert.

### 3.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente voneinander zu trennen, bedient man sich der Methode der Agarose-Gelelektrophorese. Dafür wurden 0,5-1 g Agarose (1-2% Gele) auf 50 ml TAE-Laufpuffer eingewogen und die Lösung in der Mikrowelle aufgekocht. Wenn die Agarose vollständig gelöst vorlag, wurde die Lösung in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde dieses in eine Elektrophorese-Kammer positioniert, der Kamm entfernt und das Gel mit TAE-Puffer bedeckt. Anschließend wurden die DNA-Proben und ein Marker geladen und die Elektrophorese bei 60-100 Volt durchgeführt. Um die DNA-Banden sichtbar zu machen, wurde das Gel nach Beenden der Elektrophorese für 20 min in einem Ethidiumbromid-Bad (1 µg EtBr/ml TAE-Puffer) gefärbt. Das Ethidiumbromid kann zwischen die Basenpaare der DNA interkalieren und mit Hilfe von UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht werden.

### 3.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Nach der Auftrennung und Betrachtung der DNA im Agarose-Gel können relevante Banden mit Hilfe eines Skalpell aus geschnitten werden.

Die Aufreinigung der DNA aus dem Gelstück erfolgte mit Hilfe des „NucleoSpin® Extract II Kit“ von Macherey und Nagel. Eluiert wurde in der Regel mit 30 µl Wasser.

### 3.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligations-Reaktion verknüpft die T4-DNA-Ligase DNA-Fragmente mit kompatiblen, überstehenden oder auch glatten Enden. Dabei kommt es zu einer Phosphodiesterbindung zwischen den 3'-OH- und den 5'-Phosphat-Enden der DNA. Für eine Klonierung mit überstehenden Enden wurden die Vektor-DNA und das zu ligierende Insert im molaren Verhältnis 1:3 eingesetzt. Dazu wurden das Ligase-Enzym, ein Ligationspuffer und ATP pipetiert. Dieser Ansatz wurde dann für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle wurde immer auch eine identische Reaktion ohne Insert durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Transformation der Ligationsansätze in *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen (siehe Transformation kompetenter Bakterien).

### 3.1.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde eine Polymerase Kettenreaktion (*PCR*, engl. „*Polymerase chain reaction*“) durchgeführt. Die DNA-Polymerase benötigt für den Start der Synthese eines neuen Stranges einen Primer, der sich an den Matrizenstrang anlagert. Für die PCR wurden zwei Oligonukleotid-Primer ausgewählt, wobei der erste Primer identisch mit dem 5'Ende des zu amplifizierenden Bereichs und der zweite Primer komplementär zum 3'Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes ist. Der erste Schritt der PCR ist die Denaturierung der beiden DNA Stränge. Dazu wird der Reaktionsansatz auf 95°C erhitzt. Nach der Denaturierung wird die Temperatur soweit abgesenkt, dass die ausgewählten Primer an die DNA binden können. Diesen Schritt nennt man „Annealing“. Im dritten Schritt wird die Temperatur auf das Temperaturoptimum der DNA-Polymerase (meist 72°C) angehoben, und die DNA-Polymerase beginnt die neuen DNA-Stränge zu synthetisieren. Am Ende dieses Schrittes wird die Temperatur in der PCR Maschine wieder auf 95°C erhöht, damit sich der neu synthetisierte DNA-Strang vom Matrizenstrang trennt. Nun beginnt ein zweiter Zyklus. Mit jedem weiteren Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der so entstandenen neuen doppelsträngigen Moleküle.

Für einen Standardreaktionsansatz mit einem Endvolumen von 50 µl wurde folgendes Pipettierschema verwendet. Das Zusammenpipetieren erfolgte auf Eis.

Matrizen –DNA	0.2-0.5 µg
Primer	Je 30 pmol
dNTPs	Je 50 µM
10x Polymerasepuffer	5 µl
DNA Polymerase	1 Unit
ddH <sub>2</sub> O	auf 50 µl auffüllen

### 3.1.10 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 50 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 ddH<sub>2</sub>O gemischt. Der Ansatz wurde halbiert und die Hälfte als Kontrolle bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dies diente der Kontrolle des später folgenden *DpnI* Verdaus. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 94°C durchlief der Reaktionsansatz 28 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 72°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 eingesetzten Plasmids selektiv abgebaut. 5 µl dieses Reaktionsansatzes wurden direkt in kompetente Bakterien transformiert.

### 3.1.11 Sequenzierung von DNA

Zur Bestimmung der DNA-Sequenz wird zunächst eine PCR mit 50-200 ng Plasmid, 10 pmol Primer, 2 µl Sequenzier-Puffer und 1 µl Sequenzier-Mix in 10 µl-Volumen mit dem folgenden Programm durchgeführt:

96°C	2 min	}	25 Zyklen
96°C	10 s		
55°C	15 s		
60°C	4 min		
4°C	∞		

Die Reaktion wird durch Zugabe von je 1 µl 3 M Na(OAc) pH 5,2 und 125 mM EDTA gestoppt und das PCR-Produkt durch Zugabe von 50 µl eiskalten absoluten Ethanol und anschließender 15 minütiger Zentrifugation bei 16.000 g präzipitiert. Das Pellet wird einmal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl sterilem H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Analyse der Sequenz erfolgt in einem „Genetic Analyzer 3100“ der Firma Applied Biosystems am Göttinger Zentrum für Molekulare Biowissenschaften (GZMB) der Universität Göttingen.

## 3.2 Biochemische Techniken

### 3.2.1 Nachweis und Trennung von Proteinen

#### 3.2.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet (Weber und Osborn 1969; Laemmli, 1970). Das diskontinuierliche System besteht dabei aus einem weitporigen Sammelgel und einem engporigen Trenngel. Die Proteine werden zunächst im Sammelgel fokussiert. Im Trenngel wird der Sammeleffekt aufgehoben und die Proteine werden nach ihrer Größe aufgetrennt. Um einen optimalen Trennbereich für Proteine mit unterschiedlichen Molekulargrößen zu erhalten, wurden Trenngele mit verschiedenen Polyacrylamidkonzentrationen (6-12%) hergestellt.

Nach Herstellung der Gele wurden diese in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt und das Reservoir mit Elektrophorese-Puffer (1x Lämmli-Puffer) aufgefüllt. Vor dem Auftragen der Proben in die einzelnen Taschen des Sammelgels wurden die Proben mit SDS-Ladepuffer versetzt und für fünf Minuten bei 96°C erhitzt. Der Puffer enthält neben dem Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat) auch DTT (Dithiothreitol). SDS denaturiert die Proteine und verleiht ihnen eine negative Ladung in einem konstanten Masse-Ladungs Verhältnis. Die Zerstörung der räumlichen Struktur der Proteine, deren Struktur durch Disulfidbrücken stabilisiert wird, wird durch die reduzierende Wirkung von DTT und das Erhitzen unterstützt. Die Elektrophorese wurde bei konstanten 20 mA pro Gel durchgeführt.

### *3.2.1.2 Coomassie-Färbung*

Um Proteine im Gel nachzuweisen, wurde das Gel für ca. 1 h oder über Nacht in einer Coomassie-Färbelösung geschüttelt. Diese enthielt neben Coomassie-Brilliant-Blau R250 zum Färben der Proteine auch Essigsäure und Methanol. Anschließend wurde die Hintergrund-Färbung mit Hilfe eines Coomassie-Entfärbers entfernt.

### *3.2.1.3 Proteintransfer mittels Western Blot (Semi-Dry-Verfahren)*

Der Western Blot bezeichnet den Transfer von Polypeptiden aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose mit einer Porengröße von 0,2 µm (Kyhse-Andersen, 1984). Auf die Anode der Blotting-Apparatur wurde mit Transferpuffer (25 mM Tris, 193 mM Glycin, 0,036% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol) getränktes Whatman 3MM-Papier in drei Lagen, die Nitrozellulosemembran, das Trenngel, und drei weitere getränkte Lagen Whatman 3MM-Papier geschichtet und der Kathodendeckel leitend damit verbunden. Der Transfer erfolgte bei konstanten 20 Volt und maximaler Amperezahl für 90 Minuten.

### *3.2.1.4 Färbung der transferierten Proteine auf der Membran mittels Ponceau-S*

Die Proteine können nach dem Transfer reversibel mit Ponceau-S-Lösung angefärbt werden. Überschüssige Färbelösung wurde mit 0,5% Essigsäure entfernt bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Mit einem Kugelschreiber wurde der Proteinmarker markiert. Gegebenenfalls konnte die Membran zerschnitten werden, falls eine Inkubation mit verschiedenen Antikörpern vorgesehen war. Anschließend wurde die Nitrozellulose mit Wasser vollständig entfärbt.



### 3.2.1.5 Immunologischer Nachweis der transferierten Proteine auf der Nitrozellulose

Die freien Bindungsstellen auf der Membran wurden vor der Behandlung mit dem Antikörper für 1 Stunde bei 37°C in PBS-Tween mit 5% Milchpulver (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) blockiert. Für die eingesetzten Konzentrationen der Antikörper siehe Tabelle im Teilabschnitt 2.7. Die Nachweisreaktion des zweiten Antikörpers erfolgte mit dem „ECL Western blotting analysis system“ (Pierce, ECL= enhanced chemiluminescence). Diese Methode beruht auf der Umsetzung von Luminol zu einem Dianion durch das Enzym HRP (engl. „*horseradish peroxidase*“) in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid. Dieses Dianion zerfällt anschließend unter Abgabe von Licht wieder in seinen Grundzustand. Nach einminütiger Inkubation wurde die Membran entweder auf einen Röntgenfilm aufgelegt, der durch die lokale Lichtemission belichtet wurde, oder mit dem Image Reader LAS-3000 (Fuji) gescannt.

### 3.2.2 Präzipitation von Proteinen

Um Proteine aus wässriger Lösung für die Analyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese anzukonzentrieren, wurde eine Methanol/Chloroform-Fällung durchgeführt. Dafür wurden 100-200 µl der Probe mit 3 Volumen Methanol und 1 Volumen Chloroform versetzt und gut gemischt. Dieses Gemisch wurde für 10 sec bei 10.000g zentrifugiert und anschließend wurden 3 Volumen Wasser hinzugefügt. Es wurde erneut sorgfältig gemischt und für 5 min bei 10.000 g zentrifugiert. Es bilden sich drei Phasen; das präzipitierte Protein befindet sich an der Phasengrenze. Der H<sub>2</sub>O-Methanol Überstand wurde verworfen und nochmals mit 3 Volumen Methanol gemischt. Es wurde für 5 min bei 14.000g zentrifugiert. Die gesamte Flüssigkeit wurde entfernt und das Präzipitat kurz getrocknet. Das Präzipitat wurde in 40µl 2xSDS Probenpuffer aufgenommen und für 5 min aufgeköcht.

### 3.2.3 Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen aus *E.coli*

Die Transformation des jeweiligen Plasmids erfolgt standardmäßig in BL21-DE3-Zellen am Vortag der Proteinexpression. 50 ml LB-Medium (entsprechender Resistenz) wurden mit einer frischen Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Übernacht-Kulturen mit Kanamycin-Resistenz wurden direkt in 1-2 Liter LB-Medium verdünnt, Übernacht-Kulturen mit Ampicillin-Resistenz wurden zuvor abzentrifugiert, resuspendiert und dann verdünnt. In der exponentiellen

Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> = 0,5 bis 0,8) wurde die Protein-Expression mit 0,2-1 mM IPTG induziert. Nach 3-5 Stunden bei 25°C wurden die Zellen abzentrifugiert und konnten entweder sofort weiterverarbeitet oder zunächst in flüssigem Stickstoff gefroren und für kurze Zeit bei -80°C gelagert werden. Nach ihrer Aufreinigung werden die Proteine ankonzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt im direkten Vergleich gegen definierte Mengen BSA (Rinder Serum Albumin) mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung.

#### 3.2.3.1 Aufreinigung von rekombinantem NFYA

*E. coli* BL21(DE3)-Zellen wurden mit NFYA-His (pJK 48) transformiert und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Drei Stunden nach der Expressionsinduktion mit IPTG wurden die Zellen abzentrifugiert, in 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) mit 400 mM NaCl resuspendiert und nach Zugabe von je 1 µg/ml Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, und 0,1 mM PMSF sowie 1 mM β-Mercaptoethanol mit der EmulsiFlex-C3 (Avestin, Kanada) lysiert. Das Zelllysate wurde zentrifugiert (100000 g, 1 h bei 4°C) und der Überstand mit gewaschener, äquilibrierter, Nickelagarose für 1 h inkubiert. Es folgten mehrere Waschschriffe mit jeweils 20 mM Imidazol. Nach der Elution mit 200 mM Imidazol wurde zur weiteren Aufreinigung und zur Umpufferung in Transport Puffer eine analytische Superdex 200 FPLC-Säule bei 4 °C benutzt. Die gesammelten Fraktionen wurden in einem 10%igen SDS-PAGE Gel analysiert, vereinigt und aliquotiert.

Die YFP-NFYA-His Konstrukte wurden äquivalent zum NFYA-His aufgereinigt. Allerdings wurden diese nicht wie oben angegeben bei 25 °C sondern bei 18°C induziert.

#### 3.2.3.2 Aufreinigung von rekombinantem YFP-His-Sp100

*E. coli* BL21(DE3)-Zellen wurden mit *YFP-His-Sp100* transformiert und bei 37 °C mit Kanamycin schüttelnd inkubiert. Vier Stunden nach der Expressionsinduktion mit 1 mM IPTG wurden die Zellen abzentrifugiert und in 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) mit je 1 µg/ml Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin und 0,1 mM PMSF sowie 1 mM β-Mercaptoethanol resuspendiert. Die Zellen wurden mit 1 mg/ml Lysozym für eine Stunde auf Eis aufgebrochen. Das Zelllysate wurde zentrifugiert (100000 g, 1 h bei 4°C) und der Überstand mit gewaschener, äquilibrierter Nickel-Agarose für 2

Stunden bei 4°C inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit jeweils 20 mM Imidazol. Nach der Elution mit 250 mM Imidazol wurde das Protein auf 500 µl ankonzentriert und zur weiteren Aufreinigung und zur Umpufferung in Transport Puffer auf einer analytische Superdex 200 FPLC-Säule bei 4 °C aufgetrennt.

### 3.2.3.3 Aufreinigung von rekombinantem His-S-Importin $\beta$

E. coli BL21(DE3) pLysS-Zellen wurden mit dem für His-S-Importin  $\beta$  kodierenden Plasmid (pet30a) transformiert und bei 37°C bis zu einer OD<sub>280</sub> von 0,4 schüttelnd inkubiert. Anschließend durften die Bakterien bei 25°C bis zu einer OD von 0,6 nm weiter wachsen. Vier Stunden nach der Expressionsinduktion mit 1 mM IPTG wurden die Zellen abzentrifugiert, in 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) mit 250 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 10% Glycerol resuspendiert und nach Zugabe von je 1 mg/ml Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, und 0,1 mM PMSF sowie 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol mit der EmulsiFlex-C3 (Avestin, Kanada) lysiert. Das Zelllysat wurde zentrifugiert (100000g, 1 h bei 4°C) und der Überstand mit gewaschener, äquibrierter Nickel-Agarose für 2 Stunden inkubiert. Es folgten mehrere Waschschriffe mit jeweils 20 mM Imidazol und 10 mM ATP. Nach der Elution mit 200 mM Imidazol wurde zur weiteren Aufreinigung eine präparative Superdex200 FPLC-Säule und eine MonoQ-Säule bei 4°C benutzt. Die MonoQ-Säule (1ml Säulenvolumen) wurde mit Transport Puffer und Transport Puffer mit 500 mM NaCl durchgeführt. Das Importin  $\beta$  Protein eluiert bei einer Salzkonzentration von etwa 250 mM. Die gesammelten Fraktionen wurden in einem 8% igen SDS-PAGE Gel analysiert, vereinigt und aliquotiert.

### 3.2.4 Beladen des Ran-Proteins mit GTP

Um die GTPase Ran spezifisch mit GTP oder GDP zu beladen, wurde Ran auf 1 mg/ml verdünnt und 50 µl dieser Lösung mit 1 µl 50 mM Nukleotid, 5 µl einer 200 mM Lösung EDTA und 2,5 µl 0,1 mM DTT gemischt. Zusätzlich wurden noch 23 µl 50 mM Hepes mit einem pH Wert von 7,3 und 2 µl einer 100 mM Lösung ATP dazupipettiert. Dieser Überschuss an ATP wurde eingesetzt, um zu verhindern, dass kontaminierende Nukleasen das GTP zu GDP oder GMP konvertieren.

Das Gemisch wurde für 30 min bei 30 °C inkubiert und die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl einer 1 M MgCl<sub>2</sub> Lösung abgestoppt.

### 3.2.5 *In vitro* SUMOylierung

Um zu testen, ob ein Protein mit SUMO verknüpft werden kann, wird eine *in vitro* SUMOylierung durchgeführt. Im Labor liegen die aufgereinigten Proteine der SUMO Kaskade in Transport Puffer vor. Alle Verdünnungen der Proteine werden ebenso in Transport Puffer mit 0.05% Tween 20 und 0.2 mg/ml Ovalbumin gemacht. Sowohl das Tween, als auch das Ovalbumin, verhindern dass Proteine aufgrund ihrer geringen Konzentration unspezifisch an die Wände der Reaktionsgefäße „kleben“.

Das Reaktionsvolumen beträgt in der Regel 20 µl. Die Reaktion wird für 30 bis 60 Minuten mit 3 mM ATP bei 30°C inkubiert und anschließend mit 2xSDS Probenpuffer abgestoppt und für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Als Negativ-Kontrolle dient ein Ansatz ohne ATP. Die Analyse erfolgt mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot.

Für eine SUMOylierungs-Reaktion wurden, wenn nicht anders beschriftet, folgende Mengen an aufgereinigten Proteinen eingesetzt:

Protein	Größe	Menge	Konzentration
<b>Aos1/Uba2</b>	110 kDa (38+72)	150 ng	68 nM
<b>Ubc9</b>	18 kDa	20 ng	56 nM
<b>SUMO1<math>\Delta</math>C4</b>	11 kDa	1000 ng	4,4 µM
<b>RanBP2<math>\Delta</math>FG</b>	266 AS	5 ng	6 nM
<b>NFYA-His</b>	40 kDa	500 ng	625 nM

### 3.2.6 Massenspektrometrieanalyse der SUMO-Akzeptorstellen im NFYA

Um herauszufinden, welches Lysin in einem SUMO-Substrat modifiziert wird, kann man sich der Massenspektrometrie als Methode bedienen. Diese Analyse wurde in Kollaboration mit Dr. Guido Sauer vom Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen durchgeführt. Für diesen Zweck wurde NFYA sowohl mit Wildtyp SUMO1 (ohne Markierung) als auch mit einer mutierten Form von His-SUMO1 modifiziert. Das mutierte His-SUMO1 besitzt im C-Terminus ein Arginin in Position 93. Diese Mutation fügt eine weitere tryptische Schnittstelle in das SUMO1 ein. So entsteht nach tryptischem Verdau anstatt einer 2300 Da großen Seitenkette nur eine

361 Da schwere Modifikation. Dieser verkürzte SUMO-Rest erleichtert die Suche von modifizierten Peptiden.

Die *in vitro* modifizierten Proteine wurden auf einem 5-20% Gradientengel aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Die Banden des modifizierten und unmodifizierten NFYA wurden ausgeschnitten und einem in-Gel-Verdau mit Trypsin (Promega) einer spezifischen Proteolyse unterworfen (Shevchenko et al., 1996). Das Enzym Trypsin spaltet an der C-terminalen Seite von Argininen (R) und Lysin (K).

Die extrahierten Peptide wurden durch HPLC (nanoLC2D, Eksigent) aufgetrennt. Anschließend wurde die Massenspektrometrieanalyse mit einer Inonenfalle (HCTultra, Bruker-Daltonics), welche mit einer nanoESI Quelle von Proxeon ausgerüstet ist, durchgeführt (Verdau und Analyse der Peptide wurde von Dr. Guido Sauer durchgeführt).

Der Verdau eines zu analysierenden Proteins ergibt durch die Sequenzspezifität der verwendeten Endoprotease ein Massenspektrum, das gleich einem Fingerabdruck (PMF, Peptide Mass Fingerprint) spezifisch für das analysierte Protein ist. Posttranslational modifizierte Peptide werden identifiziert, indem die potentielle Masse der modifizierten Peptide errechnet wird und anschließend gezielt nach dieser Masse gesucht wird.

### **3.2.7 Anreicherung von His-SUMO-modifizierten Proteinen nach Transfektion**

HeLa-Zellen wurden in 6 cm Platten ausgesät. Die Transfektion von HA-NFYA und His-SUMO erfolgte mit Fugene (Roche) laut Protokoll. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die Zellen zweimal vorsichtig mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 5 ml 8M Guanidinium Puffer lysiert. Zur kompletten Lyse wurde die Flüssigkeit mehrmals auf und ab pipettiert und anschließend sonifiziert. Zur Kontrolle der Expressionslevel wurde 5% der Gesamtprobe („Input“) abgenommen, mit Methanol-Chloroform (siehe Präzipitation von Proteinen) gefällt, und in 40 µl Probenpuffer aufgeköcht.

Das Gesamtzelllysate wurde nun mit der äquilibrierten Nickel-Agarose über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Abtrennung der Agarose durch Zentrifugation für 5 min bei 800 g. Der Überstand wurde verworfen und es folgten sechs Waschschrte. Allen Puffern wurde 10 mM Imidazol und 2 mM  $\beta$ -Mecaptoethanol zugesetzt. Der erste Waschschrte erfolgte mit dem Guanidinium-

Puffer, der auch für die Zellyse verwendet wurde. Der nächste Waschschrift erfolgte mit einem 8M Harnstoff-Puffer mit einem pH-Wert von 8, die letzten vier mit einem 8M Harnstoff-Puffer mit einem pH-Wert von 6,3. Im fünften und sechsten Waschschrift wurde dem Harnstoff-Puffer noch zusätzlich 0,15% Triton zugesetzt. Nach den Waschschriften wurde die restliche Flüssigkeit vollständig mit einer Hamilton-Spritze entfernt und die Agarose wurde in 80 µl 2xSDS-Probenpuffer aufgeköcht.

### **3.3 Zellbiologische Techniken**

#### **3.3.1 Kultivierung adhärenter humaner Zelllinien**

HeLa Zellen sind humane Zellen eines Gebärmutterhalskrebses. Sie wurden ursprünglich aus der Patientin Henrietta Lacks isoliert. Die Zellen wurden in dem Standardmedium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 100 µg Penicillin und Streptomycin bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen mit Trypsin von der Platte abgelöst, auf die gewünschte Zelldichte verdünnt und in eine neue Kulturschale überführt. Dazu wurde zunächst das alte Nährmedium entfernt und die adhärenenten HeLa Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA pro 10 cm Platte versetzt und für ca. 2-3 min bei 37°C inkubiert, wodurch extrazelluläre Proteine gespalten und die Zellen vom Boden der Kulturplatte gelöst wurden. Im Anschluss wurden die Zellen in frischem, vorgewärmtem Medium aufgenommen und durch gründliches Resuspendieren vereinzelt. Die gewünschte Menge an Zellen konnte nun in eine neue Kulturschale mit vorgelegtem Medium überführt werden.

#### **3.3.2 Kultivierung humaner Suspensionszellen**

Die Suspensionszellen wurden in Jokliks Medium hochgezogen. Zur Herstellung des Mediums wurde Jokliks MEM Pulver (SIGMA) zusammen mit 20 g Natrium Hydrogencarbonat und 23,8 g HEPES (Zellkulturqualität) in 10 Liter autoklaviertes reinst Wasser gemischt. Der pH-Wert wurde auf 7,1 eingestellt und das Medium steril filtriert.

Zur Kultivierung der Suspensionszellen wurde dem Medium noch 5% FBS und 5% NCS sowie 2 mM Glutamin hinzugesetzt. Die Zellen wurden in Spinner Flaschen (Belco) mit Magnetrührern bei 100 rpm in einem 37°C Inkubator gehalten. Eine ideale Zelldichte sollte immer zwischen  $3-10 \times 10^5$  Zellen pro ml liegen und die Zellen sollten täglich um den Faktor 1,5 verdünnt werden (Verdopplung alle 16 Stunden). Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

### **3.3.3 Einfrieren und Auftauen von Gewebekulturzellen**

Säugerzellen wurden zum Zweck der Lagerung stets aus einer logarithmisch wachsenden Population eingefroren. Dazu wurden diese zunächst mit Trypsin von der Kulturschale abgelöst, um dann bei 200 g für 5 min pelletiert zu werden. Dann wurden die Zellen in kaltem Kulturmedium resuspendiert und die Zellsuspension auf eine Gesamtkonzentration von 5 - 10% (v/v) DMSO gebracht. Je 1 ml der Suspension wurde in ein Einfrierröhrchen abgefüllt und in einem speziellen Behälter mit reinem Propanol langsam auf  $-80^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Die dauerhafte Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Genauso wie das Einfrieren der Zellen sollte auch das Auftauen rasch vonstatten gehen. Hierfür werden die Zellen im  $37^{\circ}\text{C}$  Wasserbad aufgetaut. Anschließend werden die Zellen einmal mit frischem Medium gewaschen und damit vom DMSO befreit. Nach dem Waschen werden die Zellen mit Standardmedium verdünnt und auf eine 10 cm Zellkulturschale überführt und kultiviert.

### **3.3.4 Herstellung von HeLa Zytosol**

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung von HeLa Zytosol dienen etwa 8 Liter HeLa Suspensionszellen. Alle verwendeten Puffer sind eiskalt und alle Vorgänge finden auf Eis oder bei  $4^{\circ}\text{C}$  statt.

Das Ernten der Zellen geschieht durch Zentrifugation bei 250 g in konischen Zentrifugationsröhrchen für 10 min. Danach werden die pelletierten Zellen zweimal mit eiskaltem PBS und anschließend mit Wasch Puffer (Zusammensetzung siehe unten) gewaschen.

Die Zellen werden in einem Volumen hypertonischem Lysis Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis schwellen gelassen. Das Lysieren der Zellen erfolgt in einem 40 ml „stainless steel“ Homogenisator. Das erfolgreiche Aufschließen der Zellen wird durch Trypan Blau Färbung überprüft. Nach der Lyse der Zellen werden diese für 15 min

bei 1500 g zentrifugiert, um die Zellkerne und Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wird bei 15.000 g für 20 min im Beckmann JA20 Rotor und anschließend bei 100000 g für 1h im Beckmann 70.1 Ti Rotor zentrifugiert.

Das so gewonnene Zytosol wird über Nacht gegen Transport Puffer dialysiert (Membran mit 10.000 Da Ausschlussgröße; Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland). Während dieser Zeit sollte mindestens dreimal der Puffer ausgetauscht werden.

Eventuell muss die Konzentration durch Ankonzentrieren auf etwa 10 mg/ml eingestellt werden bevor das Zytosol in 200 µl Aliquoten eingefroren wird.

#### Wasch Puffer

10mM HEPES, pH 7,3, 110mM KOAc, 2mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 2mM DTT

#### Lysis Puffer

5mM HEPES, pH 7,3, 10mM KOAc, 2mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 2mM DTT, 1mM PMSF, 1µg/ml von Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin

### **3.3.5 Indirekte Immunfluoreszenz**

Immunfluoreszenz-Mikroskopie ermöglicht es den Aufenthaltsort eines Antigens innerhalb einer Zelle zu bestimmen. Ein fluoreszierender Farbstoff (Fluorochrom) ist an einen sekundären Antikörper gekoppelt, welcher den proteinspezifischen primären Antikörper auffindet. Das Fluorochrom wird mit Licht bestimmter Wellenlänge im Fluoreszenzmikroskop angeregt und emittiert wiederum Licht im sichtbaren Spektrum. Die Zellen wurden in 24-Well-Platten auf sterilen Deckgläschen kultiviert. Um die Zellen zu fixieren, wurden die Deckgläschen für 6 min in -20°C kaltem Methanol inkubiert. Alternative wurden die Zellen 10 min in 3,7% Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit 0,2% Triton X-100 permeabilisiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit PBS gespült und für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einem primären Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5 min konnte die zelluläre Lokalisation des Antigens mit einem passendem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (Alexa, Invitrogen) sichtbar gemacht werden. Sowohl der primäre wie auch der sekundäre Antikörper wurden in PBS mit 1% Rinder Serum Albumin verdünnt.

Zusätzlich zur Antikörper-Färbung wurde meist eine Hoechst-Färbung durchgeführt. Diese Chemikalie färbt das Chromatin der Zellen, so dass man unter dem



Fluoreszenzmikroskop die Zellkerne erkennen kann. Dazu wurden die Zellen für 4 min mit Hoechst 33258 (Hoechst) (1  $\mu$ M in PBS) bei RT inkubiert und vor dem Einbetten in PermaFluor Aqueous Mounting Medium (Beckman Coulter) wurden sie 5 min in PBS gewaschen.

Zur Auswertung diente in der Regel das Fluoreszenzmikroskop (Fluoreszenz-Mikroskop Axioskop II der Firma Zeiss) und es kamen apochromatische Ölimmersionsobjektive mit einem Vergrößerungsfaktor von 10, 40, 63 und 100 zum Einsatz. Alle Bildaufnahmen wurden mit dem 63er Objektiv (numerische Apertur 1,4) gemacht. Die Kolokalisationsbilder wurden mit dem Zeiss LSM 510 Meta Konfokal Mikroskop aufgenommen. Falls nicht anders ausgewiesen, wurde die Software AxioVision (LE) Rel. IV.5 zur Auswertung eingesetzt.

### **3.3.6 Nukleozytoplasmatischer Transport *in vitro***

Der *in vitro* Transport Test (Adam et al., 1990) bietet die Möglichkeit, die Konzentration der im System befindlichen Komponenten (Rezeptoren, Substrat etc.) beeinflussen zu können. Hierzu wird die Plasmamembran von HeLa-Zellen selektiv mittels Digitonin permeabilisiert. Bei einer Permeabilisierung mit Digitonin bleibt die Kernhülle wegen des geringen Anteils an Cholesterin intakt, gleichzeitig wird die Plasmamembran durchlässig. Es besteht die Möglichkeit die im Zytosol vorhandenen, löslichen Proteine auszuwaschen und sie durch rekombinante Proteine zu ersetzen.

Auf Glasplättchen gewachsene HeLa-Zellen werden mit kaltem Transportpuffer gewaschen, mit 0,015% Digitonin (1% Stammlösung in DMSO) in Transportpuffer auf Eis für 5 min permeabilisiert und danach dreimal mit kaltem Transportpuffer gewaschen. Die semipermeablen Zellen wurde mit 10-15  $\mu$ l Zytosol sowie einem fluoreszent-markiertem Transport-Substrat inkubiert. Die Importreaktionen erfolgten bei 30°C bzw. bei 4°C in Anwesenheit eines ATP-regenerierenden Systems (1 mM ATP, 2,8 mM Creatinphosphat, 0,4 U Creatin Phosphokinase; Calbiochem) in Transportpuffer.

Im Anschluss an die Import-Reaktion werden die Zellen wiederum dreimal je 3-5 min mit kaltem Transportpuffer gewaschen und die Lokalisation des jeweiligen Substrates mittels (indirekter) Immunfluoreszenz analysiert.

Eine andere Variante des *in vitro* Transport Tests mit HeLa-Suspensionszellen durchgeführt (Melchior 1998). Die Analyse erfolgt anschließend mit einem Durchflusszytometer (FACScalibur, Becton Dickinson). Hierbei wird die Transport-Reaktion in FACS-Röhrchen (5 ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol, Becton Dickinson) durchgeführt.

50 ml HeLa-Suspensionszellen, mit einer bekannten Menge an Zellen, werden durch Zentrifugation mit 200 g geerntet und einmal mit Transport Puffer gewaschen. Danach werden sie je nach Zellzahl in Transport Puffer resuspendiert und die Zellmembran mit Digitonin (0,75 µl 10% Digitonin pro ml Zellsuspension) selektiv permeabilisiert. Die Effizienz der Permeabilisierung kann mit Trypan-Blau-Färbung kontrolliert werden. Zum Abstoppen der Permeabilisierung werden die Zellen mit eiskaltem Transport Puffer verdünnt. Die Zellen werden erneut durch Zentrifugation pelletiert und in 400 µl Transport Puffer aufgenommen. Die Zellzahl wird nun durch Messen der OD bei 550 nm (10 µl Zellen verdünnt in 990 µl TB) bestimmt und mit Hilfe einer Standardkurve auf  $3 \times 10^5$  Zellen/10 µl eingestellt.

Die vorbereitete Zellsuspension wurde mit 10-15 µl Zytosol oder rekombinanten Transportfaktoren, einem ATP-regenerierendem System (siehe oben) sowie einem fluoreszenten Transport-Substrat bei 30°C für 30 min inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die in Eiswasser inkubiert wurden.

Nach Ende der Transport-Reaktion wurden die FACS-Röhrchen mit 4 ml eiskaltem Transport Puffer befüllt, abzentrifugiert und pro Probe wurden 10.000 Zellen im Durchflusszytometer gemessen.

### **3.3.7 Transfektion von DNA in Säugerzellen**

Transiente Transfektion von Plasmid-DNA wurden mit den Transfektionsreagenzien Fugene (Roche) bzw. Polyfect (Qiagen) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Dabei werden die Zellen bei einer Zelldichte von 50%-70% transfiziert. Dabei wurde ein 1:2,5 Verhältnis von DNA zu Fugene (Roche) bzw. ein Verhältnis von 1:4 von DNA zu Polyfect (Qiagen) verwendet.

### **3.3.8 siRNA-vermittelte RNA Interferenz**

Die Methode der RNA-Interferenz stellt eine sehr effiziente und spezifische Methode dar, die Expression bestimmter Protein auf post-transkriptioneller Ebene zu unterdrücken. Mediatoren in diesem Prozess sind 21 Nukleotide lange,

doppelsträngige RNA-Moleküle, die sogenannten siRNAs. siRNAs können durch Transfektion direkt in Säugerzellen eingebracht werden (Elbashir et al., 2001; siehe Punkt: Transfektion von siRNA mit Oligofectamin in Säugerzellen), wo sie durch einen Enzymkomplex, der Nuklease RISC (RNA-induced silencing complex) erkannt und gebunden werden (Hammond et al., 2000). RISC vermittelt das Auftrennen des RNA-Doppelstranges sowie die darauf folgende Hybridisierung mit der mRNA durch homologe Basenpaarung. Dies führt zur Degradation dieser mRNA und damit zur Unterdrückung der Synthese des durch sie kodierten Proteins.

#### *3.3.8.1 Auswahl einer siRNA Sequenz*

Um eine siRNA Duplex gegen eine spezifische mRNA herzustellen, ist es notwendig mindestens 20 Nukleotide der Ziel-mRNA zu kennen. Um sicher zu gehen, dass nur ein einziges Gen die ausgewählte Sequenz hat, kann man verschiedene Datenbanken durchsuchen (z.B. [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)). Die Zielsequenz sollte aus 19 beliebigen Nukleotiden bestehen, umgeben von zwei Adenin- und zwei Uracil-Resten (5'-AA(N19)UU). Eine effektive siRNA weist am 5'-Ende des Antisense Stranges im Vergleich zum 3'-Ende einen thermodynamisch instabileren Abschnitt auf. Dies erleichtert vermutlich das Entwinden der siRNAs im RISC Komplex. Idealerweise weist die potenzielle Sequenz einen G/C-Gehalt zwischen 30-52% auf und sie sollte nicht im Bereich von 50-100 Nukleotiden abwärts vom Startcodon sein. Angela Reynolds und ihre Arbeitsgruppe haben im Februar 2004 einen Artikel veröffentlicht, indem das Design und die Anwendung von siRNAs sehr detailliert erklärt wird (Reynolds et al., 2004). Die ausgewählte siRNA wurde von der Firma Ambion (Austin, Texas, USA) in Salz-freier und ungeschützter Form geliefert.

Als unspezifische Kontrolle wurde parallel eine siRNA, die einem Sequenzabschnitt der Firefly-Luciferase („non targeting“-Kontrolle) entspricht, transfiziert (Sequenzen der verwendeten siRNAs siehe Teilabschnitt 2.8).

#### *3.3.8.2 Transfektion von siRNA mit Oligofectamin (Invitrogen) in Säugerzellen*

Die verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 10% fötalem Kälberserum ohne Antibiotika kultiviert. Sollte später eine Immunfluoreszenz durchgeführt werden, wurden in die einzelnen Löcher der 24-Well-Platte sterile Deckgläschen gelegt. Die Transfektion findet etwa 24 Stunden nach dem Plattieren der Zellen statt, dabei sollten die Zellen eine Konfluenz von 40 bis

60% erreicht haben. Um die siRNA in die Zellen zu transportieren, wurde das Transfektionsreagenz Oligofectamin (Invitrogen) benutzt. Es entsteht ein Liposomen-Nukleinsäure-Komplex, der von den Zellen aufgenommen wird. Anschließend wird die RNA Duplex ins Zytoplasma entlassen (Felgner et al., 1989).

Hierfür wurden für jede siRNA zwei unterschiedliche Mischungen hergestellt. Der erste Prämix enthält pro Well 3  $\mu$ l der siRNA (20  $\mu$ M Stock) und 50  $\mu$ l eines serumfreien Mediums (Optimem 1, Invitrogen), der zweite 3  $\mu$ l Oligofectamin und 12  $\mu$ l Optimem. Der Prämix 2 sollte etwa 7 min bei RT inkubieren, bis eine leichte Trübung der Lösung auftritt. Anschließend wurden die Prämixe vermischt und erneut 15 bis 30 min bei RT inkubiert, damit sich der Liposomen-Nukleinsäure-Komplex entwickeln kann. Jeweils 67  $\mu$ l der Mischung wurde dann zu den Zellen (in 530  $\mu$ l Medium ausgesät) in ein Well gegeben. Die Endkonzentration von siRNA betrug dann 100 nM pro Well. Die Konzentration der siRNA ist dabei nicht so entscheidend wie das Verhältnis der Liposomen-Komplexe zu den RNA-Molekülen.

Untersuchungen der spezifischen Effekte wurden mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie oder des Western Blots durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

Aufgrund der interessanten Doppelfunktion von RanBP2 als Bestandteil der Kernpore, sowie als SUMO E3-Ligase, vermuteten wir einen mechanistischen oder funktionellen Zusammenhang zwischen RanBP2-abhängiger SUMOylierung und Kern-Zytoplasma-Transport. Da zu Beginn der Arbeit keine *in vivo* Substrate für RanBP2-abhängige SUMOylierung bekannt waren, wurden zunächst verschiedene Transportsubstrate, deren Importrezeptoren bereits bekannt waren, in einer *in vitro* SUMOylierung-Reaktion auf RanBP2-spezifische SUMOylierung untersucht.

Auf der Suche nach potentiellen Modellsubstraten für RanBP2-abhängige SUMOylierung wurden Kandidaten aus der Literatur ausgewählt. Sp100 wurde als Modellsubstrat ausgesucht, weil es ein bekanntes RanBP2-Substrat *in vitro* ist (Sternsdorf et al., 1999; Pichler et al., 2002). Der Transkriptionsfaktor TEL wurde als potentieller Kandidat ausgewählt, um den Zusammenhang zwischen Proteinexport und RanBP2-abhängiger SUMOylierung zu untersuchen. Für TEL wurde gezeigt, dass das Protein posttranslational mit SUMO modifiziert werden kann, und dass die Mutation des SUMO-Akzeptorlysins zu Arginin zu einer Akkumulation des Proteins im Kern führt (Wood et al., 2003). Neben Sp100 und TEL wurden die Komponenten des NF-Y Transkriptionskomplexes, die von der Nachbarabteilung (Leiter: Prof. Dr. Doenecke) zur Verfügung gestellt wurden, auf RanBP2-abhängige SUMOylierung getestet. Die Importwege der einzelnen NF-Y Untereinheiten wurden durch Dr. Jörg Kahle aufgeklärt. Während NFYB und NFYC als Heterodimer durch Importin 13 in den Kern gelangen, wird NFYA durch Importin  $\beta$  transportiert (Kahle et al., 2005). Eine mögliche Verbindung zwischen Importin 13 als Importfaktor und SUMOylierung ergab sich aus dem Befund, dass Ubc9 von Importin13 importiert wird (Mingot et al., 2001). Die Interaktion zwischen Importin 13 und Ubc9 führt aber nicht zu einer Inaktivierung in SUMOylierungs-Reaktionen (Melchior, unpublizierte Daten). Ubc9 interagiert in seiner Funktion als SUMO-E2-Enzym mit vielen, verschiedenen Proteinen, so entstand die Hypothese, dass Ubc9 als eine Art Adaptor zwischen Importin 13 und SUMO-modifizierbaren Import-Substraten dienen könnte.

Wie im Folgenden beschrieben führten die arbeiten an NF-Y zum Erfolg. Arbeiten zu Sp100 und TEL wurden in einem frühen Stadium auch aufgrund technischer

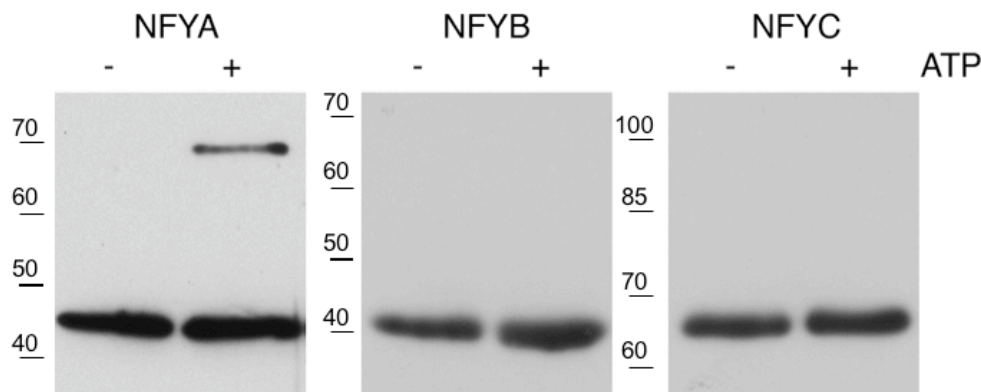
Schwierigkeiten (Proteinaufreinigung, etc.) zurückgestellt und sind hier nicht beschrieben.

#### **4.1 NFYA ist ein SUMO Substrat *in vitro***

NF-Y ist ein Transkriptionsfaktor, der aus drei Untereinheiten besteht. Die einzelnen Untereinheiten wurden im Labor von Herr Prof. Dr. Doenecke hinsichtlich ihres Transportverhaltens untersucht (Kahle et al., 2005) und standen als rekombinante Proteine zur Verfügung. Deshalb konnte getestet werden, ob NFYA, NFYB oder NFYC *in vitro* RanBP2-abhängig SUMOyliert werden. Hierfür wurden die einzelnen Untereinheiten des NF-Y Komplexes mit oder ohne Zugabe von ATP, in Anwesenheit von rekombinantem reifen SUMO-1 ( $\Delta C4$ ), E1-Enzym, E2-Enzym sowie einem Fragment von RanBP2 $\Delta FG$  als SUMO-E3-Ligase gemischt. Sowohl das E1 wie auch das E2-Enzym wurden in geringen Konzentrationen (68nM E1, 56nM E2) eingesetzt, um eine spezifische Modifikation mit Hilfe der E3-Ligase RanBP2 zu ermöglichen. Das Mischen dieser rekombinanten Proteine der SUMOylierungs-Maschine (E1, E2, E3 und SUMO) und die Zugabe von ATP ermöglicht die Modifikation eines SUMO-Substrates im Reaktionsgefäß. Nach einstündiger Inkubationszeit bei 30°C wurden die Reaktionen durch Zugabe von zweifach SDS-Probenpuffer gestoppt und auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt.

Abbildung 5 zeigt die einzelnen Untereinheiten des NF-Y Komplexes nach Reaktion, jeweils detektiert mit den spezifischen Antikörpern (siehe Antikörperliste im Material und Methoden Teil, 2.7.1 Primärantikörper). Für die A Untereinheit des trimeren NF-Y Komplexes erkennt man ohne die Zugabe von ATP nur eine spezifische Bande bei der vorhergesagten Größe von etwa 44 kDa. In der Probe, die mit ATP inkubiert wurde, erkennt man eine zusätzliche, höhermolekulare Bande, die einem ca. 20 kDa größeren Protein entspricht. Dieser Größenunterschied ist charakteristisch für eine posttranslationale Modifikation mit SUMO, obwohl SUMO-1 nur 11 kDa groß ist.

Weder für die NFYB noch für die NFYC Untereinheit konnte eine Modifikation mit SUMO durch RanBP2 nachgewiesen werden. Die A Untereinheit des NF-Y Komplexes war dagegen ein überraschend effizientes Substrat für SUMOylierung *in vitro*.

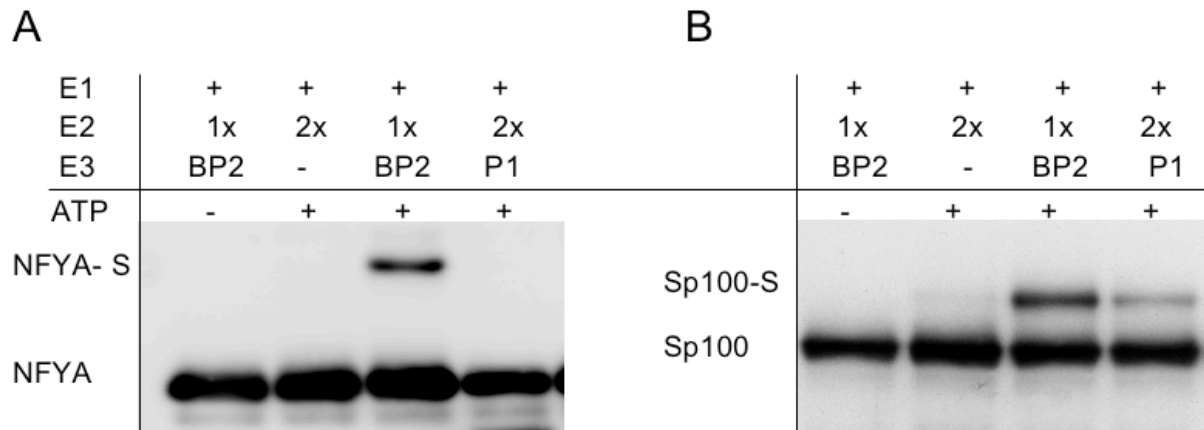


**Abb. 5: NFYA ist ein SUMO Substrat *in vitro***

NFYA-His, His-zz-NFYB oder GST-NFYC wurden mit 68nM E1, 56nM E2, 4,4 µM matures SUMO-1 ( $\Delta$ C4) und 6nM RanBP2 $\Delta$ FG, +/- 3mM ATP inkubiert (30°C, 60min). Nach Abstoppen der Reaktion mit 2x SDS-Laemmli wurden die Proben auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und mittels Immunoblot (anti-NFYA; anti-NFYB oder anti-NFYC) analysiert. NFYA wird mit SUMO kovalent modifiziert. Für NFYA, nicht aber für NFYB und NFYC, zeigt sich der charakteristische 20 kDa Größenunterschied im Gel.

**4.2 NFYA SUMOylierung erfordert *in vitro* RanBP2 als E3 Ligase**

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die *in vitro* SUMOylierung von NFYA präferenziell mit RanBP2 als SUMO-E3 Ligase erfolgt. Zu diesem Zweck wurde eine E3-Ligase der PIAS Familie im Vergleich zu RanBP2 in einer *in vitro* SUMOylierungs-Reaktion getestet. Wie die Abbildung 6 zeigt, wird NFYA spezifisch von der E3 Ligase RanBP2. Eine dem SUMOylierten NFYA Protein entsprechende Bande konnte nur in Anwesenheit von ATP und dem RanBP2 $\Delta$ FG Fragment, nicht jedoch ohne ATP oder nach Zugabe der PIAS-Ligasen detektiert werden. Als Kontrolle für die Funktionalität der PIAS-Ligase wurde eine SUMOylierungs-Reaktion des SP100 Proteins parallel durchgeführte (Abbildung 6; B). Sp100 eignet sich besonders gut als Modellsubstrat (Sternsdorf et al., 1999), da es sich *in vitro* mit vielen E3-Ligasen, aber auch E3-Ligase-unabhängig mit SUMO modifizieren lässt.



**Abb. 6: In vitro SUMOylierung von NFYA benötigt die E3 Ligase RanBP2**

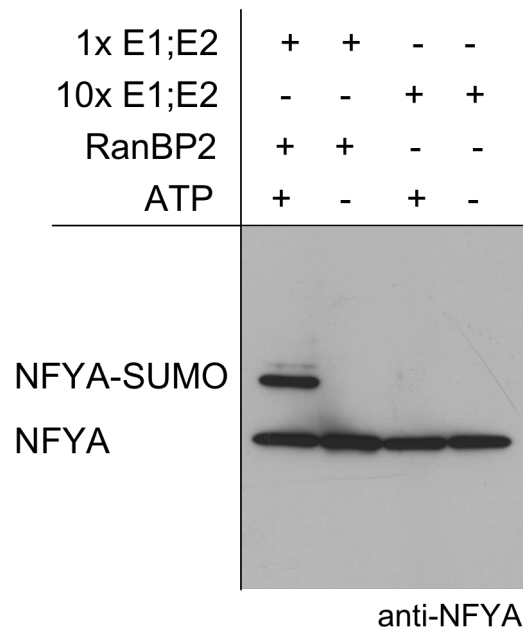
*In vitro* Modifikations-Reaktion mit 68nM E1, 56nM E2 (1x), 4,4 µM SUMO-1ΔC4 und 3mM ATP (30°C, 60min). Als SUMO E3-Ligasen wurden RanBP2ΔFG (BP2) oder PIAS1 (P1) hinzugegeben. In den Ansätzen mit PIAS als SUMO E3 Ligase wurde 112nM E2 (2x) verwendet.

(A) NFYA *in vitro* SUMOylierung mit verschiedenen SUMO E3-Ligasen. Nach Abstoppen der Reaktion mit 2x SDS-Probenpuffer wurden die Proben auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und mittels Immunoblot mit anti-NFYA Antikörper analysiert.

(B) Als Aktivitätskontrolle für das PIAS1 wurde eine Kontroll-Reaktion mit Sp100 durchgeführt. Die Proben wurden auf ein 7% SDS-Gel aufgetragen und mittels Immunoblot mit anti-YFP Antikörper analysiert.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde untersucht, ob NFYA SUMOylierung auch ohne E3-Ligase erreicht werden kann. Zu diesem Zweck wurden das E1 und das E2 Enzym in zehnfacher Konzentration eingesetzt (680nM E1, 560nM E2). Abbildung 7 zeigt einen Vergleich der NFYA SUMOylierung mit geringen Mengen der E1 und E2 Enzyme in Anwesenheit von RanBP2 oder mit erhöhter Enzymkonzentration in Abwesenheit der E3-Ligase. Das Experiment macht deutlich, dass NFYA für eine effiziente SUMOylierung die Hilfe einer E3-Ligase benötigt. Von den getesteten E3-Ligasen, Mitgliedern der PIAS Familie und RanBP2, eignete sich das RanBP2 Fragment am besten für eine effiziente Modifikation mit SUMO-1 *in vitro*.





**Abb. 7: Erhöhte Konzentration von E1 und E2 können die E3 Ligase nicht ersetzen**

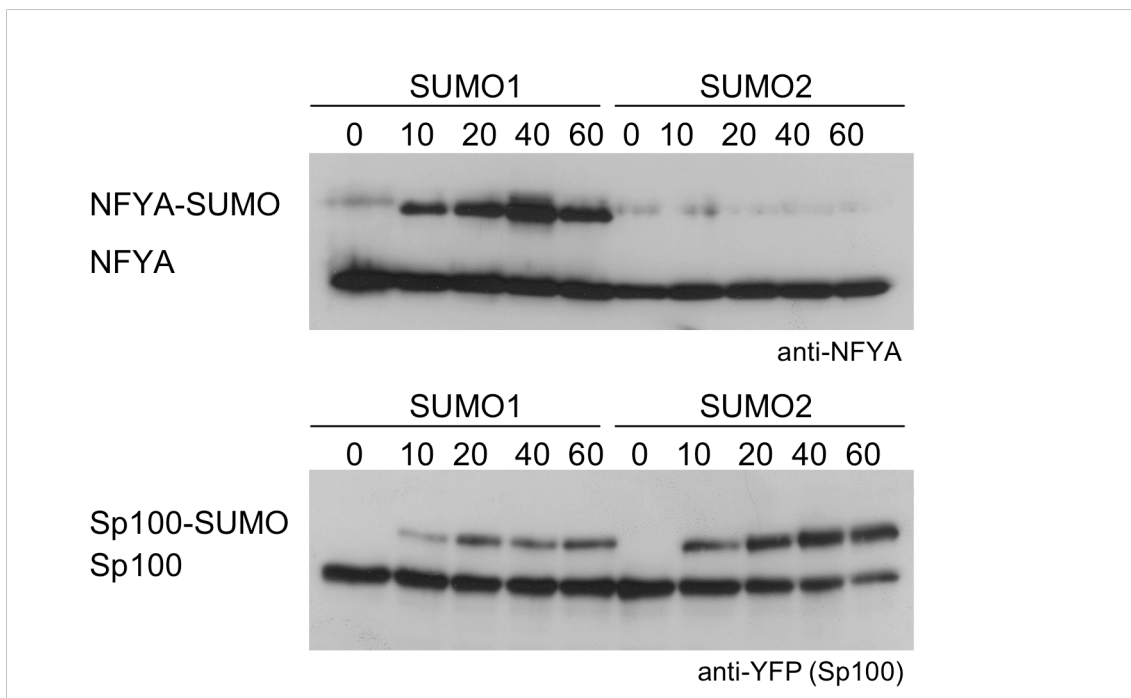
NFYA wurde entweder mit 68nM E1, 56nM E2, 4,4 µM SUMO-1ΔC4 und 6nM RanBP2ΔFG oder mit 10fach höherer E1 (Uba2/Aos1) und E2 (Ubc9) Konzentration ohne RanBP2ΔFG +/- 3mM ATP inkubiert (30°C, 60min). Nach Abstoppen der Reaktion mit 2x SDS-Probenpuffer wurden die Proben auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und mittels Immunoblot mit anti-NFYA Antikörper analysiert. Eine SUMO Modifikation von NFYA wurde mit geringen Menge E1 und E2 in Kombination mit RanBP2, nicht aber mit der 10fach höheren Konzentration von den E1 und E2 Enzymen detektiert.

**4.3 NFYA wird bevorzugt mit SUMO-1 modifiziert**

Bisher ist noch nicht bekannt, warum ein Protein bevorzugt mit SUMO-1 oder SUMO-2 modifiziert wird. Obwohl viele Substrate *in vivo* eine eindeutige Präferenz für eine SUMO Spezies zeigen, können diese häufig als rekombinante Proteine sowohl mit SUMO-1 als auch mit SUMO-2 konjugiert werden. Um zu untersuchen, ob NFYA eine Präferenz für eine der SUMO Spezies aufweist, wurde eine *in vitro* SUMOylierungs-Reaktion mit den verschiedenen SUMO Paralogen in Anwesenheit von RanBP2 durchgeführt. Die Reaktion wurde nach 10, 20, 40 oder 60 Minuten durch Zugabe von zweifach SDS-Probenpuffer gestoppt und mit spezifischen Antikörpern im Immunoblot analysiert.

Abbildung 8 zeigt, dass NFYA eine deutliche Präferenz für die Modifikation mit SUMO-1 zeigt. Eine Konjugation mit SUMO-2 ist auch nach 60 min kaum erkennbar. Als Kontrolle wurde parallel eine SUMOylierung von YFP-Sp100 mit denselben Reaktionsansätzen durchgeführt. Wie erwartet zeigt YFP-Sp100 eine bevorzugte Modifikation mit SUMO-2. Diese Kontrolle zeigt, dass die SUMOylierung mit SUMO-2

effizient funktioniert und schließt aus, dass die Spezifität für SUMO-1 durch die E3-Ligase RanBP2 bedingt ist.



**Abb. 8: NFYA wird *in vitro* bevorzugt mit SUMO-1 modifiziert**

68nM E1, 56nM E2, 4,4 $\mu$ M SUMO-1 $\Delta$ C4 und 6nM RanBP2 $\Delta$ FG wurden +/- 3mM ATP für unterschiedlich lange Zeiten inkubiert. Oben: Das Bild zeigt eine *in vitro* Modifikation (0 bis 60 min) von NFYA entweder mit SUMO-1 oder mit SUMO-2. Unten: Zeitabhängigkeit einer YFP-Sp100 SUMOylierung von 0 bis 60 min, entweder mit SUMO-1 oder mit SUMO-2. Die Sp100 Modifikation dient als Kontrolle für den SUMO-2 Enzym-Prämix. NFYA wird *in vitro* bevorzugt mit SUMO-1 modifiziert.

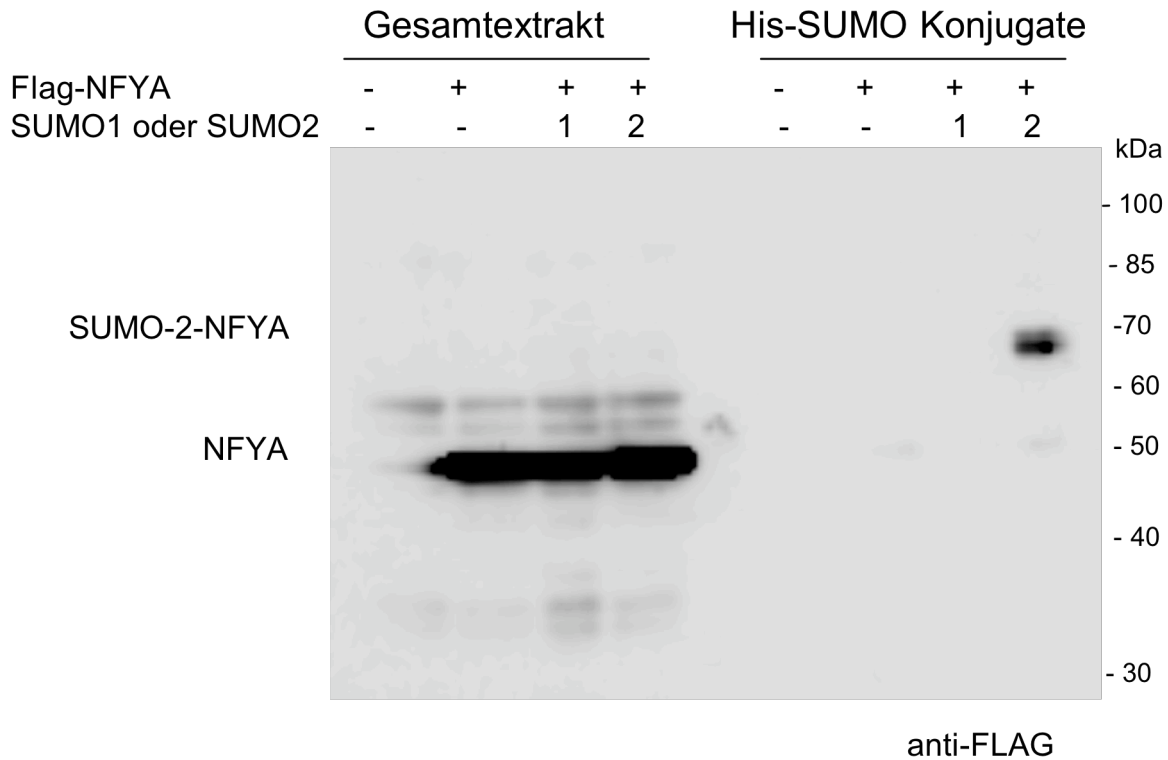
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass NFYA ein effizientes Substrat für SUMO Modifikation *in vitro* ist. Diese posttranslationale Modifikation wird erfolgreich von der SUMO E3-Ligase RanBP2 katalysiert und erfolgt *in vitro* präferentiell mit dem SUMO-1 Paralog.

#### 4.4 NFYA ist ein SUMO Substrat *in vivo*

Der NFYA Antikörper der Firma Becton Dickinson kann auf HeLa-Zelllysat keine spezifische Bande des endogenen Proteins detektieren. Deshalb kann natürlich auch keine 20 kDa vergrößerte Bande, also eine mögliche SUMOylierte Form von NFYA, im direkten Western Blot erwartet werden. Für den Nachweis, ob die SUMOylierung von NFYA auch in Zellen existiert, wurde eine Nickel-Affinitätschromatographie

durchgeführt. Das Verhältnis von unmodifizierter und modifizierter Form liegt häufig auf der Seite der nicht-modifizierten Spezies. Um das Gleichgewicht in Richtung der modifizierten Form zu verschieben und eine Detektion des NFYA Proteins zu ermöglichen, erfolgte eine Koexpression von SUMO und NFYA. HeLa-Zellen wurden 48 Stunden vor ihrer Lyse mit Flag-NFYA und His-SUMO-1 oder 2 transfiziert. Die Lyse erfolgte in denaturierendem 8M Guanidinium Puffer, wie sie 1999 von Dr. Ron Hay und seinen Kollegen (Rodriguez et al., 1999) beschrieben wurde. Durch die Verwendung eines chaotropen Salzes wie Guanidinium-Hydrochlorid erfolgt die sofortige Denaturierung aller Proteine, somit auch der SUMO Isopeptidasen, die für die Abspaltung von SUMO von seinen Substraten verantwortlich sind. Native Bedingungen oder eine langsamere Zellyse könnten im Verlust der SUMO-Modifikationen resultieren. Isopeptidasen sind auch unter extremen pH-, Temperatur- und Salzkonzentrationen noch aktiv, während die Konjugationsmaschinerie sehr störungsanfällig ist. Dies kann nur verhindert werden, indem während des gesamten Prozesses der Aufreinigung denaturierende Bedingungen aufrechterhalten werden. Eine Anreicherung der SUMO-Proteinkonjugate erfolgt über die 6fache His-Markierung des überexprimierten SUMO-1 oder SUMO-2 Proteins. Durch die Inkubation mit Nickel-Agarose werden alle zum Zeitpunkt der Lyse modifizierten Proteine aus dem Gesamtzellysat angereichert.

Wie in Abbildung 9 zu erkennen, läuft das unmodifizierte NFYA in der Gesamtprobe etwa bei 45 kDa. Eine 20 kDa höher migrierende Bande konnte in der Spur detektiert werden, in der His-SUMO-2 konjugierte Proteine angereichert wurden. Demzufolge findet eine Modifikation von NFYA mit SUMO auch in HeLa-Zellen statt. Diese scheint aber ausschließlich mit His-SUMO-2 zu erfolgen.



**Abb. 9: NFYA ist ein SUMO Substrat *in vivo***

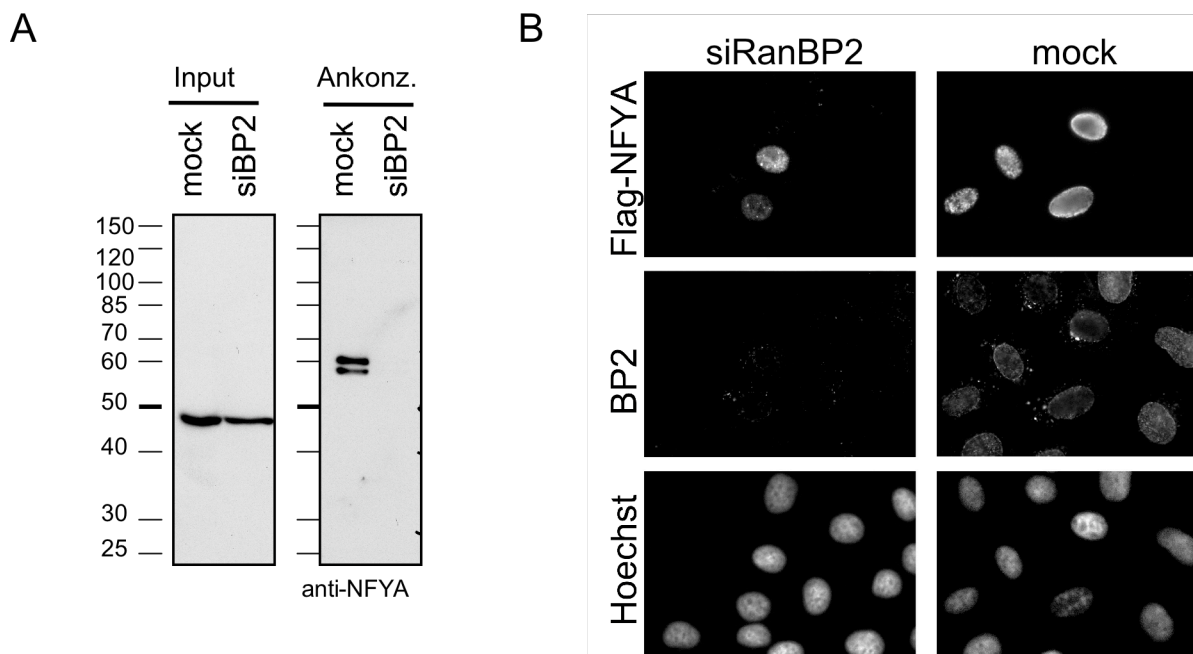
HeLa-Zellen wurden mit Flag-NFYA und HIS-SUMO1 oder 2 transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen in 8M Guanidium Puffer lysiert und eine Anreicherung an Nickel-Agarose unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Dies diente der Ankonzentration von HIS-SUMO modifizierten Proteinen. 3,6% des Gesamtextraktes wurden Methanol-Chloroform gefällt und zusammen mit den angereicherten SUMO-modifizierten Proteinen auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und mittels Immunoblot mit anti-Flag (mouse) Antikörpern analysiert.

Im Gegensatz zu den *in vitro* Daten, die eine eindeutige Präferenz für SUMO-1 zeigen, gelingt *in vivo* ein Nachweis der SUMOylierung nur mit SUMO-2. Für eine nähere Betrachtung dieser Diskrepanz zwischen der biochemischen Charakterisierung und den Experimenten in HeLa-Zellen siehe Diskussion (siehe Teilabschnitt 5.1.2).

**4.5 NFYA ist ein RanBP2-abhängiges SUMO Substrat *in vivo***

Neben den bereits gewonnenen Erkenntnissen zur SUMOylierung von NFYA in Zellen sollte nun überprüft werden, ob sich die deutliche Präferenz von RanBP2 als E3 Ligase *in vitro* auch in *in vivo* Experimenten bestätigen lässt. Dafür wurde eine etablierte siRNA gegen RanBP2 eingesetzt (Hutten et al., 2006). HeLa-Zellen

wurden mit RanBP2 spezifischer siRNAs transfiziert oder als Kontrolle nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt (im Folgenden als „mock“ bezeichnet). 24 Stunden vor Ernte der Zellen wurden diese mit Flag-NFYA und His-SUMO2 kotransfiziert. Die Zellen wurden, wie bereits beschrieben, denaturierend lysiert und SUMOylierte Proteine mittels Nickel-Agarose angereichert. Das Experiment zeigt, dass die NFYA SUMOylierung in den RanBP2 depletierten Zellen stark reduziert ist (siehe Abbildung 10 A). Parallel wurde die Lokalisation des Flag-NFYA Proteins in Abhängigkeit von RanBP2 überprüft. Falls eine Reduktion des Kernporenproteins RanBP2 zu einer Veränderung der Lokalisation von NFYA führen würde, könnte auch dies die Ursache für die beobachtete Reduktion der Mengen an SUMOyliertem NFYA sein.



**Abb. 10: Reduktion der NFYA SUMOylierung in RanBP2 depletierten Zellen**

Transfektion von Flag-NFYA und His-SUMO2 in HeLa-Zellen, die für 96 Stunden mit siRNA gegen RanBP2 behandelt wurden. (A) Denaturierende Anreicherung von His-SUMO2 modifizierter Proteinen an Nickel-Agarose. „Input“ zeigt den Gesamtzellextrakt und „Purified“ markiert die an Nickel-Agarose angereicherten Proben. Die Proben wurden auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und mittels Immunoblot mit anti-NFYA Antikörper analysiert. (B) Immunfluoreszenz auf HeLa-Zellen aus demselben Experiment wie in A. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert und mit NFYA und RanBP2 Antikörpern inkubiert. Die DNA wurde mit Hoechst 33258 (Sigma) angefärbt.

Dazu wurden Zellen desselben siRNA Experimentes entnommen und einer Immunfluoreszenz-Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen RanBP2 und Flag unterzogen. Typischerweise erscheinen Nukleoporene wie RanBP2 in der

Immunfluoreszenz in der Fokusebene hauptsächlich als ringartige Struktur um den Kern. Im Vergleich zu den mock-transfizierten Zellen verschwindet der perinukleäre Ring nach der Behandlung mit siRNA gegen RanBP2 (siehe Abb. 10 B). Es konnte jedoch keine veränderte Lokalisation von transfiziertem Flag-NFYA beobachtet werden.

Diese Daten deuten darauf hin, dass RanBP2 auch *in vivo* die SUMOylierung von NFYA katalysiert. Dieser Befund ist auch deshalb besonders interessant, weil erst sehr wenige Substrate für RanBP2 als SUMO E3-Ligase beschrieben wurden (siehe Diskussion, Teilabschnitt 5.1.3).

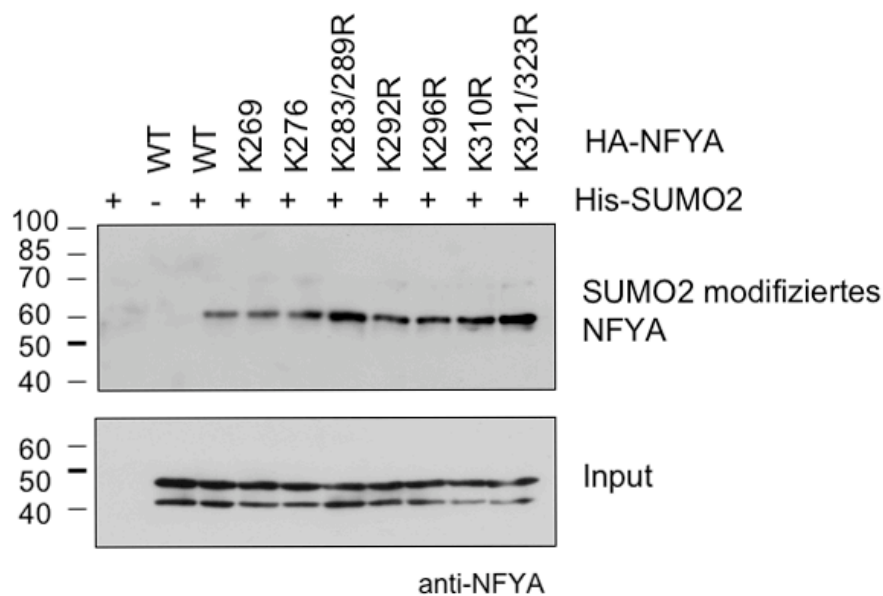
#### **4.6 Identifikation von SUMO-Akzeptorstellen in NFYA**

Angesichts der beobachteten RanBP2 Abhängigkeit der NFYA SUMOylierung sollte NFYA im Folgenden als Modellsubstrat für Transportstudien eingesetzt werden. Zunächst sollte hierzu das SUMO Akzeptorlysin im NFYA bestimmt werden, um anschließend Wildtyp NFYA und eine nicht mehr SUMOylierbare Mutante von NFYA hinsichtlich ihrer Transportraten vergleichen zu können. Die Aminosäuresequenz von NFYA enthält nur neun Lysine, wobei nur eines von ihnen in einem klassischen SUMO Konsensusmotiv eingebettet ist. Bei der Sequenz AKLE (Lysin an Position 283) handelt es sich um ein klassisches SUMO Konsensusmotiv ( $\psi$ KxE). Allerdings hatte die Mutation von Lysin 283 zu Arginin keine signifikante Reduktion der SUMOylierung *in vivo* zur Folge (siehe Abbildung 11), so dass zur Identifizierung des Lysins in NFYA, welches mit SUMO modifiziert werden kann, zwei alternative Ansätze gewählt wurden. Auf der einen Seite wurden die verschiedenen Lysine in NFYA entweder einzeln oder in Kombination mittels gezielter Mutagenese (engl.: „*site-directed mutagenesis*“) durch Arginine ersetzt (Liste siehe Anhang). Hierbei handelt es sich um einen konservativen Aminosäureaustausch, durch den die Konjugation eines SUMO Proteins an diese Position verhindert wird.

Auf der anderen Seite wurde versucht, die SUMO-Akzeptorstelle in rekombinantem NFYA-His *in vitro* mit Hilfe der Massenspektrometrie im Rahmen einer Kollaboration mit Dr. Guido Sauer (Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen) zu identifizieren.

#### 4.6.1 Analyse der SUMOylierung von NFYA Mutanten nach Transfektion

10 verschiedene Einzel- und Doppelmутanten von HA-NFYA wurden mit His-SUMO2 in HeLa-Zellen transfiziert. Nach denaturierender Lyse (siehe oben) und Anreicherung von SUMOylierten Proteinen an einer Nickel-Matrix wurde SUMOyliertes NFYA im Western Blot nachgewiesen. Wie in Abbildung 11 gezeigt, führte keine der Mutationen zu einem merklichen Verlust der Modifikation. Wie schon erwähnt, führte auch die Mutation des Lysins 283 zu Arginin, welches in dem Konsensusmotiv eingebettet ist, nicht zum Verlust der SUMOylierung (hier nur als Doppelmutante K283/289R gezeigt).



**Abb. 11: Mutationen verschiedener möglicher Akzeptorlysine (K→R) in NFYA führen nicht zum Verlust der SUMOylierung**

HeLa-Zellen wurden mit HA-NFYA und His-SUMO2 transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen in 8M Guanidinium Puffer lysiert und unter denaturierenden Bedingungen an einer Nickel-Matrix angereichert. 5% des Gesamtzellextraktes wurde Methanol-Chloroform gefällt und zusammen mit den Angereicherten SUMOylierten Proteinen auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und mittels Immunoblot mit anti-NFYA Antikörpern analysiert.

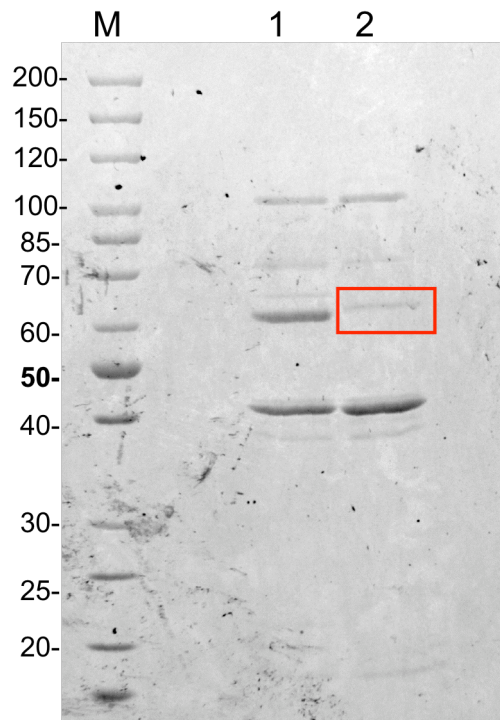
Da keine der gewählten Einzelmутationen bzw. kombinierten Mutationen zu einem signifikanten Rückgang der SUMOylierung von NFYA führte, ist die Position des Akzeptorlysins im NFYA Protein womöglich variabel. Mutiert man also ein Lysin, welches normalerweise konjugiert wird, wird statt dessen ein anderes Lysin mit SUMO verknüpft (ausführliche Diskussion siehe Teilabschnitt 5.1.1).

#### 4.6.2 Identifikation der SUMO-Akzeptor-Lysine mittels Massenspektrometrie

Alternativ zur Mutagenese wurde versucht, präferentiell verwendete SUMO-Akzeptorstellen mit Hilfe der Massenspektrometrie zu identifizieren. Für die Analyse wurden 2,5µg NFYA-His mit einer speziellen Massenspektrometrie-Mutante von SUMO-1 (im folgenden MS-SUMO1 genannt) im Rahmen einer *in vitro* SUMOylierungs-Reaktion modifiziert. Das MS-SUMO1 ist ein His<sub>6</sub> Fusionsprotein und besitzt im C-Terminus einen Aminosäureaustausch. Die Glutaminsäure in Position 93 wurde von Dr. Guido Sauer durch ein Arginin ersetzt. Hierdurch wird eine weitere tryptische Schnittstelle in das SUMO1 eingefügt. So entsteht nach tryptischem Verdau anstatt einer 2300 Da großen Seitenkette nur eine 361 Da schwere Modifikation. Dieser verkürzte SUMO-Rest erleichtert die Identifikation und Sequenzierung von SUMO-modifizierten Peptiden.

Abbildung 12 zeigt das Coomassie-Gel auf dem die *in vitro* Modifikation von NFYA mit SUMO1 und der MS-SUMO1 Variante aufgetragen wurde. Auf der linken Seite des Gels sieht man NFYA, welches mit Wildtyp SUMO1 modifiziert wurde. Auf der rechten Seite, eingerahmt in einen roten Kasten, sieht man NFYA, welches mit der MS-SUMO1 Mutante modifiziert wurde. Durch den His<sub>6</sub>-tag der MS-SUMO1 Mutante migriert das modifizierte NFYA etwas langsamer im Gel als das mit Wildtyp SUMO-1 modifizierte NFYA. Die Modifikation mit der MS-SUMO-1 Variante zeigt eine ineffizientere SUMOylierung. Unter Umständen ist dies auf die Existenz der Punktmutation oder der Histidin Markierung zurückzuführen. Das MS-SUMO1-modifizierte NFYA wurde aus dem Gel ausgeschnitten und von Dr. Guido Sauer (Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen) mittels Massenspektrometrie analysiert.





**Abb. 12: Coomassie-Gel der NFYA SUMOylierung für die MS/MS-Analyse**

Coomassie Färbung von zwei NFYA *in vitro* Modifikationen. (M) Spur mit Proteinstandard. (1) SUMO-Modifikation von NFYA mit Wildtyp SUMO. (2) SUMO-Modifikation von NFYA mit MS-SUMO1 Mutante. Der rote Kasten kennzeichnet die durch MS-SUMO1-modifizierte Form von NFYA, welche ausgeschnitten und analysiert wurde.

Um möglichst viele SUMO-Peptide zu identifizieren, ergibt sich idealerweise eine Sequenzabdeckung von 100%. Bei der Analyse von SUMO-modifiziertem NFYA konnte eine gute Abdeckung der NFYA Aminosäuresequenz des C-Terminus erzielt werden. Die gefundenen und sequenzierten Peptide sind in Abbildung 13 fett und rot markiert. Da sich im N-Terminus von NFYA keine Arginine oder Lysine befinden, konnte dieser Sequenzabschnitt wie erwartet nicht mit Trypsin verdaut werden. Im C-Terminus wurden bis auf zwei kürzere Abschnitte alle Peptide gefunden und auch sequenziert (siehe Abbildung 13).

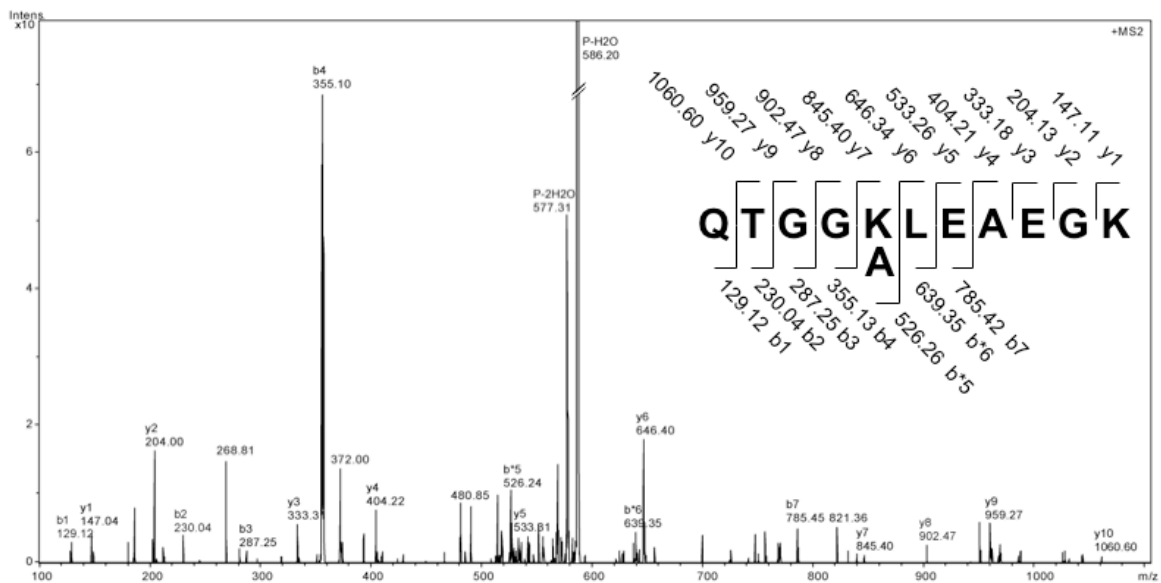
```

MEQYTTNSNS STEQIVVQAG QIQQQGGVT AVQLQTEAQV ASASGQQVQT LQVVGGQPLM 60
VQVSGGQLIT STGQPIMVQA VPGGQQQTIM QVPVSGTQGL QQIQLVPPGQ IQIQGGQAVQ 120
VQGQQGQTQQ IIIQQPQTAV TAGQTQTQQQ IAVGQQQVAQ TAEGQTIVYQ PVNADGTILQ 180
QVTVPVSGMI TIPAASLAGA QIVQTGANTN TTSSGQGTVT VTLPVAGNVV NSGGMVM MVP 240
GAGSVPAIQR IPLPGAEMLE EEPLYVNAKQ YHRILKRRQA RAKLEAEGKIPK ERKYLHE 300
SRHRHAMARK RGEGR FFSPKEKDSPHMQD PNQADEEAMT QIIRVS 346
    
```

**Abb. 13: Aminosäure-Sequenz von NFYA (GeneID: 18044)**

Identifizierte und sequenzierte Peptide der MS/MS-Analyse sind in rot und fett markiert. Die MS/MS-Analyse wurde von Dr. Guido Sauer (Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen) durchgeführt.

Bei der Analyse konnten zwei sich überlappende mit SUMO-modifizierte Peptide eindeutig identifiziert werden. In den Abbildungen 14 und 15 sind die MS/MS-Spektren zu sehen. Diese Spektren zeigen je ein NFYA Peptid, welches mit dem C-terminalem SUMO Peptid verknüpft ist. Identifiziert wurden das Lysin 283 (Abb. 14) und das Lysin 289 (Abb.15).



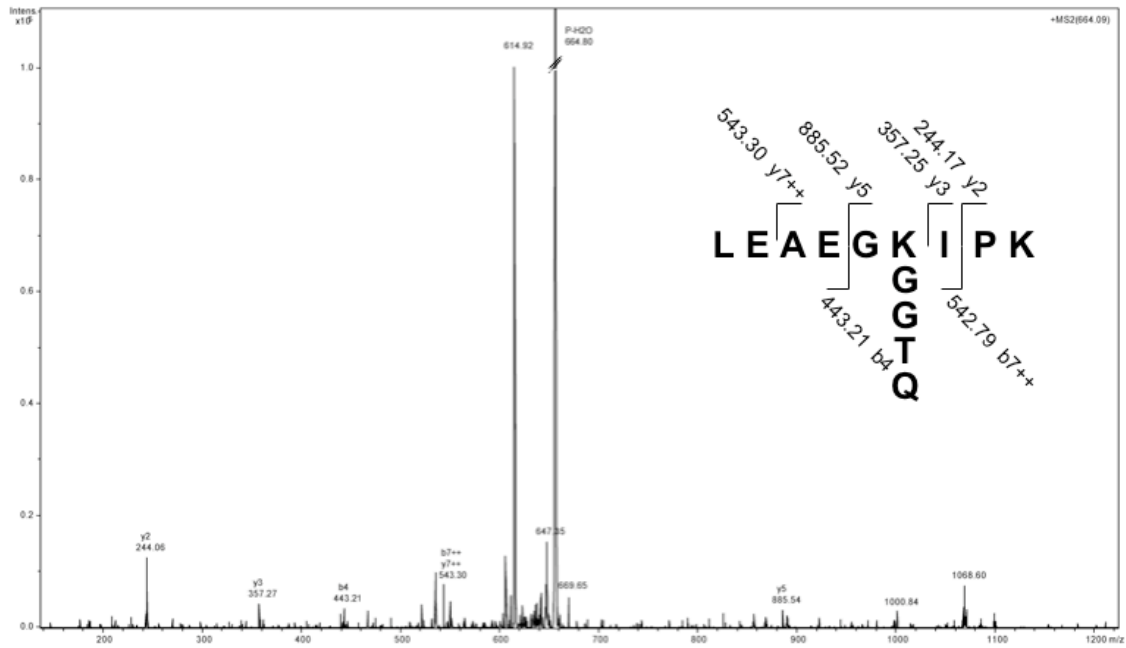
Parent ion mass: 594.85 (2+); monoisotopic mass: 1187.68 Da; modified lysine: K283

**Abb. 14: MS/MS-Spektrum eines MS-SUMO1-modifiziertem NFYA Peptid (Lysin 283)**

Die MS/MS-Analyse wurde von Dr. Guido Sauer (Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen) durchgeführt.

Das identifizierte Lysin 283 (AKLE) ist Bestandteil der einzigen klassischen SUMO-Konsensusstelle  $\psi$ KxE in der NFYA Sequenz.

Bei der zweiten identifizierten SUMOylierungsstelle handelt es sich mit der Sequenz EGKIP um eine inverse SUMO Konsensusstelle (IKGE), wie es sie auch im Korepressor KAP1 gibt (Ivanov et al., 2007). Eventuell erleichtert auch die Aminosäure Prolin die Präsentation des Lysins, so dass es besser durch das Ubc9 erreicht werden kann. Ein Konsensusmotiv, welches ein Prolin in direkter Nachbarschaft besitzt, wurde für das CCAAT/ Enhancer-binding Protein beschrieben (Subramanian et al., 2003).



Parent ion mass: 663.78 (2+); monoisotopic mass: 1325.55 Da; modified lysine: K289

**Abb. 15: MS/MS-Spektrum eines MS-SUMO1-modifiziertem NFYA Peptid (Lysin 289)**

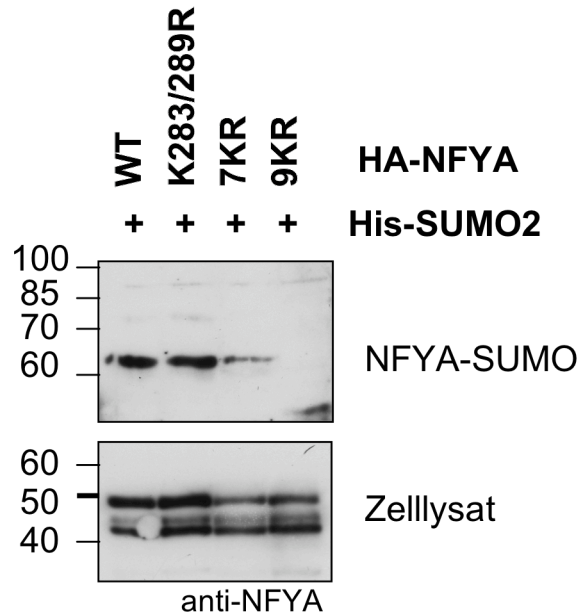
Die MS/MS-Analyse wurde von Guido Sauer (Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen) durchgeführt.

Zusammengefaßt heißt das, dass zwei SUMOylierungsstellen identifiziert werden konnten. Bei einer der beiden gefundenen SUMOylierungsstellen handelt es sich um ein klassisches SUMO Konsensusmotiv und bei der anderen um ein inverses SUMO Konsensusmotiv. Allerdings wurde in der ausgeschnittenen Bande auch ein Peptid mit beiden Lysinen ohne Modifikation mit SUMO gefunden (AKLEAEGKIPK). Dieser Befund zeigt, dass neben diesen beiden identifizierten Lysinen *in vitro* noch weitere Akzeptorlysine existieren.

**4.6.3 Analyse des Lysin-freien NFYA Proteins 9KR**

Zusammengenommen zeigen die Transfektions- und *in vitro* Daten, dass NFYA multiple SUMO-Akzeptorstellen besitzt. Daher wurde für Folgearbeiten ein NFYA ohne Lysine (9KR) hergestellt. Neben der 9KR Variante wurde eine Doppelmutante der durch Massenspektrometrie (MS/MS) identifizierten Lysine (K283/289R) und eine Mutante von NFYA, in der alle Lysine außer den beiden durch MS/MS identifizierten SUMO-Akzeptorstellen K283/289R (7KR) zu Arginine mutiert wurden, hergestellt. Ein Vergleich der SUMOylierungseffizienz in HeLa-Zellen mittels Kotransfektion dieser Konstrukte mit His-SUMO2 und Anreicherung der SUMOylierten Spezies durch

Nickel-Agarose zeigt, dass die K283/289R Mutante und die 7KR Mutante nicht signifikant schwächer als der Wildtyp mit SUMO modifiziert werden (siehe Abbildung 16). Wie erwartet wird das Lysin-freie NFYA (9KR) nicht mehr mit SUMO modifiziert.



**Abb. 16: In vivo SUMOylierung von NFYA Mutanten**

HeLa-Zellen wurden mit HA-NFYA Wildtyp, K283/289R, 7KR- oder 9KR-Mutante und His-SUMO2 transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen in 8M Guanidinium Puffer lysiert und ein Anreicherung der SUMOylierten Proteine unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. 5% der Gesamtprobe wurden Methanol-Chloroform gefällt und neben den SUMOylierten Spezies auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und mittels Immunoblot mit anti-NFYA Antikörpern analysiert. Nur im NFYA ohne Lysine (9KR) kann *in vivo* keine SUMOylierung mehr nachgewiesen werden.

Diese drei Mutanten wurden ausgewählt, um sie mit dem NFYA Wildtyp in nachfolgenden Experimenten zu vergleichen.

Zur Identifikation weiterer SUMO-Akzeptorstellen in NFYA sowie des *in vivo* präferentiell verwendeten Lysins bedarf es weiterer Untersuchungen (siehe Diskussion).

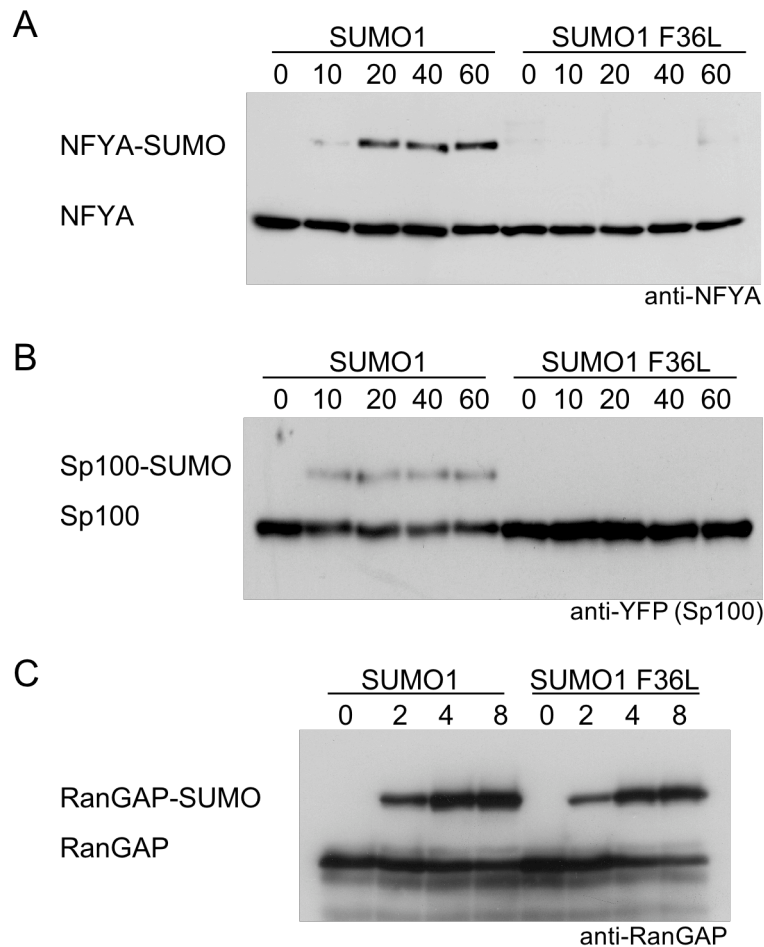
**4.7 SUMOylierung von NFYA ist von einer SIM-Sequenz abhängig**

Bei genauerer Betrachtung der NFYA Aminosäuresequenz wurde festgestellt, dass der C-Terminus von NFYA ein putatives SUMO Interaktions-Motiv (SIM) enthält. Eine

SIM setzt sich aus hydrophoben Aminosäuren zusammen und ermöglicht eine nicht-kovalente Interaktion mit SUMO (siehe Einleitung). Diese nicht-kovalente Interaktion könnte möglicherweise wie bei TDG, Daxx oder USP25 (Takahashi et al., 2005; Lin et al., 2006; Meulmeester et al., 2008) zu einer effizienten SUMOylierung von NFYA beitragen. Die Mutation dieses Interaktions-Motives diene, neben der gerichteten Mutagenese der Akzeptorlysine, als alternativer Ansatz für die Herstellung einer SUMO-defizienten NFYA Variante.

Vor diesem Hintergrund musste zunächst ermittelt werden, ob NFYA an SUMO bindet und ob es eine Präferenz für SUMO-1 oder SUMO-2/3 zeigt. Zu diesem Zweck wurde jeweils rekombinantes SUMO-1 oder rekombinantes SUMO-2 in gleichen Konzentrationen kovalent an Cyanogenbromid-aktivierte Sepharose gebunden. Die immobilisierten SUMO-Paraloge, sowie als Spezifitätskontrollen Ubiquitin und Ovalbumin, wurden mit rekombinantem NFYA inkubiert. In diesem Experiment konnte nur eine unspezifische Bindung von NFYA an SUMO, Ubiquitin und Ovalbumin detektiert werden. Verschiedene Versuche, den Hintergrund durch Erhöhen der Stringenz zu reduzieren, blieben erfolglos.

Alternativ wurde eine *in vitro* SUMOylierungs-Reaktion mit einer SUMO-1 Mutante durchgeführt, welche nicht mehr an SUMO-Interaktions-Motive binden kann (hergestellt und aufgereinigt von Dr. Ruth Geiss-Friedlander). In dieser SUMO Mutante wurde die Aminosäure Nummer 36 von Phenylalanin zu Leucin ausgetauscht. Mit dieser SUMO Mutante sollte getestet werden, ob eine SIM für die SUMOylierung von NFYA benötigt wird. Diese SUMO Variante wurde im Vergleich zu Wildtyp für eine *in vitro* Modifikation von NFYA, Sp100 und RanGAP1 eingesetzt. Es ist deutlich zu erkennen, dass NFYA in RanBP2-abhängiger SUMOylierung schlechter mit der SUMO-1 Phe35Leu Mutante modifiziert wird (siehe Abb. 17 A). Sp100 wurde in diesem Experiment als Positivkontrolle eingesetzt, da für Sp100 kürzlich gezeigt wurde, dass es eine SIM enthält (Knipscheer et al., 2008). Wie erwartet, findet keine SUMOylierung von YFP-Sp100 mit der SUMO-1 Phe36Leu Mutante statt (Abb. 17 B).



**Abb. 17: Phe36Leu Mutante zeigt Defekt in RanBP2-abhängiger NFYA SUMOylierung**

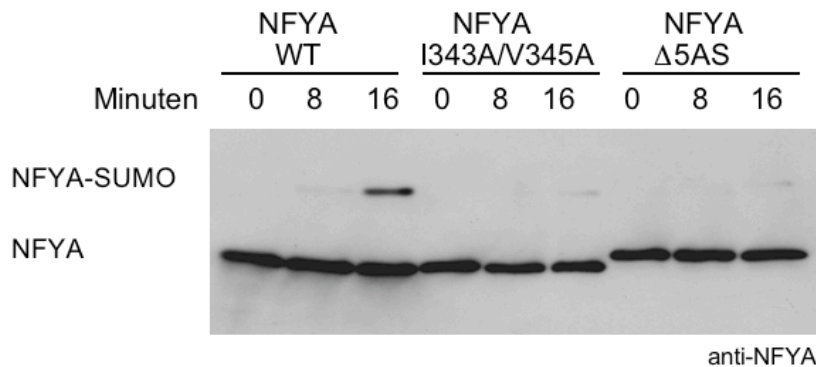
(A) *In vitro* SUMOylierungs-Reaktion von NFYA mit SUMO-1 Wildtyp oder einer SUMO-1 Phe36Leu Mutante. Es wurden 68nM E1, 56nM E2, 4,4 µM SUMO-1 und 6nM RanBP2ΔFG und 3mM ATP eingesetzt und für unterschiedlich lange Zeiten inkubiert. (B) YFP-Sp100 wurde für eine *in vitro* Modifikation mit Enzymkonzentrationen wie in A eingesetzt. (C) Als Kontrolle, ob sich die SUMO Mutante generell funktionell ist und in gleichen Mengen eingesetzt wurden, diente eine RanGAP1 SUMOylierung. Hierfür wurden 36nM E1, 112nM E2 und 4,4 µM SUMO-1 (WT oder Phe36Leu) und 3mM ATP eingesetzt und für unterschiedlich lange Zeiten inkubiert.

Als Kontrolle, dass die SUMO Mutante an Substrate ohne SIM mit der gleichen Geschwindigkeit konjugiert werden kann, diente die Modifikation von RanGAP1. RanGAP1 ist ein außergewöhnlich gutes Substrat für die SUMO Modifikation und benötigt keine SUMO E3-Ligase. Die SUMOylierung von RanGAP wurde in einem kürzeren Zeitintervall und mit geringeren Enzymkonzentrationen durchgeführt. Die Abbildung 17 (C) zeigt, dass RanGAP1 mit der SUMO-1 Phe36Leu Mutante und mit dem Wildtyp mit der selben Geschwindigkeit konjugiert wurde.

Auf den ersten Blick deutet dieses Experiment auf eine essentielle SIM in NFYA hin. Allerdings bleibt die Möglichkeit, dass die verminderte SUMOylierung auf eine SIM im RanBP2ΔFG-Fragment zurückzuführen ist. Da sich NFYA nur sehr schlecht ohne

RanBP2 als SUMO E3-Ligase modifizieren lässt, wurde als Kontrolle eine SUMOylierung von Sp100 mit der SUMO1 Phe36Leu Mutante ohne RanBP2 als E3-Ligase durchgeführt. Auch in diesem Experiment wurde Sp100 schlechter mit der SUMO Mutante modifiziert (Ergebnis nicht gezeigt). Allerdings wurde die SUMOylierung nicht völlig verhindert. Eine Bindestudie von RanBP2 an immobilisiertes SUMO-1 oder die Phe36Leu Mutante zeigte, dass RanBP2 spezifisch an Wildtyp SUMO nicht aber an die Phe36Leu Mutante bindet (unpublizierte Beobachtung von Achim Werner, AG Melchior). Die SUMO E3-Ligase RanBP2 benötigt also die gleichen Aminosäurereste für eine stabile Interaktion mit SUMO. Dieses Ergebnisse legen nahe, dass sowohl die reduzierte RanBP2 Bindung an SUMO als auch die direkte Interaktion von SUMO mit NFYA zu der beobachteten verminderten SUMOylierung beiträgt.

Es gibt nur eine Sequenz im NFYA, die einer klassischen SIM Sequenz entsprechen würde. Diese befindet sich in den letzten 5 Aminosäuren am C-Terminus (IIRV). Um die Frage abschließend zu klären, ob es sich bei NFYA um ein SIM-abhängiges Substrat handelt, und um gleichzeitig die verantwortlichen Aminosäuren zu identifizieren, wurden zwei SIM Varianten des rekombinanten NFYA-His Proteins hergestellt. Diese zwei Varianten sollten anschließend in einer *in vitro* Modifikations-Reaktion mit Wildtyp verglichen werden. Hierbei wurde ein Konstrukt verwendet, dem die letzten 5 Aminosäuren fehlen, und ein zweites Konstrukt in dem die potentielle SIM durch zwei Aminosäureaustausche (I343A/V345A) mutiert wurde. Beide Proteine wurden entsprechend dem Wildtyp NFYA-His Protein aufgereinigt und in einer *in vitro* SUMOylierungs-Reaktion mit RanBP2 eingesetzt und mittels Immunoblot analysiert (siehe Abb. 18). Beide Mutanten werden wesentlich langsamer als der Wildtyp mit SUMO-1 modifiziert.

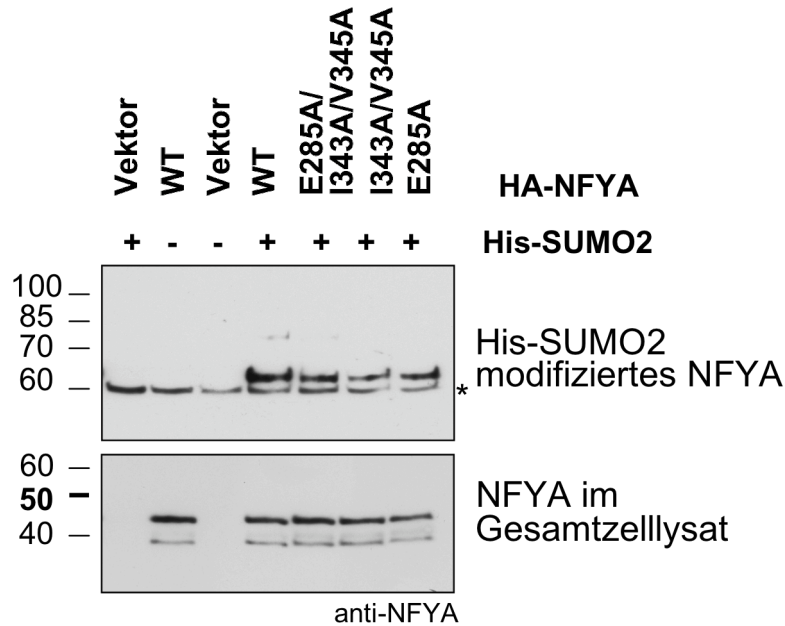


**Abbildung 18: SIM-abhängige SUMOylierung von NFYA in vitro**

NFYA-His, NFYA-His I343A/V345A oder NFYA-His ohne die letzten 5 Aminosäuren wurde mit 68nM E1, 56nM E2, 4,4 µM SUMO-1ΔC4 und 6nM RanBP2ΔFG +/- 3mM ATP inkubiert. Die Reaktion wurde nach 0, 8 oder 16 Minuten gestoppt und auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion des Immunoblots erfolgte mit anti-NFYA Antikörpern.

Um zu testen, ob die identifizierte SIM auch für eine *in vivo* SUMOylierung relevant ist, wurde erneut eine Anreicherung von His-SUMO-modifizierten Proteinen an einer Affinitätsmatrix durchgeführt. Hierfür wurden Wildtyp HA-NFYA und die *in vitro* identifizierte SIM-Mutante (I343A/V345A) zusammen mit His-SUMO-2 in HeLa-Zellen transfiziert. Abbildung 19 zeigt tatsächlich eine reduzierte SUMOylierung der NFYA SIM-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Im selben Experiment wurde auch eine weitere NFYA Mutante getestet, in der ein Glutamat zu Alanin Aminosäureaustausch (E285A) in der SUMO Konsensusstelle stattgefunden hat. Im Jahr 2001 wurde gezeigt, dass das Glutamat in der Konsensusstelle für die Bindung des Ubc9 und somit für eine effiziente SUMOylierung wichtig ist (Sampson et al., 2001). Obwohl das Lysin 283 und die SIM in diesem NFYA Konstrukt noch vorhanden sind, führt auch die E285A Mutation zu einer verminderten Effizienz der NFYA SUMOylierung (siehe Abb. 19). Als drittes wurde eine Kombination der SIM und der E285A Mutante auf SUMOylierung getestet. Wie erwartet zeigt auch diese Mutante (I343A/V345A/E285A) eine reduzierte NFYA SUMOylierung, allerdings konnte keine weitere Reduktion als mit den Einzelmutanten erzielt werden (siehe Abb. 19).





**Abb. 19: SIM-abhängige SUMOylierung von NFYA *in vivo***

HeLa-Zellen wurden mit HA-NFYA Wildtyp oder Mutanten (E285A; SIM oder Kombination) und His-SUMO2 transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen in 8M Guanidinium Puffer lysiert und ein die SUMOylierten Proteine wurden an einer Nickel-Matrix unter denaturierenden Bedingungen angereichert. 5% der Gesamtprobe wurden Methanol-Chloroform gefällt und zusammen mit den SUMO Spezies auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen. Die Analyse erfolgte mittels Immunoblot mit anti-NFYA Antikörpern. \* markiert eine unspezifische Bande. Die SIM und die E285A Mutante führen zu einer schwächeren SUMOylierung *in vivo*.

Zusammengefasst bleibt festzuhalten, dass alle getesteten Mutanten eine reduzierte SUMOylierung im Vergleich zum Wildtyp vorweisen. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die SIM im C-Terminus und auch die Konsensusstelle um das Lysin 283 für eine effiziente SUMOylierung von NFYA *in vivo* notwendig sind.

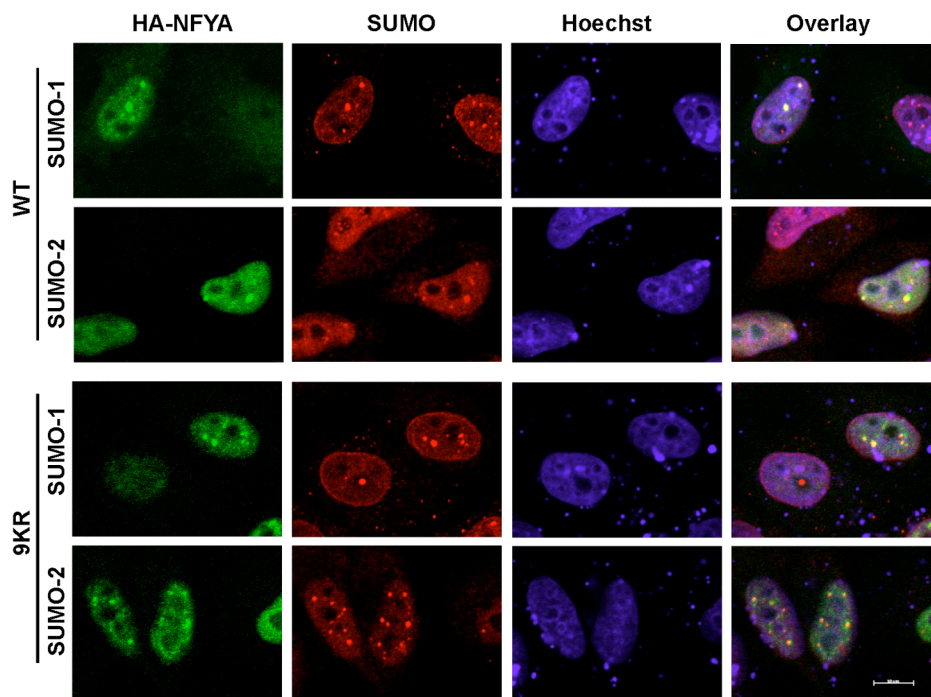
#### 4.8 NFYA kolokalisiert partiell mit SUMO in HeLa-Zellen

Da es sich beim NFYA Protein sowohl um ein SUMO Substrat als auch um einen nicht-kovalenten Bindepartner von SUMO handelt, wurde im Folgenden untersucht, ob eine Kolokalisation von NFYA und SUMO in HeLa-Zellen detektierbar ist. In der Literatur gibt es mehrere Beispiele, in denen SUMO-Substrate, die gleichzeitig ein SUMO-Interaktions-Motiv enthalten, mit SUMO kolokalisieren. Dies wurde zum Beispiel für TDG (Takahashi et al., 2005) oder Daxx (Lin et al., 2006) gezeigt.

Für diese Untersuchungen wurden HeLa-Zellen mit HA-NFYA transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit SUMO

und HA Antikörpern durchgeführt. Falls eine Kolokalisation nachweisbar ist, sollte dieses Experiment weiterhin zeigen, ob diese spezifisch mit einer der SUMO Paralogen erfolgt. Möglicherweise kann dieses Experiment Aufschluss geben, welche SUMO Isoform *in vivo* relevant ist.

Abbildung 20 zeigt eine partielle Kolokalisation von HA-NFYA sowohl mit SUMO-1 als auch mit SUMO-2. Anzumerken ist, dass diese Kolokalisation nicht in jeder Zelle sichtbar ist. Es handelt sich nur um etwa 20% der Zellen, die in der NFYA Färbung Kerndomänen aufweisen, die besonders viel NFYA beinhalten. Wenn diese Kerndomänen sichtbar sind, ist immer auch eine Kolokalisation mit SUMO zu erkennen.



**Abb. 20: Kolokalisation von HA-NFYA mit SUMO-1 und SUMO-2**

HeLa-Zellen wurden 24 Stunden zuvor mit HA-NFYA oder der 9KR Variante transfiziert und anschließend mit 3,7% PFA fixiert, mit 0,15% Triton permeabilisiert und mit Maus anti-HA sowie Ziege anti-SUMO1 oder anti-SUMO2 Antikörpern gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem Zeiss LSM 510 Meta Konfokal Mikroskop aufgenommen.

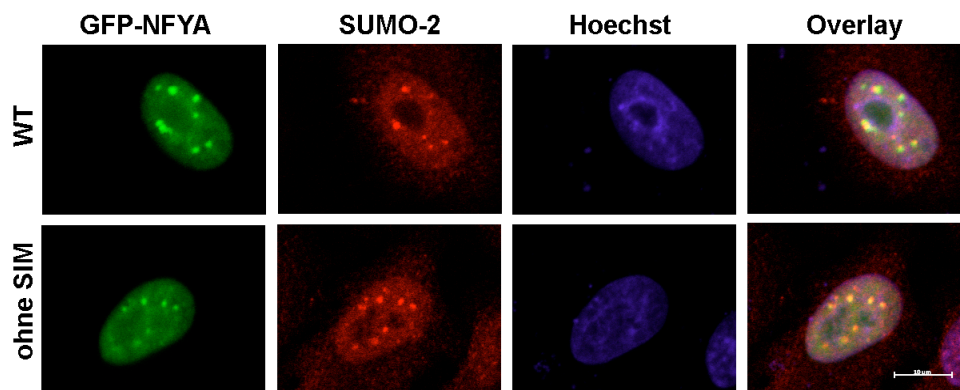
Vorläufige Resultate zeigen, dass es sich bei den NFYA Kernkörpern nicht um Cajal- oder PML-Körper handelt (Immunfluoreszenzen mit Coilin Antikörpern oder eine Doppelfärbung mit HA-Sp100 durchgeführt, Daten nicht gezeigt).

Um zu testen, ob diese Kolokalisation durch SUMOylierung zustande kommt, wurde auch die HA-NFYA 9KR Mutante analysiert. Die Immunfluoreszenzbilder zeigen,

dass die Lokalisation unabhängig vom SUMOylierungs-Status des NFYA Proteins ist (Abbildung 20).

Möglicherweise ist für die Kolokalisation mit SUMO keine Konjugation, sondern eine nicht-kovalente Bindung über ein SUMO-Interaktions-Motiv notwendig. Um diese Frage zu beantworten, wurde GFP-NFYA Wildtyp oder die SIM Mutante (I343A/V345A) in HeLa-Zellen transfiziert und eine Immunfluoreszenz mit spezifischen Antikörpern für SUMO-1 oder SUMO-2 durchgeführt.

Abbildung 21 zeigt, dass die SIM Mutation keinen Einfluss auf die Kolokalisation mit SUMO hat. Sowohl Wildtyp GFP-NFYA wie auch die SIM Mutante zeigen eine partielle Kolokalisation mit SUMO-2. Exemplarisch ist hier nur die Färbung mit SUMO-2 abgebildet, die Färbung mit SUMO-1 zeigt das gleiche Bild (Bilder nicht gezeigt).



**Abb. 21: Einfluss der SIM auf die Kolokalisation mit SUMO**

HeLa-Zellen wurden 24 Stunden zuvor mit GFP-NFYA oder der SIM (I343A/V345A) Variante transfiziert und eine IF mit anti-SUMO1 oder anti-SUMO2 Antikörpern durchgeführt. Die Bilder wurden mit dem Zeiss LSM 510 Meta Konfokal Mikroskop aufgenommen.

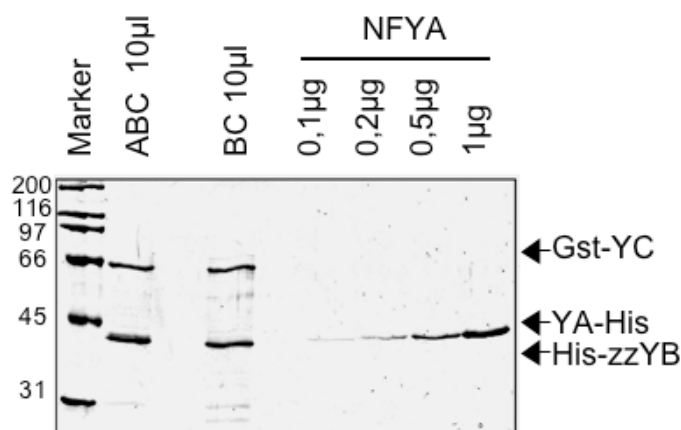
Es bleibt festzuhalten, dass weder SUMOylierung noch nicht-kovalente Bindung von SUMO einen Einfluss auf die Lokalisation des NFYA Proteins nach Überexpression haben.

## 4.9 SUMO beeinflusst Interaktionen des NFYA Proteins

Interessanterweise befinden sich alle neun Lysine im NFYA im C-terminalen Bereich des Proteins, welcher auch die Interaktion von NFYA mit seinem Transportrezeptor Importin  $\beta$ , dem Heterodimer NFYB/C und der DNA vermittelt (siehe Abbildung 4 in der Einleitung). Daher wurde im Folgenden untersucht, ob SUMOylierung diese Interaktionen beeinflusst.

### 4.9.1 Interaktion von SUMO-modifiziertem NFYA mit NFYB/C

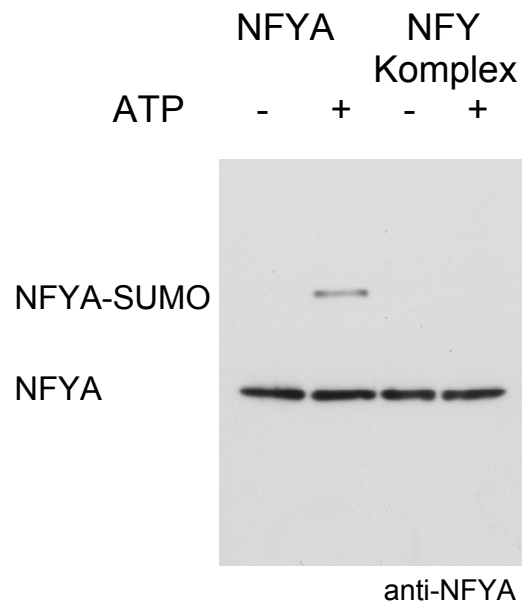
Um den funktionellen trimeren NF-Y Transkriptionsfaktor zu bilden, bindet die A Untereinheit an den bereits vorgeformten Heterodimer NFYB/C. Um zu testen, ob NFYA nur allein oder auch im trimeren NF-Y Komplex SUMOyliert werden kann, wurde eine *in vitro* SUMOylierungs-Reaktion durchgeführt. Hierfür wurde His<sub>6</sub>-zz-NFYB (zz: IgG-Bindedomäne von *Staphylococcus aureus* Protein A) und Gst-NFYC über Nickel-Agarose gemeinsam aufgereinigt (in Zusammenarbeit mit Dr. Jörg Kahle, Abteilung Doenecke). Das Eluat dieser Anreicherung wurde anschließend an Glutathion Agarose gebunden und die Hälfte der Matrix mit NFYA-His inkubiert. Der trimere NF-Y Komplex und der NFYB/C Heterodimer wurden mit Glutathion eluiert. Abbildung 22 zeigt den rekombinant hergestellten trimeren Komplex (ABC), den Heterodimer (BC) und verschiedene Mengen des monomeren NFYA Proteins, welche für die nachfolgenden Experimente verwendet wurden. Die Proteine NFYA-His und His-zz-NFYB zeigen ein sehr ähnliches Laufverhalten im SDS-Gel und sind im Coomassie Gel schwer zu unterscheiden.



**Abb. 22: Coomassie Gel des trimeren NF-Y Komplexes versus Monomer NFYA**

10µl des trimeren Komplexes (ABC), 10µl des Heterodimers (BC) und verschiedene Mengen des monomeren NFYA Proteins wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt.

Der trimere NF-Y Komplex und freies NFYA-His wurden zum Vergleich in eine *in vitro* SUMOylierungs-Reaktion mit RanBP2 als E3-Ligase eingesetzt. Interessanterweise kann nur das monomere NFYA, nicht aber das NFYA, welches sich im trimeren NF-Y Komplex befindet, nach Zugabe von ATP mit SUMO modifiziert werden (siehe Abbildung 23). Weiterhin kann man aus diesem Ergebnis schließen, dass es sich beim trimeren Transkriptionskomplex NF-Y um einen sehr stabilen Komplex mit geringer „On-Off“-Rate handelt. Anderenfalls würde ein geringer Teil des NFYA Proteins auch unter diesen experimentellen Bedingungen modifiziert werden. Um auszuschließen, dass das reduzierende Glutathion, welches für die Elution benutzt wurde und in der SUMOylierungs-Reaktion noch präsent war, einen negativen Einfluss auf die Verknüpfung mit SUMO hat, wurde NFYA mit und ohne Zugabe von Glutathion *in vitro* SUMOyliert. Die Tests ergaben, dass 5mM Glutathion keine signifikante Reduktion der NFYA SUMOylierung zur Folge hatte (Daten nicht gezeigt).

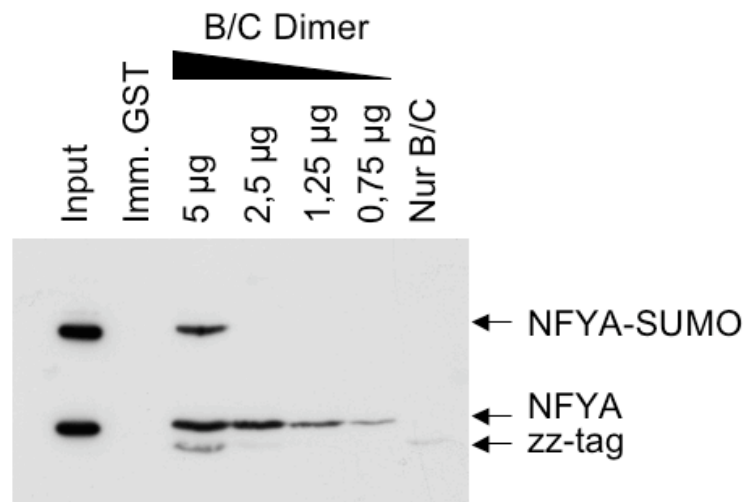


**Abb. 23: NFYA wird nur im Monomer SUMOyliert**

*In vitro* Modifikation von NFYA als Monomer oder im trimeren Komplex mit His<sub>6</sub>-zz-NFYB/GST-NFYC. 68nM E1, 56nM E2, 4,4 μM SUMO-1ΔC4 und 6nM RanBP2ΔFG mit oder ohne Zugabe von ATP. Die Proben wurden auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und mittels Immunoblot mit anti-NFYA Antikörper analysiert. NFYA wird nur allein, nicht aber im trimeren Komplex SUMOyliert.

Nachdem gezeigt wurde, dass NFYA im trimeren Komplex nicht SUMOyliert wird, sollte untersucht werden, ob SUMOyliertes NFYA noch an den NFYB/C Heterodimer

binden kann. Eventuell verhindert die Modifikation mit SUMO die Assoziation des aktiven trimeren NF-Y Transkriptionsfaktors. In diesem Experiment wurde der in Abbildung 22 dargestellte NFYB/C Dimer in verschiedenen Konzentrationen an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit einem Gemisch von SUMO-modifiziertem und unmodifiziertem NFYA inkubiert (siehe Abbildung 24). Der „Input“ spiegelt das Verhältnis zwischen unmodifiziertem und modifiziertem NFYA wieder, welches zu dem immobilisierten NFYB/C Heterodimer gegeben wurde. Unmodifiziertes und SUMOyliertes NFYA liegen hier etwa in 1:1 Verhältnis vor. Als Kontrolle wurde an Glutathion-Sepharose immobilisiertes GST anstelle des NFYB/C Dimers verwendet, um eine unspezifische Bindung von NFYA an die Matrix auszuschließen. In der Spur, in der die größte Menge an NFYB/C Heterodimer eingesetzt wurde, bindet dieses sowohl unSUMOyliertes wie SUMOyliertes NFYA in demselben Verhältnis wie im „Input“ vorhanden. Mit abnehmender Konzentration an NFYB/C kann jedoch eine präferentielle Bindung der unmodifizierten Form von NFYA detektiert werden (siehe Abb. 24).



**Abb. 24: NFYB/C bindet präferentiell an unSUMOyliertes NFYA**

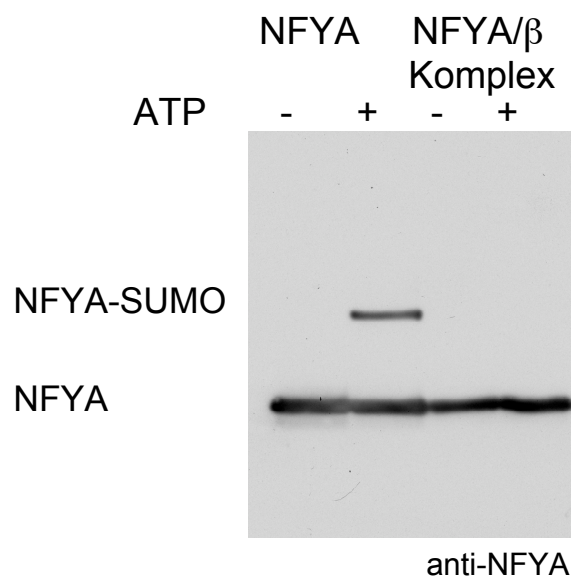
NFYA *in vitro* SUMOylierungs-Reaktion gefolgt von einem Bindungstest mit immobilisiertem NFYB/C Heterodimer. Die Menge des an Glutathion-Sepharose immobilisiertem His<sub>6</sub>-ZZ-NFYB/GST-NFYC Dimers wurde wie angegeben variiert (0,75-5µg). Als Kontrolle für eine unspezifische Bindung wurde immobilisiertes GST eingesetzt. Limitierende Mengen des NFYB/C Dimers ermöglichen präferentiell die Bindung von unmodifiziertem NFYA.

Folglich zeigen diese Experimente, dass NFYA *in vitro* nur als Monomer mit SUMO modifiziert wird, und dass NFYA SUMOylierung die Interaktion mit NFYB/C negativ beeinflusst.

#### 4.9.2 Interaktion von SUMO-modifiziertem NFYA mit Importin $\beta$

Genauso wie NFYB/C bindet auch der Transportrezeptor Importin  $\beta$  an die basische Region im konservierten C-terminalen Bereich. Daher sollte im Folgenden getestet werden, ob eine SUMOylierung von NFYA die Interaktion mit seinem Importrezeptor beeinflusst.

Hierzu wurde zunächst untersucht, ob NFYA im Komplex mit seinem Transportrezeptor Importin  $\beta$  mit SUMO modifiziert werden kann. Für diese Untersuchungen wurde NFYA zur Komplexbildung mit Importin  $\beta$  für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Der Komplex wurde mit Hilfe einer analytischen Superdex 200 Gelfiltration von freiem NFYA abgetrennt. Dieser stabil über die Säule aufgereinigte NFYA/Importin  $\beta$  Komplex wurde parallel mit unkomplexiertem NFYA in eine *in vitro* SUMOylierungs-Reaktion mit RanBP2 eingesetzt. Abbildung 25 zeigt, dass NFYA im Komplex mit Importin  $\beta$  *in vitro* nicht mit SUMO modifiziert wird.

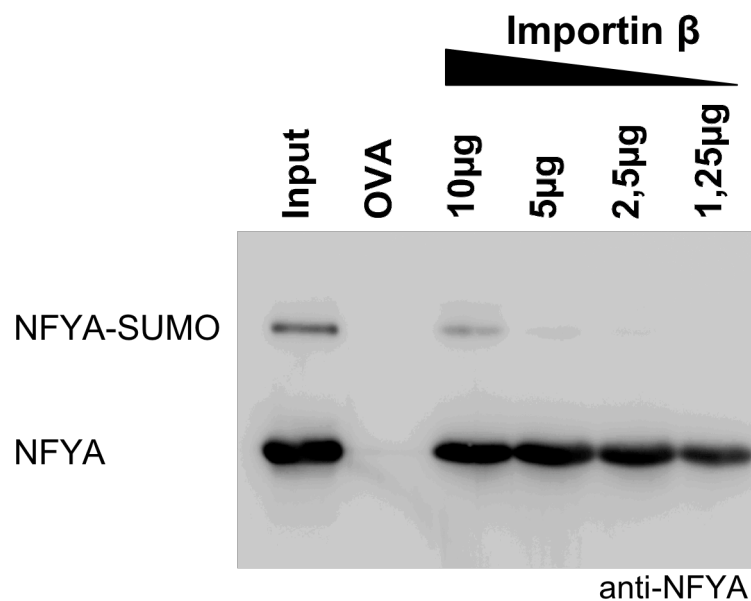


**Abb. 25: Im Komplex mit Importin  $\beta$  wird NFYA *in vitro* nicht SUMOyliert**

*In vitro* Modifikation von NFYA als Monomer oder im Komplex mit His-S-Importin  $\beta$  unter Einsatz von 68nM E1, 56nM E2, 4,4  $\mu$ M SUMO-1 $\Delta$ C4 und 6nM RanBP2 $\Delta$ FG mit oder ohne Zugabe von ATP. Die Proben wurden durch Zugabe von 2xSDS-Probenpuffer nach 60min Inkubationszeit gestoppt und auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion erfolgte mittels Immunoblot mit anti-NFYA Antikörper.

Anschließend sollte getestet werden, ob SUMOyliertes NFYA noch an Importin  $\beta$  bindet. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Mengen His<sub>6</sub>-S-Importin  $\beta$  immobilisiert. Der S tag besteht aus 15 Aminosäuren, die spezifisch mit Protein-S-

Agarose (Novagen) interagieren (Ho et al., 1996, Raines et al., 2000). Die Agarose mit gebundenem His<sub>6</sub>-S-Importin β wurde mit unterschiedlichen Mengen freier Agarose gemischt, um die Konzentration von Importin β zu variieren, dabei aber dasselbe Matrix-Volumen beizubehalten. Die Agarose mit verschiedenen Mengen von Importin β wurde mit einem Gemisch aus SUMOyliertem und unSUMOyliertem NFYA für zwei Stunden bei 4°C inkubiert. In Abbildung 26 sieht man neben dem „Input“, welcher das Verhältnis zwischen unmodifiziertem und modifiziertem NFYA widerspiegelt, die Mengen von NFYA (1,4 μg NFYA-His), die an die verschiedenen Mengen von Importin β gebunden haben. In der ersten Spur (10 μg Imp β) sieht man, dass sowohl das unmodifizierte als auch das modifizierte NFYA an die Importin β Matrix bindet. Bereits bei der nächst geringeren Menge von Importin β sieht man kaum noch modifiziertes NFYA, obwohl sich die Menge an gebundenem unmodifiziertem NFYA nicht signifikant ändert.



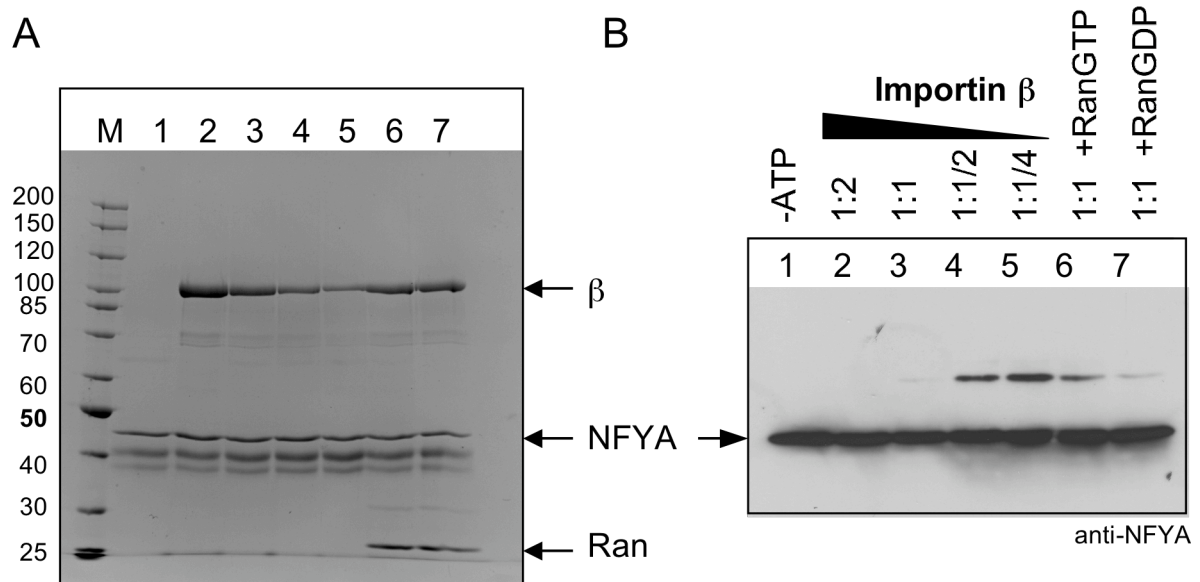
**Abb. 26: SUMOyliertes NFYA bindet schlechter an Imp β als unmodifiziertes NFYA**

Es wurde eine *in vitro* Modifikation von NFYA mit SUMO, gefolgt von einem Bindungstest mit immobilisiertem His<sub>6</sub>-S-Importin β durchgeführt. 1,25-10μg His<sub>6</sub>-S-Importin β wurden an je 40μl Protein-S-Agarose (Novagen) immobilisiert, und mit einer Mischung aus SUMOyliertem und unSUMOyliertem NFYA-His (1,4μg pro Ansatz) inkubiert. Als Kontrolle für eine unspezifische Bindung wurde immobilisiertes Ovalbumin (OVA) eingesetzt. Eine limitierende Menge von Importin β zeigt präferentiell Bindung von unmodifiziertem NFYA.

Dieses Experiment zeigt, dass auch das modifizierte NFYA an Importin β binden kann. Liegt allerdings Importin β in limitierenden Mengen vor, bindet dieses präferentiell die unmodifizierte Form des NFYA Proteins (Abbildung 26).



Um einen detaillierteren Einblick auf den Einfluss von Importin  $\beta$  auf die SUMOylierung von NFYA zu bekommen, wurde Importin  $\beta$  in eine *in vitro* SUMOylierungs-Reaktion von NFYA titriert. Abbildung 27 zeigt ein Coomassie Gel und den Western Blot der *in vitro* SUMOylierungs-Reaktion von NFYA. Im Coomassie Gel (A) sieht man die in den einzelnen SUMOylierungs-Reaktionen relativ zueinander eingesetzten Proteinmengen von NFYA und Importin  $\beta$ . In Spur 6 und 7 sind identische Mengen Importin  $\beta$  aufgetragen, diese Menge entspricht, wie in Spur 3, einem 1:1 molaren Verhältnis zwischen Importin  $\beta$  und NFYA. In den Spuren 6 und 7 wurde neben NFYA und Importin  $\beta$  auch RanGTP oder RanGDP hinzugefügt. Die Zugabe von RanGTP bewirkt die Auflösung des Importrezeptor-Substrat-Komplexes und soll daher als Kontrolle dienen, dass nicht die Zugabe des Importrezeptors per se die SUMOylierung behindert.



**Abb. 27: NFYA in einem Komplex mit Importin  $\beta$  wird nicht mehr SUMOyliert**

(A) Coomassie Gel, zeigt die unterschiedlichen Mengen an Importin  $\beta$ , gleich bleibende Mengen NFYA sowie Ran mit GTP oder GDP beladen. M weist den Proteinstandard aus, die restlichen Spuren sind mit 1-7 markiert. 1/5 dieser Mengen wurde für die *in vitro* SUMOylierung, welche in B gezeigt wird eingesetzt.

(B) *In vitro* Modifikation von NFYA mit Importin  $\beta$  in unterschiedlichen molaren Mengenverhältnissen. Die Bindung von NFYA an seinen Importrezeptor verhindert die SUMOylierung (2:1 oder 1:1), bei geringeren Mengen von Importin  $\beta$  wird eine SUMOylierung wieder ermöglicht. Die Zugabe von RanGTP zum Import-Substrat-Komplex (1:1) gestattet eine SUMOylierung von NFYA. Die Proben wurden auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und mittels Immunoblot mit Anti-NFYA Antikörper analysiert

20% der auf dem Coomassie Gel geladen Proben wurden mit E1, E2 und RanBP2 $\Delta$ FG und +/-ATP für eine Stunde bei 30°C inkubiert. Es wurde ein

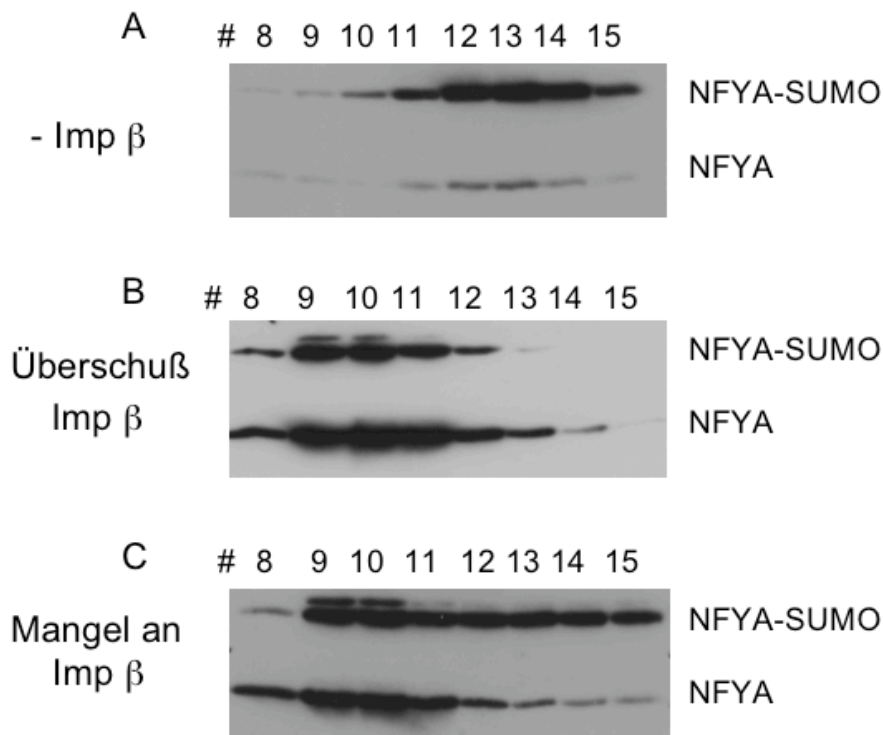
Immunoblot mit anti-NFYA Antikörpern durchgeführt (Abbildung 27 B). Ohne die Zugabe von ATP ist keine SUMOylierung detektierbar. Wenn Importin  $\beta$  im Überschuss oder in einem 1:1 molarem Verhältnis mit NFYA vorliegt, ist ebenfalls kaum NFYA in der SUMOylierten Form zu sehen. Erst bei weiter reduzierten Mengen an Importin  $\beta$  kann eine effiziente SUMOylierung von NFYA erzielt werden. Wie erwartet, wird NFYA in Anwesenheit von RanGTP trotz eines 1:1 molarem Verhältnis zu Importin  $\beta$  modifiziert (vergleiche Spur 3 mit Spur 6 bzw. 7).

Somit kann bestätigt werden, dass NFYA nur als Monomer, nicht aber gebunden an seinen Importrezeptor SUMOyliert werden kann. Wie erwartet konnte durch die Zugabe von RanGTP zudem gezeigt werden, dass Importin  $\beta$  nicht die SUMOylierungs-Maschine inhibiert, sondern durch die Bindung an NFYA dessen Modifikation verhindert. Hierzu ist zusätzlich anzumerken, dass die Zugabe von Importin  $\beta$  in eine *in vitro* SUMOylierung von Sp100 als Substrat keinen negativen Effekt hat (Daten nicht gezeigt).

Zur Manifestierung dieser Ergebnisse wurden analytische Säulenläufe mit Importin  $\beta$  im Komplex mit modifiziertem und unmodifiziertem NFYA durchgeführt. Abbildung 28 zeigt einen Immunoblot der Fraktionen mit anti-NFYA Antikörper. Teil A der Abbildung zeigt, in welchen Fraktionen NFYA ohne Zugabe von Importin  $\beta$  läuft. Im zweiten Säulenlauf wurde Importin  $\beta$  im Überschuss (B) und im dritten Säulenlauf in limitierenden Mengen (C) zum NFYA dazugegeben. Die einzelnen Fraktionen der Säulenläufe wurden auf 10% SDS-Gele aufgetragen und ein Western Blot mit anti-NFYA Antikörpern durchgeführt. Freies NFYA mit und ohne SUMO konnte vornehmlich in den Fraktionen 12-14 detektiert werden. Im Falle eines Überschusses von Importin  $\beta$  (B) sieht man, dass NFYA in den Fraktionen 9,10 und 11 zusammen mit Importin  $\beta$  läuft. Es hat sich also ein Komplex aus dem Transportrezeptor und seinem Substrat gebildet. Dies gilt sowohl für das SUMOylierte wie das unSUMOylierte NFYA.

Im zweiten Säulenlauf mit limitierenden Mengen des Importrezeptors ergibt sich ein anderes Bild. Die obere modifizierte Form von NFYA ist über mehrere Fraktionen verteilt, wobei die untere unmodifizierte Bande von NFYA weiterhin hauptsächlich in den Importin  $\beta$ -haltigen Fraktionen 9,10 und 11 läuft. Während also das unmodifizierte NFYA ausschließlich im Komplex mit Importin  $\beta$  läuft, ist das SUMOylierte NFYA nur noch zum Teil komplexiert (Abbildung 28).

Folglich offenbart auch diese Methode, dass Importin  $\beta$  präferentiell an die unSUMOylierte Form von NFYA bindet. Auf diese Weise wurde mit zwei verschiedenen Herangehensweisen eine abgeschwächte Bindung von SUMO-modifiziertem NFYA an Importin  $\beta$  nachgewiesen.



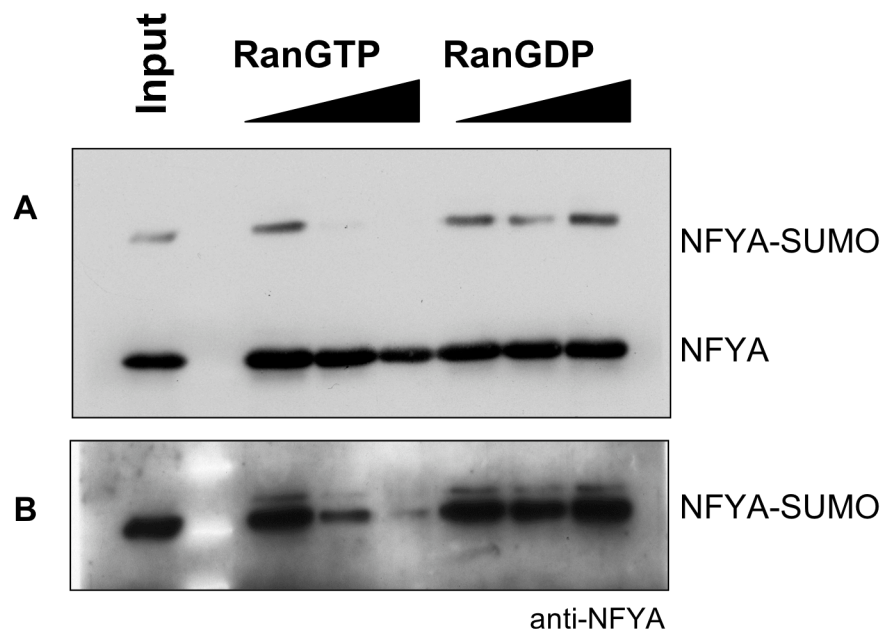
**Abb. 28: Unmodifiziertes NFYA bildet einen stabileren Komplex mit Importin  $\beta$  als SUMOyliertes NFYA**

Analytische Säulenläufe (Superdex S-200) von NFYA allein oder zusammen mit Importin  $\beta$ . Die Fraktionen 8 bis 15 wurden auf ein 10% Coomassie-Gel aufgetragen. Die Detektion erfolgte mittels Immunoblot mit anti-NFYA Antikörper. (A) Säulenlauf des NFYA Proteins allein oder im Komplex mit Importin  $\beta$  (B) Importin  $\beta$  (50 $\mu$ g) liegt im Überschuss zu NFYA (25 $\mu$ g) vor. In C wurden limitierenden Mengen von Importin  $\beta$  (25 $\mu$ g) zusammen mit NFYA eingesetzt.

Wie in Abbildungen 26 und 28 gezeigt wurde, ist eine Bindung des SUMOylierten NFYAs an seinen Importrezeptor zwar nicht favorisiert, kann aber nicht ausgeschlossen werden. Im folgenden Experiment sollte daher analysiert werden, ob die SUMOylierte Form von NFYA auch leichter vom Transportrezeptor dissoziiert als die unmodifizierte Form.

Dieses Experiment ähnelt dem in Abbildung 26 gezeigten Versuch. Wiederum wurde His-S-Importin  $\beta$  immobilisiert und mit einer Mischung von SUMOyliertem und unSUMOyliertem NFYA inkubiert. Hierbei wurde Importin  $\beta$  im Überschuss

eingesetzt, um zu gewährleisten, dass beide Formen von NFYA binden können. Anschließend wurden die immobilisierten Proteine mit ansteigenden Mengen an RanGTP oder als Kontrolle mit RanGDP inkubiert.



**Abb. 29: SUMOylierung von NFYA erleichtert die Dissoziation des NFYA-Importin  $\beta$ -Komplexes durch RanGTP**

(A) Eine Mischung von SUMOyliertem und unSUMOyliertem NFYA (je 1,4  $\mu$ g NFYA-His) wurde mit einem Überschuss immobilisiertem Importin  $\beta$  (10  $\mu$ g Imp  $\beta$ ) inkubiert. Anschließend wurden ansteigende Konzentrationen von RanGTP/RanGDP dazugegeben. Die modifizierte Bande des NFYA Proteins nimmt im Vergleich zur unmodifizierten schneller ab. (B) Lange Belichtung des SUMOylierten NFYA Proteins. Immunoblot mit anti-NFYA Antikörpern.

In Abbildung 29 A ist sowohl die modifizierte als auch die unmodifizierte Form von NFYA zu erkennen. Beide Formen von NFYA werden durch RanGTP von Importin  $\beta$  dissoziiert. In Teil B der Abbildung 29 ist eine längere Belichtung der SUMO-modifizierten Bande von NFYA mit ähnlicher Signalstärke zur unmodifizierten Form in Teil A gezeigt. Vergleicht man unmodifiziertes NFYA aus A mit SUMOyliertem NFYA aus B wird deutlich, dass das SUMO-modifizierte NFYA schneller als die unmodifizierte Form durch RanGTP vom Transportrezeptor dissoziiert.

RanGDP wurde als Kontrolle mitgeführt, um einen möglichen unspezifischen Effekt, wie zum Beispiel die Dissoziation des Transportkomplexes durch hohe Salzkonzentrationen, auszuschließen. RanGDP führt nicht zu einer Dissoziation von Substrat und Importrezeptor.

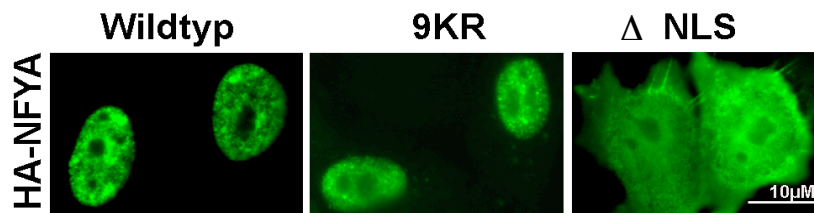
Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass SUMO konjugiertes NFYA schlechter als unmodifiziertes an Importin  $\beta$  bindet und eine Komplexbildung die SUMOylierung von NFYA verhindert. Durch die Bindung von RanGTP an Importin  $\beta$  und die darauf folgende Freisetzung von NFYA wird die SUMOylierung jedoch erneut ermöglicht.

Aufgrund dieser Ergebnisse sollte im Folgenden untersucht werden, ob die SUMOylierung von NFYA einen Einfluss auf dessen Kernimport durch Importin  $\beta$  hat.

#### ***4.10 SUMOylierung ist für NFYA Kernlokalisation nicht essentiell***

Um zu untersuchen, ob SUMOylierung von NFYA einen Einfluss auf die Kernlokalisation des Proteins hat, wurden Wildtyp HA-NFYA und ein SUMO-defizientes NFYA in HeLa-Zellen transfiziert. Da die SUMO-Akzeptorstellen nur teilweise identifiziert wurden und auf diese Weise kein SUMO-defizientes NFYA generiert werden konnte (siehe Teilabschnitt 4.6), wurde für diesen Zweck das Lysin-freie NFYA (9KR) eingesetzt. NFYA Wildtyp und die 9KR Mutante von NFYA wurden als HA-fusionierte Expressionskonstrukte in HeLa-Zellen transfiziert. Neben der 9KR Mutante wurde auch eine NLS Mutante von NFYA transfiziert. In dieser NLS Mutante wurden zwei basische Aminosäure Häufungen mutiert: KRR (276-278) zu NLG in der NFYB/C Bindungsdomäne und RKR (309-311) zu LAG in der DNA Bindungsdomäne von NFYA (als Vorlage: pjK131 aus Kahle et al., 2005). Nach 48 Stunden wurde die Lokalisation der Konstrukte mit Hilfe einer Immunfluoreszenz mit HA Antikörpern überprüft.

Wildtyp HA-NFYA lokalisiert nach Transfektion überwiegend im Kern. Abbildung 30 zeigt neben Wildtyp NFYA die Immunfluoreszenzfärbung von Lysin-freiem NFYA (9KR) und der NLS Mutante. Vergleicht man die Lokalisation der 9KR Mutante mit dem Wildtyp, sind keine Unterschiede festzustellen. Die Photos zeigen, dass die SUMOylierung von NFYA für eine Lokalisation im Kern nicht essentiell ist. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da auch die Depletion von RanBP2 als bevorzugte E3-Ligase für NFYA in HeLa-Zellen keine Misslokalisierung von NFYA zur Folge hatte (siehe Abbildung 10; RanBP2 als SUMO E3-Ligase für NFYA).



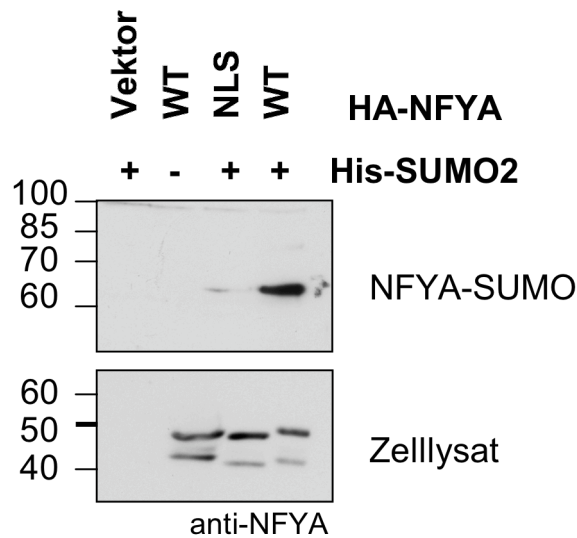
**Abb. 30: Lokalisation von HA-NFYA Wildtyp, HA-NFYA (9KR) oder HA-NFYA  $\Delta$ NLS**

Transfektion von HA-NFYA Wildtyp, ohne Lysine (9KR) und HA-NFYA ohne NLS (KRR 276-278 zu NLG; RKR 309-311 zu LAG) in HeLa-Zellen. Nach Expression für 48 Stunden wurde das NFYA mit einem anti-HA Antikörper detektiert. Wildtyp und NFYA ohne Lysine (9KR) sind hauptsächlich im Kern lokalisiert. HA-NFYA  $\Delta$ NLS ist gleichverteilt im Zytoplasma und im Kern.

Die Mutation der NLS bewirkt zwar eine verstärkt zytoplasmatische Lokalisation des NFYA im Vergleich zum Wildtyp, führen jedoch nicht zu einer vollständigen Dislokalisierung des HA-NFYA ins Zytoplasma. In der Veröffentlichung von Kahle et al. 2005 wurde dagegen gezeigt, dass  $\beta$  Galaktosidase Fusionsproteine mit dieser NLS Mutation komplett im Zytoplasma lokalisieren. Vermutlich kann HA-NFYA im Gegensatz zu  $\beta$ -Gal-NFYA passiv durch die Kernpore diffundieren, da es nur etwa 43 kDa groß ist.

Mit Hilfe der NLS Mutante konnte nun getestet werden, ob NFYA eine NLS für eine effiziente SUMOylierung benötigt. Hierfür wurde das HA-NFYA  $\Delta$ NLS oder Wildtyp HA-NFYA zusammen mit His-SUMO2 in HeLa-Zellen transfiziert. Die Anreicherung der SUMOylierten Spezies zeigt, dass HA-NFYA ohne funktionelle NLS weniger SUMOyliert vorliegt (Abbildung 31).

Um auszuschließen, dass die verminderte SUMOylierung nur auf die Abwesenheit von zwei Lysinen zurückzuführen ist, müsste zur Kontrolle zusätzlich eine NFYA K276R/K310R Mutante im selben Experiment getestet werden.



**Abb. 31: In vivo SUMOylierung von NFYA erfordert eine NLS**

HeLa-Zellen wurden mit HA-NFYA Wildtyp oder NLS Mutante (KRR 276-278 zu NLG; RKR 309-311 zu LAG) und His-SUMO2 transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen in 8M Guanidinium Puffer lysiert und SUMOylierte Spezies an Nickel-Agarose unter denaturierenden Bedingungen angereichert. 5% der Gesamtprobe wurden Methanol-Chloroform gefällt und zusammen mit den SUMOylierten Spezies auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen. Die Analyse erfolgte mittels Immunoblot mit anti-NFYA Antikörpern. Die NLS im NFYA wird für eine effiziente SUMOylierung *in vivo* benötigt.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, eine NLS Sequenz, die für die Bindung an den Importrezeptor notwendig ist, scheint auch für eine effiziente SUMOylierung essentiell zu sein. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass SUMOylierung für den Kernimport von NFYA nicht essentiell ist, da die 9KR Mutante nach transienter Transfektion in fixierten Zellen noch im Kern lokalisiert. Jedoch wird hier nur auf einen Zeitpunkt nach Transfektion (hier nach 48 Stunden) geschaut. In solchen Experimenten kann keine Aussage über Import- oder Exportgeschwindigkeiten getroffen werden. Dies sollte im Folgenden durch den Vergleich der Transportraten von Wildtyp und verschiedenen NFYA SUMO-Mutanten *in vitro* analysiert werden.

#### **4.11 Lysin-freies NFYA wird schneller importiert als Wildtyp**

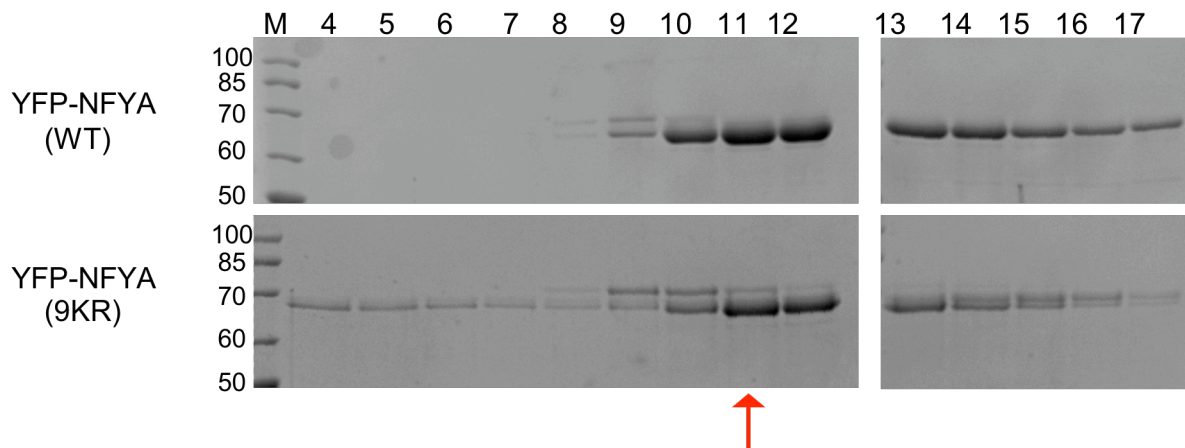
In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass SUMOylierung von NFYA die Bindung an seinem Importrezeptor schwächt. Nun sollte getestet werden, ob diese geschwächte Interaktion *in vitro* zu einer veränderten Kernimportrate führt.

Da es weder durch einzelne Mutationen oder über eine SIM Mutation gelungen war, ein SUMOylierungs-defizientes NFYA herzustellen, wurden die drei folgenden Mutanten für Transportexperimente ausgewählt: a) NFYA K283/289R, b) eine Mutante von NFYA, in der alle Lysine außer den beiden durch MS/MS identifizierten SUMO-Akzeptorstellen K283/289R (7KR) zu Arginine mutiert wurden, sowie c) ein NFYA ohne Lysine (9KR). Hierfür wurden diese Konstrukte zunächst in ein YFP-NFYA-His (*yellow fluorescence protein*) Reporterkonstrukt umklontiert und anschließend als rekombinante Proteine aufgereinigt.

Hierbei ist anzumerken, dass die Aufreinigung der Mutanten parallel mit dem Wildtyp YFP-NFYA-His durchgeführt wurden. Die Induktion der Proteine erfolgte bei niedrigeren Temperaturen (18°C statt 25°C für 3 Stunden) als für NFYA-His üblich, da die Mutanten bei 25°C zu Aggregation neigten. Um sicherzustellen, dass nur korrekt gefaltete Proteine im Transport-Test verglichen werden, wurden alle YFP-NFYA Varianten über Gelfiltration aufgereinigt.

Abbildung 32 zeigt die einzelnen Fraktionen (Fraktion 4 bis 17) einer analytischen S200 Gelfiltration in einem 10%igen Coomassie Gel. Auch bei einer Induktion der Bakterien bei 18°C sieht man deutlich, dass die Variante ohne Lysine im Gegensatz zum Wildtyp auch in den Fraktionen 4 bis 7 vorhanden ist. Dabei handelt es sich unter Umständen um falsch gefaltetes und/oder aggregiertes YFP-NFYA-His. Für weitere Experimente wurde nur die Fraktion 11 (roter Pfeil) der Gelfiltration benutzt (siehe Abbildung 32).

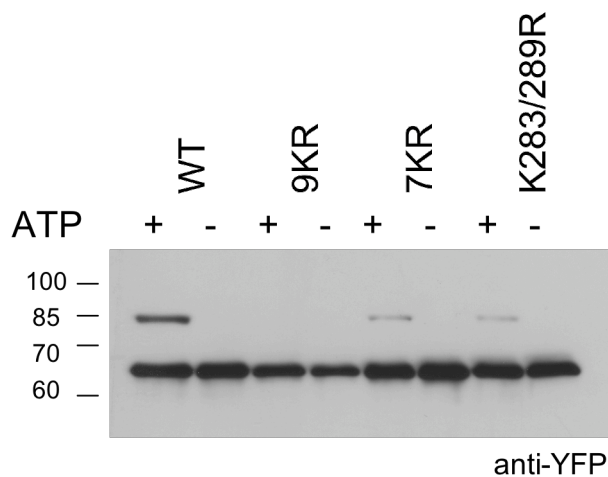




**Abb. 32: Coomassie Gele der Aufreinigung von YFP-NFYA-His**

Fraktion 4-17 eines analytischen S200 Säulenläufe der YFP-NFYA-His Proteinaufreinigungen auf einem 10% SDS-Gel. Das NFYA ohne Lysine (9KR) ist auch in Fraktion 5-8 sichtbar, der Wildtyp nicht. Der Pfeil markiert die im Weiteren verwendete Fraktion 11.

Um zunächst sicherzustellen, dass sich die YFP-Fusionsproteine wie erwartet verhalten, wurde eine *in vitro* SUMOylierungs-Reaktion mit YFP-NFYA-His<sub>6</sub> Wildtyp, 9KR, 7KR und K283/289R durchgeführt. Wie erwartet, zeigt die NFYA Mutante ohne Lysine keine SUMO-modifizierte Bande. Die 7KR und die K283/289R Mutante können noch mit SUMO modifiziert werden, zeigen aber beide eine abgeschwächte SUMOylierung im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abbildung 33).

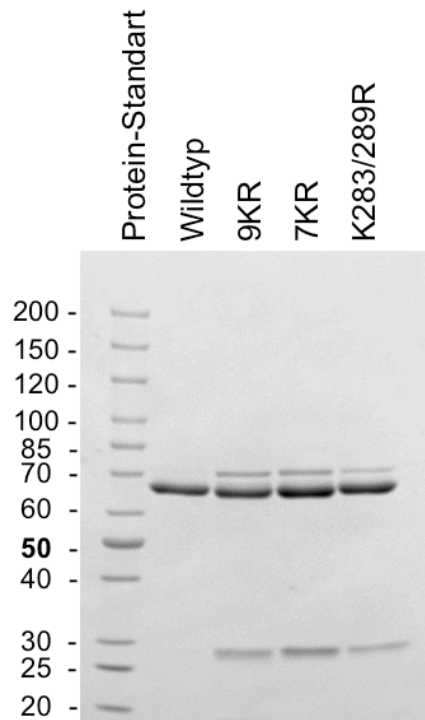


**Abb. 33: In vitro SUMOylierungs-Reaktion von YFP-NFYA-His<sub>6</sub> und Mutanten**

In vitro SUMOylierung von YFP-NFYA-His<sub>6</sub> Wildtyp, der Mutante ohne Lysine (9KR), NFYA mit nur zwei möglichen SUMOylierungsstellen (7KR) oder der K283/289R NFYA Mutante. Detektion im Immunoblot mit Anti-YFP Antikörpern.

Die Proteine, die für die Untersuchung des Transports verwendet werden sollten, wurden mit Hilfe der YFP-Signals (Anregung bei 485nm; Emission bei 525nm) auf

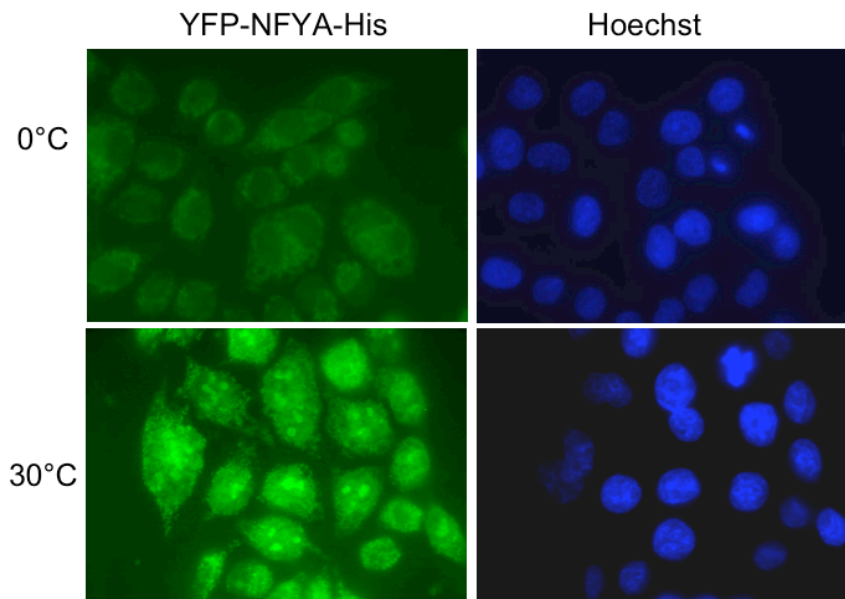
die gleiche Konzentration eingestellt. Hierfür wurden Verdünnungsreihen der jeweiligen Proteine hergestellt und mit dem Fluoroskan Ascent (Thermo Electron Cooperation, Vantaa, Finnland) gemessen. Zur Visualisierung der abgeglichenen Proteinkonzentrationen wurden 10µl der Proteinlösung auf ein 10%iges Coomassie-Gel aufgetragen (siehe Abbildung 34).



**Abb. 34: Konzentrationsabgleich von YFP-NFYA-His<sub>6</sub> Wildtyp und Mutanten**

Coomassie Gel der YFP-NFYA-His<sub>6</sub> Proteine. Die Protein-Konzentrationen des Wildtyps und der Mutanten wurde mit Hilfe des YFP-Signals (Ex 485nm; Em 527nm) eingestellt und je 10µl der Proteinlösung auf ein 10% Coomassie-Gel aufgetragen.

*In vitro* durchgeführte Import-Tests bieten eine gute Möglichkeit, den Import eines Proteins unter definierten Bedingungen zu untersuchen. Hierfür wird die Plasmamembran der Zellen durch das Detergenz Digitonin selektiv permeabilisiert und die im Zytosol vorhandenen löslichen Faktoren ausgewaschen. Der Transport kann daraufhin durch Zugabe von Zytosol oder von rekombinanten Proteinen wiederhergestellt werden. Bezüglich des *in vitro* Imports von YFP-NFYA-His<sub>6</sub> wurde zunächst ermittelt, dass dieser Temperatur- und ATP-abhängig erfolgt. Abbildung 35 zeigt exemplarisch den temperaturabhängigen Transport von YFP-NFYA.



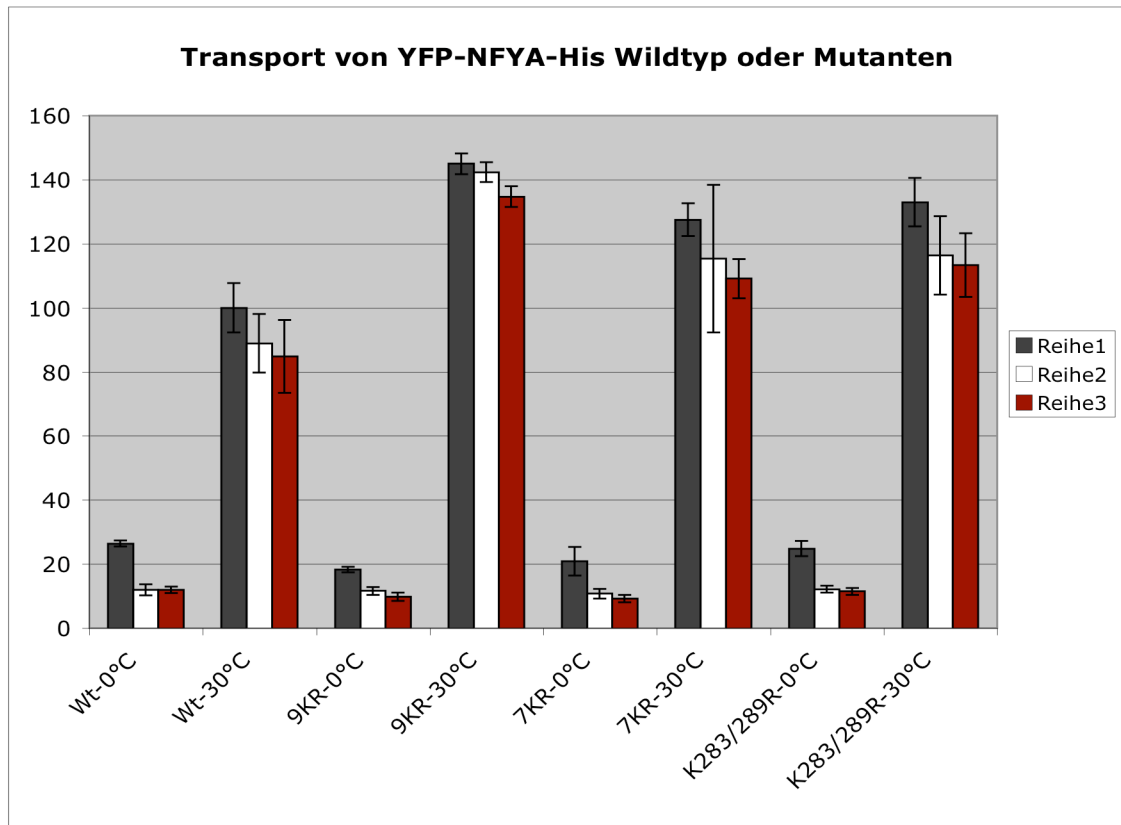
**Abb. 35: Der Transport von YFP-NFYA ist temperaturabhängig**

HeLa-Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät und die Plasmamembran wurde mit Digitonin selektiv permeabilisiert. YFP-NFYA wurde mit Zytosol als Quelle für die Transportrezeptoren für 30 min bei 30°C transportiert. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert und die Aufnahmen wurden mit Fluoreszenz-Mikroskop Axioskop II von der Firma Zeiss gemacht.

Um zu testen, ob SUMOylierung einen Einfluss auf das Transportverhalten von NFYA hat, wurde YFP-NFYA-His<sub>6</sub> Wildtyp mit den oben beschriebenen Mutanten hinsichtlich ihrer Transportrate verglichen.

Hierzu wurde Zytosol als Quelle für die Transportrezeptoren und SUMOylierungs-Maschinerie eingesetzt und der Transport in drei unterschiedlichen Versuchsreihen (Reihe 1-3) jeweils im Triplikat durchgeführt und mittels Durchflusszytometrie (FACSCalibur, Becton Dickinson) analysiert.

Die quantitative Auswertung hierzu ist in Abbildung 36 zu sehen. Überraschenderweise ergab die Analyse, dass die YFP-NFYA-His<sub>6</sub> Mutante ohne Lysine (9KR) deutlich schneller als YFP-NFYA-His<sub>6</sub> Wildtyp transportiert wird. Die beiden weiteren Mutanten, YFP-NFYA-His<sub>6</sub> 7KR und YFP-NFYA-His<sub>6</sub> K283/289R, zeigen eine mittlere Transportgeschwindigkeit. Dies passt zu dem Befund, dass beide Varianten schlechter als Wildtyp SUMOyliert werden (siehe *in vitro* SUMOylierung in Abbildung 33).



**Abb. 36: YFP-NFYA-His<sub>6</sub> 9KR wird schneller importiert als Wildtyp**

Vergleich der Transportraten von YFP-NFYA-His<sub>6</sub> Wildtyp und der drei SUMOylierungs.-Mutanten. Die Quantifizierung des YFP-Signals in den semipermeabilisierten HeLa-Suspensionszellen erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Als Quelle für Import- und SUMOylierungs-Maschinerie wurde mit Zytosol im Rahmen einer 30 minütigen Inkubation bei 30°C. Die Ergebnisse zeigen drei unabhängige Versuchsreihen (Reihe 1-3), die Standardabweichung ergibt sich aus je 3 unabhängigen Proben pro Messreihe. Pro Probe wurden 10000 Zellen gemessen.

Eine nahe liegende Interpretation dieser Daten ist, dass RanBP2-abhängige SUMOylierung den Transport von NFYA in den Zellkern verlangsamt. Allerdings bedarf es eine Vielzahl weiterer Kontrollexperimente um zu beweisen, dass der beschleunigte Transport der 9KR Mutante auf fehlende SUMOylierung zurückzuführen ist.

Basierend auf den Erkenntnissen und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergeben sich eine Reihe interessanter Fragestellungen und Diskussionsansätze.

## 5. Diskussion

Das Kernporenprotein RanBP2/Nup358 ist Teil der nukleozytoplasmatischen Transport-Maschinerie und besitzt darüber hinaus eine SUMO E3-Ligase Aktivität. Neben RanBP2 lokalisieren auch das SUMO E2 konjugierende Enzym und eine SUMO Isopeptidase an der Kernpore. Diese Befunde legen eine Verbindung zwischen Kerntransport und SUMOylierung von Transportsubstraten nahe.

Daher sollte in dieser Arbeit die Frage untersucht werden, ob SUMOylierung die Transportgeschwindigkeit von spezifischen Substraten beeinflusst. Hierfür sollten RanBP2 Substrate in Abhängigkeit ihres SUMOylierungs-Status in einer *in vitro* Transport Reaktion verglichen werden. Zu Beginn der Arbeit waren keine physiologischen RanBP2 Substrate bekannt. Im Laufe der Arbeit gelang es, NFYA als RanBP2-abhängiges SUMO Substrat zu identifizieren. Es folgte eine Charakterisierung der SUMO Modifikation von NFYA und der Vergleich der Importraten von Wildtyp NFYA und SUMO-defizientem NFYA. Die erhaltenen Ergebnisse werden im Folgenden ausführlich besprochen.

### 5.1 NFYA ist ein Substrat für die Modifikation mit SUMO

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass NFYA ein Substrat für eine posttranslationale Modifikation mit SUMO ist. Interessanterweise ist diese Modifikation *in vitro* und *in vivo* abhängig von der in der Kernpore verankerten SUMO E3-Ligase RanBP2. Um SUMO-defizientes mit Wildtyp NFYA im Kernimport zu vergleichen, sollte zunächst das SUMO-Akzeptorlysin im NFYA Protein gefunden werden.

#### 5.1.1 Variable SUMO-Akzeptorstellen im NFYA Protein

Alle neun Lysine des NFYA Proteins befinden sich in einem kleinen stark konservierten Bereich im C-Terminus (Aminosäuren 269 bis 323) (siehe Abbildung 4, Einleitung). In der vorliegenden Arbeit konnten die Lysine 283 und 289 durch *in vitro* Modifikation mit SUMO-1 und anschließender Massenspektrometrie als SUMO-Akzeptorstellen identifiziert werden. Die Ergebnisse aus der Massenspektrometrie-Analyse zeigen allerdings auch, dass diese zwei Lysine nicht die einzigen *in vitro* modifizierten Lysine sind. Passend dazu führte die gleichzeitige Mutagenese der

Lysine 283 und 289 weder *in vitro* noch *in vivo* zu einem kompletten Verlust der SUMOylierung. Für weitere Studien des NFYA Proteins wäre es wichtig, die Identifikation der SUMO-Akzeptorstellen weiter voran zu treiben.

Zur Identifikation weiterer SUMO-Akzeptorstellen könnte eine zweite massenspektrometrische Analyse der mit SUMO modifizierten K283/289R Doppelmutante durchgeführt werden. Idealerweise sollte die Identifizierung der SUMO-Akzeptorstellen mit aus Zellen angereichertem NFYA erfolgen. Hierfür müsste allerdings eine effiziente Anreicherung der SUMOylierten Form vorausgehen, um eine im Coomassie-Gel sichtbare Bande der SUMOylierten Form von NFYA zu generieren.

Um dennoch Wildtyp NFYA und eine SUMO-defiziente Mutante im Transport miteinander vergleichen zu können, wurde ein NFYA ohne Lysine (9KR) hergestellt. Die Mutation aller Lysin Reste hat allerdings einen großen Nachteil. Neben der SUMOylierung könnten auch andere posttranslationale Modifikationen, die Lysine als Akzeptor-Aminosäure benutzen, wie z.B. Ubiquitylierung oder Acetylierung verhindert werden. Deshalb ist es schwierig zu beweisen, dass beobachtete Effekte auf SUMOylierung zurückzuführen sind. In der Literatur gibt es mittlerweile diverse Fälle, in denen wie beim NFYA eine Kombination mehrerer Lysin-zu-Arginin Mutationen benötigt wurde, um die SUMOylierung eines Substrates zu verhindern. In einer Studie über die SUMOylierung von Borealin wurden alle 25 Lysine zu Arginin mutiert um ein SUMO-defizientes Protein herzustellen (Klein et al., 2008). Im Fall des Transkriptioninhibitors Daxx mussten 15 verschiedene Lysine gleichzeitig mutiert werden, um die SUMOylierung zu verhindern (Lin et al., 2006).

Bei dem Versuch die SUMO-Akzeptorstellen im NFYA zu identifizieren wurde der Eindruck gewonnen, dass je nach Anwesenheit unterschiedliche Lysine als Akzeptorstellen fungieren. Möglicherweise liegt die Erklärung dafür in dem Mechanismus mit dem das E2-konjugierende Enzym Ubc9 SUMO auf Substrate transferiert. Derzeit sind zwei mechanistische Modelle in der Literatur beschrieben. Auf der einen Seite bindet Ubc9 direkt an ein klassisches SUMO-Konsensusmotiv im Substrat und ermöglicht eine SUMOylierung des Akzeptorlysins (Sampson et al., 2001), auf der anderen Seite wird der Ubc9 SUMO-Thioester über ein SUMO-Interaktions-Motiv (SIM; *SUMO interacting motif*) rekrutiert und kann verschiedene Lysine in Reichweite modifizieren (z.B. für Daxx gezeigt, Lin et al., 2006). Das bisher identifizierte Bindemotiv für SUMO entspricht der Sequenz [V/I]-x-[V/I]-[V/I] oder umgekehrt der Sequenz [V/I]-[V/I]-x-[V/I/L] (Minty et al., 2000; Song et al., 2004;

Hecker et al., 2006). Für NFYA sind laut den Ergebnissen dieser Arbeit beide Mechanismen denkbar.

Um die Interaktion von Ubc9 mit der SUMO-Konsensusstelle im NFYA zu reduzieren, wurde ein Aminosäureaustausch von Glutamat zu Alanin durchgeführt ( $\psi$ KxE zu  $\psi$ KxA). Solch ein Aminosäureaustausch vermindert die Bindung von Ubc9 und reduziert dadurch SUMOylierung, welche ein Konsensusmotiv benötigt. Dies wurde beispielsweise für das Tumorsuppressor Protein HIC1 gezeigt (Stankovic-Valentin et al., 2007). Auch das NFYA zeigte mit dieser Mutante (E285A) eine Reduktion der SUMOylierung *in vivo*. Allerdings führte diese Mutation nicht zu einem kompletten Verlust der SUMOylierung von NFYA.

Im Daxx Protein gelang es, statt Mutation von 15 Lysinen, durch die Zerstörung eines SUMO-Interaktions-Motives (SIM) ein SUMO-defizientes Daxx herzustellen (Lin et al., 2006). Neben Daxx wurde ebenso für die Thymin-DNA Glycosylase TDG (Takahashi et al., 2005), für die Ubiquitin-Protease Usp25 (Meulmeester et al., 2008) und für die DNA Helikase BLM (Zhu et al., 2008) gezeigt, dass sie für eine effiziente Modifikation mit SUMO auf das SIM angewiesen sind. Für USP25 und BLM wurde zusätzlich gezeigt, dass SUMOylierung die durch ein SIM vermittelt wird, meist nicht ein spezielles Lysin als Akzeptorstelle benutzt, sondern diverse zugängliche Lysine in räumlicher Nähe zum SIM (Meulmeester et al., 2008; Zhu et al., 2008).

Wahrscheinlich gibt es mit dem hier identifizierten SUMO-Interaktions-Motiv im NFYA, neben dem klassischen Rekrutierungsmechanismus, die SIM-abhängige Rekrutierung des mit SUMO beladenen Ubc9s. Durch die SIM Mutation (I343A/V345A) im NFYA konnte zwar eine drastische Reduktion der SUMOylierung erzielt werden, sie führte aber nicht zu einem kompletten Verlust selbiger. Es ist auch denkbar, dass das Ubc9 nicht diskriminiert und jedes Lysin im NFYA SUMOylieren kann.

Zusammengenommen deuten diese Daten daraufhin, dass Lysin 283 das SUMO über Ubc9 rekrutiert, alle anderen Lysine können höchstwahrscheinlich SIM-abhängig modifiziert werden. Dies würde die Suche nach weiteren SUMO-Akzeptorlysinen im NFYA erschweren.

Durch die räumliche Nähe der Lysine im NFYA besteht die Möglichkeit, dass es funktionell irrelevant ist an welchem Lysin NFYA mit SUMO konjugiert wird. In diesem Fall wäre die SIM Mutation ideal einsetzbar für zukünftige Experimente. Möglicherweise kann die SUMOylierung von NFYA jedoch auch unterschiedliche

Funktionen erfüllen, je nachdem welches Lysin modifiziert wurde. Vorstellbar wäre hierbei, dass die Position des SUMO Proteins entscheidend ist für die Funktion des NFYAs in der Zelle, je nachdem ob es sich in der NFYB/C, Importin  $\beta$  oder DNA Bindungsdomäne befindet. Um diese Untersuchungen durchzuführen, könnte man NFYA Konstrukte herstellen, die spezifisch nur an einem Lysin modifiziert werden können. Hierfür müssten alle anderen Lysine zu Argininen mutiert werden. Diese Varianten sollten anschließend *in vitro* mit SUMO konjugiert und in ihrer Bindung an NFYB/C oder Importin  $\beta$  getestet werden. Die Bindung von NFYA an DNA erfordert eine vorhergehende Trimerformation, deshalb ist ein Testen der DNA Bindung nur möglich, falls die Trimerbildung unbeeinflusst von der spezifischen SUMOylierung bleibt.

### 5.1.2 Ist NFYA ein Ziel für die Konjugation mit SUMO1 oder SUMO2?

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Diskrepanz zwischen SUMO1 und SUMO2 Konjugation von NFYA *in vivo* und *in vitro* beobachtet. Während NFYA *in vitro* präferentiell mit SUMO1 modifiziert wurde, gelang der Nachweis einer NFYA SUMOylierung in HeLa-Zellen nur bei gleichzeitiger Überexpression von His-SUMO2. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Expressionslevel von His-SUMO1 für eine Modifikation des NFYA Proteins nicht ausreichen. Aus bisher unbekanntem Gründen tolerieren Zellen keine stark erhöhten Mengen an SUMO-1. Auch endogen gibt es 5 mal mehr SUMO-2 als SUMO-1 (Saitoh und Hinchev, 2000). Vielleicht ist die Spezifität für das eine oder andere SUMO Paralog *in vivo* aber auch durch andere posttranslationale Modifikationen von NFYA beeinflusst, wie zum Beispiel Phosphorylierung (Matic et al., 2008). Um zu ergründen, welches SUMO-Paralog in Zellen wirklich verwendet wird, sollte auf Überexpression verzichtet werden. Statt dessen sollte eine Immunpräzipitation von endogenem NFYA durchgeführt werden. Möglicherweise könnte man anschließend durch Detektion mit Paralog-spezifischen Antikörpern (anti-SUMO-1 oder anti-SUMO-2) feststellen, mit welcher SUMO Form NFYA in Zellen konjugiert wird. Idealerweise sollte man eine Immunpräzipitation mit anti-SUMO1 und anti-SUMO2 Antikörpern durchführen, um endogenes NFYA im Western Blot zu detektieren. Die Aufklärung der Ursachen für diese unterschiedlichen Präferenzen der SUMO Paralogen ist eine spannende Aufgabe und führt womöglich zur Aufklärung neuer Mechanismen, wie die Spezifität für eine der SUMO Formen entsteht.



Durch die Kolokalisationsstudien von NFYA mit SUMO-1 oder SUMO-2 in HeLa-Zellen konnten ebenfalls keine weiteren Erkenntnisse darüber gewonnen werden, welches SUMO Paralog *in vivo* präferentiell an NFYA konjugiert wird. HA-NFYA kolokalisiert sowohl mit SUMO-1 als auch mit SUMO-2. Der Grund und die Folgen dieser Kolokalisation sind bis jetzt unklar. Weiterführend stellt sich die Frage, ob nur die A Untereinheit, oder auch der trimere NF-Y Komplex mit SUMO kolokalisiert. Von besonderem Interesse ist die Natur der Domänen, die mit SUMO kolokalisieren und der Zeitpunkt ihrer Entstehung. Kürzlich wurde eine bisher unentdeckte Art von Kernkörperchen in Nervenzellen charakterisiert. Diese Kernkörper wurden *engl.* „SUMO nuclear bodies“ (SNB) getauft und zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht mit bekannten Kerndomänen, wie PML oder Cajal-Körpern, überlappen bzw. an sie angrenzen. Die SNBs sind Aufenthaltsort von mindestens drei Transkriptionsregulatoren, namentlich CBP, CREB und c-Jun (Navascues et al., 2007). Die Funktion dieser SNBs ist noch unbekannt. Auch in einer Studie über den Transkriptionsfaktor Pax8 wurde gezeigt, dass Pax8 in HeLa-Zellen mit SNBs kolokalisiert und diese Kolokalisation ist wie bei NFYA unabhängig vom SUMOylierungs-Status des Pax8 Proteins (de Cristofaro et al., 2008). Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass auch die NFYA Kernkörper an Cajal-Körper angrenzen und nicht mit PML Körpern kolokalisieren (Immunfluoreszenz mit Coilin Antikörpern oder Doppelfärbung mit HA-Sp100; Daten nicht gezeigt). Demzufolge ist es möglich, dass es sich bei den Kernkörpern, in denen das NFYA mit SUMO kolokalisiert, ebenfalls um SNBs handelt. Die Aufklärung der Natur dieser NFYA-haltigen Kernkörper ist eine spannende Aufgabe für zukünftige Untersuchungen. Bisher gelang der Nachweis der NFYA Kernkörper nur nach Überexpression von NFYA (mit GFP, HA oder Flag Markierung). Deshalb ist es unerlässlich zu testen, ob man diese Kernkörper mit sensitiveren anti-NFYA Antikörpern auch endogen detektieren kann. Im Fokus der zukünftigen Untersuchungen sollte stehen, dass die beobachtete punktierte Färbung, welche mit SUMO kolokalisiert, nur in etwa 20% der Zellen zu sehen ist. Womöglich handelt es sich bei der Kolokalisation von NFYA mit SUMO um ein zellzyklus-abhängig reguliertes Ereignis. Interessanterweise wurde im Jahr 1999 entdeckt, dass die Proteinlevel von NFYA zellzyklus-abhängig reguliert werden. Während die mRNA Mengen unverändert bleiben, verändert sich die Proteinmenge des NFYAs. Die Menge des NFYA Proteins ist hoch in der G1 Phase, vermehrt sich weiter in der S Phase und fällt in der G2/M Phase ab. Schließlich korrelieren die

unterschiedlichen Proteinmengen von NFYA mit einer veränderten Aktivität des NF-Y Transkriptionsfaktors (Bolognese et al., 1999). Diese beschriebene zellzyklus-abhängige Stabilität von NFYA legt eine Regulation durch posttranslationale Modifikationen nahe und könnte gegebenenfalls durch SUMOylierung reguliert werden. Um diese Frage zu beantworten, könnte man zukünftig Säugetierzellen zu verschiedenen Stadien des Zellzyklus hinsichtlich einer Modifikation des NFYA durch SUMO analysieren.

### 5.1.3 NFYA ist ein *in vivo* Substrat für die SUMO E3-Ligase RanBP2

Entscheidend für die Zielsetzung dieser Arbeit war die Identifikation eines SUMO-Substrates, dessen Modifikation von der E3-Ligase RanBP2 abhängt. RanBP2 ist in den Kern-Zytoplasma-Transport involviert und hat Funktionen in der Mitose. Es ist das einzige bisher bekannte Kernporenkomplexprotein, das eine SUMO E3-Ligase Aktivität besitzt. Die physiologische Rolle von RanBP2 ist schwierig zu untersuchen, da die Depletion von RanBP2 in Mäusen embryonal letal ist (Aslanukov et al., 2006). Phänotypen nach Herunterregulieren von RanBP2 mit Hilfe von siRNA sind schwer zu interpretieren, da eine Reduktion von RanBP2 gleichzeitig zu einer verminderten Anzahl von Andockstelle für Transportrezeptoren und zu reduzierter SUMO E3-Ligase Funktion führt. Die Identifikation neuer RanBP2-abhängiger SUMO Substrate ist kompliziert, da die katalytische Domäne alleine nicht stabil mit den Zielproteinen interagiert (Pichler et al., 2004), wohingegen längere Fragmente von RanBP2 mit einer großen Anzahl an Transportrezeptoren und ihren Substraten interagieren.

Während für die PIAS Protein Familie schon sehr viele *in vivo* SUMO Substrate identifiziert wurden, wurden während des Verlaufs dieser Doktorarbeit erst zwei *in vivo* Substrate von RanBP2 als SUMO E3-Ligase identifiziert. In einer Studie von Dawlaty und Kollegen wurden Mäuse generiert, die nur ein sehr geringes Level des RanBP2 Proteins exprimieren. Mit Hilfe dieser Mäuse konnte die Gruppe zeigen, dass RanBP2 an die Topoisomerase II  $\alpha$  bindet und den SUMOylierungs-Status des Proteins und dessen Lokalisation reguliert (Dawlaty et al., 2008).

Neben der Topoisomerase II  $\alpha$  wurde kürzlich Borealin als weiteres *in vivo* Substrat der SUMO E3-Ligase RanBP2 identifiziert. In dieser Studie wurde die Notwendigkeit von RanBP2 für eine effektive SUMOylierung von Borealin mit SUMO2/3 durch RNA Interferenz demonstriert (Klein et al., 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte NFYA als ein weiteres Substrat für RanBP2 als SUMO E3-Ligase identifiziert werden. Ein katalytisches Fragment von RanBP2 stimuliert die *in vitro* SUMO Modifikation von NFYA, und eine Depletion von RanBP2 durch RNAi *in vivo* bewirkt eine drastische Reduktion der Menge der SUMOylierten Form von NFYA. In einer Kontroll-Immunfluoreszenz-Färbung wurde sichergestellt, dass die Lokalisation von HA-NFYA unbeeinflusst von der Depletion des RanBP2 Proteins bleibt. Um zu beweisen, dass das Fehlen der enzymatischen Aktivität des RanBP2 Proteins für die verminderte SUMOylierung von NFYA verantwortlich ist, wäre es zusätzlich sinnvoll, in RanBP2 depletierten Zellen durch Überexpression eines volle Länge RanBP2-Konstruktes die ursprünglichen Level an SUMOylierten NFYA wiederherstellen. Als Kontrolle sollte ein katalytisch inaktives RanBP2-Konstrukt transfiziert werden.

Bei der Betrachtung von RanBP2 als SUMO E3-Ligase steht immer eine wichtige Frage im Raum. Da RanBP2 in Interphase Zellen an der Kernpore verankert ist, müssen potentielle Substrate der E3-Ligase dorthin rekrutiert werden. Deshalb wurde getestet, ob die An- oder Abwesenheit einer funktionellen NLS in NFYA Einfluss auf dessen SUMOylierung hat. Die erhaltenen Ergebnisse (Ergebnisteil: Abb. 31) deuten darauf hin, dass für die *in vivo* SUMOylierung von NFYA eine funktionelle NLS benötigt wird. Das HA-NFYA Konstrukt ohne NLS wurde signifikant weniger SUMOyliert. Dabei war es nicht die Kernlokalisierung per se, sondern die Interaktion mit dem Importfaktor, die in der verwendeten Mutante fehlte. Dieser Befund deutet auf einen Mechanismus hin, in dem SUMO Substrate durch ihre Transportrezeptoren zu der Kernporen-assoziierten SUMO E3-Ligase RanBP2 rekrutiert werden. Diese spannende Hypothese bedarf in der Zukunft weiterer gründlicher biochemischer und zellbiologischer Charakterisierungen.

Zukünftig könnte hierzu etwa getestet werden, ob eine direkte bzw. indirekte Interaktion zwischen RanBP2 und NFYA stattfindet. Dazu sollten ein längeres RanBP2 Fragment als das hier verwendete RanBP2 $\Delta$ FG eingesetzt werden, als auch über Phenylalanin-Glycin-haltige Regionen (engl.: „FG-repeats“) verfügt. Diese in vielen Nukleoporinen enthaltenen Aminosäure-Wiederholungen dienen als Andockstellen für Transportrezeptoren, so dass eine mögliche Abhängigkeit der Interaktion von NFYA und RanBP2 von Importin  $\beta$  analysiert werden könnte. Erste Untersuchungen zeigten aber bereits, dass ein längeres Fragment von RanBP2 *in vitro* nicht zu einer SUMO Modifikation des NFYA/Importin  $\beta$  Transportkomplexes

führt (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise gibt es im Zellsystem einen bisher unidentifizierten Faktor, der die Modifikation des NFYA Proteins auch zusammen mit Importin  $\beta$  ermöglichen würde. Die Identifikation dieses Faktors könnte gegebenenfalls erfolgen, indem man immobilisiertes RanBP2 mit Zellextrakt und rekombinanten HA-NFYA inkubiert und darauf folgend eine Immunpräzipitation mit anschließender Western Blot- bzw. Massenspektrometrie-Analyse durchführt.

## **5.2 Auswirkungen der SUMOylierung von NFYA**

Durch *in vitro* Bindestudien konnte gezeigt werden, dass SUMOylierung die Wechselwirkungen von NFYA mit Importin  $\beta$  und NFYB/C beeinträchtigt. Dies sollte Konsequenzen für die Lokalisation und/oder Funktion von NFYA in Zellen haben.

### **5.2.1 SUMOylierung als negativer Regulator für Kerntransport?**

Eine feine Einstellung der Balance zwischen Import und Export eines Transkriptionsfaktors bestimmt die Menge des aktiven Transkriptionsfaktors im Kern. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wird das Dimer NFYB und NFYC von Importin 13, und monomeres NFYA durch Importin  $\beta$  importiert. Interessanterweise überlappen die Kernlokalisationssequenzen in NFYA und NFYB/C mit den Bindestellen für den jeweiligen Partner im trimeren Komplex (Kahle et al., 2005). Folglich könnte ein NF-Y Holo-Komplex nach Assemblierung im Zytoplasma nicht importiert werden. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe einer *in vitro* Bindungsstudie gezeigt, dass SUMOylierung von NFYA mit der Bindung an den NFYB/C Dimer interferiert. Dieses Ergebnis lässt die Spekulation zu, dass eine posttranslationale Modifikation mit SUMO die Assemblierung des NF-Y Komplexes im Zytoplasma verhindert und dadurch den Import der Untereinheiten in den Kern ermöglicht.

Mit SUMO-modifiziertes NFYA bindet aber nicht nur schlechter an NFYB/C. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse belegen eine ebenfalls reduzierte Bindung an den Importrezeptor Importin  $\beta$ . Dies würde auf ein alternatives Modell hindeuten, in dem die SUMOylierung als Retentionsmechanismus für die A Untereinheit des NF-Y Komplexes dient. Wenn dies der Fall ist, sollte die SUMOylierte Form von NFYA vorwiegend im Zytoplasma vorliegen. Dies sollte mit Hilfe von Zellfraktionierungsexperimenten überprüft werden. Passend zu dieser Hypothese wurde in *in vitro*

Transport Reaktionen gezeigt, dass ein NFYA ohne Lysine (9KR) schneller als Wildtyp NFYA in den Kern importiert wird.

Um zu untersuchen, ob der beschleunigte Import wirklich auf die Abwesenheit der SUMOylierung zurückzuführen ist, fehlen allerdings noch Kontrollexperimente. Möglicherweise wird durch die Lysin zu Arginin Mutationen die Interaktion zwischen NFYA und seinem Transportfaktor Importin  $\beta$  verstärkt oder diese erleichtern die Dissoziation des Transportkomplex nach dem Durchtritt durch die Kernpore. Es ist auch denkbar, dass die SUMO-defiziente Mutante schlechter exportiert wird. Außerdem werden beim Transport von YFP-NFYA mit Zytosol auch andere posttranslationale Modifikationen, wie zum Beispiel Ubiquitinierung oder Acetylierung, behindert. Um diese Faktoren zu kontrollieren müssen weitere Experimente durchgeführt werden.

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang, die in dieser Arbeit beschriebene SIM-Mutante (I343A/V345A) hinsichtlich ihrer Transportraten zu untersuchen. Diese Mutante besitzt noch alle Lysine, wird aber deutlich schwächer als Wildtyp NFYA SUMOyliert. Falls diese Mutante ebenfalls schneller importiert wird, würde dieser Versuch die Vermutung bekräftigen, dass SUMOylierung von NFYA den Import beeinflusst.

Künftig sollten die Transport Experimente mit rekombinanten Faktoren (Transportrezeptoren und SUMO Maschinerie) wiederholt werden. Außerdem sollte rekombinant hergestelltes SUMOyliertes YFP-NFYA mit unmodifizierten YFP-NFYA in der Transportgeschwindigkeit verglichen werden. Hierbei müsste man allerdings verhindern, dass Isopeptidasen in der Zelle eine sofortige DeSUMOylierung des NFYA Proteins bewirken. Um diesem Risiko zu entgehen, könnte auch ein NFYA-SUMO Fusionsprotein im Transport Test verwendet werden. In einzelnen Studien wurden solche Fusionen erfolgreich eingesetzt (z.B. für den Transkriptionsfaktor Sp3, Ross et al., 2002). Da im NFYA scheinbar alle Lysine mit SUMO modifiziert werden können, und sich alle Lysine im C-Terminus befinden, wäre eine C-terminale Fusion mit SUMO sinnvoll. Hierbei müsste allerdings überprüft werden, dass sich ein mit SUMO fusioniertes NFYA wie mono-SUMOyliertes NFYA verhält. Dies ist keinesfalls selbstverständlich, da z.B. SUMO-fusioniertes RanGAP nicht an der Kernpore lokalisiert (unpublizierte Ergebnisse, Dr. Frauke Melchior).

Zusätzlich könnten Transport Tests mit rekombinanten Faktoren in semi-permeablen Zellen durchgeführt werden, die eine dominante Mutante von Ubc9 überexprimieren

(C93S, Banerjee et al., 1995; Azuma et al., 2003) oder in denen vorher Uba2 oder Ubc9 mit Hilfe von siRNA depletiert wurde. Dies könnte allerdings auch generelle Transporteeffekte zur Folge haben, falls zentrale Teile der Transportmaschinerie eine Modifikation mit SUMO für effizienten Proteinimport benötigen. Da hierbei aber Wildtyp NFYA mit der 9KR Mutante verglichen würde, wäre dies für die Aussage des Experimentes unerheblich.

Anders als die in dieser Arbeit verwendeten HeLa-Zellen weisen Fibroblasten (NIH3T3) und verschiedenen Epithel-Zelllinien (MDCK oder HEK Zellen) einen signifikanten zytoplasmatischen Pool des NFYA Proteins auf. Der Stimulus TGF- $\beta$  bewirkt in diesen Zellen einen Import in den Kern (Alabert et al., 2006). Dieses Zellsystem wäre alternativ zum *in vitro* Transport Test sehr gut geeignet, um ein SUMO-defizientes NFYA mit Wildtyp NFYA in der Transportgeschwindigkeit zu vergleichen. Import könnte durch die Zugabe von TGF- $\beta$  induziert werden und mittels Fluoreszenz-Mikroskopie in lebenden Zellen verfolgt werden.

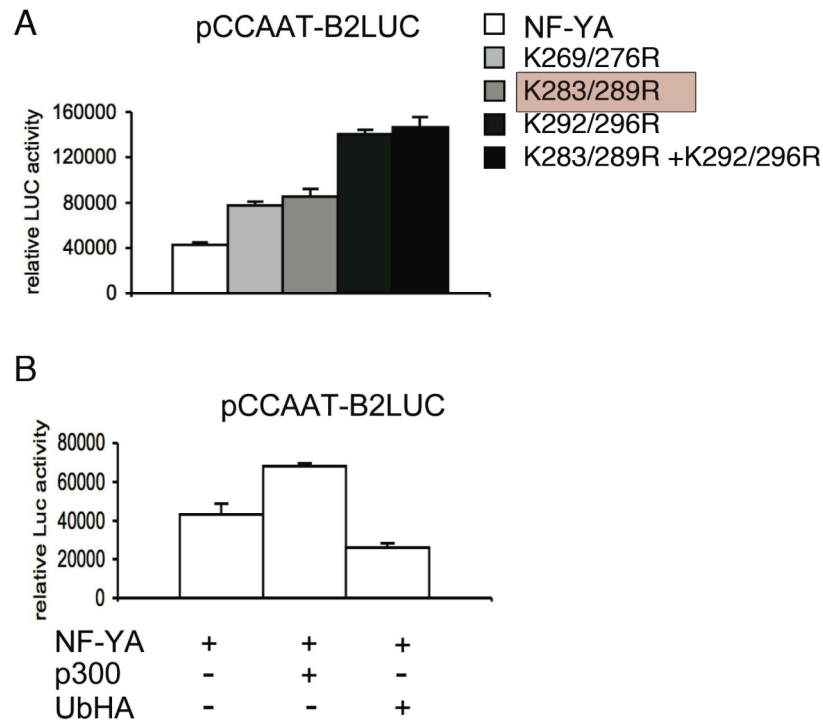
Es stellt sich außerdem die Frage, wie der zytoplasmatische Pool von NFYA entsteht. Möglicherweise handelt es sich beim NFYA um ein Protein, das sowohl importiert wie auch exportiert wird. In der Aminosäuresequenz des NFYA Proteins befindet sich zwischen Position 244-253 eine potentielle NES (SVP AIQR IPL). Überraschenderweise wurde im Jahr 2006 beschrieben, dass eine Zugabe des CRM1 Inhibitors Leptomycin B (LMB) zu einer Akkumulation des NFYA Proteins im Zytoplasma und nicht wie erwartet im Zellkern führt (Alabert et al., 2006). Scheinbar hängt die intrazelluläre Verteilung des NFYA Proteins von Faktoren ab, die ihrerseits von CRM1 reguliert werden.

Zukünftige Studien sollten daher neben HeLa-Zellen auch andere Zelllinien beinhalten. Es ist außerdem eine herausfordernde und spannende Aufgabe den möglichen Exportfaktor von NFYA ausfindig zu machen. Eventuell gibt die Mutation der potentiellen Exportsignalsequenz Aufschluss darüber, ob NFYA ein Substrat für Export ist. Anschließend könnte getestet werden, ob die SUMOylierung einen Einfluss auf den Export von NFYA hat. Womöglich spielt die SUMOylierung von NFYA auch nach dem Exportprozess eine Rolle, um einen sofortigen Reimport des Proteins zu verhindern oder den Exportkomplex zu disassemblieren.

### **5.2.2 Einfluss der SUMOylierung auf die Transkriptionsaktivität des NF-Y Komplexes**

Da NF-Y ein Transkriptionsfaktor ist, sollten in Zukunft auch mögliche Konsequenzen auf die Transkriptionsaktivität untersucht werden. In der Literatur gibt es viele Beispiele in denen SUMOylierung die Aktivität eines Transkriptionsfaktors beeinflusst (zusammengefasst in Lyst und Stancheva 2007; Gill 2005; Girdwood et al., 2004). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, kann der NF-Y Komplex sowohl die Transkription bestimmter Gene aktivieren als auch unterdrücken. Eine systematische Analyse der Rolle der SUMOylierung des NF-Y Transkriptionskomplexes wird dadurch erschwert, dass NF-Y mit sehr vielen verschiedenen anderen Transkriptionsfaktoren interagiert.

Ein Einfluss von posttranskriptionalen Modifikationen von NFYA auf Transkription wurde in einer kürzlich erschienen Publikation von Piaggio und seinen Kollegen gezeigt. Sie postulieren eine Konkurrenz zwischen Ubiquitylierung und Acetylierung im NFYA Protein. Hierbei wurden verschiedene Lysin-zu-Arginin Mutationen, unter anderen die von mir durch Massenspektrometrie identifizieren SUMO-Akzeptorstellen K283/289R, hinsichtlich ihrer Transkriptionsfaktor-Aktivität mittels Luziferase-Tests getestet (Manni et al., 2008). Abbildung 37 zeigt Resultate aus dieser Veröffentlichung. Alle getesteten Lysin Mutationen verstärken die Promotoraktivität für Cyclin B2, was in einer erhöhten Luziferase Aktivität resultiert (siehe Abbildung 37, Teil A). Während die Autoren diese Befunde auf veränderte Ubiquitylierung und Acetylierung von NFYA zurückführen, wäre die beobachtete verstärkte Transkriptionsaktivität nach Lysin-zu-Arginin Mutationen auch mit Verlust der SUMOylierung zu erklären. SUMOylierung von NFYA beeinträchtigt die Bildung des trimeren NF-Y Komplexes. Deshalb müssten Lysin-zu-Arginin Mutationen, welche die SUMOylierung von NFYA reduzieren, zu einer verstärkten Transkriptionsaktivität führen. Um zwischen Ubiquitylierung, Acetylierung und SUMOylierung zu unterscheiden müsste man andere Aminosäuren als Lysine mutieren. Beispielsweise könnte man die in dieser Arbeit ebenfalls verwendeten SUMO-Interaktions-Motiv (I343A/V345A) und Glutamat zu Alanin (E285A) Mutanten in dem Luziferase Test einsetzen. Um den Einfluss einer Acetylierung zu untersuchen, könnte man Lysin zu Glutamin Mutanten testen, da dieser Aminosäureaustausch eine Acetylierung imitiert.



**Abb. 37: Luziferase Test (Publikation von Manni et al., 2008, modifizierte Abb. 10)**

(A) Luziferase Test verschiedener NFYA Varianten in C2C12 Zellen. Messung der Aktivität des Cyclin B2 Promotors (pCCAAT-B2LUC). (B) Luziferase Test von C2C12 Zellen, die mit pCCAAT-B2LUC, NFYA und p300 und/oder Ubiquitin (UbHA) kotransfiziert wurden. In A und B wurde die Luziferase Aktivität durch Messung der Proteinkonzentrationen und  $\beta$ -Gal Expression normalisiert. (Abbildung modifiziert aus Manni et al., 2008)

Interessanterweise sind die beiden Lysine 283/289, welche in dieser Arbeit durch Massenspektrometrie als Akzeptorstellen für SUMO identifiziert wurden, laut Manni et al. auch das Hauptziel für eine Acetylierung durch den Transkriptions-Koaktivator p300 (Manni et al., 2008). Möglich wäre demzufolge eine Konkurrenz zwischen Acetylierung und SUMOylierung um dieselben Lysinreste. Dabei verhindert eine Acetylierung die SUMOylierung und fördert damit die Bildung des aktiven trimern NF-Y Komplexes. Dieses Modell wird von den Daten in der Veröffentlichung von Manni et al., 2008 unterstützt, da die Kotransfektion von p300 zu einem starken Anstieg der Promotoraktivität führt (siehe Abbildung 37, Teil B). Um diese Modelle zu bestätigen und die Rolle der einzelnen posttranslationalen Modifikationen im Detail zu verstehen, müssten allerdings noch viele Untersuchungen folgen.

Neben der reinen Verhinderung der Formation des trimern NF-Y Komplexes, und somit dessen Transkriptionsaktivität, könnte die SUMOylierung von NFYA auch ein NFYA-unabhängiges Agieren des NFYB/C Heterodimers ermöglichen. Im Jahre



1999 wurde gezeigt, dass NFYB und NFYC auch ohne die regulatorische A Untereinheit Funktionen haben. Beispielsweise hat das Heterodimer eine intrinsische Affinität für die Histone H3-H4 während der Formation der Nukleosomen (Caretti et al., 1999). Diese Interaktion konkurriert aber nicht mit einer möglichen späteren Bindung von NFYA. Andere biochemische Hinweise deuten daraufhin, dass der NFYB/NFYC Dimer in Abwesenheit von NFYA Teil von verschiedenen hochmolekularen Komplexen ist (Bellorini et al., 1997). Bei der SUMOylierung von NFYA könnte es sich also auch um einen Regulationsmechanismus handeln, der eine unabhängige Funktion des NFYB/C Dimers ermöglicht.

Aufgrund der verschiedenen Aufgabengebiete des NFYA zum einen als Monomer oder auch als Bestandteil des NF-Y Trimers besteht die Möglichkeit, dass Modifikation von NFYA mit SUMO sehr vielfältige Folgen hat. Diese könnten, je nachdem, ob es sich um eine Zelle in der Interphase oder in Mitose, eine ungestresste oder gestresste Zelle, eine ausdifferenzierte oder eine differenzierende Zelle handelt, variieren. Diese komplexen und vielschichtigen Regulationsmechanismen von NFYA bieten daher diverse Möglichkeiten zur Untersuchung der Folgen und des Wechselspiels posttranslationaler Modifikationen wie SUMO.

### **5.3 Perspektiven**

Es bedarf noch einiger Anstrengungen, um die Funktionsweise der posttranslationalen Modifikation von NFYA mit SUMO gänzlich zu verstehen. Dazu würde sicherlich die genauere Aufklärung der hier beschriebenen Wechselwirkungen von NFYA zu Faktoren wie Importin  $\beta$  oder NFYB/NFYC *in vivo* beitragen. Weitere Betrachtung verdient auch das Wechselspiel der einzelnen posttranslationalen Modifikationen des NFYA Proteins und deren Auswirkungen auf den NF-Y Holo-Komplex. Die Ursache und der Zweck der NFYA-haltigen Kerndomänen, die mit SUMO kolokalisieren, verdient ebenfalls zukünftige Aufmerksamkeit.

Die im *in vitro* Transport erzielten Ergebnisse für YFP-NFYA bedürfen weiterer Untersuchungen, um die mögliche Rolle der SUMOylierung für die Importgeschwindigkeit zu charakterisieren. Interessanterweise wurden dieses Jahr mehrere neue physiologische RanBP2 Substrate identifiziert. In Weiterführung der

---

bisherigen Arbeiten sollten diese ebenfalls in *in vitro* Transport Reaktionen getestet werden, um die generelle Frage zu ergründen, ob die SUMOylierung von RanBP2 Substraten zu Veränderungen in deren Importverhalten führt.

Die hier gezeigte Arbeit kann die Frage nicht abschließend beantworten, ob SUMOylierung mit Hilfe der E3-Ligase RanBP2 die Transportgeschwindigkeit von Zielproteinen beeinflusst, aber sie bietet neue Denkanstöße. Es wurde begonnen ein detailliertes Bild der NFYA SUMOylierung aufzuzeigen, für ein vollständiges Verständnis bedarf es aber noch weiterer Studien.

## 6. Zusammenfassung

Reversible posttranslationale Modifikation mit Ubiquitin-ähnlichen Proteinen der SUMO-Familie ist ein wichtiger Mechanismus, um Proteine in ihrer Funktion, Aktivität oder Lokalisation zu beeinflussen. Die kovalente Anheftung von SUMO erfordert das Zusammenspiel einer Enzymkaskade von einem E1, einem E2 Enzym und in den meisten Fällen einer E3 Ligase. Interessanterweise ist eine der wenigen bekannten SUMO E3 Ligasen, RanBP2/Nup358, ein Kernporenkomplexprotein. Dies legt eine Verbindung zwischen Kerntransport und SUMOylierung nahe.

Um dieser Vermutung nachzugehen, mussten zunächst RanBP2-abhängige SUMO-Substrate identifiziert werden, da zu Beginn der Arbeit noch keine physiologischen RanBP2 Substrate bekannt waren.

Dies gelang mit dem Nachweis, dass NFYA, eine Untereinheit des trimeren Transkriptionsfaktors NF-Y, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Abhängigkeit von RanBP2 SUMOyliert wird. Systematische Untersuchungen zur Identifikation der SUMO-Akzeptorstelle im NFYA führten zu dem Schluss, dass möglicherweise alle neun vorhandenen Lysine mit SUMO verknüpft werden können. Eine SUMO-Akzeptorstelle (K283) ist in ein klassisches SUMO Konsensusmotiv eingebettet, weitere Lysine können höchstwahrscheinlich in Abhängigkeit eines SUMO-Interaktions-Motives (SIM) mit SUMO verknüpft werden.

Funktionelle Studien zur Bedeutung der SUMOylierung zeigten, dass NFYA nur als Monomer, nicht aber im Komplex mit Importin  $\beta$  oder dem NFYB/C Heterodimer modifiziert werden kann. Nach SUMOylierung ist monomeres NFYA in seiner Fähigkeit zur Komplexbildung deutlich inhibiert.

Aufgrund der verschlechterten Interaktion von NFYA mit seinem Importrezeptor sollte anschließend untersucht werden, ob die Modifikation mit SUMO den Import *in vitro* Transport-Reaktionen beeinflusst. Hierzu wurden verschiedene YFP-Fusionsproteine hergestellt und deren Importraten verglichen. Interessanterweise konnte ein schnellerer Import von Lysin-freiem, also nicht SUMOylierbarem NFYA im Vergleich zum Wildtypprotein festgestellt werden. Möglicherweise verlangsamt die SUMOylierung den NFYA Proteinimport, indem sie die Bindung an den Importrezeptor beeinträchtigt.

## 7. Summary (engl.)

Reversible post-translational modification with SUMO (small ubiquitin-related modifier) is an important mechanism to regulate the function, activity or localization of target proteins. Covalent attachment of SUMO requires an enzymatic cascade involving an E1, an E2 enzyme and in most cases an E3 ligase. Interestingly, one of the few well-characterized SUMO E3 ligases, RanBP2/Nup358, is a nuclear pore complex protein suggesting a connection between nuclear transport and SUMOylation.

Prerequisite for following this assumption was to identify RanBP2-dependent SUMO substrates, since there was no physiological RanBP2 target known at the onset of this work.

Here, we show that NFYA, a subunit of the trimeric transcription factor NF-Y, is a substrate for RanBP2-dependent SUMOylation both *in vitro* and *in vivo*.

In a site-directed mutagenesis and mass spectrometry based approach, we systematically investigated SUMO-acceptor sites in NFYA. These studies led to the conclusion that possibly all nine existing lysine residues can be covalently linked with SUMO. The K283 SUMO-acceptor site is embedded in a classical SUMO consensus motif; further lysines can probably be linked to SUMO in dependence of a SUMO interaction motif (SIM).

In order to assess the biological function of NFYA SUMOylation, we conducted binding studies revealing that NFYA can be modified only as a monomer, but neither in complex with its transport receptor importin  $\beta$  nor in context of the trimeric NF-Y complex. Furthermore, monomeric SUMOylated NFYA is visibly inhibited in its ability for complex formation with importin  $\beta$  or NFYB/C.

Due to the impaired interaction of NFYA with its import receptor, it has been examined, whether SUMO modification affects the import as measured by *in vitro* transport reactions. Therefore, different YFP fusion proteins have been generated and their import rates were compared. Interestingly a faster import could be determined by a lysine-less and therefore non-SUMOylatable NFYA in comparison to the wild-type protein. SUMOylation of NFYA possibly decelerates protein import by impairing binding of NFYA to importin  $\beta$ .

## 8. Literatur

- Adam S. A., Marr R. S. and Gerace L. (1990) Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J Cell Biol* **111**, 807-16.
- Alabert C., Rogers L., Kahn L., Niellez S., Fafet P., Cerulis S., Blanchard J. M., Hipskind R. A. and Vignais M. L. (2006) Cell type-dependent control of NF-Y activity by TGF-beta. *Oncogene* **25**, 3387-96.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-402.
- Anckar J., Hietakangas V., Denessiouk K., Thiele D. J., Johnson M. S. and Sistonen L. (2006) Inhibition of DNA binding by differential sumoylation of heat shock factors. *Mol Cell Biol* **26**, 955-64.
- Andrews E. A., Palecek J., Sergeant J., Taylor E., Lehmann A. R. and Watts F. Z. (2005) Nse2, a component of the Smc5-6 complex, is a SUMO ligase required for the response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **25**, 185-96.
- Aslanukov A., Bhowmick R., Guruju M., Oswald J., Raz D., Bush R. A., Sieving P. A., Lu X., Bock C. B. and Ferreira P. A. (2006) RanBP2 modulates Cox11 and hexokinase I activities and haploinsufficiency of RanBP2 causes deficits in glucose metabolism. *PLoS Genet* **2**, e177.
- Azuma Y., Arnaoutov A. and Dasso M. (2003) SUMO-2/3 regulates topoisomerase II in mitosis. *J Cell Biol* **163**, 477-87.
- Banerjee A., Deshaies R. J. and Chau V. (1995) Characterization of a dominant negative mutant of the cell cycle ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34. *J Biol Chem* **270**, 26209-15.
- Bernier-Villamor V., Sampson D. A., Matunis M. J. and Lima C. D. (2002) Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* **108**, 345-56.
- Berry M., Grosveld F. and Dillon N. (1992) A single point mutation is the cause of the Greek form of hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Nature* **358**, 499-502.
- Bhattacharya A., Deng J. M., Zhang Z., Behringer R., de Crombrughe B. and Maity S. N. (2003) The B subunit of the CCAAT box binding transcription factor complex (CBF/NF-Y) is essential for early mouse development and cell proliferation. *Cancer Res* **63**, 8167-72.
- Bi W., Wu L., Coustry F., de Crombrughe B. and Maity S. N. (1997) DNA binding specificity of the CCAAT-binding factor CBF/NF-Y. *J Biol Chem* **272**, 26562-72.
- Birnboim H. C. and Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23.

- Bischoff F. R. and Ponstingl H. (1991) Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10830-4.
- Boggio R., Passafaro A. and Chiocca S. (2007) Targeting SUMO E1 to ubiquitin ligases: a viral strategy to counteract sumoylation. *J Biol Chem* **282**, 15376-82.
- Bohren K. M., Nadkarni V., Song J. H., Gabbay K. H. and Owerbach D. (2004) A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J Biol Chem* **279**, 27233-8.
- Bolognese F., Wasner M., Dohna C. L., Gurtner A., Ronchi A., Muller H., Manni I., Mossner J., Piaggio G., Mantovani R. and Engeland K. (1999) The cyclin B2 promoter depends on NF-Y, a trimer whose CCAAT-binding activity is cell-cycle regulated. *Oncogene* **18**, 1845-53.
- Bossis G. and Melchior F. (2006) Regulation of SUMOylation by reversible oxidation of SUMO conjugating enzymes. *Mol Cell* **21**, 349-57.
- Caretti G., Salsi V., Vecchi C., Imbriano C. and Mantovani R. (2003) Dynamic recruitment of NF-Y and histone acetyltransferases on cell-cycle promoters. *J Biol Chem* **278**, 30435-40.
- Ceribelli M., Dolfini D., Merico D., Gatta R., Viganò A. M., Pavesi G. and Mantovani R. (2008) The histone-like NF-Y is a bifunctional transcription factor. *Mol Cell Biol* **28**, 2047-58.
- Chang C. C., Lin D. Y., Fang H. I., Chen R. H. and Shih H. M. (2005) Daxx mediates the small ubiquitin-like modifier-dependent transcriptional repression of Smad4. *J Biol Chem* **280**, 10164-73.
- Cole C. N. and Hammell C. M. (1998) Nucleocytoplasmic transport: driving and directing transport. *Curr Biol* **8**, R368-72.
- Cook A., Bono F., Jinek M. and Conti E. (2007) Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annu Rev Biochem* **76**, 647-71.
- Cronshaw J. M., Krutchinsky A. N., Zhang W., Chait B. T. and Matunis M. J. (2002) Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* **158**, 915-27.
- Dawlaty M. M., Malureanu L., Jeganathan K. B., Kao E., Sustmann C., Tahk S., Shuai K., Grosschedl R. and van Deursen J. M. (2008) Resolution of sister centromeres requires RanBP2-mediated SUMOylation of topoisomerase IIalpha. *Cell* **133**, 103-15.
- de Cristofaro T., Mascia A., Pappalardo A., D'Andrea B., Nitsch L. and Zannini M. (2008) Pax8 protein stability is controlled by sumoylation. *J Mol Endocrinol*.
- Desterro J. M., Rodriguez M. S. and Hay R. T. (1998) SUMO-1 modification of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell* **2**, 233-9.
- Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K. and Tuschl T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-8.
- Fabbro M. and Henderson B. R. (2003) Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. *Exp Cell Res* **282**, 59-69.

- Farina A., Manni I., Fontemaggi G., Tiainen M., Cenciarelli C., Bellorini M., Mantovani R., Sacchi A. and Piaggio G. (1999) Down-regulation of cyclin B1 gene transcription in terminally differentiated skeletal muscle cells is associated with loss of functional CCAAT-binding NF-Y complex. *Oncogene* **18**, 2818-27.
- Felgner P. L. and Ringold G. M. (1989) Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* **337**, 387-8.
- Fischer U., Huber J., Boelens W. C., Mattaj I. W. and Luhrmann R. (1995) The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**, 475-83.
- Fornerod M., Ohno M., Yoshida M. and Mattaj I. W. (1997) CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**, 1051-60.
- Fried H. and Kutay U. (2003) Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci* **60**, 1659-88.
- Geiss-Friedlander R. and Melchior F. (2007) Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 947-56.
- Gill G. (2005) Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 536-41.
- Girdwood D., Bumpass D., Vaughan O. A., Thain A., Anderson L. A., Snowden A. W., Garcia-Wilson E., Perkins N. D. and Hay R. T. (2003) P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* **11**, 1043-54.
- Girdwood D. W., Tatham M. H. and Hay R. T. (2004) SUMO and transcriptional regulation. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 201-10.
- Gong L., Millas S., Maul G. G. and Yeh E. T. (2000) Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease. *J Biol Chem* **275**, 3355-9.
- Gong L. and Yeh E. T. (2006) Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *J Biol Chem* **281**, 15869-77.
- Gorlich D., Pante N., Kutay U., Aebi U. and Bischoff F. R. (1996) Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *Embo J* **15**, 5584-94.
- Gostissa M., Hengstermann A., Fogal V., Sandy P., Schwarz S. E., Scheffner M. and Del Sal G. (1999) Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J* **18**, 6462-71.
- Guo D., Li M., Zhang Y., Yang P., Eckenrode S., Hopkins D., Zheng W., Purohit S., Podolsky R. H., Muir A., Wang J., Dong Z., Brusko T., Atkinson M., Pozzilli P., Zeidler A., Raffel L. J., Jacob C. O., Park Y., Serrano-Rios M., Larrad M. T., Zhang Z., Garchon H. J., Bach J. F., Rotter J. I., She J. X. and Wang C. Y. (2004) A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet* **36**, 837-41.
- Hammond S. M., Bernstein E., Beach D. and Hannon G. J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *Nature* **404**, 293-6.

- Hang J. and Dasso M. (2002) Association of the human SUMO-1 protease SENP2 with the nuclear pore. *J Biol Chem* **277**, 19961-6.
- Hay R. T. (2005) SUMO: a history of modification. *Mol Cell* **18**, 1-12.
- Hecker C. M., Rabiller M., Haglund K., Bayer P. and Dikic I. (2006) Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem* **281**, 16117-27.
- Hietakangas V., Anckar J., Blomster H. A., Fujimoto M., Palvimo J. J., Nakai A. and Sistonen L. (2006) PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 45-50.
- Ho I. C., Hodge M. R., Rooney J. W. and Glimcher L. H. (1996) The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* **85**, 973-83.
- Hochstrasser M. (2007) Ubiquitin ligation without a ligase. *Dev Cell* **13**, 4-6.
- Hoege C., Pfander B., Moldovan G. L., Pyrowolakis G. and Jentsch S. (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135-41.
- Hu Q. and Maity S. N. (2000) Stable expression of a dominant negative mutant of CCAAT binding factor/NF-Y in mouse fibroblast cells resulting in retardation of cell growth and inhibition of transcription of various cellular genes. *J Biol Chem* **275**, 4435-44.
- Hutten S. and Kehlenbach R. H. (2006) Nup214 is required for CRM1-dependent nuclear protein export in vivo. *Mol Cell Biol* **26**, 6772-85.
- Hutten S. and Kehlenbach R. H. (2007) CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends Cell Biol* **17**, 193-201.
- Ivanov A. V., Peng H., Yurchenko V., Yap K. L., Negorev D. G., Schultz D. C., Psulkowski E., Fredericks W. J., White D. E., Maul G. G., Sadofsky M. J., Zhou M. M. and Rauscher F. J., 3rd. (2007) PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing. *Mol Cell* **28**, 823-37.
- Izaurralde E. and Adam S. (1998) Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *Rna* **4**, 351-64.
- Johnson E. S. (2004) Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* **73**, 355-82.
- Johnson E. S. and Gupta A. A. (2001) An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* **106**, 735-44.
- Kagey M. H., Melhuish T. A. and Wotton D. (2003) The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* **113**, 127-37.
- Kahle J., Baake M., Doenecke D. and Albig W. (2005) Subunits of the heterotrimeric transcription factor NF-Y are imported into the nucleus by distinct pathways involving importin beta and importin 13. *Mol Cell Biol* **25**, 5339-54.
- Kim C. G. and Sheffery M. (1990) Physical characterization of the purified CCAAT transcription factor, alpha-CP1. *J Biol Chem* **265**, 13362-9.



- Kim I. S., Sinha S., de Crombrughe B. and Maity S. N. (1996) Determination of functional domains in the C subunit of the CCAAT-binding factor (CBF) necessary for formation of a CBF-DNA complex: CBF-B interacts simultaneously with both the CBF-A and CBF-C subunits to form a heterotrimeric CBF molecule. *Mol Cell Biol* **16**, 4003-13.
- Kirsh O., Seeler J. S., Pichler A., Gast A., Muller S., Miska E., Mathieu M., Harel-Bellan A., Kouzarides T., Melchior F. and Dejean A. (2002) The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *Embo J* **21**, 2682-91.
- Klein U. R., Haindl M., Nigg E. A. and Muller S. (2008) RanBP2 and SENP3 Function in a Mitotic SUMO2/3 Conjugation-Deconjugation Cycle on Borealin. *Mol Biol Cell*.
- Knipscheer P., Flotho A., Klug H., Olsen J. V., van Dijk W. J., Fish A., Johnson E. S., Mann M., Sixma T. K. and Pichler A. (2008) Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination. *Mol Cell* **31**, 371-82.
- Kudo N., Wolff B., Sekimoto T., Schreiner E. P., Yoneda Y., Yanagida M., Horinouchi S. and Yoshida M. (1998) Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res* **242**, 540-7.
- Kuo H. Y., Chang C. C., Jeng J. C., Hu H. M., Lin D. Y., Maul G. G., Kwok R. P. and Shih H. M. (2005) SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-binding protein via the recruitment of Daxx. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16973-8.
- Kyhse-Andersen J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203-9.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lee G. W., Melchior F., Matunis M. J., Mahajan R., Tian Q. and Anderson P. (1998) Modification of Ran GTPase-activating protein by the small ubiquitin-related modifier SUMO-1 requires Ubc9, an E2-type ubiquitin-conjugating enzyme homologue. *J Biol Chem* **273**, 6503-7.
- Lin D. Y., Huang Y. S., Jeng J. C., Kuo H. Y., Chang C. C., Chao T. T., Ho C. C., Chen Y. C., Lin T. P., Fang H. I., Hung C. C., Suen C. S., Hwang M. J., Chang K. S., Maul G. G. and Shih H. M. (2006) Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Mol Cell* **24**, 341-54.
- Lin X., Liang M., Liang Y. Y., Brunnicardi F. C., Melchior F. and Feng X. H. (2003) Activation of transforming growth factor-beta signaling by SUMO-1 modification of tumor suppressor Smad4/DPC4. *J Biol Chem* **278**, 18714-9.
- Lin X., Sun B., Liang M., Liang Y. Y., Gast A., Hildebrand J., Brunnicardi F. C., Melchior F. and Feng X. H. (2003) Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. *Mol Cell* **11**, 1389-96.
- Lyst M. J. and Stancheva I. (2007) A role for SUMO modification in transcriptional repression and activation. *Biochem Soc Trans* **35**, 1389-92.

- Mahajan R., Delphin C., Guan T., Gerace L. and Melchior F. (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* **88**, 97-107.
- Maity S. N. and de Crombrughe B. (1998) Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF-Y in transcription. *Trends Biochem Sci* **23**, 174-8.
- Manni I., Caretti G., Artuso S., Gurtner A., Emiliozzi V., Sacchi A., Mantovani R. and Piaggio G. (2008) Posttranslational Regulation of NF-YA Modulates NF-Y Transcriptional Activity. *Mol Biol Cell*.
- Mantovani R. (1999) The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* **239**, 15-27.
- Marziali G., Perrotti E., Ilari R., Testa U., Coccia E. M. and Battistini A. (1997) Transcriptional regulation of the ferritin heavy-chain gene: the activity of the CCAAT binding factor NF-Y is modulated in heme-treated Friend leukemia cells and during monocyte-to-macrophage differentiation. *Mol Cell Biol* **17**, 1387-95.
- Matunis M. J., Coutavas E. and 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**, 1457-70.
- Melchior F. (1998) Nuclear protein import in a permeabilized cell assay. *Methods Mol Biol* **88**, 265-73.
- Melchior F. (2000) SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 591-626.
- Melchior F., Paschal B., Evans J. and Gerace L. (1993) Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *J Cell Biol* **123**, 1649-59.
- Meulmeester E., Kunze M., Hsiao H. H., Urlaub H. and Melchior F. (2008) Mechanism and consequences for paralog-specific sumoylation of ubiquitin-specific protease 25. *Mol Cell* **30**, 610-9.
- Mingot J. M., Kostka S., Kraft R., Hartmann E. and Gorlich D. (2001) Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *Embo J* **20**, 3685-94.
- Minty A., Dumont X., Kaghad M. and 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**, 36316-23.
- Miyauchi Y., Yogosawa S., Honda R., Nishida T. and Yasuda H. (2002) Sumoylation of Mdm2 by protein inhibitor of activated STAT (PIAS) and RanBP2 enzymes. *J Biol Chem* **277**, 50131-6.
- Moore M. S. and Blobel G. (1993) The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* **365**, 661-3.
- Nakielnny S., Siomi M. C., Siomi H., Michael W. M., Pollard V. and Dreyfuss G. (1996) Transportin: nuclear transport receptor of a novel nuclear protein import pathway. *Exp Cell Res* **229**, 261-6.

- Navascues J., Bengoechea R., Tapia O., Vaque J. P., Lafarga M. and Berciano M. T. (2007) Characterization of a new SUMO-1 nuclear body (SNB) enriched in pCREB, CBP, c-Jun in neuron-like UR61 cells. *Chromosoma* **116**, 441-51.
- Nishi K., Yoshida M., Fujiwara D., Nishikawa M., Horinouchi S. and Beppu T. (1994) Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression. *J Biol Chem* **269**, 6320-4.
- Peng Y. and Jahroudi N. (2002) The NFY transcription factor functions as a repressor and activator of the von Willebrand factor promoter. *Blood* **99**, 2408-17.
- Pichler A., Gast A., Seeler J. S., Dejean A. and Melchior F. (2002) The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* **108**, 109-20.
- Pichler A., Knipscheer P., Oberhofer E., van Dijk W. J., Korner R., Olsen J. V., Jentsch S., Melchior F. and Sixma T. K. (2005) SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 264-9.
- Pichler A., Knipscheer P., Saitoh H., Sixma T. K. and Melchior F. (2004) The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 984-91.
- Pichler A. and Melchior F. (2002) Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic* **3**, 381-7.
- Potts P. R. and Yu H. (2005) Human MMS21/NSE2 is a SUMO ligase required for DNA repair. *Mol Cell Biol* **25**, 7021-32.
- Raines R. T., McCormick M., Van Oosbree T. R. and Mierendorf R. C. (2000) The S.Tag fusion system for protein purification. *Methods Enzymol* **326**, 362-76.
- Reverter D. and Lima C. D. (2005) Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex. *Nature* **435**, 687-92.
- Rexach M. and Blobel G. (1995) Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* **83**, 683-92.
- Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W. S. and Khvorova A. (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* **22**, 326-30.
- Ribbeck K., Lipowsky G., Kent H. M., Stewart M. and Gorlich D. (1998) NTF2 mediates nuclear import of Ran. *Embo J* **17**, 6587-98.
- Rodriguez M. S., Desterro J. M., Lain S., Midgley C. A., Lane D. P. and Hay R. T. (1999) SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo J* **18**, 6455-61.
- Ronchi A., Berry M., Raguz S., Imam A., Yannoutsos N., Ottolenghi S., Grosveld F. and Dillon N. (1996) Role of the duplicated CCAAT box region in gamma-globin gene regulation and hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Embo J* **15**, 143-9.
- Roy B. and Lee A. S. (1995) Transduction of calcium stress through interaction of the human transcription factor CBF with the proximal CCAAT regulatory element of the grp78/BiP promoter. *Mol Cell Biol* **15**, 2263-74.

- Roy B. a. L., A.S. (1995) Transduction of calcium stress through interaction of the human transcription factor CBF with the proximal CCAAT regulatory element of the *grp78/BiP* promoter. *Mol Cell Biol* **15**, 2263-2274.
- Sachdev S., Bruhn L., Sieber H., Pichler A., Melchior F. and Grosschedl R. (2001) PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* **15**, 3088-103.
- Saitoh H. and Hinchey J. (2000) Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* **275**, 6252-8.
- Saitoh H., Pu R. T. and Dasso M. (1997) SUMO-1: wrestling with a new ubiquitin-related modifier. *Trends Biochem Sci* **22**, 374-6.
- Salinas S., Briancon-Marjollet A., Bossis G., Lopez M. A., Piechaczyk M., Jariel-Encontre I., Debant A. and Hipskind R. A. (2004) SUMOylation regulates nucleo-cytoplasmic shuttling of Elk-1. *J Cell Biol* **165**, 767-73.
- Sambrook J., Fritsch E. and Maniatis T. (1989) Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd edn. *Cold Spring Harbor Laboratory, New York*.
- Sampson D. A., Wang M. and Matunis M. J. (2001) The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J Biol Chem* **276**, 21664-9.
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O. and Mann M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**, 850-8.
- Sinha S., Kim I. S., Sohn K. Y., de Crombrugge B. and Maity S. N. (1996) Three classes of mutations in the A subunit of the CCAAT-binding factor CBF delineate functional domains involved in the three-step assembly of the CBF-DNA complex. *Mol Cell Biol* **16**, 328-37.
- Siomi M. C., Eder P. S., Kataoka N., Wan L., Liu Q. and Dreyfuss G. (1997) Transportin-mediated nuclear import of heterogeneous nuclear RNP proteins. *J Cell Biol* **138**, 1181-92.
- Smith A., Brownawell A. and Macara I. G. (1998) Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2. *Curr Biol* **8**, 1403-6.
- Song J., Durrin L. K., Wilkinson T. A., Krontiris T. G. and Chen Y. (2004) Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14373-8.
- Stade K., Ford C. S., Guthrie C. and Weis K. (1997) Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* **90**, 1041-50.
- Stade K., Vogel F., Schwienhorst I., Meusser B., Volkwein C., Nentwig B., Dohmen R. J. and Sommer T. (2002) A lack of SUMO conjugation affects cNLS-dependent nuclear protein import in yeast. *J Biol Chem* **277**, 49554-61.
- Stankovic-Valentin N., Deltour S., Seeler J., Pinte S., Vergoten G., Guerardel C., Dejean A. and Leprince D. (2007) An acetylation/deacetylation-SUMOylation switch through a phylogenetically conserved psiKXEP motif in the tumor suppressor HIC1 regulates transcriptional repression activity. *Mol Cell Biol* **27**, 2661-75.

- Sternsdorf T., Jensen K., Reich B. and 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**, 12555-66.
- Stielow B., Sapetschnig A., Kruger I., Kunert N., Brehm A., Boutros M. and Suske G. (2008) Identification of SUMO-dependent chromatin-associated transcriptional repression components by a genome-wide RNAi screen. *Mol Cell* **29**, 742-54.
- Subramanian L., Benson M. D. and Iniguez-Lluhi J. A. (2003) A synergy control motif within the attenuator domain of CCAAT/enhancer-binding protein alpha inhibits transcriptional synergy through its PIASy-enhanced modification by SUMO-1 or SUMO-3. *J Biol Chem* **278**, 9134-41.
- Takahashi H., Hatakeyama S., Saitoh H. and Nakayama K. I. (2005) Noncovalent SUMO-1 binding activity of thymine DNA glycosylase (TDG) is required for its SUMO-1 modification and colocalization with the promyelocytic leukemia protein. *J Biol Chem* **280**, 5611-21.
- Tempe D., Piechaczyk M. and Bossis G. (2008) SUMO under stress. *Biochem Soc Trans* **36**, 874-8.
- Terry L. J., Shows E. B. and Wentz S. R. (2007) Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science* **318**, 1412-6.
- Ulrich H. D. (2008) The fast-growing business of SUMO chains. *Mol Cell* **32**, 301-5.
- Valin A. and Gill G. (2007) Regulation of the dual-function transcription factor Sp3 by SUMO. *Biochem Soc Trans* **35**, 1393-6.
- Vertegaal A. C., Andersen J. S., Ogg S. C., Hay R. T., Mann M. and Lamond A. I. (2006) Distinct and overlapping sets of SUMO-1 and SUMO-2 target proteins revealed by quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* **5**, 2298-310.
- Wang C. Y. and She J. X. (2008) SUMO4 and its role in type 1 diabetes pathogenesis. *Diabetes Metab Res Rev* **24**, 93-102.
- Weber K. and Osborn M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244**, 4406-12.
- Wei F., Scholer H. R. and Atchison M. L. (2007) Sumoylation of Oct4 enhances its stability, DNA binding, and transactivation. *J Biol Chem* **282**, 21551-60.
- Weis K. (2003) Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* **112**, 441-51.
- Wen W., Taylor S. S. and Meinkoth J. L. (1995) The expression and intracellular distribution of the heat-stable protein kinase inhibitor is cell cycle regulated. *J Biol Chem* **270**, 2041-6.
- Werner A., Moutty M. C., Moller U. and Melchior F. (2009) Performing In Vitro Sumoylation Reactions Using Recombinant Enzymes. *Methods in Molecular Biology*, 187-199.
- Wood L. D., Irvin B. J., Nucifora G., Luce K. S. and Hiebert S. W. (2003) Small ubiquitin-like modifier conjugation regulates nuclear export of TEL, a putative tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3257-62.

- 
- Yang S. H. and Sharrocks A. D. (2004) SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Mol Cell* **13**, 611-7.
- Yun J., Chae H. D., Choi T. S., Kim E. H., Bang Y. J., Chung J., Choi K. S., Mantovani R. and Shin D. Y. (2003) Cdk2-dependent phosphorylation of the NF-Y transcription factor and its involvement in the p53-p21 signaling pathway. *J Biol Chem* **278**, 36966-72.
- Zhang H., Saitoh H. and Matunis M. J. (2002) Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex. *Mol Cell Biol* **22**, 6498-508.
- Zhao J. (2007) Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell Mol Life Sci* **64**, 3017-33.
- Zhu J., Zhu S., Guzzo C. M., Ellis N. A., Sung K. S., Choi C. Y. and Matunis M. J. (2008) Small ubiquitin-related modifier (SUMO) binding determines substrate recognition and paralog-selective SUMO modification. *J Biol Chem* **283**, 29405-15.

## 9. Anhang

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	Aprotinin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CRM1	engl.: <i>chromosome region maintenance 1</i>
C-terminal	carboxyterminal
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1	SUMO aktivierendes Enzym
E2	SUMO konjugierendes Enzym
ECL	engl.: <i>enhanced chemoluminescence</i>
FACS	engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FG	Phenylalanin-Glycin
FPLC	engl.: <i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung (im Kontext von Zentrifugation)
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IF	Immunfluoreszenz-Mikroskopie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -Thiogalaktopyranosid
LMB	Leptomycin B
LP	Leupeptin/Pepstatin
m	Milli
M	Molar (mol/l)
min	Minute(n)
n	Nano
NES	engl.: <i>nuclear export factor</i>
NF-Y	engl.: <i>nuclear factor Y</i>

---

NLS	engl.: <i>nuclear localisation factor</i>
nm	Nano Meter
NPC	engl.: <i>nuclear pore complex</i>
N-terminal	Aminoterminal
OD	optische Dichte
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIAS	engl.: <i>protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ran	Ras-related nuclear protein
RanBP2	Ran binding protein 2
RanGAP1	Ran GTPase activating protein 1
RCC-1	regulator of chromosome condensation-1
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIM	SUMO-Interaktions-Motiv
SUMO	engl.: <i>small ubiquitin-like modifier</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	p-Isooctylphenylpolyoxyethylen
Tween-20	Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaureat
U	engl.: <i>unit</i> (im Zusammenhang mit Enzymaktivität)
UV	ultraviolettes Licht
v/v	engl.: <i>volume per volume</i>
w/v	engl.: <i>weight per volume</i>
WB	Western-Blot
YFP	engl.: <i>yellow fluorescent protein</i>
z.B.	zum Beispiel
μ	Micro



---

## **9.2 Symbole für Aminosäuren**

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

### **9.3 Liste der NFYA Mutanten**

1	K310
2	K321/323
3	K269
4	K276
5	K283
6	K292
7	K289/K283
8	–
9	–
10	K310 + K269
11	K310 + K283 + K269
12	K296
13	K296 + K283 + K289
14	K310 + K296
15	K269 + K296
21	K269 + K283 + K289 + K310
23	K283 + K289 + K292 + K296
24	K283 + K289 + K292 + K296 + K310
25	K283 + K289 + K292 + K296 + K310 + K269
26	K283 + K289 + K292 + K296 + K310 + K276
27	K283 + K289 + K292 + K296 + K310 + K276 + K269
30	9KR

## 10. Danksagung

Ich möchte mich bei all den Menschen bedanken, die mir bei der Durchführung dieser Doktorarbeit tatkräftig geholfen haben.

Frau Prof. Dr. Frauke Melchior danke ich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für die Überlassung des interessanten Themas und die allzeitige Diskussionsbereitschaft, sowie ihren Enthusiasmus und Ideenreichtum und die Betreuung während der Höhen und Tiefen dieser Doktorarbeit.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Doenecke für die Übernahme des Korreferates und seinem Interesse an der Themenstellung.

Ein großer Dank geht an Dr. Jörg Kahle für die tolle Beratung in allen wissenschaftlichen und technischen Fragen und für seine unerschütterliche positive Einstellung.

Große Hilfe wurde mir auch von Dr. Guido Sauer zuteil, der mit Hilfe massenspektrometrischer Analysen zwei der SUMOylierten Lysine im NFYA identifizieren konnte.

Den Arbeitsgruppen Melchior und Kehlenbach möchte ich ein großes persönliches Lob aussprechen. Nur selten findet man eine so kollegiale, nette und besonders witzige Arbeitsgruppe. Danke für die tolle Arbeitsatmosphäre, insbesondere Saskia, MCM, Inga, Erik, Achim und Sarah. Danke auch an Ralph Kehlenbach, der mir immer eine große Hilfe in „Transport“-Fragen war und Katja Curth für ihre Unterstützung beim Klonieren und Mutieren. Vielen Dank, Frank, für viel organisatorische Hilfe und Deine leckeren Kuchen und Brote.

Großer Dank hiermit auch an Saskia, Yvonne, Silke, Andreas und Annette für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die Hilfe bei vielfältigen, computertechnischen Problemen.

Besonderer Dank geht an dieser Stelle an jene Menschen außerhalb des Labors, deren Freundschaft mir sehr wichtig ist. Nicht mit Worten zu danken ist meiner Familie, die mich über zehn Jahre Ausbildung hinweg mit viel mehr als nur finanzieller Hilfe unterstützt hat. Am besten werde ich Euch mal ganz fest und lange umarmen. Darauf muss sich auch meine beste Freundin Stefanie gefasst machen, der ich damit zeigen möchte, dass die hier mit ihr in Göttingen verbrachten Jahre die schönsten meines bisherigen Lebens waren.

# Curriculum Vitae

## Persönliche Angaben

Tina Lampe, geboren am 28. Januar 1980 in Alfeld (Leine), ledig

## Ausbildung

- |                        |   |
|------------------------|---|
| Seit 2005              | Doktorarbeit am Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Abteilung Biochemie I bei Prof. Dr. F. Melchior, Universität Göttingen                              |
| 2004-2005              | Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, Abt. Biochemie & Zellbiologie unter der Leitung von Prof. K. Weber (Diplomnote: sehr gut) |
| November 2003          | Mündliche Diplomprüfung in den Fächern Biochemie, Immunologie und Organischer Chemie  |
| Okt. 1999 - Okt. 2003  | Studium der Biologie an der Georg-August-Universität in Göttingen   |
| Sept. 1992 – Juni 1999 | Gymnasium Alfeld (Abiturnote: 2,5)  |
| Sept. 1990 – Juni 1992 | Orientierungsstufe Duingen  |
| Sept. 1986 – Juni 1990 | Grundschule Delligsen   |

## Sprachkenntnisse

Englisch fließend in Wort und Schrift  
Französisch: Schulkenntnisse (5 Jahre)

## Ausseruniversitäre Praktika

- |                       |  |
|-----------------------|--|
| Juli 2000 - Sept.2000 | Chemiepraktikum in der Forschungsabteilung der Goldschmidt AG, Essen |
|-----------------------|--|

## Veröffentlichungen

Gruber J.\*, **Lampe T.\***, Osborn M. and Weber K. 2005  
*RNAi of FACE1 protease results in growth inhibition of human cells expressing lamin A: implications for Hutchinson-Gilford progeria syndrome.*  
J Cell Sci. 118: 689-696.

\*Geteilte Erstautorschaft

## Posterbeiträge

G. Sauer, **T. Lampe**, A. Flotho and F. Melchior

*Functional analysis of the RanGAP1\*SUMO-1 / RanBP2 complex*

Biochemie I, Bereich Humanmedizin, Universität Göttingen

Rubicon meeting 2006, Florence, Italy

**T. Lampe**, J. Kahle\*, D. Doenecke\* and F. Melchior

*SUMOylation in nucleocytoplasmic transport*

Biochemie I, Bereich Humanmedizin, Universität Göttingen

\*Molecular Biology, Universität Göttingen

Horizons 2007, Göttingen

## Ausgewählte Vorträge

SFB 523, Annual Meeting

*Functional analysis of the RanGAP1\*SUMO-1 / RanBP2 complex*

Teistungen, Oktober 2006

SFB 523, Annual Meeting

*SUMOylation in Nucleocytoplasmic Transport*

Schloss Ringberg, Oktober 2007