

**Konjugation und Dekonjugation
des Ubiquitin-ähnlichen Proteins SUMO
in *Saccharomyces cerevisiae*.**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Ingrid Schwienhorst

aus Lüdinghausen

Köln, 2001

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. R. Jürgen Dohmen

2. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. Nils Johnsson

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2001

What we know is a drop.
What we don't know an ocean.
(Edward Newton)

Abstract

Posttranslational modifications are important means to alter a proteins activity, function, stability or its intracellular localization. The best characterized modification that involves covalent attachment of one protein to another is the ubiquitin system. In the past few years a number of small proteins have been discovered that function similarly to ubiquitin, and are therefore termed ubiquitin-related modifiers. This work analyzed the function of one specific modifier called SUMO ("Small Ubiquitin-related Modifier").

Similar to the ubiquitin system, the initial step in the SUMO system is its activation. SUMO-activating enzyme is composed of the Aos1p and Uba2 protein, the latter bearing the active site. Like ubiquitin (Ub), activated SUMO is covalently attached to internal lysine side chains of other proteins via its C-terminal glycine. Sequence comparisons of SUMO and its activating enzymes revealed that the SUMO-modification system, like the ubiquitin system, is conserved in all eukaryotes.

To learn more about the functions of SUMO, several conditional *uba2* mutants were analyzed. Characterization of these mutants revealed an influence of this system on cell-cycle progression, various kinds of stress responses, nuclear import, as well as spindle and cell integrity, indicating the involvement of multiple substrates. I found that one out of several spontaneous suppressors of an *uba2* mutant affected a gene encoding a novel protein termed Ulp2p. Ulp2p is one of two SUMO-deconjugating enzymes in yeast, which are functionally and spatially distinct. The analysis of *ulp2* mutants showed that Ulp2p-dependent removal of SUMO, like its conjugation, is important for stress responses and spindle integrity. Additionally deconjugation plays a role in mitotic chromosome and nuclear division, as well as DNA repair mechanisms.

Ulp1p co-localized with nuclear pore complexes. Ulp2p yielded a grainy nuclear staining, similar to Uba2p and Ubc9p involved in SUMO-conjugation. Thus, parts of the SUMO-conjugation and deconjugation machineries were found in the same cellular compartments. Ulp2p-dependent removal of SUMO from its substrates is cell-cycle regulated by phosphorylation and consequent inhibition of Ulp2p.

In addition to the results described above I have established and started procedures to identify additional unknown enzymes and substrates of this system, e.g. two-hybrid interaction cloning using SUMO as a bait; isolation and analysis of overexpression and spontaneous suppressors of various mutants; purification of SUMO-modified proteins.

Inhaltsverzeichnis

Abstract (in englischer Sprache)

1	Einleitung-----	1
1.1	Das Ubiquitin-System -----	1
1.2	Ubiquitin-ähnliche Proteine-----	3
1.3	Das SUMO-System -----	6
1.3.1	Die Konjugation von SUMO -----	7
1.3.2	SUMO-Substrate -----	9
1.4	Ziel dieser Arbeit-----	15
2	Material & Methoden -----	16
2.1	Materialien -----	16
2.1.1	Stämme -----	16
2.1.2	Vektoren und Plasmide-----	18
2.1.3	Oligonukleotide-----	19
2.1.4	Enzyme -----	20
2.1.5	Chemikalienverzeichnis -----	21
2.1.6	Antikörper -----	22
2.1.7	Medien -----	23
2.1.7.1	Medien zur Anzucht von <i>S. cerevisiae</i> -Stämmen -----	23
2.1.7.2	Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i> -Stämmen -----	24
2.2	Methoden-----	24
2.2.1	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen-----	24
2.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen-----	24
2.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -----	24
2.2.4	DNA-Präparation aus <i>S. cerevisiae</i> -----	25
2.2.5	DNA-Restriktion -----	25
2.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten -----	25
2.2.7	Amplifikation von DNA-Fragmenten -----	25
2.2.8	Elektrophoretische Auftrennung von DNA. -----	26
2.2.9	Aufreinigung von DNA-Fragmenten. -----	26
2.2.10	Zellbiologische Methoden-----	26
2.2.10.1	Untersuchung zur Lyse der Zellen. -----	26
2.2.10.2	Induzierung von Zellzyklus-Arresten-----	27
2.2.11	Methoden der Hefegenetik -----	27
2.2.12	Biochemische Methoden -----	28
2.2.12.1	Herstellung von zellfreien Proteinextrakten aus Hefe -----	28
2.2.12.1.1	Proteinextraktion mittels alkalischer Lyse.-----	28

2.2.12.1.2	Proteinextraktion aus Sphäroplasten -----	28
2.2.12.1.3	Proteinextraktion durch Glassperlen-Aufschluss-----	29
2.2.12.2	Detektion von Proteinen -----	29
2.2.13	Zytologische Detektion von Proteinen durch indirekte Fluoreszenz-Markierungen -----	29
2.2.14	Bestimmung des DNA-Gehaltes von Zellen mittels FACS-Analyse-----	31
3	Ergebnisse -----	33
3.1	Proteine des SUMO-Konjugationssystems sind in Eukaryoten konserviert-----	33
3.2	Phänotypische Charakterisierung von <i>uba2</i> -Mutanten -----	36
3.2.1	Gestörte Zellintegrität in SUMO-Konjugationsdefizienten Stämmen -----	36
3.2.2	Hinweise auf gestörte Mikrotubuli-Strukturen in <i>uba2</i> -Mutanten-----	39
3.2.3	Defekte bei der SUMO-Konjugation verursachen einen Zellzyklus-Arrest-----	40
3.2.4	Biochemische Analysen der <i>uba2</i> -Mutanten -----	42
3.3	Charakterisierung von intergenischen Suppressoren der <i>uba2</i> -ts9-Mutante -----	44
3.3.1	Klonierung des <i>ULP2</i> -Gens-----	45
3.4	Phänotypische Charakterisierung der <i>ulp2</i> -Deletionsmutante-----	47
3.4.1	Ulp2p ist nicht essentiell für meiotische Teilungen -----	50
3.4.2	Funktionen des Ulp2-Proteins im Verlauf des Zellzyklus -----	50
3.4.2.1	Genetische Interaktion von <i>ULP2</i> mit Genen für Komponenten des Centromer-Komplexes-----	50
3.4.2.2	Defekte bei der Chromosomen- und Kernteilung -----	53
3.4.3	Ulp2p spielt eine Rolle bei der DNA-Reparatur -----	57
3.5	Ulp2p ist ein SUMO-dekonjugierendes Enzym-----	59
3.5.1	Biochemische Analysen der <i>ulp2</i> -Mutanten -----	59
3.5.2	Sequenzvergleiche SUMO-spezifischer Proteasen -----	61
3.6	SUMO-dekonjugierende Enzyme der Bäckerhefe -----	62
3.6.1	Ulp1p und Ulp2p haben unterschiedliche Funktionen -----	63
3.6.1.1	Biochemischer Vergleich der Ulp-Proteine-----	63
3.6.1.2	Gleichgewicht zwischen Konjugation und Dekonjugation -----	65
3.6.2	Ulp1p und Ulp2p sind in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle lokalisiert -----	68
3.7	Die Aktivität von Ulp2p wird Zellzyklus-abhängig kontrolliert -----	71
3.7.1	Einfluss von Ulp2p auf die Sumoylierung der Septine-----	72
3.8	SUMO-Substratproteine sind hauptsächlich nukleär -----	76
4	Diskussion -----	79
4.1	Auswirkungen von Defekten des SUMO-aktivierenden Enzyms-----	79
4.1.1	Sumoylierung hat keinen direkten Einfluss auf die Proteinstabilität -----	80
4.1.2	Bedeutung der SUMO-Konjugation für die Zellintegrität und den Zellzyklus -----	81
4.2	Ulp2p ist ein SUMO-dekonjugierendes Enzym-----	83
4.3	Vergleich SUMO-dekonjugierender Enzyme der Hefe -----	86

4.3.1	Ulp1p ist das für die Reifung des SUMO-Voläufers verantwortliche prozessierende Enzym-----	86
4.3.1	Ulp1p und Ulp2p sind räumlich voneinander getrennt-----	87
4.3.1	Ulp2p wird Zellzyklus-abhängig reguliert -----	88
4.4	Funktionen der SUMO-Konjugation und Dekonjugation-----	90
4.4.1	Normale SUMO-Konjugation und Dekonjugation sind Voraussetzung für Stresstoleranz -----	90
4.4.2	Das SUMO-System und mitotische Zellteilungen -----	91
4.4.3	Ulp2p wird für die DNA-Reparatur benötigt -----	93
4.4.4	Balance der Konjugation und Dekonjugation von SUMO-----	94
4.5	Ausblick -----	95
5	Zusammenfassung -----	98
6	Literaturverzeichnis -----	99
7	Abkürzungsverzeichnis -----	110
8	Anhang (Schwienhorst et al. 2000)-----	111
	Danksagung	
	Eidesstattliche Erklärung	

1 Einleitung

Ubiquitin ist ein kleines, erst vor gut zwanzig Jahren entdecktes Protein, das sich für eine Vielzahl zellulärer Prozesse als bedeutsam erwiesen hat. Es kann einzeln oder als Kette aus mehreren Ubiquitin-Molekülen an andere Proteine kovalent gebunden (konjugiert) werden und wirkt dann meist als Abbausignal. Wachstum, Teilung und Entwicklung eukaryotischer Zellen setzen ebenso ein funktionsfähiges Ubiquitin-System voraus, wie ihre Fähigkeit adäquat auf Stress zu reagieren (zur Übersicht siehe Varshavsky 1997, Hershko und Ciechanover 1998).

Die Konjugation des Ubiquitins an sein Substrate erfolgt durch Ausbildung einer Amid-(Isopeptid-)Bindung zwischen seiner carboxy-terminalen Hydroxylgruppe und der ϵ -Amino-Seitenkette eines internen Lysinrestes des Akzeptorproteins.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Konjugation und Dekonjugation von SUMO („small ubiquitin-related modifier“), einem Protein mit Ähnlichkeiten zu Ubiquitin. Diese Studien werden mit der Bäckerhefe *S. cerevisiae* als eukaryotisches Modellsystem durchgeführt. Ebenso wie Ubiquitin muss SUMO an andere Proteine über sein C-terminales Glycin konjugiert werden, um seine essentiellen Funktionen erfüllen zu können (Johnson, *et al.* 1997). Die enzymatischen Aktivitäten, die für das Anheften (Konjugation) und Entfernen (Dekonjugation) von SUMO notwendig sind, und deren zelluläre Funktionen sind Gegenstand dieser Arbeit.

Auf Grund der Verwandtschaft dieser beiden Systeme, soll an dieser Stelle vorab ein Überblick über das besser erforschte Ubiquitin-System gegeben werden.

1.1 Das Ubiquitin-System

Ubiquitin wird nicht als Produkt eines einzigen Genes synthetisiert, sondern kann aus unterschiedlichen Vorläuferformen freigesetzt werden. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wird es unter anderem als Fusion mit ribosomalen Untereinheiten translatiert und erst dann von spezifischen Proteasen (Ubps, siehe unten) freigesetzt (siehe Abb. 1). Die Generierung des reifen Ubiquitins durch carboxyterminale Prozessierung der Ubiquitin-Vorläufer verläuft sehr präzise und effizient. Dies ist notwendig, da die Di-Glycinsequenz am C-Terminus reifer Ubiquitin-Moleküle essentiell für die Konjugation sind.

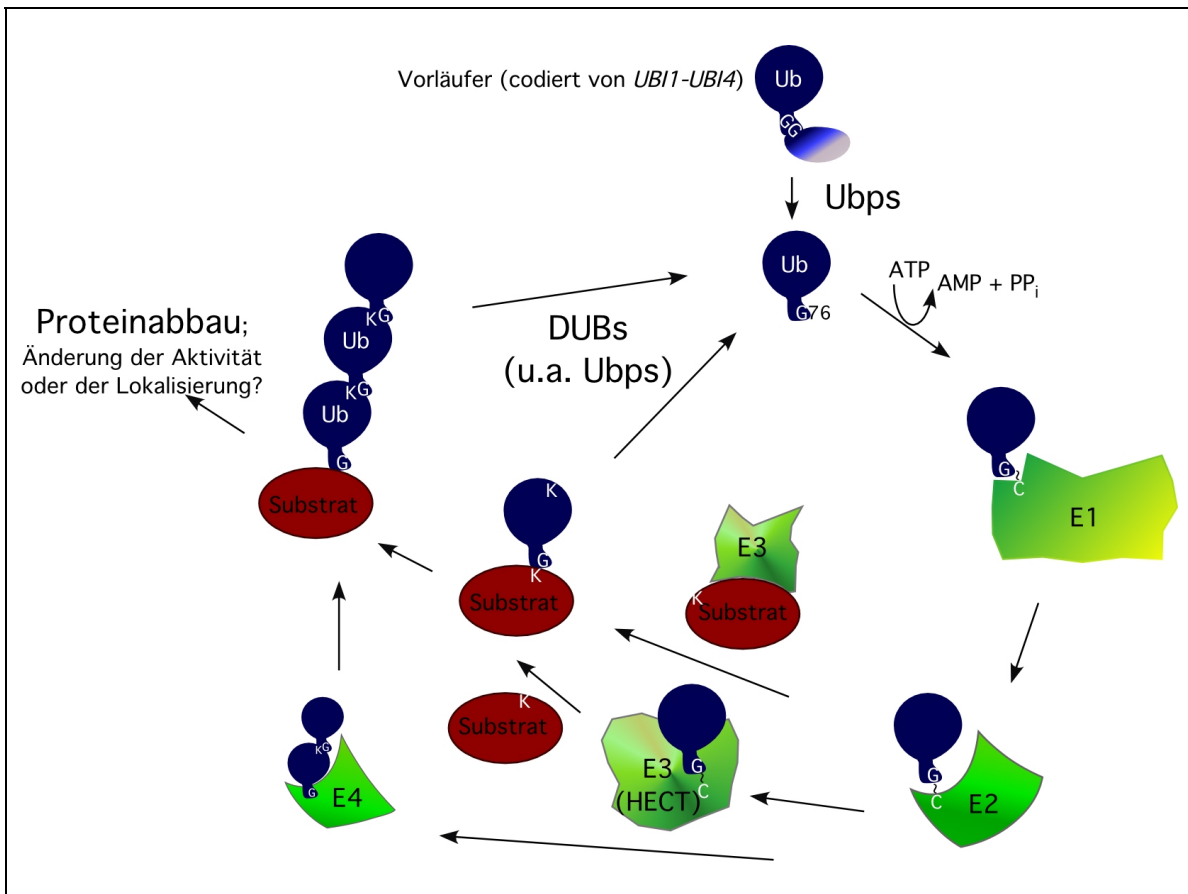


Abb. 1: Schematische Übersicht des Ubiquitin-Systems. Ubiquitin (Ub) wird mit Hilfe Ubiquitin-prozessierender Proteasen (Ubps) aus Vorläufern freigesetzt. Das aktivierende Enzym (E1) überträgt Ub auf eines der 12 verschiedenen konjugierenden Enzyme (E2). Diese katalysieren, z. T. mit Beteiligung von Ub-Protein-Ligasen (E3) die Bindung an die Substrate. An dem primär gebundenen Ub können sich, bisweilen mit Hilfe von E4-Proteinen, durch Konjugation weiterer Ub-Einheiten Ketten bilden. Isopeptidasen (DUBs) können Ub wieder von den Substraten freisetzen. Die Ub-markierten Substrate werden meist vom 26S-Proteasom abgebaut. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Initiierender Schritt zur Konjugation des Ubiquitins an seine Zielproteine ist die Ausbildung eines energiereichen Thioesters an seinem C-Terminus. Diese Aktivierung erfolgt durch ein so genanntes E1-Enzym, oder Ubiquitin-aktivierende Enzym (Uba1p der Hefe, Haas und Rose 1982, McGrath, *et al.* 1991). Das aktivierte Ubiquitin wird in einer Transesterifizierungskaskade auf eines von mehreren E2-Enzymen (Ubiquitin-konjugierende Enzyme) übertragen. In der Hefe werden E2-Proteine von den Genen *UBC1-8, 10, 11* und *UBC13* kodiert. Diese können entweder alleine oder mit Hilfe von E3-Enzymen (Ubiquitin-Protein-Ligasen, „Recognine“) Ubiquitin auf seine Zielproteine übertragen. Im Gegensatz zu den Ubiquitin-konjugierenden Enzymen handelt es sich bei den E3-Enzymen um eine sehr heterogene Klasse. Die Einordnung in diese Enzymklasse erfolgt nicht auf Grund von Sequenzhomologien, sondern durch funktionelle Analogien. Die E3-Enzyme sind dadurch gekennzeichnet, dass sie direkt oder indirekt spezifische Proteinsubstrate binden und diese in räumliche Nähe zu dem an E2-Enzyme gebundenen aktivierten Ubiquitin bringen (zur Übersicht siehe Hershko und Ciechanover 1998, Weissman 2001). Man unterscheidet zwei Klassen von E3-Enzymen. Proteine der ersten

Klasse, so genannte HECT-Proteine („homolog to E6-AP C-Terminus“) übernehmen Ubiquitin von bestimmten E2-Enzymen unter Ausbildung einer Thioesterbindung und übertragen es dann direkt auf die Substrate. Die andere Gruppe vermittelt die Interaktion zwischen Substrat und dem Ubiquitin-E2-Komplex. Die Enzyme dieser Gruppe weisen sehr unterschiedliche Domänen mit zum Teil hochkomplexer Struktur auf. Eine Gemeinsamkeit dieser E3-Enzymen ist eine so genannte RING-Finger-Domäne oder -Untereinheit (Freemont 2000). Sie weist eine Sequenzähnlichkeit zu den „Zink-Fingern“ DNA-bindender Proteine auf und ist für Protein-Protein-Interaktionen wichtig.

Um eine effiziente Erkennung und den nachfolgenden Abbau durch das 26S-Proteasom, einer ATP-abhängigen multikatalytischen Protease, zu gewährleisten, werden meist an den Substraten Ubiquitin-Ketten aufgebaut. Bei manchen Substraten wird dafür ein weiteres Enzym, das so genannte E4 benötigt werden (Ufd2p der Hefe, Koegl, *et al.* 1999).

Lange Ubiquitin-Ketten, die sich an intrazellulären Proteinen bilden, könnten den „Pool“ des freien Ubiquitins zu weit reduzieren, würden sie nicht durch Isopeptidasen, so genannte Deubiquitylierende Enzyme (DUBs, u.a. Ubps), auch wieder abgespalten (Hochstrasser 1996). Diese spalten Ubiquitin spezifisch hinter der C-terminalen Di-Glycinsequenz ab. Sie können monomere Ubiquitin-Proteine aus den Vorläuferformen generieren und Ubiquitin von Akzeptorproteinen abspalten, wodurch die Konzentration an freiem Ubiquitin in der Zelle auf einem bestimmten Niveau gehalten wird.

Die Ubiquitylierung von Proteinen dient vor allem als Signal für deren Abbau, entweder durch das Proteasom oder im Lysosom (Vakuole der Hefe). Über das Ubiquitin-System hat die Zelle die Möglichkeit, schnell und spezifisch Proteine zum Abbau zu markieren und somit aus dem Verkehr zu ziehen. Auf diese Weise werden sowohl abnorme, wie zum Beispiel falsch gefaltete Proteine, aber auch viele kurzlebige Regulatorproteine beseitigt. Verschiedene Deubiquitylierungsenzyme sorgen dafür, dass Ubiquitin nicht mit abgebaut wird, sondern „recycled“ wird und so der Zelle wieder zur Verfügung steht.

1.2 Ubiquitin-ähnliche Proteine

In den letzten Jahren fand man verschiedene Proteine, die Sequenzähnlichkeiten zu Ubiquitin aufweisen. Man unterscheidet hier so genannte Ubiquitin-Domänen tragende Proteine von „Ubiquitin-ähnlichen“.

Die ersten enthalten eine Domäne mit signifikanter Sequenzähnlichkeit zu Ubiquitin. Ihnen fehlt jedoch das C-terminale Di-Glycin-Motiv. Dadurch können diese Ubiquitin-Domänen nicht abgespalten werden, da die Erkennung durch Ubps (Ubiquitin-prozessierende Proteasen, siehe oben) nicht möglich ist. Die Ubiquitin-Domänen spielen daher keine Rolle bei der posttranslationalen Konjugation an andere Proteine, sie dienen viel mehr der korrekten Faltung und der Interaktion mit anderen Proteinen (Schauer, *et al.* 1998, Funakoshi, *et al.* 1999, Hiyama, *et al.* 1999, Kaye, *et al.* 2000).

Wesentlich Aufsehens erregender war die Entdeckung so genannter „Ubiquitin-ähnlicher“ Proteine („Ubiquitin-related modifier“). Beim Vergleich ihrer Primärstrukturen fällt auf, dass sie nur geringe Homologie untereinander aufweisen. Allerdings sind sie wie Ubiquitin durch einen C-Terminus mit meist zwei aufeinander folgenden Glycinen gekennzeichnet (siehe Abb. 2). Im Falle von Ubiquitin ist diese Sequenzabfolge notwendig für die Thioester-Bildung und die Ausbildung der Amid-Bindung zum Substrat. In der Tat konnte auch für diese Ubiquitin-ähnlichen Proteine gezeigt werden, dass sie analog zu Ubiquitin posttranslational an andere Proteine konjugiert werden (Hochstrasser 2000a). Zudem zeigen die bisher untersuchten Proteine dieser Klasse eine charakteristische Faltung der Polypeptidkette, die sehr ähnlich der des Ubiquitins ist (Bayer, *et al.* 1998, siehe unten). In der Hefe *S. cerevisiae* sind bisher neben Ubiquitin vier weitere Proteine bekannt, die an andere Proteine kovalent gebunden werden (Hochstrasser 2000b, Jentsch und Pyrowolakis 2000).

Ubiquitin	1	-----
Rub1p	1	-----
SUM O	1	-----
Urm1p	1	-----
Apg12p	1	M SRILESENETESDESSII STNNGTAMERSRNN QELRSSPHTVQN RLELFSRRLSQ
Ubiquitin	1	-----M Q I F V
Rub1p	1	-----M I V K V
SUM O	1	-----M S D S E V N Q E A K P E V - K P E V K P E T H - - I N L -
Urm1p	1	-----M V N V K V E F L G G L D A I F G K Q R V H K I K M D K E D
Apg12p	57	L G L A S D I S V D Q Q V E D S S S G T Y E Q E E T I K T N A Q T S K Q K S H K D E K N I Q - - K I Q I K F Q P
Ubiquitin	6	K T L T G - K T I T L E V E S S D T I D N V K S K I Q D K E G I P P D Q Q R L I E A - - - - G K Q L E D G R T L
Rub1p	6	K T L T G - K E I S V E L K E S D L V Y H I K E L L E E K E G I P P S Q Q R L I E Q - - - - G K Q I D D K L T V
SUM O	27	K V S D G S S E I F F K I K K T T P L R R L M E A F A K R Q G K E M D S L R F L Y D - - - - G I R I Q A D - Q T
Urm1p	31	P V T V G - D L I D H I V S T M I N N P N D V S I F I E D D S I R P G I I T L I N D - - - - T D W E L E G - - E
Apg12p	111	I G S I G Q L K P S V C K I S M S Q S F A M V I L F L K R R L K M D H V Y C Y I N N S F A P S P Q N I G E L W
Ubiquitin	57	S D Y N I Q K E S T L H L V L R L R G G 76
Rub1p	57	T D A H L V E G M Q L H L V L T L R G G 76
SUM O	78	P E L D M E D N D I I E A H R E Q I G G 98
Urm1p	80	K D Y I L E D G D I I S F T S T L H G G 99
Apg12p	167	M Q F K T N D E L I V S Y C A S V A F G 186

Abb. 2: Vergleich der Aminosäuresequenz von „Ubiquitin-ähnlichen“ Proteinen der Hefe *S. cerevisiae*. Der Sequenzvergleich wurde unter Benutzung des Programms ClustalW1.8 durchgeführt (Thompson, *et al.* 1994). Identische Aminosäurereste sind orange unterlegt, C-terminale Glycinreste rot. Weitere Erläuterungen im Text.

Apg12p und Urm1p sind Proteine, die keine nennenswerten Sequenzähnlichkeiten zu Ubiquitin aufweisen (siehe Abb. 2). Ebenso wie alle anderen Proteine dieser Familie, die analog zu Ubiquitin an Aktzeptorproteine konjugiert werden, muss der C-Terminus von Apg12p und Urm1p aktiviert werden.

Urm1p spielt eine Rolle beim Schutz der Zelle gegen Hitze (Furukawa, *et al.* 2000), seine genaue Funktion ist allerdings noch nicht geklärt. Identifiziert wurde es bei einer Untersuchung des Hefe-Genoms auf Proteine die ortholog zu bakteriellen Protein-basierenden Sulfid-Donor-Systemen sind (Furukawa, *et al.* 2000). Der

Aktivierungsprozess von Ubiquitin und verwandten Proteinen in Eukaryoten verläuft enzymatisch vergleichbar der Biosynthese von Schwefelhaltigen Enzym-Kofaktoren in Prokaryoten (Furukawa, *et al.* 2000, Hochstrasser 2000b). Da es keinerlei Hinweise auf Ubiquitin oder ähnliche Proteine in bisher bekannten Genomen von Prokaryoten gibt, könnte mit der Identifizierung des Urm1-Proteins ein Hinweis auf die evolutionäre Entwicklung von Protein-Protein-Modifikationen in Eukaryoten gefunden worden sein.

Apg12p ist ein Bestandteil des Autophagie-Weges der Hefe, orthologe Proteine existieren auch in höheren Eukaryoten (Mizushima, *et al.* 1998). Im Gegensatz zu anderen modifizierenden Proteinen wird durch die Konjugation von Apg12p an sein Substrat Apg5p nicht die Eigenschaft des Substrates verändert, sondern die von Apg12p selber. Nur wenn Apg12p an sein Substrat gebunden ist, interagiert es mit Apg16p. Dieser trimere Komplex ist an der Membranreorganisation beteiligt (Mizushima, *et al.* 1998, Shintani, *et al.* 1999).

Die Polypeptidsequenz von Rub1p (Ortholog des NEDD8-Proteins der Metazoen) ist zu 50% identisch mit der von Ubiquitin. Damit ist Rub1p in seiner Primär-, wahrscheinlich auch in seiner Tertiärstruktur, das zu Ubiquitin am nächsten verwandte Protein (siehe Abb. 2). Für eine konformative Verwandtschaft der beiden Proteine spricht unter anderem, dass Rub1p-Fusionen von Proteasen gespalten werden können, die auch Ubiquitin erkennen und prozessieren, beziehungsweise dekonjugieren (Wada, *et al.* 1998, Gong, *et al.* 2000).

Die einzigen bisher bekannten Proteine, die von Rub1p/NEDD8 modifiziert werden, sind Proteine der „Cullin-Familie“ (Lammer 1998, Liakopoulos, *et al.* 1998, Osaka 1998, Hori, *et al.* 1999, Liakopoulos, *et al.* 1999, Gray und Estelle 2000, Morimoto, *et al.* 2000, Osaka, *et al.* 2000, Podust, *et al.* 2000, Read, *et al.* 2000, Wada, *et al.* 2000, Wu, *et al.* 2000). Culline sind strukturgebende Bestandteile von SCF-Komplexen, einer Klasse von Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3s, siehe oben). Die Konjugation von Rub1p spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Stabilisierung und/oder Aktivierung der SCF-Komplexe. Die Enzymkaskade, die zur Anheftung von Rub1p/Nedd8 an Culline führt, ist zum großen Teil aufgeklärt. Das aktivierende Enzym setzt sich, ebenso wie das von SUMO (siehe unten), aus zwei Proteinen zusammen, Ula1p/Enr2p und Uba3p (Lammer 1998, Liakopoulos, *et al.* 1998). Das aktivierte Rub1-Protein wird von dem konjugierenden Enzym Ubc12p auf die Substrate übertragen. Eine Funktion ähnlich den E3-Enzymen hat Roc1p/Rbx1p (Bestandteil der SCF-Komplexe), da es für die Übertragung von Rub1p auf Cdc53p/Cullin notwendig ist (Kamura, *et al.* 1999).

In höheren Eukaryoten gibt es außer den bisher genannten Proteinen weitere mit Sequenzähnlichkeiten zu Ubiquitin. Dies sind zum Beispiel die Interferon-induzierbaren Proteine UCRP/ISG15 (Loeb und Haas 1994) und Fat10 (Liu, Y. C., *et al.* 1999b). Von ihnen nimmt man an, dass sie unter anderem sezerniert werden und als Cytokine wirken können (Hochstrasser 2000b). Genauere Informationen zu ihrer Funktion liegen noch nicht vor.

Da sich diese Arbeit mit der Funktion des SUMO-Systems beschäftigt, sollen an dieser Stelle die bisher bekannten Daten zu dieser Art der posttranslationalen Proteinmodifikation ausführlicher behandelt werden. Die Untersuchungen in der Hefe *S. cerevisiae* führten zur weitgehenden Aufklärung der enzymatischen Wege, die zur Konjugation von SUMO notwendig sind.

1.3 Das SUMO-System

Das für SUMO codierende Gen *SMT3* der Bäckerhefe wurde ursprünglich als Überexpressions-Suppressor einer temperatursensitiven Mutation des *MIF2*-Gens isoliert (Meluh und Koshland 1995). Das Mif2-Protein ist am Centromer der Hefe lokalisiert und zeigt Sequenzähnlichkeiten zu CENP-C, einer Komponente des Kinetochors in Säugerzellen. *Mif2*-Mutanten zeigen Defekte bei der Chromosomen-Segregation in der Mitose und eine veränderte Morphologie der Mikrotubuli. Diese Defekte können durch Überexpression von *CEP1* (einem weiteren Centromerprotein) sowie von *SMT3* supprimiert werden (Meluh und Koshland 1995).

Aus Maus und Mensch konnten drei verschiedene Gene mit Sequenzähnlichkeiten zu Ubiquitin und vor allem zum *SMT3*-Gen der Hefe kloniert werden (SUMO-1, SUMO-2/SMT3H1, SUMO-3/SMT3H2; Mannen, *et al.* 1996, Lapenta, *et al.* 1997, Chen, *et al.* 1998). SUMO-1 wird konstitutiv exprimiert. Die Transkription von SUMO-2 und SUMO-3 wird durch Stress-Faktoren, z. B. Hitzestress und DNA-Schäden, induziert (Saitoh und Hinchey 2000).

Das SUMO-1 der Säugerzelle wurde von mehreren Gruppen in unabhängigen Studien identifiziert und erhielt daher eine Reihe verschiedener Namen (GMP1, PIC1, Ubl1, Sentrin-1, hSmt3p; zur Übersicht siehe Hochstrasser 2000b, Melchior 2000). Das orthologe Protein von *Drosophila melanogaster* wird als dSmt3 bezeichnet, das der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* als Pmt3 (Huang, *et al.* 1998, bzw. Tanaka, *et al.* 1999). In dieser Arbeit wird die sich in der Literatur durchsetzende Bezeichnung SUMO („small Ubiquitin-related modifier“) für dieses Protein verwendet.

Ubiquitin und SUMO zeigen nur geringe Sequenzhomologie, ca. 18% der Aminosäurereste sind identisch in beiden Proteinen (Abb. 2). Die Aufklärung der Struktur des humanen SUMO-1 zeigte jedoch, dass beide Proteine eine sehr ähnliche Tertiärstruktur aufweisen (Vijay-Kumar, *et al.* 1987, Bayer, *et al.* 1998). SUMO-1 besitzt eine charakteristische $\beta\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Faltung und dreidimensionale Struktur von Ubiquitin-Molekülen. So befindet sich der C-Terminus, über den diese Proteine an andere konjugiert werden, an exponierter Stelle. Er ragt aus einer kompakten Struktur heraus. Der aminoterminal Bereich von SUMO unterscheidet sich dabei deutlich von Ubiquitin und Rub1p (Bayer, *et al.* 1998). Dieser flexible N-Terminus enthält viele geladene Aminosäurereste und ist damit prädestiniert für potentielle Protein-Protein-Interaktionen (siehe Abb. 2). Wenn auch die Gesamtstruktur der beiden Proteine Ubiquitin und SUMO

vergleichbar ist, so sind die Ladungen, die an den Proteinoberflächen präsentiert werden, sehr unterschiedlich. Im Hinblick auf die Tertiärstrukturen ist es nicht verwunderlich, dass die Enzyme des SUMO-Systems mit denen des Ubiquitin-Systems verwandt sind, es jedoch eine klare Spezifität für das eine oder andere modifizierende Protein gibt.

Während in Säugern innerhalb kurzer Zeit verschiedene Substrate von SUMO-1 identifiziert wurden, konnte in der Hefe die Enzymatik der Konjugation aufgeklärt werden. Es wurde bisher das SUMO-aktivierende Enzym (Heterodimer aus Aos1p und Uba2p, Johnson, *et al.* 1997) und das konjugierende Enzym (Ubc9p, Johnson und Blobel 1997) identifiziert (siehe Abb. 3). Kürzlich konnten auch die ersten SUMO-Protein-Ligasen (E3) identifiziert werden (Johnson und Gupta 2001). Es handelt sich hierbei um die Proteine Siz1p und Siz2p. Diese enthalten eine Domäne, die Ähnlichkeit zu der sog. RING-Finger-Domäne von Ubiquitin-Protein-Ligasen aufweist (siehe oben).

Ebenso wie Ubiquitin wird SUMO als Vorläuferprotein synthetisiert. Um die Konjugation zu ermöglichen, muss dieses spezifisch proteolytisch prozessiert werden. In der Hefe wird dies von der SUMO-spezifischen Protease Ulp1p bewerkstelligt (Li und Hochstrasser 1999). Die Dekonjugation von SUMO und auch das Ulp1-Protein sind Themengebiete dieser Arbeit und werden in anderen Kapiteln eingehender behandelt (siehe Ergebnisse und Diskussion).

1.3.1 Die Konjugation von SUMO

Die Aktivierung von SUMO verläuft vermutlich analog zur Aktivierung von Ubiquitin, da die beteiligten Enzyme dafür charakteristische Merkmale aufweisen. Im Fall von Ubiquitin formiert sich beim ersten Schritt unter Freisetzung von Pyrophosphat aus ATP ein eng an das E1-Enzym angelagertes Ubiquitin-Adenylat. Unter Freisetzung des AMP erfolgt die Umlagerung zu einem Thioester am selben Enzym. Die nun freie Nukleotidbindestelle des Enzyms kann unter erneuter Bindung von ATP und dessen Hydrolyse zu AMP ein weiteres Ubiquitin als Adenylat binden (Haas und Rose 1982).

Das SUMO-aktivierende Enzym der Hefe ist ein Heterodimer, bestehend aus Aos1p und Uba2p (Johnson, *et al.* 1997). Die beiden Untereinheiten des SUMO-aktivierenden Enzyms spiegeln die verschiedenen Domänen des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms (Uba1p) wieder (Schwienhorst 1997). Die Proteinsequenz von Aos1p ist ähnlich dem N-Terminus von Uba1p, 29% der Aminosäurereste (AS) dieser Bereiche sind zueinander identisch (Johnson, *et al.* 1997). Das Uba2-Protein enthält beide für die Adenylat- und Thioesterausbildung notwendigen Domänen (Dohmen, *et al.* 1995). Damit ist Uba2p homolog zur C-terminalen Hälfte von Ubiquitin-aktivierenden Enzymen. Die ersten 551 AS von Uba2p sind zu 28% identisch mit denen des Carboxyterminus des Uba1-Proteins (Schwienhorst 1997). Zusätzlich zu den in der Familie der aktivierenden Enzyme konservierten Domänen besitzen Uba2-Proteine einen nicht essentiellen C-terminalen

Bereich von ca. 120 Aminosäureresten. Dieser enthält eine klassische Kernlokalisierungssequenz, die für einen effizienten Transport des Proteins in den Kern benötigt wird (Dohmen, *et al.* 1995). Der C-Terminus des Uba2-Proteins ist außerdem notwendig für die Interaktion mit Poly(A)-Polymerase (Pap1p, del Olmo, *et al.* 1997). Die physiologische Relevanz für diese Interaktion ist noch nicht bekannt.

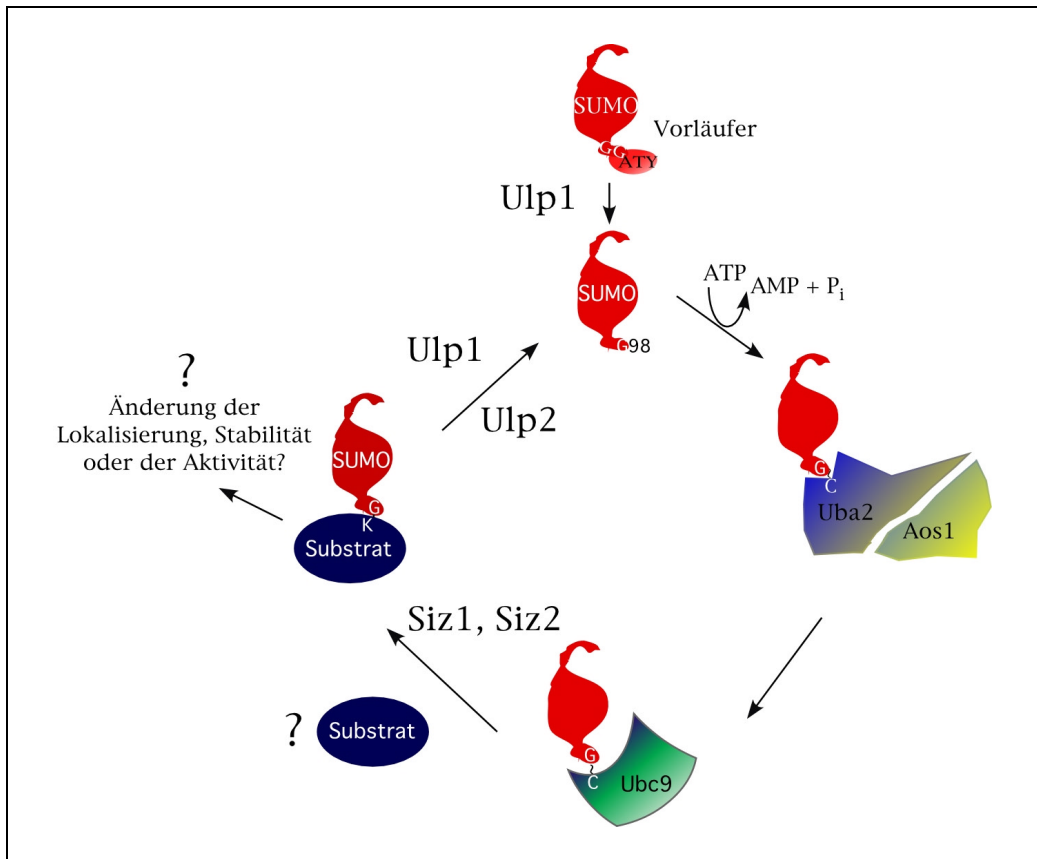


Abb. 3: Schematische Übersicht des SUMO-Systems der Hefe. SUMO wird als Vorläuferprotein synthetisiert und von der Protease Ulp1 prozessiert. Reifes SUMO wird von dem aktivierenden Enzym (Heterodimer aus Uba2 und Aos1) auf das konjugierende Enzym Ubc9 übertragen. Dieses vermittelt die Ausbildung der Isopeptidbindung zu den Substraten unter Beteiligung einer der beiden SUMO-Protein-Ligasen Siz1 oder Siz2. Die kovalente Bindung zwischen SUMO und seinen Substraten kann von einer der beiden Proteasen Ulp1 oder Ulp2 wieder gespalten werden. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Das vom E1-Enzym aktivierte SUMO wird in einer Transesterifizierungsreaktion an das konjugierende Enzym Ubc9p weitergeleitet (Desterro, *et al.* 1997, Johnson und Blobel 1997, Lee, *et al.* 1998, Saitoh, *et al.* 1998, Schwarz, *et al.* 1998). Von den bisher bekannten Proteinen, die an der Konjugation und Dekonjugation von SUMO beteiligt sind, ist Ubc9p dasjenige, welches die größte Homologie zu der Enzymfamilie des Ubiquitin-Systems aufweist. Aufgrund dieser Sequenzhomologie, und da es Einfluss auf den Abbau von B-Typ Cyclinen ausübt, ist es anfangs den Ubiquitin-konjugierenden Proteinen zugeordnet worden (Seufert, *et al.* 1995, Aristarkhov, *et al.* 1996). Bis heute ist nicht geklärt, wie es zu der beobachteten Stabilisierung von Cyclinen in *ubc9*-Mutanten kommt. Ubc9p ist trotz der großen Ähnlichkeit zu Ubiquitin-konjugierenden Enzymen spezifisch für die

Übertragung von SUMO. Es präsentiert an der Proteinoberfläche eine positive Ladung, die mit der negativ geladenen Oberfläche von SUMO spezifisch interagieren kann und wahrscheinlich eine Interaktion mit Ubiquitin und verwandten Proteinen verhindert (Liu, Q., *et al.* 1999a).

Wie alle Proteine, die an der Konjugation von SUMO in der Hefe beteiligt sind (SUMO, Uba2p, Aos1p, Ulp1p), ist Ubc9p für die mitotische Teilung der Zellen essentiell (Dohmen, *et al.* 1995, Johnson, *et al.* 1997, Li und Hochstrasser 1999, Seufert, *et al.* 1995). Konditionelle Mutationen in *UBA2* und *UBC9* führen unter restriktiven Bedingungen zu einem G₂/M-Zellzyklusarrest der betroffenen Zellen (Seufert, *et al.* 1995, Johnson, *et al.* 1997, Li und Hochstrasser 1999, Schwienhorst, *et al.* 2000). Anhand dieser Daten, sowie von Analysen der SUMO-Konjugate in unterschiedlichen Zellzyklusstadien kann auf eine Zellzyklus-abhängige Kontrolle der Sumoylierung geschlossen werden (siehe unten und Ergebnisse).

An der Erkennung der Substrate sind, ähnlich wie beim Ubiquitin-System, SUMO-Protein-Ligasen beteiligt (Johnson und Gupta 2001). Auch diese weisen eine, wenn auch geringe, Verwandtschaft zu einer Klasse der Ubiquitin-Protein-Ligasen, den RING-Fingerkomplexen, auf.

Ähnlich wie bei Ubiquitin beinhaltet die Funktion von SUMO, dass es mit dem carboxyterminalen Glycinrest an eine ϵ -Aminogruppe eines internen Lysinrestes eines anderen Proteins konjugiert wird (Johnson, *et al.* 1997). Aber welche Proteine werden auf diese Weise modifiziert, und was sind die Auswirkungen?

1.3.2 SUMO-Substrate

Das erste identifizierte Substrat, das durch Sumoylierung modifiziert wird, war das humane RanGAP1 (Matunis, *et al.* 1996, Mahajan, *et al.* 1997). RanGAP1 („Ran GTase activating protein“) ist notwendig für den nukleo-zytoplasmatischen Transport von Proteinen und Nukleinsäuren. Es aktiviert auf der zytoplasmatischen Seite der Kernpore die Hydrolaseaktivität der kleinen GTPase Ran, wodurch ein Konzentrationsgradient von GTP-gebundenem Ran über die Kernmembran entsteht (Übersicht in Görlich und Kutay 1999). Nicht-modifiziertes RanGAP1 ist zytosolisch. Erst durch die kovalente Bindung an SUMO-1 ist es in der Lage mit RanBP2, einem Protein an den zytoplasmatischen Fibrillen der Kernpore, zu interagieren (Matunis, *et al.* 1996, Mahajan, *et al.* 1997, Mahajan, *et al.* 1998, Matunis, *et al.* 1998). 60-70% des RanGAP1-Proteins der Zelle liegt in SUMO-modifiziertem Zustand vor (Mahajan, *et al.* 1997). Dem zu RanGAP1 orthologen Protein der Bäckerhefe, Rna1p, fehlt die C-terminale Domäne an der die Sumoylierung von RanGAP1 in Säugerzellen stattfindet. In der Tat wird es in der Hefe nicht modifiziert (Johnson, *et al.* 1997) und ist im Zytoplasma lokalisiert (Melchior 2000). Die Sumoylierung von RanGAP1 spielt demnach zumindest in der Hefe keine essentielle

Rolle. In der Säugerzelle ist es allerdings das dominierende Substrat von SUMO-1, es macht etwa 80-90% der SUMO-konjugierten Proteine unter normalen Wachstumsbedingungen aus (Matunis, *et al.* 1996, Kamitani, *et al.* 1997, Kamitani, *et al.* 1998a).

Ran-GTP hat neben dem Kerntransport auch eine noch ungeklärte Funktion bei der Mitose. Im Verlauf der Zellteilung ist sumoyliertes RanGAP1 auch am Spindelapparat zu detektieren (Matunis, *et al.* 1996). Denkbar ist, dass in der Hefe – in der die Kernmembran im Verlauf der Mitose nicht aufgelöst wird - ein anderes Protein eine dem sumoylierten RanGAP1 vergleichbare Aufgabe bei der Chromosomen-Segregation übernimmt. Für einen Einfluss der SUMO-Konjugation bei der Verteilung der Chromosomen spricht, dass eine Erhöhung der SUMO-Syntheserate in der Hefe einen Defekt im Centromer supprimieren kann (Meluh und Koshland 1995).

Für RanBP2 aus *Xenopus laevis* konnte *in vitro* gezeigt werden, dass es nicht nur sumoyliertes RanGAP1 bindet, sondern selbst als Substrat fungieren kann (Saitoh, *et al.* 1997, Saitoh, *et al.* 1998). Der Bereich des Proteins der sumoyliert wird, überlappt mit dem, an den Ubc9p und RanGAP1 binden. Der Nachweis der Modifikation *in vivo* steht noch aus. In Leberzellen der Ratte konnte diese Modifikation bisher nicht nachgewiesen werden (Lee, *et al.* 1998).

Ein weiteres SUMO-Akzeptorprotein ist I κ B α , ein Inhibitor des Transkriptionsregulators NF- κ B (Desterro, *et al.* 1998). I κ B α hält NF- κ B im Zytoplasma zurück, indem es dessen Kernlokalisierungssequenz maskiert. Wird der NF- κ B-Weg induziert, zum Beispiel durch TNF α („tumor necrosis factor α “), kommt es zur Phosphorylierung des Inhibitors mit nachfolgender Ubiquitylierung. Die Folge ist ein schneller Abbau von I κ B α durch das Proteasom und der Transkriptionsregulator kann in den Kern zu seinem Wirkort transportiert werden.

Im Fall der Sumoylierung von I κ B α wirkt SUMO antagonistisch zu Ubiquitin. Die Bindung zwischen SUMO und I κ B α erfolgt nicht nur über den selben Lysinrest (K21) an den auch Ubiquitin bindet, sondern es wirkt zudem inhibitorisch auf die Phosphorylierung, dem Signal, welches zur Ubiquitylierung führt (Desterro, *et al.* 1998). *In vivo* wird nur ein geringer Anteil des vorhandenen I κ B α -Proteins SUMO-modifiziert, eventuell um eine gewisse Menge des Proteins kontinuierlich vor dem Abbau zu schützen. Zusätzlich ist ein weiterer Einfluss auf den NF- κ B-Weg nicht auszuschließen. Bekannt ist, dass der TNF α -Rezeptor und die initiiierende Kinase der Signalkaskade MEKK1 mit hUBC9 interagieren (Saltzman, *et al.* 1998).

Substrat (Funktion)	Spezies	Funktion/Auswirkung der Sumoylierung	Referenz
Septine: Cdc3p, Cdc11p, Sep7p (Knospung)	<i>S. cerevisiae</i>	zum Teil bei der Lokalisierung der Knospe und damit der Polarität der Zelle	Johnson und Blobel 1999, Takahashi, <i>et al.</i> 1999
RanGAP1 (Ran GTPase Aktivator)	Mensch	Interaktion mit RanBP2 an der Kernpore	Matunis, <i>et al.</i> 1996, Mahajan, <i>et al.</i> 1997
RanBP2 (Protein der Kernpore)	<i>X. laevis</i>	unbekannt	Saitoh, <i>et al.</i> 1997, Saitoh, <i>et al.</i> 1998
IκBα (Inhibitor des NF-κB Transkriptionsaktivators)	Mensch	verhindert Phosphorylierung, Ubiquitylierung und damit Abbau von IκBα	Tashiro, <i>et al.</i> 1997, Desterro, <i>et al.</i> 1998, Hay, <i>et al.</i> 1999
Dorsal (Transkriptionsaktivator, homolog zu NF-κB)	<i>Drosophila melanogaster</i>	Kernlokalisierung	Bhaskar, <i>et al.</i> 2000
p53 (Tumor Suppressor, Transkriptionsregulator)	Mensch	Regulierung der Aktivität	Gostissa, <i>et al.</i> 1999, Rodriguez, <i>et al.</i> 1999, Fogal, <i>et al.</i> 2000, Müller, <i>et al.</i> 2000
p73α (p53-verwandtes Protein)	Mensch	Steigerung des proteasomalen Abbaus	Minty, <i>et al.</i> 2000
MDM2 (Ub-Protein-Ligase von p53)	Mensch	Rolle bei der Selbst-Ubiquitylierung	Rodriguez, <i>et al.</i> 1999, Buschmann, <i>et al.</i> 2000, Müller, <i>et al.</i> 2000, Hjerrild, <i>et al.</i> 2001
c-Jun (Transkriptionsaktivator)	Mensch	unbekannt	Müller, <i>et al.</i> 2000
PML (ND10-Strukturen)	Mensch	Aufbau der ND10-Körper	Müller, <i>et al.</i> 1998
Sp100 (ND10-Strukturen)	Mensch	Lokalisierung in ND10-Körpern	Sternsdorf, <i>et al.</i> 1999
BZLF1 (Transkriptionsaktivator)	Eppstein-Barr Virus	Zerstörung von ND10-Körpern	Adamson und Kenney 2001
IE1 und IE2/IE-p86 (Transaktivatoren)	hCytomegalovirus	Transkriptionsaktivierung	Hofmann, <i>et al.</i> 2000
HSF2 (Transkriptionsaktivator)	Mensch	Ausbildung der aktiven, DNA-bindenden Form	Goodson, <i>et al.</i> 2001
TEL (Transkriptionsrepressor)	Mensch	Lokalisierung in TEL-Körpern	Chakrabarti und Nucifora 1999, Chakrabarti, <i>et al.</i> 1999, Chakrabarti, <i>et al.</i> 2000
Androgen-Rezeptor (Transkriptionsfaktor)	Mensch	evtl. Reduzierung der Aktivität	Poukka, <i>et al.</i> 1999, Poukka, <i>et al.</i> 2000
Tramtrack (Transkriptionsrepressor)	<i>Drosophila melanogaster</i>	unbekannt	Lehembre, <i>et al.</i> 2000
HIPK2 (Proteinkinase)	Mensch	Lokalisierung in nukleären Strukturen	Kim, <i>et al.</i> 1999
E1 (Transkriptionsregulator)	Bovines Papillomavirus	Akkumulation im Kern und Replikation	Rangasamy und Wilson 2000, Rangasamy, <i>et al.</i> 2000
Wrn (DNA-Helikase, ATPase, Exonuklease)	Mensch	unbekannt	Kawabe, <i>et al.</i> 2000
TOP1 (DNA Topoisomerase)	Mensch	Antwort auf TOP1-vermittelte DNA-Schäden	Mao, <i>et al.</i> 2000a, Mao, <i>et al.</i> 2000b
Pescadillo (nukleoläres Protein)	Mensch	Zellzyklus-abhängige Regulation des nukleolären Proteins	Kinoshita, <i>et al.</i> 2000
CaMKII (neuronale Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase)	<i>Drosophila melanogaster</i>	unbekannt	Long und Griffith 2000

Tab. 1: Übersicht der Proteine, die mit SUMO *in vivo* und/oder *in vitro* modifiziert werden können.
Siehe Text für weitere Erläuterungen

Obwohl die enzymatische Kaskade, die zur Konjugation von SUMO führt, in allen Eukaryoten konserviert ist, und die Auswirkungen von Störungen der SUMO-Konjugation für ähnliche Funktionen der Sumoylierung in verschiedenen Organismen spricht, unterscheiden sich die Substratproteine und die Auswirkungen der Modifizierung. So ergaben die Untersuchungen in verschiedenen Organismen immer einen Einfluss des SUMO-Systems auf den Kernimport (siehe oben und diese Arbeit). Dieser Einfluss wird jedoch nicht immer über die Relokalisierung von RanGAP1 ausgeübt.

Ähnliches findet man bei der Untersuchung des NF- κ B-Weges. In *Drosophila melanogaster* wird die NF- κ B-Signalkaskade zumindest zum Teil anders reguliert als in Säuger-Zellen. In der Fliege ist das NF- κ B-verwandte Protein Dorsal selbst der Akzeptor von SUMO (Bhaskar, *et al.* 2000). Die Induktion von Dorsal verläuft analog der von NF- κ B: Von dem Inhibitor Cactus wird es solange im Zytoplasma festgehalten, bis dieser phosphoryliert, ubiquityliert und abgebaut wird. Die SUMO-Modifizierung von Dorsal führt zu einer Cactus-unabhängigen Kernlokalisierung und damit Aktivierung von Dorsal, dem gegenteiligen Effekt der SUMO-Modifizierung von I κ B α in Säugerzellen.

Neben dem Beispiel I κ B α gibt es weitere Proteine die sowohl ubiquityliert als auch sumoyliert werden. Soweit bekannt, wird allerdings bei keinem dieser Proteine die Isopeptidbindung zwischen SUMO und dem Substrat an einem Lysinrest aufgebaut, welches auch Ziel einer Ubiquitylierung ist.

Der Tumor-Suppressor p53 ist das prominenteste Beispiel. p53 inhibiert den Zellzyklus und/oder induziert die Apoptose (zur Übersicht siehe Levine 1997). Unter normalen Bedingungen wird es daher schnell über das Ubiquitin/Proteasom-System abgebaut. Von verschiedenen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass Sumoylierung die Transaktivierung durch p53 steigert (Gostissa, *et al.* 1999, Rodriguez, *et al.* 1999, Müller, *et al.* 2000). Da allerdings nur ein kleiner Teil des zellulären p53 mit SUMO modifiziert wird, hat dies keine bisher bekannten Auswirkungen auf die Zelle. Die Modifikation wird durch Phosphorylierung aufgehoben, Stressfaktoren oder DNA-Schädigungen haben jedoch keinen Einfluss.

Vor kurzer Zeit konnte gezeigt werden, dass SUMO nicht nur direkt die Aktivität von p53 regulieren kann, sondern indirekt Einfluss auf die Stabilität von p53 ausübt, indem es MDM2 modifiziert (Buschmann, *et al.* 2000, Hjerrild, *et al.* 2001). MDM2 ist die Ubiquitin-Protein-Ligase, die verantwortlich ist für die Ubiquitylierung von p53. Die MDM2-Aktivität reguliert sich selbst durch Auto-Ubiquitylierung und darauf folgenden Abbau. Die kovalente Bindung von SUMO-1 verhindert zum Teil diese Selbst-Ubiquitylierung, wodurch mehr p53 markiert und abgebaut werden kann (Buschmann, *et al.* 2000).

Bei der Untersuchung von p73 α , einem Protein mit Verwandtschaft zu p53, stellte sich heraus, dass auch ein Anteil des vorhandenen p73 α in der Zelle in einer SUMO-modifizierten Form vorliegt. Im Gegensatz zu der bei SUMO-p53 beobachteten

Aktivierung, scheint SUMO-p73 α effizienter durch das Ubiquitin/Proteasom-System abgebaut zu werden (Minty, *et al.* 2000).

Neben den bisher genannten Proteinen sind im Laufe des letzten Jahres eine Reihe weiterer Transkriptionsregulatoren bekannt geworden, die durch SUMO-1 modifiziert werden (siehe Tab. 1, Abb. 4). Oftmals ist die Funktion und die Auswirkung der Konjugation *in vivo* noch nicht geklärt.

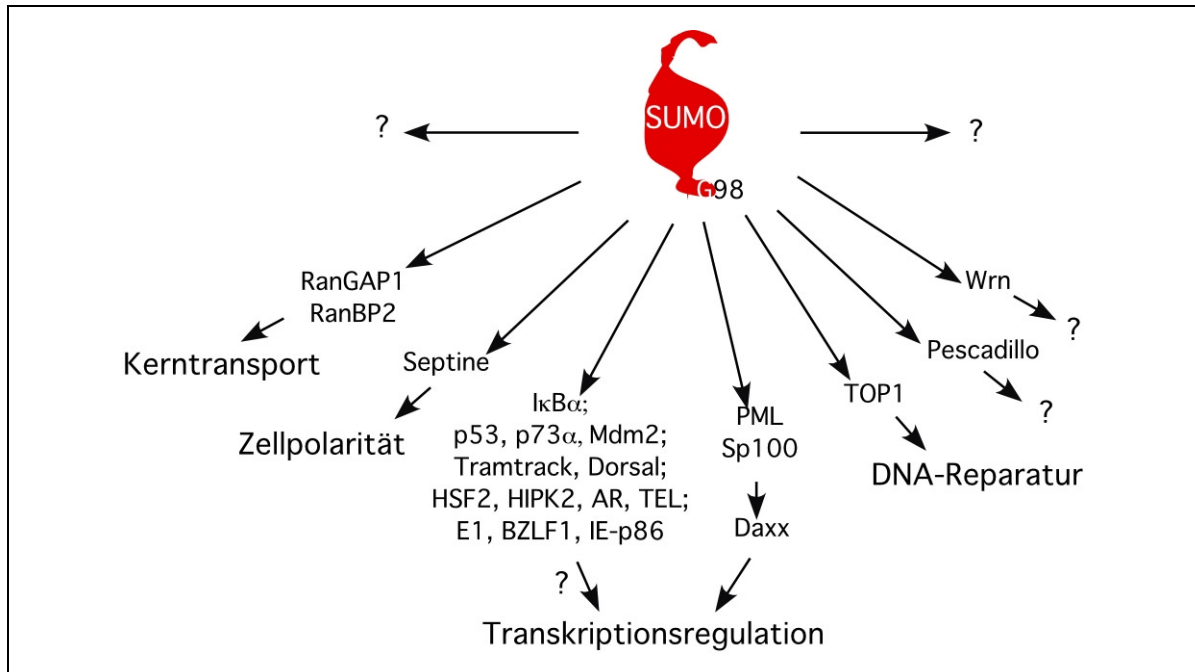


Abb. 4: Bekannte Substrate von SUMO und deren Einfluss auf zelluläre Prozesse. Nähere Erläuterungen siehe Text und Tab. 1.

Sieht man sich die Lokalisierung von humanem SUMO-1 in der Zelle an, stellt man fest, dass es hauptsächlich im Kern lokalisiert ist (Everett, *et al.* 1999). Das Nukleoplasma ist allerdings keine strukturlose, homogene Masse. Es gibt einige Regionen, die als Punkte oder kleinere Sprenkel erscheinen, in denen keine Nukleinsäuren vorhanden sind. Diese Strukturen sind wichtig für bestimmte Funktionen. So spielen die so genannten ND10-Körper (für „Nuclear dot 10“) und die daran beteiligten Proteine eine Rolle bei der Antwort auf verschiedene apoptotische Signale, z. B. Fas und TNF α (Wang, *et al.* 1998).

PML und Sp100 sind Proteine, die für die Ausbildung der ND10-Strukturen notwendig sind. Bei Patienten mit Akuter Promyelozytischer Leukämie (APL) ist PML durch eine Chromosomentranslokation fusioniert mit dem Rezeptor der Retinsäure (RAR α). Dies führt zur Mislokalisierung von PML. Zellen, die dieses Fusionsprodukt (PML-RAR α) exprimieren, können nicht mehr den programmierten Zelltod ausführen. Dies führt zur Pathogenität dieser Mutation (Wang, *et al.* 1998).

Ebenso wie PML, muss auch Sp100 Bestandteil von aktiven ND10-Strukturen sein. Das Signal, das die beiden Proteine zusammenbringt und diese Strukturen aufrechterhält, ist die Konjugation mit SUMO. Sowohl Sp100 als auch PML werden sumoyliert (Sternsdorf, *et al.* 1997, Zhu, *et al.* 1997, Howe, *et al.* 1998, Kamitani, *et al.* 1998b, Kamitani, *et al.* 1998c, Müller, *et al.* 1998, Chelbi-Alix und de The 1999, Duprez, *et al.* 1999).

PML ist außer bei der Apoptose und der Stressantwort auch an der Präsentation von MHC Klasse I Peptiden beteiligt, und hat wahrscheinlich eine Funktion bei der Virenabwehr (Maul, *et al.* 1995, Maul 1998, Maul, *et al.* 2000). Diese Funktionen sind abhängig von der Lokalisierung in ND10-Strukturen. Einige Viren, wie das Herpes Simplex-Virus (HSV), humanes Cytomegalovirus (hCMV) und das Epstein Barr-Virus (EBV) zerstören spezifisch diese ND10-Körper, um die Immunantwort zu inhibieren. Die Auflösung erfolgt durch virale Proteine (HSV ICP0; CMV IE1; EBV BZLF1), die die Sumoylierung von PML herabsetzen (Adamson und Kenney 2001). Der Transkriptionsaktivator des Epstein-Barr-Virus BZLF1 bildet dabei selbst eine Isopeptidbindung zu SUMO-1 und könnte dadurch die Menge an konjugierbarem SUMO-1 so weit reduzieren, dass außer PML auch andere natürliche Substrate nicht mehr in ausreichendem Maße modifiziert werden können (Adamson und Kenney 2001).

Im Verlauf des letzten Jahres wurde eine Reihe weiterer Proteine gefunden, die posttranslational mit SUMO modifiziert werden (siehe Tab. 1 und Abb. 4). Bei vielen ist die Funktion der Sumoylierung *in vivo* noch nicht aufgeklärt. Die Art der Substrate macht jedoch deutlich, dass SUMO Einfluss auf die verschiedensten Prozesse der Zelle wie Kerntransport, DNA-Reparatur und Zellzyklus hat.

Die einzigen bisher bekannten SUMO-Substrate in der Bäckerhefe sind Septine (Johnson und Blobel 1999). Diese Proteine sind zentrale Komponenten von 10nm-Filamenten an der Knospungsstelle der Zelle, die wichtig für die Bestimmung der Zellpolarität und Regulation der Zytokinese sind. Septine sind während des gesamten Zellzyklus an der Knospungsstelle. In der frühen G₁-Phase der mitotischen Zellteilung, noch bevor eine Knospe sichtbar wird, bildet sich ein multimerer Komplex aus fünf verschiedenen Septinen (siehe Abb. 5). Im Verlauf des Knospenwachstums verbreitert sich dieser ringförmige Komplex bis in die Tochterzelle. Die Ringstruktur bleibt bis zur Abtrennung der Tochterzelle von der Mutterzelle erhalten. In der G₂/M-Phase des Zellzyklus werden drei (Cdc11p, Sep7p, Cdc3p) der fünf verschiedenen Septine sumoyliert. Diese Modifikation betrifft allerdings nicht den gesamten Anteil der vorhandenen Proteine, sondern nur einen geringen Teil, der sich auf der Mutter-Zellseite der Filamente befindet (siehe Abb. 5; Johnson und Blobel 1999). Die Sumoylierung hat einen Einfluss auf die Auflösung der Septinringe nach Abschluss der Zytokinese und damit auch auf die Ausbildung neuer Knospungsstellen.

Obwohl der größte Anteil des vorhandenen SUMO-Proteins in der G₂/M-Phase konjugiert an die Septine vorliegt, und Mutanten mit Defekten bei der SUMO-Konjugation in eben dieser Zellzyklusphase arretieren, ist die Ausbildung von SUMO-Septin-Bindungen nicht essentiell für den Fortlauf des Zellzyklus (Johnson und Blobel 1999).

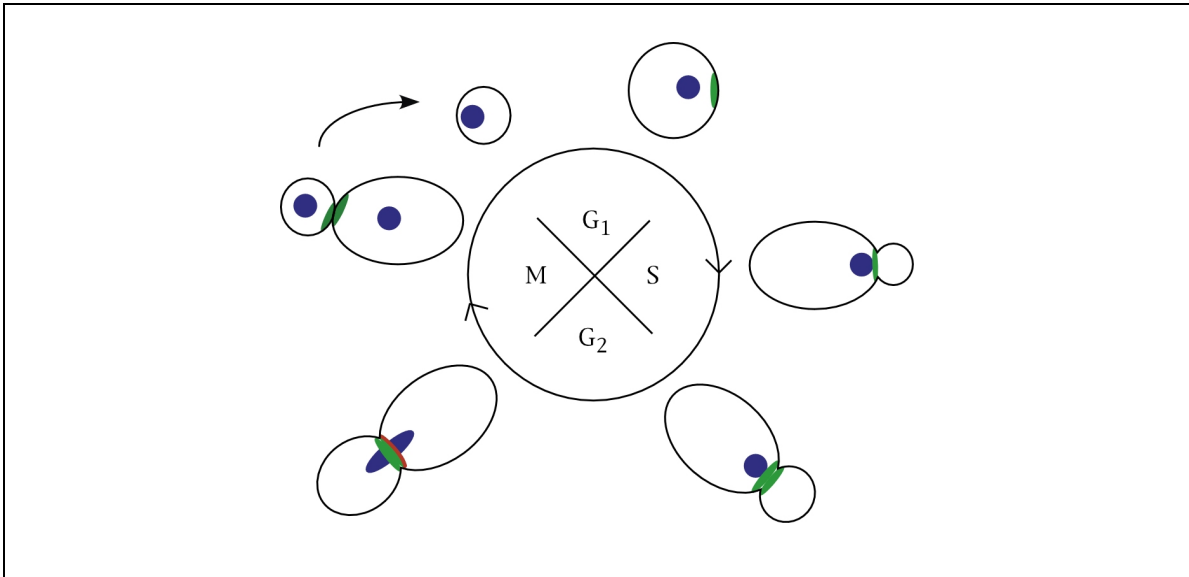


Abb. 5: Schematische Darstellung des Zellzyklus der Hefe *S. cerevisiae*. Septinkomplexe sind grün dargestellt; SUMO-modifizierte Septine rot; der Kern blau. Erläuterungen siehe Text.

1.4 Ziel dieser Arbeit

Viele Punkte in Bezug auf das SUMO-System waren zu Beginn dieser Arbeit noch ungeklärt. Durch die Fortführung der phänotypischen Charakterisierung der während meiner Diplomarbeit generierten konditionalen Allele des *UBA2*-Gens, welches an der Aktivierung von SUMO beteiligt ist, sollte der Einfluss der SUMO-Konjugation auf verschiedene zelluläre Prozesse untersucht werden.

Insbesondere sollten neue Komponenten des Modifikationssystems identifiziert werden. Die Identifizierung und Charakterisierung neuer Faktoren, entweder Enzyme oder Substrate des SUMO-Systems, sollte Einblick in die Funktionen der essentiellen posttranslationalen Modifikation mit dem kleinen Ubiquitin-ähnlichen Protein SUMO in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* geben.

2 Material & Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Stämme

Stamm	Genotyp	Derivat von	Referenz/Herkunft
JD47-13C	<i>MATa leu2-Δ1 trp1-Δ63 his3-Δ200 ura3-52 lys2-801 ade2-101</i>	Ausgangsstamm	Dohmen, <i>et al.</i> 1995
JD53	<i>MATα</i>	JD47-13C	Dohmen, <i>et al.</i> 1995
JD51	<i>MATa/α leu2-Δ1/leu2-Δ1 trp1-Δ63/trp1-Δ63 his3-Δ200/his3-Δ200 ura3-52/ura3-52 lys2-801/lys2-801 ade2-101/ade2-101</i>	Ausgangsstamm	Dohmen, <i>et al.</i> 1995
JD90-1A;pJDA315-A	<i>MATα uba2Δ::HIS3, pRS315-wtUBA2</i>	JD47-13C	R. J. Dohmen
uba2-tsX	<i>MATα uba2Δ::HIS3 pRS315-uba2-tsX</i> (X=1, 2, 4, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 18, 22)	JD90-1A	Schwienhorst 1997
JD90-1B;pIS3	<i>MATa uba2Δ::HIS3 pRS314-wtUBA2</i>	JD47-13C	Schwienhorst 1997
uba2-tsX	<i>MATa uba2Δ::HIS3 pRS314-uba2-tsX</i>	JD90-1B	Schwienhorst 1997
sut9-3	<i>MATa ulp2-1 uba2Δ::HIS3 pRS314-uba2-tsX</i>	JD90-1B;pISt-ts9	Schwienhorst 1997
EJY251-11B	<i>MATa smt3Δ::HIS3</i> <i>pRS315-P_{GAL10}-His6Flag-SMT3</i>	JD47-13C	Johnson, <i>et al.</i> 1997
EJY260	<i>MATa/α AOS1/aos1Δ::HIS3</i>	JD47-13C	Johnson, <i>et al.</i> 1997
IS15	<i>MATa/α aos1Δ::HIS3/AOS1 ULP2/ulp2-1</i>	sut9-3 X EJY260-Sporklon	diese Arbeit
IS16	<i>MATa/α smt3Δ::HIS3/SMT3 ULP2/ulp2-1</i>	EJY251-11B X sut9-3	diese Arbeit
IS18	<i>MATa/α ULP2/ulp2-1</i>	JD53 X sut9-3	diese Arbeit
IS18-M1, -M4, -M5	<i>MATa ulp2-1 (Y434)</i>	IS18-Sporklone	diese Arbeit
IS18-M2, -M3, -M6	<i>MATα ulp2-1 (Y434)</i>	IS18-Sporklone	diese Arbeit
IS29	<i>MATa/α ULP2/ulp2-Δ1::URA3</i>	JD51	diese Arbeit
IS30a	<i>MATa ulp2-Δ1::URA3</i>	JD47-13C	diese Arbeit
IS91	<i>MATa/α ulp2-1/ulp2-Δ1::URA3</i>	IS30a X IS18-M2	diese Arbeit
HH902	<i>MATa ura3 LEU2 TRP1</i>	Ausgangsstamm	J. Hegemann
HH903	<i>MATa mif2-3 ura3</i>	HH902	J. Hegemann
IS23	<i>MATa uba2Δ::HIS3 cep1Δ::LEU2,</i> <i>YEPlac195-P_{GAL10}-UBA2</i>	JD90-1A	diese Arbeit
IS106	<i>MATa ulp2-Δ1::URA3 cep1Δ::LEU2</i>	IS30a	diese Arbeit
IS31	<i>MATa ULP2-HA2::Y1plac211</i>	JD47-13C	diese Arbeit
IS35	<i>MATa ULP2-Myc9::KITRP1</i>	JD47-13C	diese Arbeit
IS36	<i>MATa ULP1-Myc9::KITRP1</i>	JD47-13C	diese Arbeit
IS38	<i>MATa/α nup133Δ::HIS3/NUP133</i> <i>ULP1/ULP1-Myc9::KITRP1</i>	nup133-Δ X IS36	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Derivat von	Referenz/Herkunft
IS39-A1	<i>nup133Δ::HIS3 ULP1-Myc9::KITRP1</i>	IS38-Sporklon	diese Arbeit
IS69	<i>MATα ulp2-Δ1::URA3 uba2Δ::HIS3, uba2-ts9-pRS314</i>	JD90-1A:pIS1-ts9	diese Arbeit
IS70	<i>MATα ulp2-Δ1::URA3 ulp1Δ::HIS3 LEU2::ulp1-333</i>	MHY1488	diese Arbeit
IS71	<i>MATα P_{GALI}-CDC14::URA3</i>	JD47-13C	diese Arbeit
IS86	<i>MATα ulp2-1 URA3::P_{GALI}-CDC14</i>	IS18-M1	diese Arbeit
IS90	<i>MATα/α SMT3/SMT3-ΔATY::HIS3 ULP1/ulp1Δ::KITRP1</i>	IS77	diese Arbeit
IS90-1B	<i>MATα ulp1Δ::KITRP1 YCplac33-ulp1-333</i>	IS90-Sporklon	diese Arbeit
DF5	<i>MATα/α trp1-1 / trp1-1 ura3-52 / ura3-52 his3-Δ200 / his3-Δ200 leu2-3,112 / leu2-3,112 lys2-801 / lys2-801</i>	Ausgangsstamm	Finley, <i>et al.</i> 1987
MHY1488	<i>MATα ulp1Δ::HIS3 LEU2::ulp1-333ts</i>	DF5	S.-J. Li
EJY303	<i>MATα CDC11-HA::HIS3</i>	JD47-13C	Johnson und Blobel 1999
nup133-Δ	<i>MATα nup133Δ::HIS3 / NUP133 ULP1 / ULP1-Myc9::KITRP1</i>	nup133Δ X IS36	Pemberton, <i>et al.</i> 1995
JD293-7B	<i>MATα CDC11-HA::HIS3 ulp2-Δ1::URA3</i>	EJY303	R. J. Dohmen

Tab. 2: Verwendete *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz/Herkunft
DH5alpha F'	<i>F' / endA1 hsdR17 (rK-mK+) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nalr) relA1 Δ(lacIZYA-argF)U16□9 deoR (ϕ80dlacΔ(lacZ)M15)</i>	Woodcock, <i>et al.</i> 1989
XL1blue	<i>F'::T10 proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nalr) thi hsdR17 (rK-mK+) glnV44 relA1 lac</i>	Stratagene
MC1061	<i>F- araD139 Δ(ara-leu)7696 galE15 galK16 Δ(lac)X74 rpsL (Strr) hsdR2 (rK-mK+)mcrA mcrB1</i>	Wertman, <i>et al.</i> 1986
MC1066	<i>Δ(lacI PO ZYA)74 galu galk strAr leuB6 trpC9830 pyr74::pN5(Kanr) hsdR-</i>	Casadaban, <i>et al.</i> 1983

Tab. 3: Verwendete *Escherichia coli*-Stämme.

2.1.2 Vektoren und Plasmide

Plasmid	Beschreibung (Replikationsmodul, selektierbarer Marker, Verwendungszweck)	Referenz/Herkunft
pRS315	<i>CEN6/ARSH4, LEU2</i> Basisvektor	Sikorski und Hieter 1989
pRS314	<i>CEN6/ARSH4, TRP1</i> Basisvektor	Sikorski und Hieter 1989
YCplac33	<i>CEN4/ARS1, URA3</i> Basisvektor	Gietz und Sugino 1988
YEplac181	<i>2μ, LEU2</i> Basisvektor	Gietz und Sugino 1988
pJDA315-A	<i>CEN6/ARSH4, LEU2</i> Expression von wt <i>UBA2</i> unter Kontrolle des eigenen Promotors	Dohmen, <i>et al.</i> 1995
pIS1-tsX	<i>CEN6/ARSH4, LEU2</i> Expression der konditionalen <i>uba2</i> -Allele unter Kontrolle des eigenen Promotors (<i>uba2-tsX</i> -pRS315); X=1, 2, 4, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 18, 22	Schwienhorst 1997
pIS3	<i>CEN6/ARSH4, TRP1</i> Expression von wt <i>UBA2</i> unter Kontrolle des eigenen Promotors	Schwienhorst 1997
pIS2-tsX	<i>CEN6/ARSH4, TRP1</i> Expression der konditionalen <i>uba2</i> -Allele unter Kontrolle des eigenen Promotors (<i>uba2-tsX</i> -pRS314)	Schwienhorst 1997
pH-6, -7, -8, -11, -13	<i>CEN4/ARS1, LEU2</i> <i>ULP2</i> -exprimierende Plasmide aus einer Genbank mit genomischer Hefe-DNA	diese Arbeit
pY-11, -12	<i>CEN4/ARS1, URA3</i> <i>ULP2</i> -exprimierende Plasmide aus einer auf YCp50-basierenden Genbank mit genomischer Hefe-DNA	diese Arbeit
pISTS9-3	<i>E. coli, Amp</i> Amplifikation des <i>ulp2-1</i> -Allels mit eigenen 5'- und 3'-Sequenzen	diese Arbeit
p275	<i>E. coli, LEU2</i> Disruptionsplasmid zum Austausch des <i>CEP1</i> -ORF mit dem <i>LEU2</i> -Markergen (<i>cep1Δ::LEU2</i>)	Mellor, <i>et al.</i> 1990
pIS80	<i>E. coli, URA3</i> Plasmid zur Disruption des <i>ULP2</i> -ORF's mit dem <i>URA3</i> -Markergen (<i>ulp2-Δ1::URA3</i>)	diese Arbeit
pEMBLyEX-P _{GAL10} -SMT3-Y101	<i>2μ, URA3 leu2d</i> Expression von His6-Flag-Epitop-markiertem <i>SMT3</i> kontrolliert vom <i>GAL10</i> -Promotor (HF-SUMO)	Johnson, <i>et al.</i> 1997
YCplac22- <i>ulp1-333</i>	<i>CEN4/ARS1, TRP1</i> Expression des konditionalen <i>ulp1-333</i> -Allels unter Kontrolle des eigenen Promotors	S.-J. Li
pJD358	<i>2μ, URA3</i> P _{GAL1} -kontrollierte Überexpression von <i>UBA2</i>	R. J. Dohmen
pJD389	<i>2μ, LEU2</i> P _{CUP1} -kontrollierte Überexpression von <i>UBA2</i>	R. J. Dohmen
pIS47-B	<i>2μ, LEU2</i> P _{CUP1} -kontrollierte Expression von <i>AOS1</i>	Schwienhorst 1997
pIS50	<i>2μ, LEU2</i> P _{CUP1} -kontrollierte Überexpression von <i>SMT3-ΔATY</i> (SUMO-G98)	Schwienhorst 1997
pIS69	<i>2μ, TRP1</i> erhöhte Expression von <i>UBC9</i> unter Kontrolle des eigenen Promotors	diese Arbeit
pIS121	<i>2μ, LEU2</i> P _{CUP1} -kontrollierte Überexpression von <i>ULP2</i>	diese Arbeit
pIS123	<i>CEN6/ARSH4, URA3</i> P _{GAL1} -kontrollierte Überexpression von <i>ULP2</i>	diese Arbeit
pIS107	<i>2μ, LEU2</i> P _{CUP1} -kontrollierte Überexpression von <i>ULP1-Δ72</i>	diese Arbeit
pIS110	<i>2μ, LEU2</i> P _{CUP1} -kontrollierte Überexpression von <i>ULP1</i> (Voll-Längen)	diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz/Herkunft
pIS120	<i>CEN6/ARSH4, URA3</i>	Expression des <i>ulp1</i> -333-Allels unter Kontrolle des eigenen Promotors
pIS74	<i>Ylp, URA3</i>	Integrativer Vektor zur endogenen Expression von <i>ULP2</i> -HA2
pWZV87	<i>E. coli, TRP1</i>	Plasmid zur Amplifikation von Integrationskassetten zur Gen-Fusion mit 9×Myc-Epitopen, Markergen <i>K. lactis TRP1</i>
pWZV89	<i>E. coli, TRP1</i>	Plasmid zur Amplifikation von Integrationskassetten zur Gen-Fusion mit 3×HA-Epitopen, Markergen <i>K. lactis TRP1</i>

Tab. 4: Plasmide und Vektoren.

2.1.3 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')	Amplifizierter Bereich
IS351	CCCATAGCCTGCTTGAATGC	<i>S.pombe his5 (HIS3MX6)</i>
IS404	ttctgcaggtaccAGGGTCTTCATCTTCCAAG	<i>ULP2</i> -Epitopmarkierung
IS405	CGAGGTTAGGAGTGAATTCTGAAA	<i>ulp2</i> -Δ5'
IS406	GATGTATGGAAGAATTCTAAG	<i>ulp2</i> -Δ5'
IS407	TCCCCGGGGTCTAGAATGTCTGCCAGAAAACGCAAG	<i>ULP2</i>
IS482	GAGAACATCGTGAAACAACA	<i>ULP2</i> -Promotor
IS483	TGCCTATTTATGTGAGTATG	<i>ULP2</i> -Terminator
IS488	GCGGACTTTCATCATTAG	<i>ulp2</i> -Δ5'
IS525	CTCGAGCGGCGGCTAATCTGAAAAGTATA	<i>ULP2</i> -Promotor
IS553	CTATGTTTATTGCAC	<i>ULP2</i> -Sequenzierung
IS554	GCAAGCTCCGCTTCA	<i>ULP2</i> -Sequenzierung
IS555	GGACTCGTATTGCCA	<i>ULP2</i> -Sequenzierung
IS556	GGATTGGGTTAATGA	<i>ULP2</i> -Sequenzierung
IS557	CGATGCCATCAACTC	<i>ULP2</i> -Sequenzierung
IS558	CCGTAGTACGACAGC	<i>ULP2</i> -Sequenzierung
IS559	CTCTATCGACTGATTC	<i>ULP2</i> -Sequenzierung
IS560	GATGTGGCATTTAGT	<i>ULP2</i> -Sequenzierung
IS671	TTCTGCAGGTACCCTCAAGGGTCTTCATCTTCCAAG	<i>ULP2</i>
IS607	GTTTGGGATGAGGGCAGAGATAATCCTATACTCTTGAAGATGAAGACCCTT CCGGTTCTGCTGCTAG	<i>ULP2</i> -Epitopmarkierung
IS608	GTATGTATATACTAGTTATTTATTGCTGTTACTATTATTATGCGAGAATGT CCTCGAGGCCAGAAGAC	<i>ULP2</i> -Epitopmarkierung
IS852	CAGCTTTCAGCAGGTGCCGGC	<i>ULP1</i> -Promotor
IS776	TTCTGCAGGTACCCTATTTTAAAGCGTCCGGTAAAAATC	<i>ULP1</i>

Name	Sequenz (5'-3')	Amplifizierter Bereich
IS857	CGGAATTCATGGAAGAATCAATGAAAGATGGG	<i>ulp1-Δ72</i>
IS591	CGGAATTCATGTCAGTTGAAGTAGATAAG	Voll-Längen- <i>ULP1</i>
IS593	GGAATTCGAGTTTGAGAAAGACTTCAAAAAG	<i>ulp1-Δ5'</i>
IS610	CGATTAGGATGAGAAGATTTATTGCCCATTTGATTTAACCGACGCTTTAAA ATCCGGTTATGATGATCG	<i>ULP1</i> -Epitopmarkierung
IS611	GATCTGAATATTTCTACTTATGTATAATAATTGTATATTATAAAAAGAATAACC TCGAGGCCAGAAGAC	<i>ULP1</i> -Epitopmarkierung
IS655	CACTCAATAATATATTCTCTAGG	<i>ULP1</i> -Terminator
IS714	CAGTTTTTTTCTCTTCTCTCTGACCTTTGGATATCATAATAGATACTTTTC CTCTTTTCAAATGG	<i>ulp1Δ::KITRP1</i> -Kassette
IS767	GGTTCGTAGCGAAAGAAAAAACTATAACCATCAACTATGAAACCAACACT GTAGAATACCGGATCCCCGGGTTAATTAA	<i>nup133</i> -Deletionskassette
IS768	CATATTTATTATTATCATTCCCCAGTAAAGTTTATTATATATATGTA AAAATTG TATTATAGATAGAATTCGAGCTCGTTAAAC	<i>nup133</i> -Deletionskassette
IS769	CTTCAACGAATTCCCTAAAGAG	<i>nup133-Δ3'</i>
IS803	TCTACTTATGTATAATAATTGTATATTATAAAAAGAATAACTAAAAGTGGAAC GATCATTCACTATA	<i>ulp1Δ::KITRP-</i> Deletionskassette
IS712	GAGGATAACGATATTATTGAGGCTCACAGAGAACAGATTGGTGGTCGTACG CTGCAGGTCGAC	<i>SMT3-ΔATY</i> -Kassette
IS713	GGGAGAGGTTTGTGGCGTTTTTTAGGCATTGTTAAGAGTCCTAATCGATGA ATTTCGAGCTCG	<i>SMT3-ΔATY</i> -Kassette
IS805	GGTGAAGGTGGCACTGGTGAG	<i>KITRP1</i>
JD105	TCGTTTCTGTCTTTTTC	<i>CYC1</i> -Terminator
JD118	AATGTCAGATCCTGTAGAGA	<i>URA3</i>
JD290	GCCTTCGAGCGTCCCAAAACCTTC	<i>CYC1</i> -Terminator

Tab. 5: Verwendete Oligonukleotide.

2.1.4 Enzyme

Die Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Roche, Hybaid und New England Biolabs bezogen. Für die PCR wurden die DNA-Polymerasen *Taq* der Firma Peqlab und „High Fidelity“ (Gemisch aus *Taq* und *Pwo*) von Roche verwendet. Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase der Firma GibcoBRL Life Technology, eingesetzt. Zum Abbau der Ascuswände von *S. cerevisiae*-Sporen wurde β -Glukuronidase der Firma Roche verwendet.

Alle nicht aufgeführten Enzyme wurden von Sigma, St. Louis, USA bezogen.

2.1.5 Chemikalienverzeichnis

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Gibco, Paisley, Schottland
Ampicillin	Sigma, St. Louis, USA
Bacto-Agar	Oxoid, Basingstoke, England
BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat)	Roth, Karlsruhe
Bradford-Farbreagenz	Biorad, München
Bromphenolblau	Janssen, Beerse, Belgien
CaCl ₂ (Calciumchlorid)	Janssen, Beerse, Belgien
Chloroform	Baker, Deventer, Niederlande
Cycloheximid	Serva, Heidelberg
DMF (Dimethylformamid)	Janssen, Beerse, Belgien
DMSO (Dimethylsulfonat)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol	Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Fluka, Deisenhofen
5'-Fluorotat (FoA)	Toronto Research Chemicals
Formaldehyd	Sigma, St. Louis, USA
Galaktose	Roth, Karlsruhe
Glukose	Caesar & Loretz, Hilden
Glycin	Serva, Heidelberg
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	USB Amersham Life Science, England
Hefeextrakt	GibcoBRL, Paisley, Schottland
Hefe-Stickstoffbasis	Difco, Becton-Dickinson, Sparks, USA
HEPES (4-(2-hydroxyethyl)Piperazin-1-Ethansulfonsäure)	Serva, Heidelberg
Histidin	Fluka, Deisenhofen
KAc (Kaliumacetat)	Acros, Geel, Belgien
LiAc (Lithiumacetat)	Sigma, St. Louis, USA
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Baker, Deventer, Niederlande
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Baker, Deventer, Niederlande
MgSO ₄ (Magnesiumsulfat)	Janssen, Beerse, Belgien
NaCl (Natriumchlorid)	Baker, Deventer, Niederlande
Na ₂ HPO ₄ (di-Natriumhydrogenphosphat)	Riedel de Haen, Seelze
NaH ₂ PO ₄ (Natrium-dihydrogenphosphat)	Baker, Deventer, Niederlande
NEM (N-Ethylmaleimid)	Sigma, St. Louis, USA
NH ₄ Ac (Ammoniumacetat)	Acros, Geel, Belgien
Proteaseinhibitor-Mixtur	Roche, Boehringer Mannheim
Proteaseinhibitoren, einzeln	Sigma, St. Louis, USA
PEG3350 (Polyethylenglycol)	Roth, Karlsruhe
Pepton	Difco, Detroit, USA
Raffinose	Serva, Heidelberg
SDS (Natrium-Dodecylsulfat)	USB Amersham Life Science, Buckinghamshire, England
Sorbit	Sigma, St. Louis, USA
TCA (Trichloressigsäure)	Roth, Karlsruhe
Tris Base	USB Amersham Life Science, Buckinghamshire, England
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypton	Difco, Detroit, USA
Uracil	Sigma, St. Louis, USA

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck Eurolab, Darmstadt bezogen.

2.1.6 Antikörper

Antigen (Klon, Art)	Anwendung (eingesetzte Verdünnung)	Herkunft
SUMO/Smt3p (polyklonal, Kanninchen)	Western-Blot (1:10000); IF (1:1000)	Erica S. Johnson
Cdc11p (polyklonal, Kanninchen)	Western-Blot/IP (1:1000); IF (1:500)	Santa Cruz Biotechnology
Uba2p (polyklonal, Kanninchen)	Western-Blot (1:300)	R. J. Dohmen, R. Stappen
Nukleoporin-Domäne (MAb414, monoklonal, Maus)	Western-Blot (1:5000); IF (1:500)	BAbCo
α-Tubulin (Ab-1, monoklonal, Maus)	IF (1:300)	Oncogene Science
FLAG (M2, monoklonal, Maus)	Western-Blot (1:1000-1:3000); IF (1:300)	Sigma
HA (16B12, monoklonal, Maus)	Western Blot/IP (1:2000-1:5000)	BAbCo
HA (High Affinity) (3F10, monoklonal, Ratte)	Western Blot/IP (1:8000); IF (1:1000)	Roche
c-Myc (9E10, monoklonal, Maus)	Western-Blot (1:3000); IF (1:500)	BAbCo
Kanninchen IgG; Cy3-gekoppelt	IF (1:500)	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Kanninchen IgG; POD-gekoppelt	Western Blot (1:5000)	Amersham Pharmacia Biotech /ECL
Maus IgG; Cy3-gekoppelt	IF (1:500)	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Maus IgG; FITC-gekoppelt	IF (1:500)	Leinco Technologies
Maus IgG; POD-gekoppelt; Fab-Fragmente	Western-Blot (1:2000)	Roche
Ratte IgG; FITC-gekoppelt	IF (1:700)	Leinco Technologies

Tab. 6: Verwendete Antikörper. IP, Immunopräzipitation; IF, indirekte Immunofluoreszenz.

2.1.7 Medien

2.1.7.1 Medien zur Anzucht von *S. cerevisiae*-Stämmen

Vollmedium YPD: 1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 2% Glukose

Minimalmedium SD: 0,67% Hefestickstoffbasis ohne Aminosäuren, 2% Glukose, je 0,01mg/ml Histidin und Methionin, 0,02mg/ml Arginin, je 0,04mg/ml Lysin und Tryptophan, 0,05mg/ml Threonin, je 0,06mg/ml Isoleucin und Phenylalanin, 0,04mg/ml Uracil sowie 0,02mg/ml Adenin

Feste Nährböden (Agarplatten) enthielten zusätzlich 2% Agar.

Zur Selektion Plasmid-haltiger Hefezellen oder von Hefezellen die ins Genom integrierte Markergene trugen, wurden die Zellen in Minimalmedium kultiviert, dem die entsprechende Aminosäure oder Base nicht zugesetzt war.

Galaktose- bzw. Raffinose-haltige Medien (YPG/SG bzw. YPR/SR) enthielten, statt Glukose, 2% Galaktose bzw. 2% Raffinose. Um ein Zerfallen des Trisaccharides Raffinose zu verhindern, wurde die verwendete Stocklösung (20%ig) zur Sterilisation filtriert. Alle anderen Komponenten der Medien wurden autoklaviert.

Fluorotat-haltige Platten enthielten 1g/l FoA in Minimalmedium.

Minimalsporulationsmedium enthielt als einzige Komponente 1% Kaliumacetat.

Zur Herstellung von Thiabendazol-haltigen Agarplatten wurde eine Stocklösung mit 20mg/ml Thiabendazol (TBZ) in 100% Dimethylformamid (DMF) hergestellt. Zu ca. 50°C heißem YPD-Medium mit 2% Agar wurde TBZ bis zu einer Endkonzentration von 75µg/ml zugegeben.

Herstellung von Methylmethansulfonat-Gradienten:

Methylmethansulfonat (MMS) wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,2% zum auf ca. 50°C abgekühlten Agar gegeben. Eine schräge Agarschicht wurde gegossen, in dem die Petrischalen auf einer Seite auf einer 0,3mm hohen Unterlage bis zur Verfestigung des Agars schräg gestellt wurden. Diese schräge Schicht wurde mit YPD-haltigem Medium überschichtet. Auf diese Weise erhielt man Platten mit einem Konzentrationsgradienten von 0 bis 0,2% MMS.

Die Zellen wurden je nach verwendetem Stamm bei 23°C bis 30°C kultiviert.

2.1.7.2 Medien zur Anzucht von *E. coli*-Stämmen

Luria-Bertani (LB) Medium: 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl

SOC-Medium: 2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 20mM Glukose,
10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄,
pH7,5

Zur Selektion auf Zellen mit Plasmid-codierter Ampicillinresistenz wurde das Medium mit 100µg/ml Ampicillin versetzt. Die Zellen wurden bei 37°C kultiviert. Feste Nährböden enthielten zusätzlich 2% Agar.

2.2 Methoden

Die hier nicht im Einzelnen beschriebenen angewandten molekularbiologischen Experimente wurden nach Standardmethoden durchgeführt (Maniatis *et al.* 1982).

2.2.1 Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen

Die Transformation der Hefen erfolgte im Allgemeinen nach der von Dohmen, *et al.* (1991) beschriebenen Methode. Zur Erreichung einer besonders hohen Transformationseffizienz wurde auch die Methode von Gietz, *et al.* (1995) verwendet. Die *ulp2*-Mutanten reagierten hypersensitiv gegenüber dem in der von Gietz, *et al.* (1995) beschriebenen Lithium-Acetat, daher wurden diese Mutanten nur mit Hilfe der von Dohmen, *et al.* (1991) beschriebenen Methode transformiert.

2.2.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

Die Transformation von *E. coli* Zellen wurde gemäß dem Protokoll 3 von Hanahan (1985) durchgeführt oder durch Elektroporation mit Hilfe des EasyjecT Optima Elektroporators der Firma Equibio/Peqlab, Die Herstellung der kompetenten Zellen erfolgte dabei nach der vom Hersteller empfohlenen Methode.

2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte mit Hilfe der Präparationskits der Firma Qiagen, Hilden, nach Anleitung des Herstellers.

2.2.4 DNA-Präparation aus *S. cerevisiae*

Zur Rückgewinnung von Plasmiden aus der Hefe wurde die Methode von Robzyk und Kassir 1992 verwandt. Hierzu wurden Zellen einer 2-4ml Ü.N.-Kultur pelletiert (Zentrifugation 1min/12000×g). Diese wurden in 100µl STET (8% Sukrose, 50mM Tris-HCl pH8, 50mM EDTA, 5% Triton X-100) resuspendiert, Nach Zugabe von einer dreiviertel des Volumens entsprechenden Menge Glassperlen (Ø 0,45mm) erfolgte der Aufschluss der Zellen durch fünfminütiges Schütteln bei max. Geschwindigkeit auf einem IKA-Vibrax-VXR (Janke&Kunkel). Nach Zugabe von weiteren 100µl STET wurde die Suspension 5min aufgeköcht. Unlösliche Bestandteile wurden bei 12000×g/4°C/10min abzentrifugiert und der DNA-enhaltende Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der Proteine erfolgte nach Zugabe von einem halben Volumen Ammoniumacetat (7,5M) bei -20°C für ca. 1 Stunde. Nach Abzentrifugation der präzipitierten Proteine (10min/12000×g/4°C) erfolgte die Präzipitation der Nukleinsäuren aus dem Überstand durch Zugabe des zweifachen Volumens Ethanol (eiskalt, 96%). Restliche Salze wurden mit 70%tigem Ethanol heraus gewaschen und die DNA in 20µl Tris-HCl (10mM, pH8,0) rehydriert. Die gewonnene DNA wurde dann zur Amplifikation in *E. coli* transformiert.

2.2.5 DNA-Restriktion

Die Restriktion der DNA erfolgte nach Angaben der Hersteller der verwendeten Restriktionsendonukleasen. Pro µg DNA wurden 2-5U Enzym verwendet.

2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von linearen DNA-Fragmenten wurde die DNA Ligase des Phagen T4 (Gibco Life Technologies) verwendet. Die Reaktionsansätze wurden nach Angaben des Herstellers angesetzt und entweder 1h bei 23°C oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

2.2.7 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine *In-vitro*-Technik, mit der gezielt DNA-Abschnitte mit Hilfe von zwei Oligonukleotiden mit freien 3'-OH-Enden amplifiziert werden können. Zur Amplifikation dieser definierten DNA-Fragmente wurde die PCR unter Verwendung des „High Fidelity Kits“ der Firma Roche oder der *Taq*-Polymerase der Firma Peqlab durchgeführt. Die Puffer wurden nach Angaben der Hersteller verwendet. Bei den verschiedenen Reaktionsansätzen wurde jeweils 2,5mM MgCl₂ eingesetzt. Als Matrize für die Reaktion wurde entweder Plasmid-DNA, genomische Hefe-DNA oder, für analytische Zwecke, *E. coli*-Zellen oder Zellen einer Hefekolonie verwendet. Zur Verwendung von *E. coli*-Zellen wurde 1µl einer frischen Kultur in das Reaktionsgefäß gegeben. Bei der Verwendung von Hefezellen wurde ein geringer Teil einer Kolonie zur

Lyse und Denaturierung der Membran in ein Reaktionsgefäß überführt und 1min bei 600 Watt in der Mikrowelle aufgekocht (nach Huxley, *et al.* 1990).

Die Kettenreaktion lief nach folgendem Schema ab:

Vollständige Denaturierung der DNA durch das Erhitzen auf 94°C für 3min;

27-35 Zyklen einer Schleife aus

1. Denaturierung: 30sek bei 94°C
2. Hybridisierung: 1min bei 45-68°C je nach verwendeter Matrize und Schmelztemperatur T_m der Oligonukleotide ($T_m=4\times(G/C)+2\times(A/T)-4$)
3. Elongation: 0,75min pro kb bei 72°C

2.2.8 Elektrophoretische Auftrennung von DNA.

Zur Trennung und Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Die Auftrennung von 0,1-20Kb Fragmenten erfolge in 0,8%-2,0%igen Agarosegelen bei 25-30mA. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1×TAE (40mM Tris-Acetat, pH8,0, 1mM EDTA) verwendet. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid im Gel angefärbt (Endkonzentration Ethidiumbromid im Agarosegel: 10mg/ml). Durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (312-366nm) wurde die DNA anschließend sichtbar gemacht.

2.2.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten.

Die Aufreinigung der mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte nach dem Protokoll der Firma Qiagen mittels des PCR-Aufreinigungs-Kits.

Zur Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen wurde nach Angaben des Hersteller das „Qiaex II Agarose Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen verwendet.

2.2.10 Zellbiologische Methoden

2.2.10.1 Untersuchung zur Lyse der Zellen.

Die bei permissiven Temperaturen auf Minimalmedien angezogenen Zellen wurden einem Hitzeschock ausgesetzt, indem die Platten für drei Stunden bei 37°C gelagert wurden. Die Platten wurden dann mit BCIP-haltiger Agarose überschichtet (10mM BCIP in 1% Agarose/0,05M Glycin pH9,5-Suspension). Die Spaltung des BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat) durch freigesetzte intrazelluläre alkalische Phosphatasen führt zur Präzipitation des blau gefärbten Abbauprodukts Indoxylphosphat.

2.2.10.2 Induzierung von Zellzyklus-Arresten

G₁-Arrest: (Nur bei *MATa*-Zelltypen möglich)

Zur Arretierung einer Zellkultur in der G₁-Phase wurde das Medium durch Zugabe von Natriumcitrat (pH4,5, Endkonz. 0,1M) angesäuert. Dies diente der Stabilisierung des Paarungspheromons α -Faktor. Nach Zugabe von 10 μ M α -Faktor wurden die Kulturen weiter inkubiert, bis nach mikroskopischer Untersuchung mind. 90% der Zellen in der G₁-Phase arretiert waren.

G₂/M-Arrest:

Die Zellen wurden in der G₂/M-Phase des Zellzyklus durch Zugabe von Nocodazol arretiert. Das Mikrotubuli-destabilisierende Nocodazol verhindert die Elongation der Spindel im Verlauf der Anaphase. Die Zellen arretieren somit mit großen Tochterzellen. Nocodazol wurde bis zu einer Endkonzentration von 15 μ g/ml zu den Zellkulturen gegeben und diese bis zur Erreichung des Zellzyklusarrest für drei bis fünf Stunden weiter inkubiert.

2.2.11 Methoden der Hefegenetik

Zur Kreuzung von haploiden Hefestämmen, Sporulation und Tetradenanalyse wurden Standardmethoden angewendet (Rose, *et al.* 1990).

***In-vivo*-Rekombination:**

In dieser Arbeit wurden verschiedene Mutanten konstruiert, in denen ein Wildtyp-Gen an seinem normalen chromosomalen Locus gegen ein *in vitro* generiertes Allel ausgetauscht wurde. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass sich der Ausgangsstamm und der resultierende Stamm nur in dem veränderten Allel unterscheiden. Zur Integration der gewünschten Allele wurde nach dem Verfahren von Rothstein (1983) vorgegangen. Es wurden DNA-Fragmente amplifiziert, die das gewünschte Allel und einen selektierbaren Marker enthielten. Diese Allele waren an ihren 5'- und 3'-Enden flankiert von Sequenzen (40-50bp), die homolog zu den chromosomalen Sequenzen des Integrationsortes waren. Diese Bereiche der DNA sind die Angriffspunkte für die Rekombination *in vivo* in das Genom der Hefezelle. Auf diese Weise wurden sowohl Disruptionskassetten als auch C-terminale Epitopmarkierungen in das Genom der Zellen eingebracht. Amplifiziert wurden die Allele durch PCR oder durch die vorherige Klonierung in ein Plasmid.

Der korrekte Austausch an dem gewünschten Locus wurde über analytische PCR festgestellt (siehe oben). Hierzu wurden Oligonukleotide verwendet, die entweder mit dem Markergen des eingefügten Allels hybridisieren, oder mit einer chromosomalen Sequenz außerhalb der integrierten Kasette. Wenn ein PCR-Produkt entstand, konnte davon ausgegangen werden, dass das Allel am gewünschten chromosomalen Locus vorlag.

2.2.12 Biochemische Methoden

2.2.12.1 Herstellung von zellfreien Proteinextrakten

Da die Anheftung von SUMO an andere Proteine reversibel ist und die SUMO-spezifischen Proteasen nur bei bestimmten Aufschlussbedingungen inaktiviert werden können, war es notwendig verschiedene Aufschlussmethoden und Proteinextraktionen zu verwenden. Das erhaltene Bandenmuster der SUMO-Konjugate war unterschiedlich je nach verwendeter Extraktionsmethode. Die einzelnen Methoden sind unter Angabe des Verwendungszweckes im Folgenden aufgeführt.

2.2.12.1.1 Proteinextraktion mittels alkalischer Lyse.

Mit Hilfe des Zellaufschlusses durch alkalische Lyse konnten denaturierte, sumoylierte Proteine aus den Zellen extrahiert werden. Die in den Abbildungen 12, 13 und 20A analysierten Proteinextrakte wurden mit dieser Methode gewonnen (modifiziert nach Johnson, *et al.* 1997).

Zellen einer exponentiell wachsenden Hefekultur wurden bei 3000×g 3min abzentrifugiert, mit H₂O (Hälfte des Ausgangsvolumens) gewaschen und die Zellsedimente in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Durch Resuspension der gefrorenen Zellen in 1,85N NaOH, 7,4% β-Mercaptoethanol wurden diese lysiert (mind. 10min Inkubation auf Eis). Die Proteine wurden nach Zugabe des gleichen Volumens 50%iger Trichloressigsäure (eiskalt, w/v) präzipitiert. Nach mind. 10min Inkubation auf Eis wurden diese 10min bei 12000×g/4°C abzentrifugiert. Das Protein-Sediment wurde mit 1ml eiskaltem Aceton (80%) gewaschen. Die Proteine wurden nach Trocknung in UKSM-Puffer (9,5M Harnstoff, 5mM K₂CO₃, 1,25% SDS, 5% β-Mercaptoethanol) durch Schütteln bei Raumtemperatur zurückgelöst. Unlösliche Bestandteile wurden 10min bei 12000×g bei Raumtemperatur abzentrifugiert.

2.2.12.1.2 Proteinextraktion aus Sphäroplasten

Die mit Hilfe dieser Extraktionsmethode gewonnenen sumoylierten Proteine lagen in nativem Zustand vor. Die in den Abbildungen 20B, 22A und 27 verwendeten Proteinextrakte wurden auf diese Weise gewonnen.

Zellen einer exponentiell wachsenden Hefekultur wurden bei 3000×g 3min abzentrifugiert und zweimal in dem halben Kulturvolumen mit PS-Puffer (0,1M KPO₄-Puffer, pH7,5, 1,2M Sorbit) und einmal mit 1/4 Vol. gewaschen. Zum Abbau der Zellwand wurden die Zellen in 1ml PS-Puffer mit 0,2mg Lyticase und 0,2% β-Mercaptoethanol resuspendiert und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit 1ml PS-Puffer gewaschen und durch Zugabe von Lysis-Puffer (150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM HEPES, pH7,5, 1% Triton X-100 v/v, 10mM NEM) aufgeschlossen. Unlösliche Zellfragmente wurden durch Zentrifugation bei 12000×g/4°C für 10min entfernt.

2.2.12.1.3 Proteinextraktion durch Glassperlen-Aufschluss

Der Glassperlen-Aufschluss der Zellen führte zur vollständigen Dekonjugation von sumoylierten Proteinen, unabhängig von der Zugabe von Proteaseinhibitoren wie N-Ethylmaleimid (NEM). Die in Abb. 25 aufgetragenen Proteinextrakte wiesen demnach keine sumoylierten Proteine auf.

Die Zellen wurden nach dem Protokoll von Dohmen *et al.* (1995) aufgeschlossen: Zellen einer Kultur wurden bei 3000×g 3min abzentrifugiert, mit 0,5 Vol. H₂O gewaschen und in Lysispuffer (150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM HEPES, pH7,5, 1% Triton X-100 v/v) resuspendiert. Zur Inhibition von Proteasen wurde dem Puffer 10mM NEM sowie eine Proteaseinhibitor-Mixtur von Roche zugesetzt. Nach Zugabe von 2/3 Vol. Glassperlen (Ø 0,45mm) erfolgte der Aufschluss der Zellen durch dreiminütiges Schütteln auf einem IKA-Vibrax-VXR (Janke & Kunkel) bei maximaler Schüttelfrequenz. Unlösliche Zellbestandteile wurden 10min bei 12000×g und 4°C abzentrifugiert.

2.2.12.2 Detektion von Proteinen

Die Proteine wurden über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli 1970 aufgetrennt. Die Proben wurden vor der Auftrennung in Probenpuffer aufgenommen (Endkonzentration 50mM Tris-HCl, 10% Glycerin, 2% SDS, 0,01% Bromphenolblau, 1% β-Mercaptoethanol). Es wurden das „Mini ProteanII“-System der Firma BioRad oder das Hoefer SE400-Gelsystem von Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 80V bzw. 150V.

Zur Western-Blotanalyse wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran (PVDF) übertragen. Der Transfer der Proteine erfolgte falls nicht anders angegeben für 60min bei 70Volt in einem Tankblot-System (BioRad). Der Immunologische Nachweis der Proteine erfolgte nach der von Ramos, *et al.* 1998 beschriebenen Methode.

2.2.13 Zytologische Detektion von Proteinen durch indirekte Fluoreszenz-Markierungen

Bei der indirekten Immunfluoreszenz wurden die Zellen nach Fixierung und Permeabilisierung mit Antikörpern inkubiert, die intrazellulär an das von ihnen erkannte Protein binden. Mit einem zweiten Antikörper, der spezifisch den primären bindet und an eine fluoreszierende Substanz gekoppelt ist, wurde dann die Lage der Primär gebundenen Antikörpern sichtbar gemacht. Die Fluoreszenz der Farbstoffe wurde bei Bestrahlung mit einer Quecksilberlampe (HB100, Zeiss) unter Verwendung geeigneter Einlass- und Emissionsfilter sichtbar gemacht. Die Präparate wurden mit dem Zeiss Axioplan2 betrachtet und mit einer digitalen Quantix-Kamera (Photometrix) aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit dem Metamorph Imaging System (Metamorph).

Die von Pringle, *et al.* (1989) entwickelte Methode wurde modifiziert. Da diese Methode im Verlauf dieser Arbeit von mir in der Arbeitsgruppe etabliert wurde, wird an dieser Stelle eine schematische Auflistung der Methode gewählt.

Lösungen (alle sterilfiltriert):

PBS 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na₂HPO₄, 1,4mM KH₂PO₄

Phosphatpuffer: 0,1M K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 6,5, 0,5mM MgCl₂

PS-Puffer 0,1M KH₂PO₄ pH 7,5, 1,2M Sorbitol

10mg/ml Lyticase in PS-Puffer

10 % Triton

0,1%l Polylysin (Sigma)

PBS-BSA-Lösung: 10mg/ml BSA in PBS (BSA muss IgG frei sein!)

Bisbenzimid-Lösung: 0,1M Hoechst Nr.33258 (Lagerung bei -20°C)

Einbettmedium 100mg p-Phenylendiamin wurden in 10ml PBS gelöst und mit 0,5M Na₂CO₃ auf einen pH-Wert von 9,0 eingestellt. Mit Glycerin wurde dann auf 100ml aufgefüllt. Aliquots dieses Mediums wurden bei -80°C gelagert. Das Phenylendiamin verhindert das schnelle Ausbleichen der Fluoreszenz.

Vorbereitung der 8-Loch-Objektträger

Auf saubere Objektträger wurden je Loch 20µl 10mg/ml Polylysin aufgetragen und für ca. 1min inkubiert. Das Polylysin wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, die Objektträger an der Luft getrocknet, zweimal mit Wasser und zweimal mit PBS gewaschen.

Fixierung der Zellen

1,4ml einer Kulturen wurden durch Zugabe von 100µl Formaldehyd ca. 30min bei RT unter leichtem Schwenken vorfixiert. Die Zellen wurden dann 1min bei 3000×g abzentrifugiert. und in 1ml Phosphatpuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 50µl Formaldehyd wurden die Zellen über Nacht bei 4°C oder 1-2 Stunden unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Zellen wurden zweimal mit Phosphatpuffer und zweimal mit PS-Puffer gewaschen.

Entfernung der Zellwand

Das Zellpellet wurde in 1ml PS-Puffer mit 2µl β-Mercaptoethanol und 20µl Lyticaselösung aufgenommen und 60min bei 37°C im Wasserbad unter gelegentlichem vorsichtigem Schütteln inkubiert. Der Abbau der Zellwand wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Lyticase-Lösung wurde durch zweimaliges Waschen mit je 1ml PS-Puffer entfernt. Die Zellen wurden in 1ml PS-Puffer mit 10µl 10% Triton X-100 aufgenommen, 5min bei RT vorsichtig geschwenkt und noch einmal mit 1ml PS-Puffer gewaschen. Je 15µl der permeabilisierten Zellen wurden pro Loch auf die Objektträger aufgegeben. Dann ließ man die Zellen 1min auf der Polylysin-Oberfläche binden.

Immunreaktion

Alle Inkubationen erfolgten in einer dunklen Feuchthaltekammer bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und durch Tropfen PBS aus einer Pasteur-Pipette und wieder Absaugen dieser Lösung ersetzt. Alle Wasch-Schritte verliefen folgendermaßen: Je 12 mal wurden PBS-Tropfen auf das Loch gegeben und abgesaugt. Nachdem alle Löcher gewaschen waren, wurde der Objektträger um 90° gedreht und wieder alle Löcher gewaschen, usw. Insgesamt wurden die Zellen von allen vier Seiten auf diese Weise gewaschen. Dann wurden je 20µl PBS-BSA-Lösung aufgetropft, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Nach 10min wurde diese wieder abgesaugt und der primäre Antikörper in 20µl PBS-BSA-Lösung aufgetragen und 90min inkubiert. (Die verwendeten Verdünnungen sind in Abschnitt 2.1.6 angegeben.) Anschließend wurde je 4× mit 12 Tropfen PBS gewaschen. Mit dem sekundären, Cy3-markierten Antikörper wurde entsprechend vorgegangen. Zum Schluss wurde wieder mit PBS gewaschen.

Färbung des Zellkerns

Das fluoreszierende Bisbenzimid interkaliert in den DNA-Doppelstrang und erlaubt so die Lokalisation des Zellkerns. Die Bisbenzimid-Lösung wurde vor Gebrauch 1:500 mit PBS verdünnt. 20µl dieser Verdünnung wurden je Loch aufgetragen. Nach 5-minütiger Inkubation wurde wieder mit PBS gewaschen.

Versiegeln der Objektträger

Um eine Lagerung der Objekte zu ermöglichen und ein zu schnelles Ausbleichen der fluoreszierenden Farbstoffe zu verhindern, wurden die Objektträger versiegelt. Hierzu wurden das PBS abgesaugt und die Objektträger getrocknet. Das Einbettmedium wurde auf den Mittelstrich des Objektträgers gegeben, ein 24 x 60 mm Deckglas darauf gelegt und alle Luftblasen entfernt. Die Ränder wurden gegen Austrocknung mit Nagellack versiegelt.

2.2.14 Bestimmung des DNA-Gehaltes von Zellen mittels FACS-Analyse

Der DNA-Gehalt der Zellen in Kulturen wurde mit Hilfe der FACS-Analyse („Fluorescence activated cell sorting“) bestimmt. Hierzu wurden exponentiell wachsende Kulturen verwendet. Die DNA der Zellen wurde mit Propidiumjodid fluoreszierend markiert. Jeweils 20.000 Zellen wurden mit Hilfe des FACSort von Becton-Dickinson bei 488nm mittels Durchfluss-Zytometrie analysiert. Da nur der DNA-Gehalt pro Zelle detektiert wurde, ist diese Messung unabhängig von der Größe der Zellen. In Histogrammen wird die Anzahl der Zellen mit einem bestimmten DNA-Gehalt dargestellt. Die Vorbereitung der Zellen erfolgte nach der Methode der Arbeitsgruppe J. Hegemann (Inst. für Mikrobiologie, Düsseldorf). Die Analyse erfolgte unter Anleitung von Sabine Klein aus dieser Arbeitsgruppe.

Ungefähr $1,5 \times 10^7$ Zellen einer exponentiell wachsenden Kultur wurden bei $4000 \times g$ für 3min abzentrifugiert und in 1ml 0,2M Tris-HCl pH7,5 gewaschen. Die Zellen wurden in 1ml 70% Ethanol, 0,2M Tris-HCl aufgenommen und über Nacht bei $4^\circ C$ fixiert. Das Ethanol wurde durch zweimaliges Waschen mit 0,2M Tris-HCl entfernt und ca. 1×10^6 Zellen pro Messung in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Entfernung der RNA wurde 01mg/ml RNase A zugegeben und die Suspension 2 Stunden bei $37^\circ C$ inkubiert. Das Enzym wurde durch zweimaliges Waschen mit 0,2M Tris-HCl entfernt. Die Zellen wurden dann in 0,05mg/ml Propidiumjodid-Lösung aufgenommen, und dann direkt gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 Proteine des SUMO-Konjugationssystems sind in Eukaryoten konserviert

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem SUMO-Modifikationssystem, welches mit dem Ubiquitin-System verwandt ist. Da das Ubiquitin und die für die Ubiquitylierung notwendigen Enzyme in allen Eukaryoten verbreitet sind, stellte sich die Frage, ob auch das SUMO-System in Eukaryoten konserviert ist. Mit Hilfe von computergestützten Recherchen wurden verschiedene Datenbanken nach Sequenzen mit Homologie zu den bekannten Komponenten des SUMO-Systems durchsucht. Der stetige Zuwachs an Informationen in Genomdatenbanken ermöglichte es, homologe Proteine von allen bis dahin bekannten Enzymen des SUMO-Systems in verschiedenen Organismen zu identifizieren. Es wurden zu den bekannten Enzymen der Bäckerhefe *S. cerevisiae* homologe Proteine in höheren Eukaryoten, von der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* (*Sp*), über *Arabidopsis thaliana* (*At*), den Nematoden *Caenorhabditis elegans*, (*Ce*), die Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*, *Dm*), bis hin zu Maus (*Mus musculus*, *Mm*) und Mensch (*Homo sapiens*, *Hs*) identifiziert (siehe Abb. 6 und 7). In daraufhin untersuchten Prokaryoten konnten keine näher verwandten Sequenzen gefunden werden.

Der Vergleich der Sequenzen der verschiedenen Proteine ergab, dass nur das SUMO-konjugierende Enzym Ubc9p eine sehr nahe Verwandtschaft mit vergleichbaren Enzymen des Ubiquitin-Systems aufweist. Die Aminosäuresequenz des humanen UBC9-Proteins, auch UBE2I genannt, ist zu 56% identisch mit dem entsprechenden Protein der Hefe *S. cerevisiae*. Die Sequenz ist zu ca. 40% identisch mit Ubiquitin-konjugierenden Proteinen.

In Metazoen existiert nicht nur ein SUMO-codierendes Gen, wie in Hefen, sondern mehrere. Der Mensch weist drei verschiedene SUMO-Proteine auf. Die Aminosäuresequenz von SUMO-1 ist zu 51% identisch mit der von SUMO-2 und SUMO-3. Die beiden letzteren unterscheiden sich nur in sechs ihrer Aminosäurereste. Die Sequenz der drei ist zu zirka 48% identisch mit der des SUMO-Proteins der Hefe (Abb. 6).

<i>Sc</i> SUMO	1	M S D S E V N Q E A K P E V K P E V K P - - E T H I N L K V S D -	
<i>Os</i> SUMO	1	- - - - M S A A G E E D K K P A G G E G G G A H I N L K V K G Q	
<i>Hs</i> SUMO-2	1	- - - - M A D E K P K E G V K T E N N - - - - D H I N L K V A G Q	
<i>Hs</i> SUMO-3	1	- - - - M S E E K P K E G V K T E N - - - - D H I N L K V A G Q	
<i>Hs</i> SUMO-1	1	- - - - M S D Q E A K P S T E D L G D K K E G E Y I K L K V I G Q	
<i>At</i> SUMO	1	- - - - M S A N Q E E D K K P G D G - - - G A H I N L K V K G Q	
<i>Sp</i> Pmt3	1	- - - - - - - - - M X K P S T E - - - - H I N L K V V G Q	
<i>Ce</i> SUMO	1	- - - - M A D D A A Q - - - - A G D N - - A E Y I K I K V V G Q	
Ubiquitin	1	- - - - - - - - - - - - - - - - Q I F V K T L T -	
<i>Sc</i> SUMO	31	G S S E I F F K I K K T T P L R R L M E A F A K R Q G K E M D S L	
<i>Os</i> SUMO	29	D G N E V F F R I K R S T Q L K K L M N A Y C D R Q S V D M N A I	
<i>Hs</i> SUMO-2	26	D G S V V Q F K I K R H T P L S K L M K A Y C E R Q G L S M R Q I	
<i>Hs</i> SUMO-3	25	D G S V V Q F K I K R H T P L S K L M K A Y C E R Q G L S M R Q I	
<i>Hs</i> SUMO-1	30	D S S E I H F K V K M T T H L K K L K E S Y C Q R Q G V P M N S L	
<i>At</i> SUMO	26	D G N E V F F R I K R S T Q L K K L M N A Y C D R Q S V D M N S I	
<i>Sp</i> Pmt3	17	D N N E V F F K I K K T T E F S K L M K I Y C A R Q G K S M N S L	
<i>Ce</i> SUMO	23	D S N E V H F R V K Y G T S M A K L K K S Y A D R T G V A V N S L	
Ubiquitin	10	G - K T I T L E V E S S D T I D N V K S K I Q D K E G I P P D Q Q	
<i>Sc</i> SUMO	64	R F L Y D G I R I Q A D Q T P E D L D M E D N D I I E A H R E Q I	
<i>Os</i> SUMO	62	A F L F D G R R L R G E Q T P D E L E M E D G D E I D A M L H Q T	
<i>Hs</i> SUMO-2	59	R F R F D G Q P I N E T D T P A Q L E M E D E D T I D V F Q Q Q T	
<i>Hs</i> SUMO-3	58	R F R F D G Q P I N E T D T P A Q L R M E D E D T I D V F Q Q Q T	
<i>Hs</i> SUMO-1	63	R F L F E G Q R I A D N H T P K E L G M E E E D V I E V Y Q E Q T	
<i>At</i> SUMO	59	A F L F D G R R L R A E Q T P D E L D M E D G D E I D A M L H Q T	
<i>Sp</i> Pmt3	50	R F L V D G E R I R P D Q T P A E L D M E D G D Q I E A V L E Q L	
<i>Ce</i> SUMO	56	R F L F D G R R I N D D D T P K T L E M E D D D V I E V Y Q E Q L	
Ubiquitin	42	R L I F A G K Q L E D G R T L S D Y N I Q K E S T L H L V L R L R	
<i>Sc</i> SUMO	97	G G A T Y	101
<i>Os</i> SUMO	95	G G C L P A	100
<i>Hs</i> SUMO-2	92	G G V Y	95
<i>Hs</i> SUMO-3	91	G G V P E S S L A G H S F	103
<i>Hs</i> SUMO-1	96	G G H S T V	101
<i>At</i> SUMO	92	G G G A K N G L K L F C F	104
<i>Sp</i> Pmt3	83	G G C T H L C L	90
<i>Ce</i> SUMO	89	G G F	91
Ubiquitin	75	G G . . .	76

Abb. 6: Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener SUMO-Proteine mit Ubiquitin aus *S. cerevisiae*. Identische Aminosäurereste sind schwarz oder grau unterlegt. Die Di-Glycinsequenz, welche den C-Terminus der reifen SUMO-Proteine bildet, ist rot unterlegt. (*Sc*, *S. cerevisiae*; *Os*, *Oryza sativa*; *Hs*, *Homo sapiens*; *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Sp*, *Schizosaccharomyces pombe*; *Ce*, *Caenorhabditis elegans*).

Im Gegensatz zu den Ubiquitin-aktivierenden Enzymen (E1, Uba1p) besteht das SUMO-aktivierende Enzym aus zwei Untereinheiten, Aos1p und Uba2p. Diese beiden Untereinheiten spiegeln dabei die Domänen des Amino- bzw. Carboxyterminus der Ubiquitin-aktivierenden Enzyme wider. Die humanen *AOS1*- und *UBA2*-codierenden Gene liegen in nächster Nähe auf Chromosom 16 (LocusID 10054). In anderen Organismen, auch in der Hefe, sind die codierenden Sequenzen auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert. Das humane Uba2-Protein und das der Hefe *S. cerevisiae* weisen 35% identische Aminosäurereste auf. Im Fall von Aos1p sind es 34%. Vergleicht man die Sequenzen von Aos1p und Uba2p mit den N- beziehungsweise C-terminalen Domänen des Uba1-Proteins stellt man eine ca. 26-prozentige Identität fest.

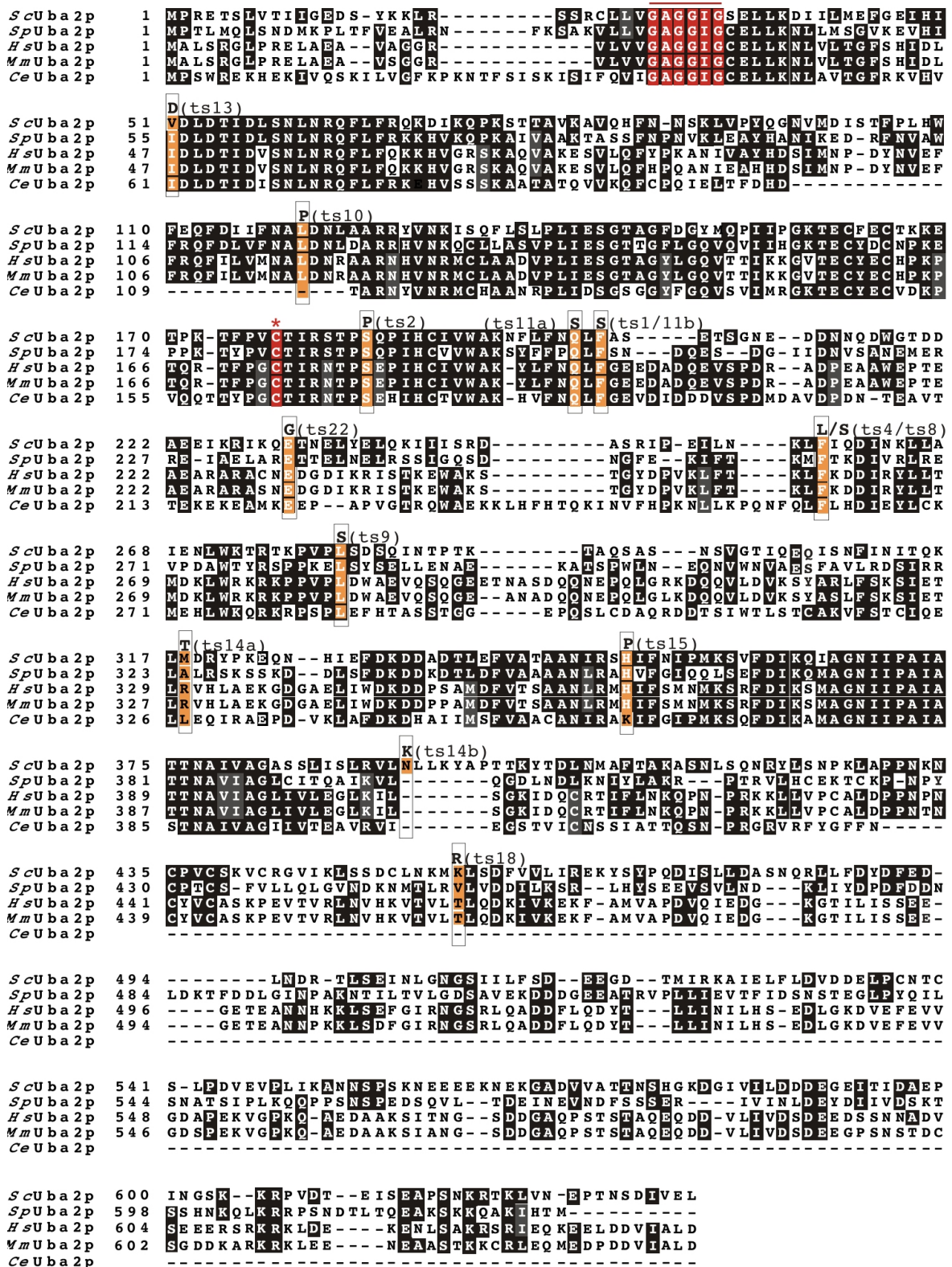


Abb. 7: Sequenzvergleich von Uba2-Proteinen aus verschiedenen Spezies. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der Uba2-Proteine aus *S. cerevisiae* (ScUba2p), der Spaltheefe *S. pombe* (SpUba2p), dem Nematoden *C. elegans* (CeUba2p), sowie aus der Maus (*MmUba2p*) und dem Menschen (*HsUba2p*). Die Positionen der im Hefeprotein eingeführten Mutationen sind orange unterlegt. Die ATP-Bindestelle sowie das Cystein am aktiven Zentrum sind rot unterlegt.

Obwohl verschiedene SUMO-Proteine in höheren Eukaryoten exprimiert werden, gibt es offenbar nur jeweils ein aktivierendes und ein konjugierendes Enzym. Die Funktion der verschiedenen SUMO-Proteine bleibt daher noch ungeklärt.

3.2 Phänotypische Charakterisierung von *uba2*-Mutanten

Die Aktivierung von SUMO ist der initiiierende Schritt dieses essentiellen posttranslationalen Modifikationssystems. Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden konditionale Mutanten von *UBA2* isoliert, die einen temperatursensitiven Defekt aufweisen (Schwienhorst 1997).

Die ersten phänotypischen Untersuchungen zeigten, dass Defekte bei der SUMO-Aktivierung und damit der SUMO-Konjugation nicht zu Defekten beim Abbau von Proteolyse-Testsubstraten führen. Die *uba2*-Mutanten weisen weder eine Hypersensitivität gegenüber dem Arginin-Analog Canavanin, noch gegenüber Bestrahlung mit ultraviolettem Licht auf. Allerdings sind sie auch bei nicht-letalen Temperaturen nicht in der Lage, auf Medium mit 20µM Cadmiumchlorid zu wachsen (siehe Diskussion 4.1).

Diese Befunde deuteten an, dass Proteinmodifikation durch SUMO-Konjugation nicht wie im Falle der Ubiquitin-Konjugation als Abbausignal dient. Vielmehr wiesen diese Ergebnisse auf vom Ubiquitin-System distinkte Funktionen der SUMO-Modifikation hin.

3.2.1 Gestörte Zellintegrität in SUMO-Konjugationsdefizienten Stämmen

Neben der Temperatursensitivität zeigte die Mehrzahl der *uba2*-Mutanten (ts2, 8, 10, 11, 14, 15, 18, 22) eine erhöhte Sensitivität gegenüber Ethanol (Schwienhorst 1997). Dieser Befund wies auf einen Defekt bei der Zellwandstabilität hin. Für verschiedene Hefemutanten mit Defekten in der Zellintegrität konnte eine Hypersensitivität gegenüber Stressbedingungen wie Hitze und Ethanol nachgewiesen werden (zur Übersicht siehe Heinisch *et al.* 1999).

Wenn auch die erniedrigte Temperaturtoleranz der *uba2*-Mutanten durch einen Defekt bei der Zellintegrität hervorgerufen wird, dann sollte die Zugabe von osmotischen Stabilisatoren, z.B. Sorbit, ein Wachstum bei ansonsten restriktiven Temperaturen erlauben. In der Tat konnten verschiedene *uba2*-Mutanten bei 37°C wachsen, wenn 1M Sorbit im Medium enthalten war (siehe Abb. 8 und Tab. 7).

Ein weiteres Indiz für eine gestörte Zellstabilität ist die Hypersensitivität der *uba2*-Mutanten gegenüber Koffein. Schon bei Zugabe von 10mM Koffein zum Medium waren diese mit Ausnahme von auf *uba2*-ts4 nicht mehr in der Lage, bei ansonsten permissiven Temperaturen zu wachsen (Abb. 8, Tab. 7). Das Purin-Analog Koffein beeinflusst verschiedene zelluläre Prozesse. Insbesondere Mutanten mit Defekten im an

der Zellintegrität beteiligten MAP-Kinasesystem weisen eine starke Hypersensitivität auf (zur Übersicht siehe Cid *et al.* 1995).

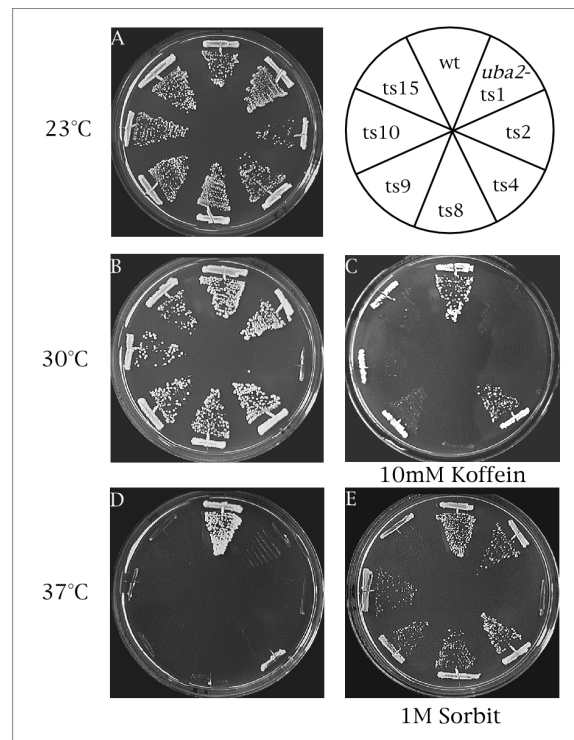


Abb. 8: Wachstum von *uba2*-Mutanten unter verschiedenen Bedingungen. Wildtyp- (wt, JD90-1B:pIS3) und *uba2*-Mutanten (*uba2*-tsX) wurden auf Platten mit Vollmedium und den angegebenen Zusatzstoffen bei den angegebenen Temperaturen für drei Tage inkubiert.

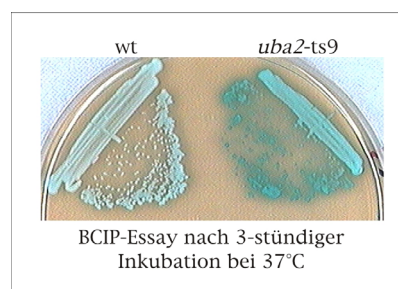


Abb. 9: *Uba2*-ts9-Mutanten lysieren bei erhöhter Temperatur. Die beiden Stämme, Wildtyp (wt, JD47-13C) und *uba2*-ts9, wurden auf Minimalmedium ausgestrichen und für zwei Tage bei permissiver Temperatur (30°C) inkubiert. Nach einem Wechsel zur restriktiven Temperatur (3 Stunden/37°C) wurde die Platte mit einem BCIP-haltigen Agar überschichtet. Die blaue Färbung dient als Nachweis für freigesetzte intrazelluläre Phosphatasen.

Eine reduzierte Zellintegrität äußert sich durch einen erhöhten Anteil an lysierten Zellen. Zum Nachweis der Zell-Lyse bei restriktiver Temperatur wurde beispielhaft mit der *uba2*-ts9-Mutante ein entsprechender Test durchgeführt (Abb. 9). Die Zellen wurden nach

dem Hitzeschock mit BCIP-haltiger Agarose überschichtet. BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat) ist ein chromogenes Substrat, nach dessen Spaltung durch alkalische Phosphatasen blau gefärbtes Indoxylphosphat präzipitiert. Dieser Versuch zeigte, dass *uba2*-ts9-Mutanten im Gegensatz zu Zellen des Wildtyps nach dreistündiger Inkubation bei 37°C in hohem Maße intrazelluläre alkalische Phosphatasen ins Medium freisetzen. Dieses Resultat bestätigt, dass die fehlende Stabilität der Zellwand und die Lyse der Zellen ein Grund für die Hypersensitivität gegenüber Hitze war.

Stamm	Mutation	Wachstum bei				Resistenz gegenüber	
		23°C	30°C	37°C	37°C + Sorbit	Ethanol	Koffein
Wildtyp	<i>UBA2</i>	++	++	++	++	++	++
<i>uba2</i> -ts1	<i>uba2</i> -F202S	++	++	-	++	+	-
<i>uba2</i> -ts2	S184P	++	-	-	-	-	-
<i>uba2</i> -ts4	F258L	++	++	-	++	++	+
<i>uba2</i> -ts8	F258S	++	+	-	++	+	-
<i>uba2</i> -ts9	L281S	++	++	-	++	+	+/-
<i>uba2</i> -ts10	L120P	++	+	-	++	+	+/-
<i>uba2</i> -ts11	Q200R, F202S	++	+/-	-	n.b.	-	-
<i>uba2</i> -ts13	V51D	++	+	-	n.b.	-	+/-
<i>uba2</i> -ts14	M318T,N393K	++	+/-	-	n.b.	-	-
<i>uba2</i> -ts15	H351P	++	+	-	-	-	+/-
<i>uba2</i> -ts18	K457R	++	+/-	-	n.b.	-	-
<i>uba2</i> -ts22	E231G	++	++	-	n.b.	-	+/-

Tab. 7: Einfluss von Hitze, Ethanol, Sorbit und Koffein auf das Wachstum von temperatursensitiven *uba2*-Mutanten. Alle Untersuchungen wurden auf Vollmedium mit den angegebenen Zusatzstoffen durchgeführt. Die Suppression durch Zugabe von 1M Sorbit wurde bei 37°C untersucht. Die Resistenz der *uba2*-Mutanten gegenüber Koffein (10mM) und Ethanol (3%) wurde bei 30°C getestet. Da die *uba2*-ts2-Mutante bei 30°C nicht wuchs, wurde diese bei 23°C inkubiert. (++, Wachstum vergleichbar mit dem Wildtypstamm; -, kein Wachstum; + und +/- stehen für entsprechend reduziertes Wachstum; n.b., nicht bestimmt).

3.2.2 Hinweise auf gestörte Mikrotubuli-Strukturen in *uba2*-Mutanten

Das SUMO-codierende Gen *SMT3* wurde als Dosis-abhängiger Suppressor einer *mif2*-Mutation isoliert (Meluh und Koshland 1995, siehe Einleitung 1.3). Mif2p ist ein Centromer-assoziiertes Protein. Daher wurde untersucht, ob *uba2*-Mutanten einen Defekt

bei der Aufrechterhaltung des Spindelapparates aufweisen. Hierzu wurden Zellen der *uba2*-Stämme auf Vollmedien ausgestrichen, die entweder 0,375% Dimethylformamid (DMF), oder in DMF gelöstes Thiabendazol (75µg/ml TBZ, 0,375% DMF) enthielten. Thiabendazol destabilisiert Mikrotubuli und damit den Spindelapparat. Es zeigte sich, dass die meisten *uba2*-Stämme hypersensitiv auf die Zugabe von TBZ reagierten (Abb. 10). Die Analyse wurde dadurch erschwert, dass einige *uba2*-Stämme schon ein verringertes Wachstum nach Zugabe des Lösungsmittels DMF zeigten, was vermutlich auf die reduzierte Zellintegrität zurückzuführen ist (siehe oben). Allerdings war bei Zusatz des TBZ's das Wachstum fast aller *uba2*-Mutanten noch deutlich stärker inhibiert.

Um weitere Hinweise auf einen Zusammenhang der Sumoylierung mit der Chromosomenverteilung zu erhalten, wurde eine konditionale *ubc9*-Mutante untersucht (Seufert *et al.* 1995). Ubc9p ist das SUMO-konjugierende Enzym, welches das vom Uba2p/Aos1p-Komplex aktivierte SUMO auf Substrate überträgt. Auch diese Mutante war nicht in der Lage auf TBZ-haltigem Medium zu wachsen (Daten nicht gezeigt). Ebenso wie Hefemutanten, die einen Defekt des Spindelapparates oder des Centromers aufweisen, zeigen SUMO-Konjugations-defiziente Hefestämme eine erhöhte Sensitivität gegenüber der Mikrotubuli-destabilisierenden Substanz Thiabendazol. Die Befunde bestätigen den Hinweis aus genetischen Zusammenhängen (siehe oben), dass die SUMO-Modifikation eine Rolle bei der Spindelintegrität spielt.

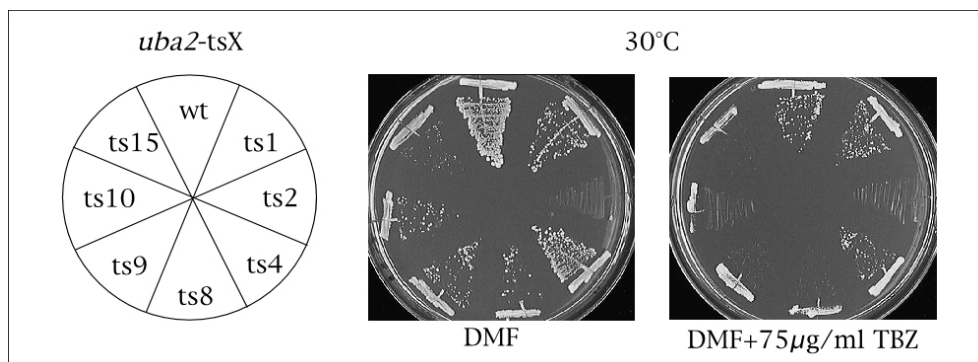


Abb. 10: Wachstum von *uba2*-Mutanten bei Zugabe von Thiabendazol. Wildtyp- (wt, JD90-1B:pIS3) und *uba2*-ts-Zellen (*uba2*-tsX) wurden auf Vollmedium mit 0,375% DMF bzw. 0,375% DMF und 75µg/ml Thiabendazol-haltigem Medium (TBZ) ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte für drei Tage bei 30°C.

3.2.3 Defekte bei der SUMO-Konjugation verursachen einen Zellzyklus-Arrest

Zellen, die eine konditionale *ubc9*-Mutation tragen (siehe oben), arretieren bei restriktiver Temperatur im Übergang der Anaphase zur Zytokinese (so genannter G₂/M-Arrest, Seufert *et al.* 1995). Bei der Betrachtung der Zellen mit *uba2*-Mutationen war ebenfalls ein solcher Arrest zu beobachten. So waren die Zellen im Vergleich zum Wildtyp

stark vergrößert und es häuften sich Zellen mit großen Knospen an. Genauere Vergleiche wurden am Beispiel der *uba2-ts9*-Mutante durchgeführt (Tab. 8, Abb. 11B).

Stamm	Zellgröße (\varnothing in μm) bei		Teilungsstadien (in Prozent)		
	30°C	37°C	ohne Knospe	kleine Knospe	große Knospe
Wildtyp	4,5(\pm 0,5)	4,7(\pm 0,7)	50,0(\pm 5,2)	35,8(\pm 6,8)	14,2(\pm 9,3)
<i>uba2-ts9</i>	7,0(\pm 0,8)	7,2(\pm 0,4)	41,3(\pm 15,6)	18,8(\pm 10,7)	40,0(\pm 10,9)

Tab. 8: Vergleich von Wildtyp (JD47-13C) und *uba2-ts9*. Zellen von exponentiell bei 30°C wachsenden Kulturen, sowie nach dreistündiger Inkubation bei 37°C, wurden nach mikroskopischen Aufnahmen ausgemessen. Die Durchschnittgröße der Mutterzellen von jeweils 20 Zellen wurde ermittelt. Das Vorkommen verschiedener Teilungsstadien ist prozentual in Relation zur Gesamtzellzahl angegeben. Ausgezählt wurden 2× ca. 70 Zellen einer für zwei Stunden bei 37°C inkubierten Kultur.

Um zu belegen, dass es sich bei dem beobachteten Zellzyklus-Arrest tatsächlich um einen G₂/M-Arrest handelt, wurde die Anordnung der Mikrotubuli mit Hilfe von primären anti- α -Tubulin-Antikörpern durch indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Des Weiteren wurden die Zellkerne mit Hoechstfarbstoff angefärbt. Deutlich zeigten *uba2*-Mutanten vermehrt Zellen mit großer Knospe, einem Zellkern der an der Mutterzelleseite der Knospungsstelle lokalisiert ist, sowie nur kurze Spindeln (Abb. 11C). Nach Hitzeschock traten zudem Zellen auf, in denen die Orientierung der Spindel nicht mehr korrekt war. Die Ausrichtung der Spindel verlief nicht in Richtung der Tochterzelle, sondern um bis zu 90° gedreht.

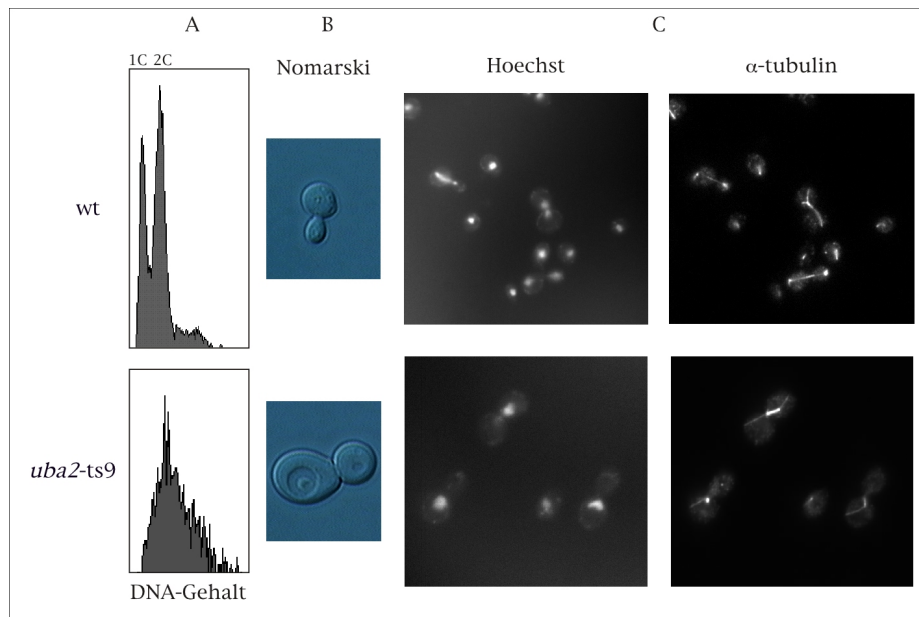


Abb. 11: Defekte bei der Aktivierung von SUMO führen zu einem G₂/M-Zellzyklusarrest. **A)** Zur Bestimmung des DNA-Gehalts der für 3 Stunden bei 37°C inkubierten Kulturen wurde die DNA mit Propidiumjodid angefärbt und mit Hilfe der FACS-Analyse (siehe Methoden) quantitativ bestimmt. **B)** Mikroskopische Aufnahme im Differenz-Interferenz-Kontrast. **C)** Zellkerne der angegebenen Stämme wurden mit Hoechst-Farbstoff angefärbt, Mikrotubuli durch Verwendung von Antikörpern gegen α -Tubulin und einem entsprechenden Fluorochrom-markiertem sekundären Antikörper.

Der DNA-Gehalt in Kulturen des Wildtypstammes im Vergleich zu *uba2*-Mutanten wurde mit Hilfe der FACS-Analyse („Fluorescence activated cell sorting“) bestimmt. Hierzu wurden exponentiell wachsende Kulturen des Wildtypstammes JD90-1B:pIS3 und der *uba2*-ts9-Mutante für drei Stunden bei 37°C inkubiert und mit Ethanol fixiert (siehe Methoden 2.2.14). Die DNA der Zellen wurde mit Propidiumjodid fluoreszierend markiert. Jeweils 20.000 Zellen wurden mit Hilfe des FACSsort von Becton-Dickinson bei 488nm mittels Durchfluss-Zytometrie analysiert (Abb. 11A). Da nur der DNA-Gehalt pro Zelle detektiert wurde, ist diese Messung unabhängig von der Größe der Zellen. Die Abbildung 11A zeigt grafisch die Anzahl der Zellen mit einem bestimmten DNA-Gehalt. Im Vergleich zum Wildtyp ist in der *uba2*-Mutante deutlich eine Anhäufung von Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt zu erkennen.

Diese Ergebnisse untermauern die Beurteilung der morphologischen Betrachtungen, dass die Zellen Schwierigkeiten beim Durchschreiten der G₂/M-Phase haben.

3.2.4 Biochemische Analyse der *uba2*-Mutanten

SUMO wird nach Aktivierung durch den Aos1p/Uba2p-Komplex über das konjugierende Enzym an Akzeptorproteine kovalent gebunden. Zur Klärung der Frage, welchen Einfluss die verschiedenen *uba2*-Allele auf die Sumoylierung von Substraten haben, wurden Proteine der verschiedenen Stämme extrahiert und einer Western-Blotanalyse unterzogen. Die Detektion der sumoylierten Proteine erfolgte mit Hilfe polyklonaler anti-SUMO-Antikörper (Abb. 12).

Erstaunlicherweise zeigten die *uba2*-Mutanten schon bei der permissiven Temperatur eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich herabgesetzte Menge an SUMO-Konjugaten (Abb. 12). Bei dieser Temperatur wuchsen die Zellen noch vergleichbar mit dem Wildtypstamm (siehe oben). Dies deutet darauf hin, dass nur ein geringer Anteil der Sumoylierung notwendig ist, um normale Zellteilungen zu gewährleisten.

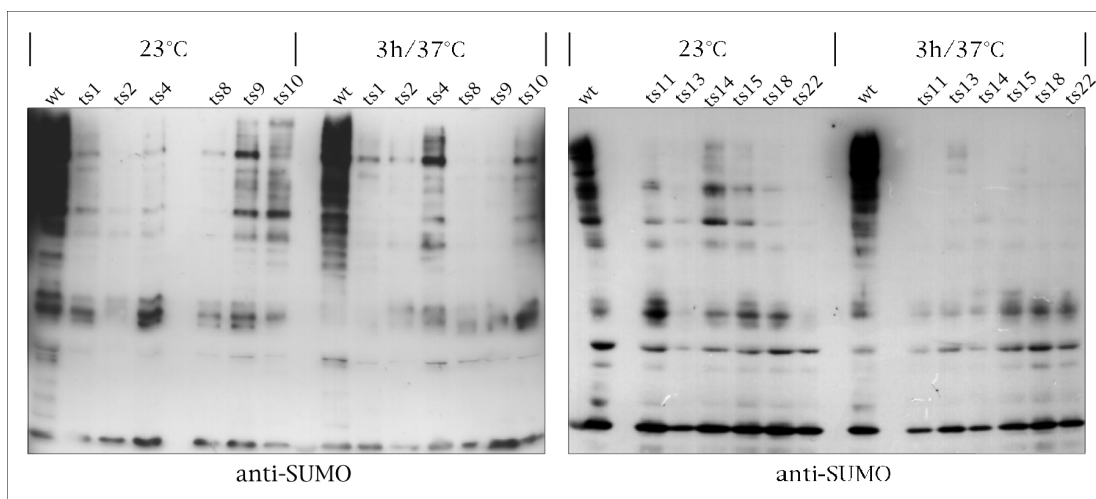


Abb. 12: Immunologische Detektion von SUMO-Konjugaten in *uba2*-Mutanten. Kulturen der angegebenen Stämme wurden bei 23°C angezogen und zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase aufgeteilt. Für drei Stunden wurde eine Hälfte weiter bei 23°C inkubiert, die andere auf 37°C erwärmt. Die Detektion nach SDS-PAGE und Western-Blot erfolgte mit anti-SUMO-Antikörpern.

Die in *uba2*-Mutanten auftretenden SUMO-Konjugate waren bezüglich der Molekulargewichte vergleichbar. Es waren allerdings leichte quantitative Unterschiede in verschiedenen Mutanten wie zum Beispiel den *uba2*-*ts1*, -*ts4* und -*ts9*-Mutanten zu erkennen (Abb. 12). Die Inkubation der Kulturen für drei Stunden bei 37°C hatte unterschiedliche Auswirkungen auf die Intensität der detektierten Proteinbanden. In den Mutanten *uba2*-*ts1*, -*ts2* und -*ts13* war kein signifikanter Unterschied vor und nach dem Hitzeschock zu detektieren. Die *uba2*-*ts4*-Mutante wies sogar eine deutlich erhöhte Menge an sumoylierten Proteinen auf. Die in diesen Mutanten exprimierten Uba2^{ts}-Proteine scheinen demnach nicht bei erhöhten Temperaturen ihre Aktivität zu verlieren, sondern weisen vielmehr schon von vornherein eine geringere Enzymaktivität auf.

Im Fall des temperatursensitiven *ubc9*-Allels konnte gezeigt werden, dass das defekte Ubc9^{ts}-Protein bei erhöhter Temperatur abgebaut wird (Betting und Seufert 1996). Um zu prüfen, inwieweit auch bestimmte der mutanten Uba2^{ts}-Proteine einem Temperatur-induzierten Abbau unterliegen, wurde deren intrazelluläre Konzentration untersucht. Zum Nachweis der Uba2^{ts}-Proteine wurden die in Abb. 12 verwandten Membranen mit anti-Uba2p-Antikörper hybridisiert (Abb. 13).

Es waren keine signifikanten quantitativen Unterschiede der jeweiligen Uba2^{ts}-Proteine bei 23°C und 37°C zu erkennen. Die Uba2^{ts}-Proteine, die von den Allelen *uba2-ts1*, *-ts2*, *-ts9* und *-ts10* codiert werden, lagen allerdings in sehr geringen, nur bei längeren Expositionen detektierbaren Mengen vor. In diesen Mutanten liegen eventuell instabilere Uba2-Proteine vor, die durch die eingefügten Mutationen schneller dem Abbau zugeführt werden. Dies würde auch die geringere Effizienz der SUMO-Konjugation schon bei permissiven Temperaturen erklären. Die Proteinmenge ist aber offensichtlich ausreichend um normales Wachstum zu erlauben.

Erstaunlicherweise wies ein Stamm, in dem das SUMO-Protein überexprimiert wurde (SUMO^{OE}), eine höhere Uba2-Proteinmenge auf. Möglicherweise wirkte sich hier der höhere Anteil an freiem SUMO in den Zellen auf die vorliegende Uba2p Konzentration aus (siehe Diskussion 4.1).

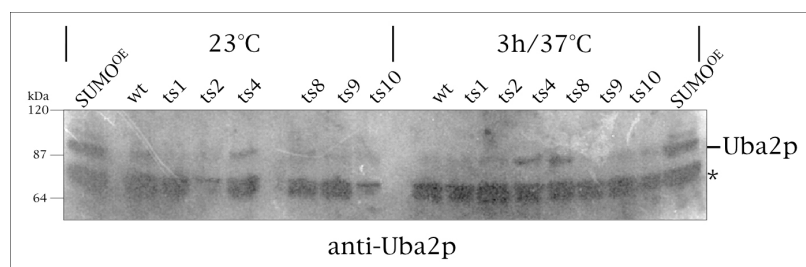


Abb. 13: Immunologischer Nachweis der Uba2^{ts}-Proteine. Nach Anzucht der angegebenen Stämme bei 23°C bis zu einer optischen Dichte von 0,8 wurden die Kulturen geteilt und entweder bei der restriktiven Temperatur von 37°C oder bei 23°C weitere drei Stunden inkubiert. Zur Detektion der Proteine wurden polyklonale anti-Uba2p-Antikörper verwendet. Ein Stern kennzeichnet kreuzreagierende Banden.

3.3 Charakterisierung von intergenischen Suppressoren der *uba2-ts9*-Mutante („*sut9-Y*“/*ulp2-Y*)

Zur Isolierung spontaner Suppressoren des temperatursensitiven Phänotyps der *uba2*-Mutanten wurden Zellen dieser Stämme für acht bis zehn Tage bei der restriktiven Temperatur von 37°C inkubiert (Schwienhorst 1997). Die rezessiven Suppressoren der Mutante *uba2-ts9* („*sut9-Y*“) ließen sich in verschiedene Komplementationsgruppen einteilen. Die *sut9-3*-Mutante wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit genauer

untersucht. Die in diesem Stamm vorliegende Suppressormutation war rezessiv, da der Stamm nach Rückkreuzung mit der *uba2-ts9*-Mutante einen diploiden Stamm mit temperatursensitivem Phänotyp ergab (Schwienhorst 1997). Weitere Rückkreuzung der *sut9-3*-Mutante mit den Mutanten *sut9-4*, *-7* und *-8* dagegen ergaben diploide Stämme, die bei der restriktiven Temperatur wuchsen. Die Mutationen *sut9-3*, *-4*, *-7* und *-8* konnten daher in eine Komplementationsgruppe eingeteilt werden, das heißt die Mutationen sind allel.

Weitere phänotypische Analysen zeigten, dass die *uba2-ts9*, *sut9-3*-Doppelmutante im Vergleich zu den Zellen des Ausgangsstammes *uba2-ts9* bei niedrigen Temperaturen ein stark verlangsamtes Wachstum aufwies (Schwienhorst 1997). Tauschte man das vorliegende *uba2-ts9*-Allel in der supprimierenden Doppelmutante *sut9-3* gegen ein plasmid-kodiertes *wtUBA2*-Allel, war der resultierende Stamm temperatursensitiv (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass die spontane *sut9-3*-Mutation im Wildtyphintergrund selbst eine Temperatursensitivität verursacht. Weiterhin kann aus diesem Befund geschlossen werden, dass nicht nur die *sut9-3*-Mutation die *uba2-ts9*-Mutation supprimiert, sondern auch umgekehrt. Diese Beobachtungen wiesen auf einen wichtigen Zusammenhang der Funktion der Proteine Uba2p und Sut9p hin.

Die weiteren Untersuchungen (siehe unten) zeigten, dass die in der Suppressormutante vorliegende Mutation eine SUMO-spezifische Protease betrafen. Diese wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Ulp2p (für englisch „Ubiquitin-like specific protease 2“) bezeichnet, da unterdessen eine weitere Protease Ulp1p beschrieben worden war (Li und Hochstrasser 1999). Die Funktionen dieser SUMO-dekonjugierenden Enzyme werden im Folgenden genauer untersucht. Um eine eindeutige Bezeichnung im Verlauf der Arbeit beizubehalten wird nachfolgend entsprechend das *sut9-3*-Allel als „*ulp2-1*“ bezeichnet, das zugehörige Wildtyp-Gen als „*ULP2*“.

Zur weiteren Analyse wurde ein Stamm konstruiert, der als einzige Mutation das *ulp2-1*-Allel aufweist. Hierzu wurden Zellen des Wildtyp-Stammes JD53 mit denen der *uba2*, *ulp2*-Doppelmutante gekreuzt (resultierender Stamm IS18). Es wurde nach Zerlegung von Tetraden eine Sporklon-Analyse durchgeführt. Diese ergab, dass diejenigen Sporklone, die sowohl das *wtUBA2*-Gen, als auch das mutierte *ulp2*-Allel trugen, nur bei Temperaturen unter 30°C auskeimen konnten. Bei Inkubation der Sporklone bei 23°C bildeten diese nach ca. acht Tagen sichtbare Mikrokolonien (IS18-M1 bis -M6). Weitere Ausstrichtests zeigten, dass Zellen, die eine Mutation im *ULP2*-Gen trugen, bis zu einer Temperatur von 33°C in der Lage waren sich zu teilen, jedoch Kolonien mit sehr heterogenen Größen bildeten. Bei höheren Temperaturen war dagegen kein Wachstum zu beobachten (siehe Abb. 14A).

Weitere genotypische und phänotypische Analysen der *ulp2*-Mutante führten im Rahmen dieser Arbeit zur Identifizierung und Charakterisierung des betroffenen Genproduktes und werden im Folgenden beschrieben.

3.3.1 Klonierung des *ULP2*-Gens

Auf Grund der funktionellen Interaktion mit Uba2p war nicht auszuschließen, dass in dem *ulp2*-Stamm ein bereits bekanntes Gen des SUMO-Systems mutiert war. Daher wurde eine Komplementationanalyse mit Zellen durchgeführt, die Defekte in am SUMO-System beteiligten Genprodukten aufwiesen. Es wurde untersucht, ob eine Allelie von *ulp2-1* mit dem SUMO-codierenden Gen *SMT3* oder dem Gen für die zweite Untereinheit des SUMO-aktivierenden Enzyms *AOS1* vorlag. Keines der beiden Gene war allel zu *ulp2-1* (Daten nicht gezeigt).

Da zu diesem Zeitpunkt keine weiteren Komponenten des SUMO-Systems bekannt waren, wurde das *ULP2*-Gen durch Komplementation des Wachstumsdefekts der *ulp2*-Mutante bei 37°C identifiziert. Unter Verwendung von zwei verschiedenen Genbanken mit genomischer *S. cerevisiae*-DNA, die auf dem Vektor YCp50 (*CEN/URA3*), bzw. einem *LEU2/CEN*-Derivat desselben basieren (Rose *et al.* 1987), wurde das *ULP2*-Gen isoliert. Kompetente Zellen des *ulp2*-Stammes (IS18-M1) wurden mit DNA dieser Genbanken transformiert. Die Zellen wurden nach eintägiger Inkubation bei 30°C auf die für den Ausgangsstamm restriktive Temperatur von 37°C gesetzt. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurde ein Teil des Transformationsansatzes bei 30°C belassen. Nach Hochrechnung der dort erhaltenen Transformanten wurden ca. 8000 unabhängige Klone mit der *LEU2*-markierten Genbank durchmustert. Von diesen wuchsen nach dreitägiger Inkubation bei 37°C neun zu größeren Kolonien heran. Die in Zellen dieser aus den neun positiven Klonen enthaltenen Genbankplasmide wurden in *E. coli* transferiert und genauer analysiert. Nur fünf der neun isolierten Plasmide enthielten genomische *S. cerevisiae* DNA-Fragmente, die größer als 200 Basenpaare waren. Nur diese fünf vermittelten Temperaturresistenz nach Rücktransformation in *ulp2-1*. Bei der Durchmusterung der *URA3*-markierten Genbank wurden ca. 6000 unabhängige Transformanten untersucht. Bei dieser Durchmusterung konnten nur zwei Kolonien nach dreitägiger Inkubation bei 37°C isoliert werden. Beide aus Zellen dieser Klone isolierten Genbankplasmide führten nach Rücktransformation in *ulp2*-Zellen zum Wachstum der Zellen bei 37°C.

Sequenzanalysen und Restriktionskartierungen der enthaltenen Insertionen zeigten, dass alle sieben Plasmide überlappende Bereiche des rechten Arms auf Chromosom IX von Position 286500 bis 296900 enthielten (Abb. 14). In diesem Bereich befand sich neben den offenen Leserahmen (ORF) von *CKA1*, *CAP2*, *SRA1* und *YIL032c* auch ein Gen, welches zu dem Zeitpunkt unter der Bezeichnung *SMT4* in den Datenbanken geführt wurde. Die einzige bekannte Information war, dass Überexpression von *SMT4*, ebenso wie die des SUMO-codierenden Gens *SMT3*, eine Mutation im *MIF2*-Gen supprimiert (siehe Einleitung 1.3 und Diskussion). Dies wies auf einen Zusammenhang von Smt4p mit dem SUMO-System hin und legte den Schluss nahe, dass es sich um das gesuchte Gen handelte. Daher wurde untersucht, ob *SMT4* das in der *ulp2-1*-Mutante betroffene Gen war. Der *SMT4*-ORF wurde in einem Vektor unter die Kontrolle des Kupfer-induzierbaren *CUP1*-Promotors gebracht (pIS121) und in Zellen des *ulp2-1*-Stammes transformiert. Die

Transformanten waren auch ohne Kupferinduktion in der Lage, bei 37°C zu wachsen, was sich durch das relativ hohe basale Expressionsniveau des *CUP1*-Promotors erklären lässt.

Die beobachtete Komplementation der *ulp2*-Mutante war im Einklang mit der Vermutung das *SMT4* und *ULP2* ein und dasselbe Gen ist.

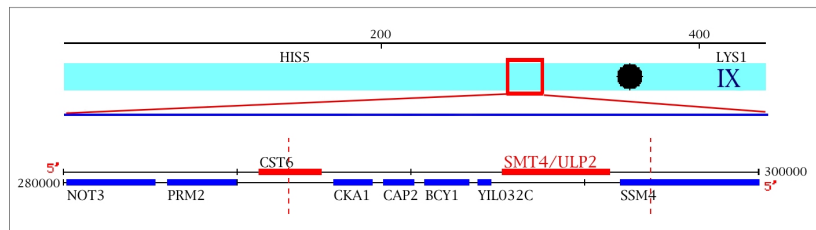


Abb. 14: Grafische Darstellung der auf Chromosom IX lokalisierten Gene. Der Bereich des Chromosoms, der als Insertion in den Genbankplasmiden vorlag, ist hervorgehoben und durch gestrichelte Linien eingegrenzt. (Modifiziert aus Saccharomyces Genome Database, NCBI)

Um einen letzten Beweis für diese Vermutung zu erbringen musste gezeigt werden, dass *SMT4* das in der *ulp2*-Mutante betroffene Gen ist. Zur Identifizierung der Mutation in *ulp2-1*-Zellen wurde das *SMT4*-Gen mittels PCR aus diesen Zellen amplifiziert und in ein Plasmid kloniert (pISTS9-3). Es wurden zwei unabhängige PCR-Amplifikationen und Klonierungen durchgeführt, um bei der späteren Sequenzierung PCR-generierte Mutationen von der ursprünglichen unterscheiden zu können. Der gesamte *ULP2*-ORF wurde sequenziert (verwendete Oligonukleotide IS553-IS560). In beiden Plasmiden wurde, nach Vergleich mit der Sequenz des Wildtypallels, nur eine Punktmutation gefunden. Diese verursachte einen Austausch des Cytosins an Position +1302 des 3105 Basenpaar umfassenden Leserahmens von *ULP2*. Diese Mutation führt zu einem vorzeitigen Stoppcodon anstelle des Tyrosins an Position 434. Das *ulp2-1*-Allel codiert demnach nur für ≈42% des Wildtyp Ulp2-Proteins. Es war daher anzunehmen, dass es sich wie ein Nullallel verhielt.

Bei den bis dahin bekannten Komponenten des SUMO-Systems handelt es sich um essentielle Genprodukte. Sollte sich das isolierte *ulp2-1*-Allel tatsächlich wie ein Nullallel verhalten, wäre es das erste nicht essentielle Gen in diesem System. Zur Kontrolle wurde daher eine Deletions-/Disruptionsmutante hergestellt. Hierfür wurde im *ULP2*-Gen ein internes *BamHI*-Fragment mit dem *URA3*-Marker ersetzt. Dadurch wurde ein Bereich von 1089 Basenpaaren deletiert. Mit diesem im Hintergrund des Plasmides pUC19 konstruierten *ulp2-Δ1::URA3*-Allel wurde sowohl der diploide Stamm JD51 als auch der haploide Stamm JD47-13C transformiert. Die Transformanten wurden auf Minimalmedien ohne Uracil selektiert. Durch homologe Rekombination kam es zu einem Austausch des wt*ULP2*-Gens mit dem Deletionsallel *ulp2-Δ1*. Sowohl im diploiden als auch im haploiden

Hintergrund konnte auf diese Weise das *ulp2*-Deletionsallel eingebracht werden. Der korrekte Austausch des Wildtypallels gegen dieses Nullallel wurde durch analytische PCR verifiziert (siehe Methoden 2.2.11).

3.4 Phänotypische Charakterisierung der *ulp2*-Mutante

Die ersten phänotypischen Untersuchungen der *ulp2-1*-Mutante zeigten, dass die Mutation das Wachstum der Zellen bei erhöhten Temperaturen verhindert (siehe oben). Um Aufschluss über die Funktion des Genproduktes von *ULP2* zu erhalten, wurden weitere phänotypische Charakterisierungen mit der *ulp2-Δ1*-Mutante vorgenommen. Alle durchgeführten Tests mit dem *ulp2-1*-Allel und der *ulp2-Δ1*-Deletion zeigten, dass sich Zellen der beiden Stämme phänotypisch nicht unterscheiden ließen.

Da auch die Disruption von *ULP2* wie die *ulp2-1*-Mutation zu einer Suppression der Temperatursensitivität der *uba2-ts9*-Mutante führte, war eine Frage, ob auch andere Phänotypen supprimiert wurden. In den zur Beantwortung dieser Frage durchgeführten Untersuchungen wurden immer vier verschiedene Stämme im Vergleich analysiert: der Wildtypstamm JD47-13C, die beiden Mutanten *uba2-ts9* und *ulp2-Δ1*, sowie die isolierte Doppelmutante *uba2-ts9, ulp2-1*.

Die Analyse der oben genannten Stämme zeigte, dass die Disruption des *ULP2*-Gens zu einer partiellen Suppression aller getesteten *uba2*-Phänotypen führte. Neben Hitzeresistenz vermittelte die zusätzliche Mutation auch erhöhte Resistenz der *uba2*-Mutante gegenüber Koffein, Cadmiumchlorid, Ethanol und Thiabendazol (siehe Tab. 9 und Abb. 15).

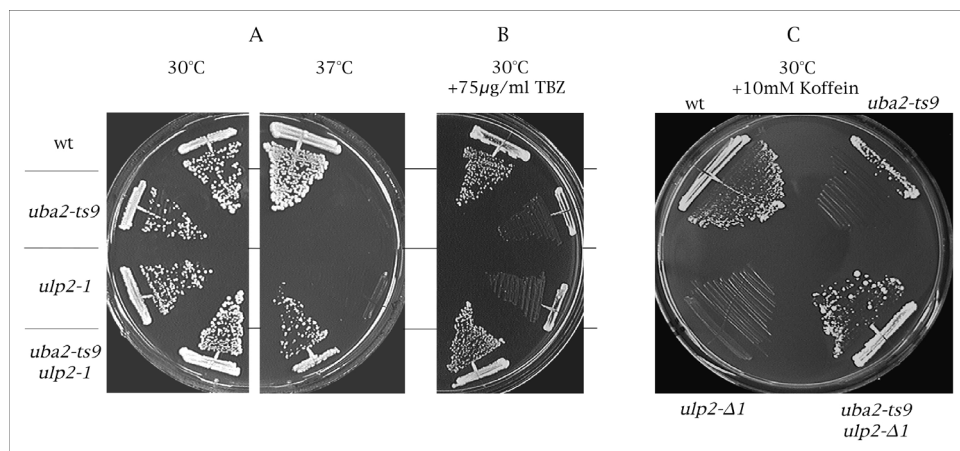


Abb. 15: Phänotypischer Vergleich der Einzelmutanten, *uba2-ts9* und *ulp2-1* mit dem Wildtyp sowie der supprimierenden Doppelmutante. Die Zellen wurden auf Vollmedien mit den angegebenen Additiven ausgestrichen und für drei bis vier Tage bei den angegebenen Temperaturen inkubiert.

Wie schon in Abschnitt 3.3 beschrieben, war das Wachstum von *ulp2*-Mutanten auch bei niedrigeren Temperaturen sehr heterogen. Zudem waren diese Mutanten nicht in der Lage, bei Temperaturen über 33°C zu wachsen. Das heißt, die beiden Einzelmutationen *uba2-ts9* und *ulp2-Δ1* verursachen jeweils Temperatursensitivität. Nur wenn beide Gene defekt sind, sind die Zellen in der Lage, bei höheren Temperaturen zu wachsen. Bei der Untersuchung der weiteren Phänotypen, wie unter anderem Resistenz gegenüber Koffein und Thiabendazol, stellte sich heraus, dass *ulp2*-Mutanten ebenso wie *uba2*-Mutanten hypersensitiv auf diese Substanzen reagierten (Abb. 15).

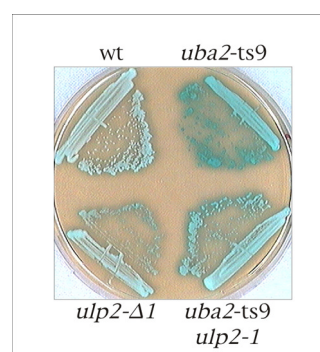


Abb. 16: Vergleich der Zell-Lyse bei 37°C. Zellen des Wildtyps (wt), *uba2-ts9*, *ulp2-Δ1* und der Doppelmutante (*uba2-ts9*, *ulp2-1*) wurden auf Minimalmedium für drei Tage bei 30°C inkubiert. Nach einer dreistündigen Inkubation bei 37°C wurde die Platte mit BCIP-haltiger Agarose überschichtet. Das durch Phosphatase-Spaltung entstandene Indoxylphosphat ist blau gefärbt.

Falls die Temperatursensitivität der *ulp2*-Mutante durch fehlende Zellwandstabilität der Zellen bei 37°C hervorgerufen wurde, sollten diese in der Lage sein, auf osmotisch stabilisiertem Medium zu wachsen (siehe oben Abschnitt 3.2.1). Ebenso wie die *uba2*-Mutanten wurden daher die *ulp2*-Zellen auf Vollmedium mit 1M Sorbit ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Die *ulp2*-Mutante war im Gegensatz zu *uba2*-Mutanten auch unter diesen Bedingungen nicht in der Lage zu wachsen (siehe Diskussion 4.3).

Parameter		Stamm:			
		Wildtyp	<i>uba2-ts9</i>	<i>ulp2-Δ1</i>	<i>uba2-ts9 ulp2-Δ1</i>
Wachstum bei	16°C	++	++	+	+/-
	30°C	++	++	+	++
	37°C	++	-	-	++
Suppression durch Sorbit		n.b.	+	-	n.b.
Resistenz gegenüber	TBZ	++	-	-	++
	CdCl ₂	++	-	-	+
	EtOH	++	-	-	++
	Koffein	++	-	-	++
Zell-Lyse bei 37°C		-	++	+/-	-

Tab. 9: Phänotypen von Wildtyp (JD47-13C), *uba2-ts9*, *ulp2-Δ1* (IS30a) und der Doppelmutante *uba2-ts9, ulp2-Δ1* (IS69) im Vergleich. Alle Untersuchungen wurden auf Vollmedium, zum Teil mit den angegebenen Zusätzen, durchgeführt. Suppression von Sorbit (1M) wurde bei 37°C untersucht. Die Resistenz der Zellen gegenüber Thiabendazol (75µg/ml TBZ), Cadmiumchlorid (20µM CdCl₂), Koffein (10mM) und Ethanol (3% EtOH) wurde bei 30°C getestet. (++, Wachstum vergleichbar mit dem Wildtypstamm; + und +/- reduziertes Wachstum; -, kein Wachstum; n.b., nicht bestimmbar).

Obwohl die *ulp2*-Stämme drei der Kriterien für Mutanten mit Defekten bei der zellulären Integrität erfüllten, Ethanol- und Koffein-Hypersensitivität und Temperatursensitivität, ließen sie sich nicht durch die Zugabe von Sorbit supprimieren. Außerdem lysierten die Zellen dieser Mutanten nicht nach Hitzeschock (Abb. 16). Demnach war die Hypersensitivität dieser Mutante keine Folge instabiler Zellwände (siehe Diskussion).

3.4.1 Ulp2p ist nicht essentiell für meiotische Teilungen

Das *ULP2*-Gen ist nicht essentiell für mitotische Zellteilung. Es konnten *ulp2*-Disruptionsmutanten in haploiden Zellen hergestellt werden (siehe 3.3.1). Um festzustellen, ob Ulp2p eine Funktion bei der Sporenkeimung besitzt, wurde ein heterozygot diploider Stamm (*ULP2/ulp2-Δ1*, IS29) untersucht. Das mitotische Wachstum der heterozygoten *ulp2*-Zellen war nicht unterscheidbar von Wildtypzellen.

Bei der Zerlegung von Tetraden stellte sich heraus, dass Sporen, die das *ulp2-Δ1*-Allel trugen, nur bei 23°C auskeimen konnten (siehe auch Abb. 17, Abschnitt 3.4.2). Auch bei dieser Temperatur waren jedoch nicht alle *ulp2*-Sporklone in der Lage auszukeimen. Nach Analyse von 17 Tetraden keimten 18 der insgesamt 34 Sporklone aus, die das *ulp2-Δ1*-Allel trugen. Von diesen bildeten vier Kolonien mit unter 20 Zellen. Elf der Sporen bildeten Kolonien mit bis zu ≈100 Zellen und nur drei Sporklone wuchsen zu deutlich sichtbaren Kolonien nach zehn Tagen Inkubation bei 23°C heran. Bei 30°C konnten ebenso viele Sporklone mit *ULP2*-disruptiertem Allel auskeimen wie bei 23°C. Die Zellen durchliefen aber nur wenige Teilungen, bis zu Koloniegrößen unter 100 Zellen.

Ulp2-Disruptionsstämme aus beiden Paarungstypen wurden miteinander gekreuzt, um einen homozygot diploiden *ulp2*-Deletionsstamm (IS91) zu erhalten. Dieser Stamm wies dasselbe verlangsamte, heterogene Wachstum wie haploide Mutanten auf. Induzierte man in diesen Zellen die Sporenbildung durch Stickstoffmangel, bildeten sich nach zehn bis zwölf Tagen Sporen. Dies ist deutlich langsamer als in Wildtypzellen unter den selben Bedingungen. Wildtypzellen benötigten fünf bis sechs Tage zur Sporenbildung. Die Tetradenanalyse der homozygoten *ulp2*-Mutanten zeigte, dass nur ungefähr 60 Prozent der Sporklone auszukeimen konnten.

Das Ulp2-Protein hat daher keine essentielle Funktion bei der Meiose. Das Fehlen dieses Proteins führt jedoch zu Defekten bei der Sporenkeimung, sowie einer verlangsamten Sporenbildung. Diese Effekte können unter anderem auf die stark verlangsamte Zellteilung zurückzuführen sein (siehe nachfolgender Abschnitt).

3.4.2 Funktionen des Ulp2-Proteins im Verlauf des Zellzyklus

3.4.2.1 Genetische Interaktionen von *ULP2* mit Genen für Komponenten des Centromer-Komplexes

Das *ULP2/SMT4*-Gen wurde als Dosis-abhängiger Suppressor einer *mif2*-Mutation identifiziert (Meluh und Koshland 1995), weswegen der bis dahin noch unbeschriebene ORF *YIL031w* als „*SMT4*“ („suppressor of *mif two*“) in den Datenbanken geführt wurde. Das Protein Mif2p ist ortholog zu der CENP-C-Untereinheit von Centromer-Komplexen in Säugerzellen. Überexpression von *SMT4* führte zur Suppression der Temperatursensitivität der *mif2-3*-Mutante (Saccharomyces Genome Database). Weitere veröffentlichte Informationen zu diesem Gen lagen nicht vor. Die funktionellen

Analysen dieser Arbeit führten zur Umbenennung von Smt4p zu Ulp2p („Ubiquitin-like specific protease 2“).

Wie in Abbildung 15 gezeigt, führten *ulp2*-Mutationen zu einer Hypersensitivität der Zellen gegenüber Mikrotubuli-destabilisierendem Thiabendazol (TBZ). Da die *mif2-3*-Mutante ebenfalls sensitiv auf Mikrotubuli-destabilisierende Substanzen reagierte (Brown *et al.* 1993), wurden nachfolgend beschriebene Untersuchungen durchgeführt.

Haploide Zellen, die jeweils eine der beiden Mutationen (*ulp2-Δ1* und *mif2-3*) enthielten, wurden gekreuzt und eine Tetradenanalyse durchgeführt (Abb. 17). Da die *mif2-3*-Mutation nicht in einem zu *ulp2*-Mutanten isogenen Stammhintergrund vorlag, wurden parallel Zellen des entsprechenden Wildtyps HH902 mit *ulp2-1* (IS18-M1) gekreuzt und untersucht. Wie schon in Abschnitt 3.4 erläutert, wurden die Zellen für acht bis zehn Tage bei 23°C inkubiert. Die *mif2-3*- und *ulp2-1*-Allele in den Sporklonen wurden durch die von diesen Allelen vermittelte Temperatursensitivität nachgewiesen. Durch die *ulp2*-Mutation waren auch bei permissiver Temperatur nicht alle Sporklone in der Lage zu wachsen (Abb. 17A). Dies war anhand der Kontrollanalyse zu erkennen. In diesem zweiten Ansatz wurden Tetraden zerlegt, die zusätzlich ein *ULP2*-exprimierendes und *URA3*-markiertes Plasmid enthielten (pY-11). Aufgrund der Inkubation auf Vollmedien enthielten jedoch nicht mehr alle Sporklone dieses Plasmid (Abb. 17B).

Wie Abbildung 17C zeigt, sind Zellen, die sowohl das *mif2-3*-Allel als auch eine *ulp2*-Nullallele enthalten, nicht in der Lage zu wachsen. Wenn in einer Tetrade ein Wildtypsporklon vorkommt, muss zwangsläufig ein anderer Sporklon beide Mutationen tragen. Wildtypzellen haben eine kürzere Verdopplungszeit als die Mutanten, und sind anhand der Koloniegröße von *mif2* und *ulp2* zu unterscheiden. Weitere Ausstrichtests zeigten, dass alle erhaltenen, in Abb. 17C gezeigten Klone entweder keine oder nur eine der beiden Mutationen trugen.

Um nachzuweisen, dass *mif2-3* und *ulp2*-Mutationen tatsächlich synthetisch letal sind, wurden Doppelmутanten erzeugt, die zur Komplementation der *ulp2*-Mutation Plasmid-codiertes *ULP2* exprimierten (Abb. 17D). Die erhaltenen haploiden Sporklone wurden auf Minimalmedium übertragen, das zusätzlich 5'-Fluororotat (FoA) enthielt. FoA wird von Zellen mit intaktem *URA3*-Gen zu toxischem Fluor-Orotidylat umgewandelt. Auf FoA-haltigem Medium konnten somit nur Zellen selektioniert werden, die das *ULP2*-codierende Plasmid mit dem *URA3*-Markergen im Zuge mitotischer Teilungen verloren hatten. Auf diesem Medium waren Sporklone mit *mif2-3* und *ulp2-1*-Mutation nicht in der Lage zu wachsen.

Die Deletion von *ULP2* in einem *mif2-3*-Hintergrund ist demnach letal. Die Zellen sind nicht mehr in der Lage, sich mitotisch zu teilen.

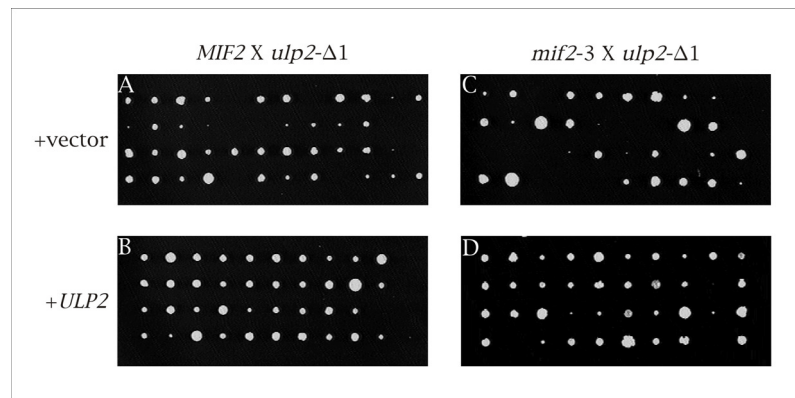


Abb. 17: Genetische Interaktion zwischen *mif2-3* und *ulp2-1*. Diploide Stämme wurden einer Tetradenanalyse unterzogen. Die haploiden Segreganten wurden auf Vollmedium bei 23°C für acht bis zehn Tage inkubiert. A-B) Der Wildtypstamm HH902 (*MIF2*) wurde mit IS18-M1 (*ulp2-1*) gekreuzt. Die diploiden Zellen enthielten zusätzlichen entweder einen leeren Vektor (A) oder ein *ULP2*-exprimierendes Plasmid (B). C-D) Zellen des HH903-Stammes (*mif2-3*) wurden mit *ulp2-1* gekreuzt und einer Tetradenanalyse unterzogen. In D) enthielten die Zellen zur Komplementation des *ulp2*-Phänotyps zusätzlich ein *ULP2*-exprimierendes Plasmid. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Ein weiterer Überexpressionssuppressor der *mif2*-Mutante ist *CEP1/CBF1* (Meluh und Koshland 1995). Das Genprodukt ist ebenso wie Mif2p mit dem Centromer assoziiert. *Mif2*-Allele sind in gleicher Weise synthetisch letal mit *cep1*-Deletionsallelen (Brown *et al.* 1993), wie zuvor für die *ulp2*-Deletionsallele gezeigt (Abb. 17). Daher sollte untersucht werden, ob eine genetische Interaktion zwischen *ULP2* und *CEP1* nachweisbar ist. Es wurde ein Stamm generiert, der das *ulp2*-Deletionsallel trug und eine Deletion im *CEP1*-Gen. Durch homologe *In-vivo*-Rekombination wurde der Leserahmen des *CEP1*-Gens mit einer *LEU2*-markierten Kasette ausgetauscht (resultierender Stamm IS106). Das *CEP1*-Gen ist nicht essentiell. Da es allerdings notwendig für die Transkription der Gene des Methionin-Biosyntheseweges ist, sind Zellen ohne Cep1p nicht in der Lage, auf Medium ohne Methionin zu wachsen (Thomas *et al.* 1989, O'Connell und Baker 1992). Die korrekte Deletion des *CEP1*-Gens konnte somit leicht verifiziert werden, indem die Zellen auf Medien ohne Methionin getestet wurden. Unter diesen Bedingungen waren *cep1Δ*-Zellen nicht in der Lage zu wachsen. Da die *cep1Δ ulp2*-Mutanten aber generiert werden konnten und auf Medium mit Methionin ähnlich der *ulp2*-Einzelmutante wuchsen, erbrachten diese Experimente keine Hinweise auf eine genetische Interaktion von *ULP2* und *CEP1* (Daten nicht gezeigt).

Die genetische Interaktion von *UBA2*-Allelen und *CEP1* wurde auf die gleiche Art und Weise untersucht (verwendeter Stamm IS23). Das *cep1Δ::LEU2*-Allel wurde in die Mutanten *uba2-ts1*, *-ts2* und *-ts9* eingeführt. Auch hier zeigte sich kein Einfluss der Deletion des *CEP1*-Gens auf das Wachstum dieser *uba2*-Mutanten (Daten nicht gezeigt).

Die genetische Interaktion zwischen Genen des SUMO-Systems und dem Centromerkomplexen, wie sie für das *MIF2*-Gen zu beobachten sind, erstrecken sich also nicht auf das mit *MIF2* genetisch interagierende *CEP1*-Gen.

3.4.2.2 Defekte bei der Chromosomen- und Kernteilung

In Abschnitt 3.2.3 wurde gezeigt, dass Mutationen des SUMO-aktivierenden Enzyms, ebenso wie Mutationen im SUMO-konjugierenden Enzym, einen G₂/M-Zellzyklusarrest verursachen. Daher sollte untersucht werden, ob ein ähnlicher Zellzyklusarrest in *ulp2*-Mutanten auftrat.

Kolonien dieser Mutante zeigten ein sehr heterogenes Wachstum. Bei Einzelkolonie-Ausstrichen traten immer kleinere und größere Kolonien auf, unabhängig davon, ob die verwendete Ausgangskolonie groß oder klein war. Das Wachstum innerhalb einer Kolonie war zudem nicht gleichmäßig. Die Ränder der Kolonien waren zum Teil ausgefranst, was auf ein Absterben der Zellen hindeutet. Bei der mikroskopischen Betrachtung von *ulp2*-Deletionsmutanten fiel auf, dass die Zellen im Vergleich zum Wildtyp stark vergrößert waren. Zellen, in denen das *ULP2*-Gen deletiert war, zeigten vermehrt eine abnorme, lang gezogene Morphologie und bildeten zum Teil mehrere Knospen. Ein Teil der Tochterzellen bildete neue Knospen, noch ehe sie von der Mutterzelle abgelöst waren (Abb. 18A).

Da *ulp2*-Mutanten sensitiv auf die Zugabe von Mikrotubuli-destabilisierendem Thiabendazol reagierten, wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz die Mikrotubuli untersucht. Dabei zeigte sich, dass in der Mehrzahl der Zellen mit einer Knospe die Spindel verkürzt war, aber ansonsten keine auffälligen Defekte aufwies. Auffällig war, dass die zytoplasmatischen Mikrotubuli im Vergleich zum Wildtyp verlängert zu sein schienen (Abb. 18B).

Auch die Zellkerne wurden in diesem Versuchsansatz markiert. Hierzu wurde der fluorochrome Farbstoff Bisbenzimid (Hoechst Nr. 33258) verwendet, da dieser besonders in GC-reiche nukleäre DNA-Stränge interkaliert. Dadurch wurde die AT-reiche DNA der Mitochondrien kaum markiert. Bei der Untersuchung der Zellkerne fiel auf, dass Zellen ohne Knospe aber mit zwei Zellkernen auftraten. Außerdem lagen Zellen vor, in denen sich der Zellkern in der kleineren Tochterzelle befand. Die Form dieser Zellen war allerdings nicht auffällig. Da in manchen Zellen nicht nur ein Zellkern in den Zellen mit Bisbenzimid markiert wurde, sondern auch zusätzliche kleinere Bereiche, schienen in diesen die Zellkerne fragmentiert vorzuliegen. In Zellen, die einen anormalen Zellkern aufwiesen, konnten auch keine Mikrotubuli detektiert werden. In diesen Fällen zeigte die Markierung mit anti- α -Tubulin-Antikörpern eine diffuse Färbung der Zellen, oder nur ein sehr schwaches Signal (Abb. 18B).

Insgesamt wiesen nach Inkubation der Zellen bei 30°C ungefähr 20% der Zellen eine Fragmentierung oder Mislokalisierung des Zellkerns auf. In weiteren ca. 10% traten verlängerte zytoplasmatische Mikrotubuli auf. Zellen mit großen, elongierten Knospen wiesen meist nur kurze Spindeln auf. In Folge von Hitzeschock vermehrte sich das Auftreten sowohl von anormalen Zellen als auch von solchen mit fragmentierten Zellkernen, gestörten Spindeln oder zytoplasmatischen Mikrotubuli. Nach drei Stunden Inkubation bei 37°C wiesen insgesamt bis zu 50% der Zellen zytologische Defekte auf (Daten nicht gezeigt).

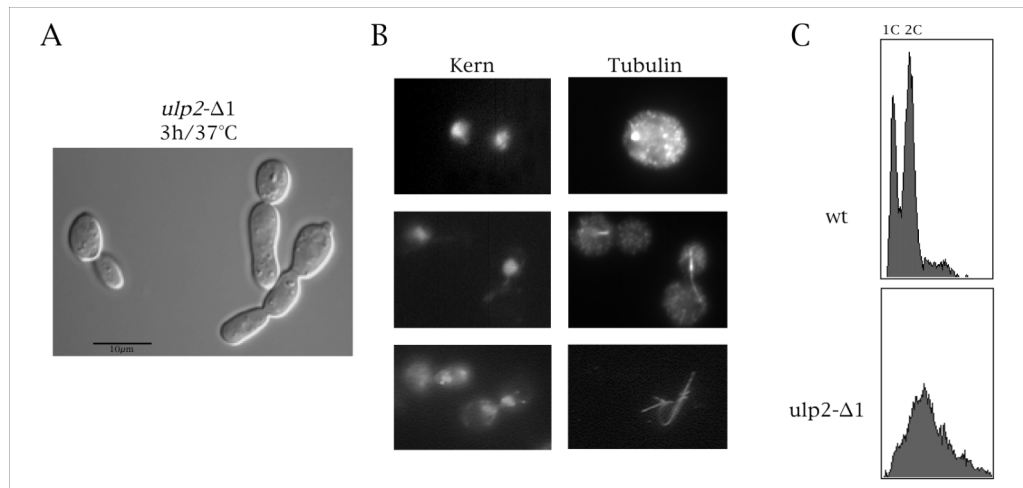


Abb. 18: Zytologische Charakterisierung der *ulp2*-Mutante. **A)** Mikroskopische Aufnahme der Zellen im Differenz-Interferenz-Kontrast (Nomarski). **B)** Die Mikrotubuli wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz fluoreszenzmarkiert. Als primärer Antikörper wurde anti- α -Tubulin-Antikörper verwendet. Die DNA der Zellkerne wurde mit Bisbenzimid markiert. **C)** Zur Bestimmung des DNA-Gehalts der für 3 Stunden bei 37°C inkubierten Kulturen wurde die DNA mit Propidiumjodid angefärbt und deren zelluläre Konzentration mit Hilfe der FACS-Analyse (siehe Methode 2.2.14) quantitativ bestimmt. wt, Wildtyp JD47-13C; *ulp2*- Δ 1, Deletionsstamm IS30a.

Die heterogenen Zellformen, die in Ulp2p-freien Kulturen auftraten, wiesen auf keinen bestimmten Zellzyklusarrest hin. Zur Verifizierung wurde der DNA-Gehalt in Zellen einer *ulp2* Δ -Kultur untersucht. Die Zellen wurden in Vollmedium bei 30°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase inkubiert, fixiert und die DNA mit Propidiumjodid markiert (siehe auch Abschnitt 3.2.3). Mittels der FACS-Analyse wurde der DNA-Gehalt pro Zelle bestimmt und in einem Histogramm die Häufigkeit der Zellen mit unterschiedlichem DNA-Gehalt aufgetragen (Abb. 18C). Zellen des Wildtyps wurden parallel untersucht. Da diese in einer exponentiell wachsenden Kultur eine deutliche Verteilung der Zellen mit einfachem (1C) und doppeltem Chromosomensatz (2C) aufweisen. Bei dem Vergleich mit *ulp2*-Mutanten fiel auf, dass die Mehrzahl dieser Zellen einen doppelten Chromosomensatz aufwies. Das heißt die Chromosomen in *ulp2*-Mutanten werden vollständig verdoppelt. Allerdings scheint eine signifikante Anzahl Zellen einen mehr als zweifachen Chromosomensatz aufzuweisen. Gründe hierfür könnten die Defekte bei der Kern- und Chromosomenverteilung sein (siehe Diskussion).

Die ungewöhnliche Ausdehnung der Graphen im Bereich von Zellen mit DNA-Gehalten höher als 2C könnte außerdem darauf hin deuten, dass zum Teil unvollständige Chromosomen- oder Kernaufteilungen erfolgt sind, die zu Zellen mit abnormem DNA-Gehalt geführt haben. Da die *ulp2*-Mutanten im Durchschnitt jedoch größer als Wildtypzellen sind, könnte es auch zu einer stärkeren Hintergrundstrahlung kommen und damit der Graph insgesamt zu höheren Fluoreszenzwerten verschoben werden. Dies würde allerdings nicht die breite Ausdehnung erklären.

Sollte die Funktion von Ulp2p tatsächlich für die Chromosomenverteilung von Bedeutung sein, wäre für *ulp2*-Mutanten eine erhöhte mitotische Verlustrate für Chromosomen und damit auch Centromer-abhängiger Plasmide zu erwarten. Um dies zu überprüfen, wurde in verschiedene Mutanten ein *TRP1*-markierter Centromer-Vektor eingebracht, der neben einem Replikationsmodul die Centromer-Sequenz von Chromosom VI enthielt (pRS314). Die Transformanten wurden in Selektivmedium ohne Tryptophan bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Verdünnungen der Kulturen wurden auf Tryptophan-haltigem, also nicht-selektivem Minimalmedium ausplattiert und die Agarplatten für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Die erhaltenen Einzelkolonien wurden jeweils auf Platten mit und ohne Tryptophan replika-plattiert. Durch den Vergleich des Wachstums der Kolonien auf den Komplett- und Selektivmedien konnte festgestellt werden, welcher Anteil der Zellen aus einer exponentiell wachsenden Kultur im Verlauf der mitotischen Teilung das Centromerplasmid verloren hatten. Es wurden sowohl die Mutanten *ulp2*, *uba2-ts9*, als auch die *ulp2-1*, *uba2-ts9* Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp untersucht (Tab. 10). Nur die *ulp2*-Mutante zeigte eine stark erhöhte Verlustrate der Plasmide. 65% der Einzelkolonien waren nicht mehr zur Tryptophan-Biosynthese in der Lage, was auf den Verlust des *TRP1*-markierten Plasmides zurückzuführen war. Dieser Phänotyp wurde von einer zusätzlichen Mutation im *UBA2*-Gen supprimiert. Kulturen des Wildtyps, der *uba2-ts9*-Mutante und der *uba2*, *ulp2*-Doppelmutante wiesen dagegen eine deutlich geringere Verlustrate von höchstens 11% auf.

Parameter	Stamm:			
	Wildtyp	<i>uba2-ts9</i>	<i>ulp2-Δ1</i>	<i>uba2-ts9 ulp2-Δ1</i>
Verdopplungszeit	103(±6)	190(±16)	254(±25)	145(±4)
Zellgröße (Ø in µm)	4,3(±0,7)	7,0(±0,8)	Länge 8(±2) Breite 4,5(±1,5)	5,1(±1,0)
Verlust von <i>CEN</i> -Plasmiden	7(±6)%	11(±5)%	65(±2)%	10(±3)%
Überlebensrate	100%	41 (±3)%	29(±11)%	98(±8)%

Tab. 10: Vergleich von Wildtyp (JD47-13C), *uba2-ts9*, *ulp2-Δ1* (IS30a) und der Doppelmutante *uba2-ts9,ulp2-Δ1* (IS69). Alle Untersuchungen wurden bei 30°C durchgeführt. Zur Bestimmung der Verdopplungszeit wurden jeweils drei unabhängige Kulturen der Stämme untersucht. Die Zellgröße wurde nach mikroskopischen Aufnahmen mit Hilfe des Metamorph Image Systems bestimmt. Der Durchschnitt von mind. 20 ausgemessenen Zellen ist angegeben. Zur Bestimmung der *CEN*-Plasmid-Verlustrate wurden die Zellen mit einem *TRP1*-markierten *CEN*-Plasmid transformiert und in Medium ohne Tryptophan bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Verdünnungen dieser Kulturen wurden auf synthetischem Medium mit Tryptophan ausplattiert und nach zwei Tagen auf Medien mit und ohne Tryptophan replikaplattiert. Die Platten wurden nach drei Tagen Inkubation bei 30°C ausgewertet. Zur Bestimmung der Überlebensrate wurden exponentiell wachsende Kulturen der Stämme in Vollmedien verdünnt und ausplattiert. Verglichen wurde die ausplattierte Gesamtzellzahl (ermittelt durch Auszählen in der Thoma-Zählkammer) mit den auf Vollmedien gewachsenen Kolonien. Die Überlebensrate des Wildtypstammes wurde gleich 100% gesetzt, die der anderen Stämme entsprechend kalkuliert.

Ulp2p spielt nach den oben aufgeführten Ergebnisse eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung und Teilung des Zellkerns und dessen Lokalisierung in Mutter- und Tochterzelle. Außerdem ist es notwendig für eine korrekte Aufteilung der Chromosomen. Die Disruption des *ULP2*-Gens führt jedoch zu keinem einheitlichen Zellzyklusarrest. Allerdings kommt es zu einer Verlangsamung des Zellzyklus, sowie zusätzlich zu einem Absterben großer Anteile der Zellpopulation. Nur 29% der Zellen einer exponentiell wachsenden Kultur sind in der Lage, sich zu teilen (Tab. 10). Zusammengenommen erklären diese beiden Defekte die lange Verdopplungszeiten der *ulp2*-Zellen von 254 Minuten. *Uba2*-Mutanten benötigten ebenfalls länger für eine Zellteilung, so wies *uba2-ts9* wies eine Verdopplungszeit von 190 Minuten auf. Diese Verzögerung wurde in der Doppelmutante *uba2-ts9, lp2-1* nur zum Teil supprimiert (Tab. 10).

3.4.3 Ulp2p spielt eine Rolle bei der DNA-Reparatur

In Säugerzellen interagiert das SUMO-konjugierende Protein UBC9 mit RAD51 (Kovalenko *et al.* 1996, Shen *et al.* 1996). Dieses ist an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt. Sowohl Doppel- als auch Einzelstrangbrüche werden mit Hilfe des RAD51-Komplexes wieder zusammengefügt. Die Untersuchungen verschiedener *uba2*-Mutanten im Hinblick auf die Hypersensitivität gegenüber ultravioletter Strahlung in *S. cerevisiae* deuteten darauf hin, dass die Konjugation von SUMO nicht notwendig für die Reparatur UV-induzierter Einzelstrangbrüche ist (Schwienhorst 1997).

Da in Säugerzellen ein Zusammenhang zwischen Mechanismen der DNA-Reparatur und dem SUMO-System besteht, wurde dennoch überprüft, ob Ulp2p einen Einfluss auf Reparaturmechanismen hat. In den verschiedenen Mutanten wurden sowohl die Resistenz gegenüber UV-induzierten Einzelstrangbrüchen, als auch MMS-induzierten Doppelstrangbrüchen untersucht. Durch den Einfluss von ultraviolettem (UV) Licht können benachbarte Pyrimidinreste eines Stranges kovalent verknüpft werden. Methylmethansulfonat (MMS) hingegen methyliert Stickstoffatome an Purinen. Als Folge dieser Schäden sind Replikation und Genexpression blockiert. Die verantwortlichen Reparaturmechanismen schneiden die beschädigten DNA-Stränge spezifisch heraus (Excisionsreparatur). Im Fall der Pyrimidindimere wird ein Einzelstrangbruch induziert. Alkylierte Basen verursachen einen Bruch des DNA-Stranges und bei den involvierten Reparaturmechanismen ist vermutlich ebenfalls der Rad51/52-Komplex beteiligt (Xiao *et al.* 1996).

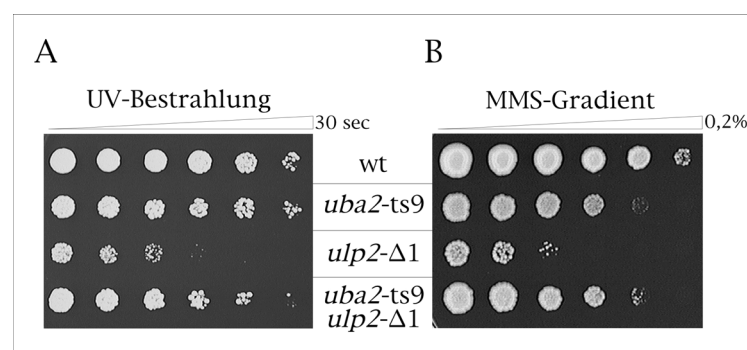


Abb. 19: Einfluss von DNA-Schäden auf das Wachstum der verschiedenen Mutanten. Zellen exponentiell wachsender Kulturen wurden auf die Platten aufgetropft. Die Inkubation der Platten erfolgte für vier Tage bei 30°C. **A)** Die Zellen wurden mit UV-Licht (312nm) für 0, 10, 15, 20, 25 und 30 Sekunden bestrahlt. Um Licht-induzierte Reparaturmechanismen auszuschließen, wurden die Zellen direkt nach Bestrahlung abgedunkelt. **B)** Agarplatten, die einen MMS-Gradienten aufwiesen wurden hergestellt wie in Abschnitt 2.1.7.1 beschrieben. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Um festzustellen, ob die Mutanten einen Defekt in der UV-induzierten DNA-Reparatur aufweisen, wurden die Zellen bis zu 30 Sekunden mit Licht einer Wellenlänge von 312nm bestrahlt. Pyrimidindimere können unter anderem durch enzymatische Spaltung durch Photolyasen eliminiert werden. Wird diese Möglichkeit durch Abdunkeln der Kulturen verhindert, müssen die Dimere durch Excisionsreparatur entfernt werden. Da dies der zu testende Reparaturmechanismus war, wurden die Kulturen direkt nach der Bestrahlung abgedunkelt.

Zur Untersuchung der MMS-Resistenz wurden Platten angefertigt, die einen MMS-Gradienten enthielten (siehe Material 2.1.7.1). Dieser enthielt bis zu 0,2% Methylmethansulfonat in Vollmedium.

Es wurden neben dem Wildtypstamm (JD47-13C) die Mutanten *uba2-ts9* und die *ulp2*-Mutante (IS30a), sowie die Doppelmutante *uba2-ts9, ulp2-1 (sut9-3)* untersucht. Gleiche Verdünnungen von sich exponentiell teilenden Zellen wurden auf Agarplatten aufgetropft. Da die Überlebensrate der verschiedenen Stämme unterschiedlich war (siehe Tab. 10), wurden von den Einzelmutanten mehr Zellen pro Tropfen auf die Platte gegeben. Die Tropfen von Wildtyp und Doppelmutante enthielten $\approx 1 \times 10^5$ Zellen. Da nur 40% der Zellen einer *uba2*-Kultur überlebten, wurden in diesem Fall 2×10^5 Zellen aufgetropft. Von der *ulp2*-Deletionsmutante wurden auf Grund der hohen Sterberate $3,5 \times 10^5$ Zellen verwendet.

Wie in Abbildung 19 zu erkennen, waren bis auf die *ulp2*-Mutante, alle getesteten Stämme ähnlich resistent gegenüber UV-Bestrahlung und MMS-Schädigung. Ulp2p allerdings scheint wichtig für die Antwort der Zelle auf DNA-Schäden zu sein. Disruption von *ULP2* führte zur Hypersensitivität, sowohl gegenüber UV-, als auch MMS-induzierten DNA-Schäden. Ebenso wie alle bisher aufgeführten Phänotypen, wurde die Hypersensitivität gegenüber DNA-Schädigung durch zusätzliche Mutation des *UBA2*-Gens supprimiert.

3.5 Ulp2p ist ein SUMO-dekonjugierendes Enzym

Disruption des *ULP2*-Gens führte zur Suppression der in *uba2*-Mutanten auftretenden Defekte. Umgekehrt wiesen *ulp2*-Mutanten Phänotypen auf, die durch Mutationen in *UBA2* supprimiert wurden. Da die Funktion des Uba2-Proteins die Aktivierung des Ubiquitin-verwandten Proteins SUMO ist, deutete somit alles auf eine Beteiligung von Ulp2p am SUMO-Modifikationssystem hin. Biochemische Untersuchungen sollten Aufschluss über die Funktion des Ulp2-Proteins liefern.

3.5.1 Biochemische Analysen der *ulp2*-Mutanten

Da die genannten genetischen Interaktionen zwischen *ULP2* und *UBA2* auf eine direkte Beteiligung von Ulp2p im SUMO-System hinwies, wurden die SUMO-Konjugate in *ulp2*-Mutanten näher analysiert.

Zur besseren Detektion wurde Epitop-markiertes SUMO in den Zellen exprimiert. Hierzu wurde ein von E. S. Johnson zur Verfügung gestelltes Plasmid verwendet, das His₆Flag-markiertes SUMO (HF-SUMO) unter Kontrolle des Galaktose-induzierbaren *GAL10*-Promotors exprimiert (pEMBLyEx-HF-SMT3, Johnson *et al.* 1997). Neben dem *ulp2*-Deletionsstamm wurde der Wildtypstamm JD47-13C, die *uba2*-*ts9*-Mutante und die *uba2*, *ulp2*-Doppelmutante *sut9-3* untersucht. Die Kulturen wurden auf Galaktose-haltigem Selektivmedium bei 30°C bis zu einer Optischen Dichte (bei 600nm) von 0,9-1,2 angezogen. Proteinextrakte wurden mittels alkalischer Lyse der Zellen und darauf folgender Proteinfällung gewonnen (siehe Methoden 2.2.9.1). Diese Aufschlussmethode wurde gewählt, da vorherige Experimente ergeben hatten, dass die sonst angewandte Aufschlussmethode mit HEPES-Puffer und 1% Triton X-100 zu einem völligen Verschwinden von SUMO-Konjugaten führt (siehe Methoden 2.2.12.1) Mittels Anti-Flag-Antikörper wurden die HF-SUMO-Konjugate detektiert (Abb. 20A).

Wie schon in einem ähnlichen Versuch in Abschnitt 3.2.4 gezeigt, waren in der *uba2*-Mutante kaum Konjugate detektierbar. In Extrakten des Wildtyps dagegen wurden eine Vielzahl höhermolekularer Banden, hauptsächlich über 100KDa, von dem Antikörper erkannt. In der *uba2*, *ulp2*-Doppelmutante traten ebenso wie in der *uba2*-Einzelmutante kaum sumoylierte Proteine auf. Die Doppelmutante verhielt sich jedoch in fast allen phänotypischen Untersuchungen ähnlich wie Wildtypstämme. Trotzdem waren kaum Unterschiede in Bezug auf die SUMO-Konjugation zu detektieren. Die einzige auffällige zusätzliche Bande, die in der Doppelmutante auftrat, war eine mit einem Molekulargewicht von 72KDa. In geringerer Konzentration war diese auch im Wildtyp zu detektieren.

Die SUMO-Konjugate aus *ulp2Δ*-Zellen waren auffälliger. In diesen Extrakten akkumulierte eine große Anzahl verschiedener SUMO-modifizierter Proteine. Zusätzlich zu den hochmolekularen Konjugaten trat eine 55KDa-Bande auf. Die 72KDa-Bande war dominierend (Abb. 20A). Demnach zeigten die beiden temperatursensitiven Mutanten *uba2-ts* und *ulp2-Δ* gegenteilige Effekte auf die Sumoylierung. Das Uba2^{ts}-Protein war nicht mehr in der Lage, ausreichende Mengen des SUMO-Proteins für die Konjugation zu

aktivieren, daher reduziert sich die Menge an modifizierten Proteinen. Durch die Disruption des *ULP2*-Gens wurden SUMO-Modifikationen stabilisiert. Dies deutet auf eine dekonjugierende Funktion des Ulp2-Proteins hin.

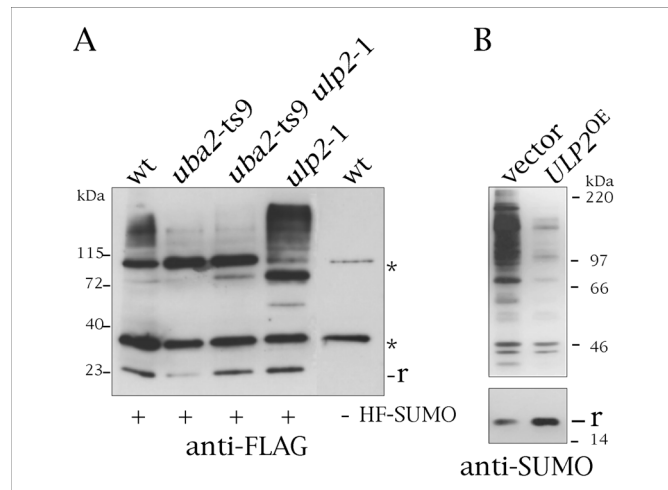


Abb. 20: Immunologische Detektion von SUMO und sumoylierten Proteinen. A) Western-Blotanalyse von Proteinextrakten des Wildtyps (wt), der Mutanten *uba2-ts9*-, der *ulp2-Δ1* und der Doppelmutante (*uba2-ts9 ulp2-1*) in denen falls angegeben His₆Flag-markiertes SUMO (HF-SUMO) überexprimiert wurde. Zur immunologischen Detektion wurde als primärer Antikörper anti-Flag-Antikörper verwendet. Banden von unspezifisch mit dem Antikörper reagierenden Proteinen sind durch einen Stern gekennzeichnet. **B)** Vergleich der SUMO-Konjugate und des freien SUMO's in Extrakten aus Wildtypzellen. Zellen enthielten entweder ein Kontrollplasmid (Vektor) oder ein *ULP2*-Überexpressionsplasmid (*ULP2^{OE}*). Hybridisierung erfolgte mit primärem anti-SUMO-Antikörper.

Falls Ulp2p SUMO von den Akzeptorproteinen entfernt, sollte die Überexpression von *ULP2* in Wildtypzellen die Anzahl der SUMO-Konjugate reduzieren. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde der Leserahmen des *ULP2*-Gens unter Kontrolle des Kupfer-induzierbaren *CUP1*-Promotors in einem 2 μ -Vektor exprimiert („*ULP2* over expression“, *ULP2^{OE}*; Plasmid pIS121). Zellen des Wildtypstamms JD47-13C wurden sowohl mit einem Kontrollvektor, als auch mit dem *ULP2^{OE}*-Konstrukt transformiert. Die Zellen wurden in Selektivmedium bei 30°C bis zu einer Optischen Dichte gemessen bei 600nm von $\approx 0,5$ inkubiert. Die Überexpression des *ULP2*-Gens wurde durch Zugabe von 100 μ M Kupfersulfat für sechs Stunden induziert. Um sowohl die sumoylierten höhermolekularen Proteine, als auch das freie SUMO-Protein detektieren zu können, wurde das Polyacrylamidgel aufgeteilt. Der untere Teil mit Proteinen unter 30KDa wurde 10 Minuten transferiert. Die höhermolekularen Proteine wurden in einem einstündigen Transfer auf die Membran übertragen. SUMO-Proteine wurden mit anti-SUMO-Antikörper als primärem Antikörper detektiert (Abb. 20B).

Abbildung 20B zeigt, dass Überexpression von *ULP2* zu einer erheblichen Reduktion von SUMO-Konjugaten führt. Zugleich erhöhte sich die intrazelluläre Konzentration an freiem SUMO. Das Ulp2-Protein hat demnach einen Einfluss auf die Desumoylierung.

3.5.2 Sequenzvergleiche SUMO-spezifischer Proteasen

Im Laufe dieser Charakterisierung des Ulp2-Genproduktes erschien eine Publikation von Li und Hochstrasser (1999). Diese beschrieb zum ersten Mal ein SUMO-dekonjugierendes Enzym, das Ulp1-Protein. Dieses Enzym wies zwei Funktionen auf. Zur Freisetzung der für die Konjugation essentiellen C-terminalen Di-Glycinsequenz wird das SUMO-Vorläuferprotein von Ulp1p spezifisch carboxyterminal prozessiert. Überdies zeigten die Daten, dass Ulp1p eine wichtige Funktion bei der Desumoylierung von Konjugaten besitzt.

Bei der Durchmusterung des Hefegenoms nach homologen Sequenzen zu Ulp2p konnte nur das später als Ulp1p bezeichnete Protein gefunden werden. Im Gegensatz zur hohen Anzahl an Ubiquitin-dekonjugierenden Enzymen (17 DUB's), ließen sich im Hefegenom nur zwei für SUMO-spezifische Isopeptidasen codierende Gene, *ULP1* und *ULP2*, identifizieren. Die Homologie zwischen von diesen beiden Genen codierten Proteinsequenzen beschränkt sich auf einen sehr kleinen Bereich von ungefähr 200 Aminosäureresten (Abb. 21). Diese Domäne zeigt auch eine signifikante Homologie zu adenoviralen Cystein-Proteasen, was die Ulp-Proteine als Cystein-Proteasen enttarnte und die Lage des Cysteins des aktiven Zentrums identifizierte (Li und Hochstrasser 1999).

Ebenso wie Enzyme des SUMO-Konjugationssystems (siehe 3.1) sind dekonjugierende Enzyme in allen Eukaryoten zu finden. In höheren Eukaryoten konnten verschiedene Proteinsequenzen mit Homologie zu Ulp1p und Ulp2p gefunden werden. In Abbildung 21 sind beispielhaft Bereiche von Proteinen gezeigt, die näher mit Ulp2p als mit Ulp1p verwandt sind. Die Datenbankanalysen ergaben, dass sich die Homologie in allen Fällen nur auf die das aktive Zentrum enthaltende Domänen beschränkten (siehe Diskussion 4.2).

<i>ScUlp2p</i>	447	QDFKCLFNKDWVNDLSILDFFTKFYIES	SIEKSIKREQVHLMSSFFYTKLI	----	498
<i>HsUlp2p</i>	665	EDLHCLNEGEFLNDVIIDFYLYLVLEKLRKED	--ADRIHIFSSFFYKRLN	----	714
<i>SpUlp2p</i>	378	TDLTRLNEGEFLNDTIIDFYLYLVLEKLRKED	--ADRIHIFSSFFYKRLN	----	428
<i>CeUlp2p</i>	571	KDITRTLDREKFLNDSVMAFMLNYIAFML	SSSELMK--S-VHMCNTFLFVNLT	RLLP	623
<i>ScUlp1p</i>	438	RDFKTLAPRRWLNDTIIIEFFMKYIEKST	PTNTVA-----FNSFFYT	NLS----	481
<i>ScUlp2p</i>	499	---SNPADYYSNV-----	---KKWVNNTDLFS	KKYVVIPINISYHWFSCI	I
<i>HsUlp2p</i>	715	---QERRNHETTNLSIQQRHGRVKT	WTRHVDIFEKDFIFVPLNEAAHWFLAVV		768
<i>SpUlp2p</i>	429	---SKDKDGKRLG-----	---HRGVKRWTKQKVDLFH	KKYIIVPINETFHWYLA	I
<i>CeUlp2p</i>	624	PLCFSKRRPIEPEHIKIVKDNCP	RVLRWTRKFDVLA	KDYIIPINEDLHWLVIAV	
<i>ScUlp1p</i>	482	-----ERGVOGVR-----	---RWMKRKKTQIDKLD	KIFTPINLNQS	HWALG
<i>ScUlp2p</i>	539	TNLDAILDFHQNKDKN-----	---DAINSDEISINNPLVN	-----	ILTFDS
<i>HsUlp2p</i>	977	T-----	---LLMDSLIRGFS	RSN-----	
<i>SpUlp2p</i>	473	CNIDRLMPVDTKLEEQ-----	---DEIVMSSVEQPSAS	KTRQAEELTSNSPA	ILIFDS
<i>CeUlp2p</i>	679	INPSGATVDMSENEEASRAAPKCY	IVFFDPLSGLDPS	KK-----	NH
<i>ScUlp1p</i>	522	DLKKTITG-----	---YVDSLNGPNAMS	-----	
<i>ScUlp2p</i>	577	LRQTHSREIDPIKEFLISYALDKYS	---IQLDKTOIKMKTCPVPQPPNMS	SDCGV	627
<i>HsUlp2p</i>	992	-----VVKILREYLEVEWEVKKGSK	--RSFSKDVMMKGSNPKVPQNNF	SDCGV	1037
<i>SpUlp2p</i>	522	LANLHKGALNYLREYLEEA	FERKKN---VHLKSTDIRGF	HAKVPQNSNFSDCGI	572
<i>CeUlp2p</i>	719	MCHCIKIYLAQLYENTKAPGMK	FASKNPTIYDEERVV	VTRAENTPIQDNFYDCGL	773
<i>ScUlp1p</i>	543	-----FAILTDLQKYVMEES	KHTIG-----ED	---FDLIHLDCPQPPNGY	DCGI
<i>ScUlp2p</i>	627	HVILNIRKFFENPVETIDV			645
<i>HsUlp2p</i>	1037	YVLQYVESFFENPILS	FEL		1057
<i>SpUlp2p</i>	572	YALHFVLELFLETPEQVFTI			597
<i>CeUlp2p</i>	773	YVLHFIEGLFCYPNRPVNV			791
<i>ScUlp1p</i>	583	YVCMNTLYGSADAPL	DFDY		601

Abb. 21: Vergleich Ulp-spezifischer Domänen verschiedener Organismen. Dargestellt sind Bereiche dekonjugierender Enzyme aus *S. cerevisiae*: *ScUlp2p* (Aminosäurereste von Position 447 bis 645) und *ScUlp1p* (AS 6438-601), *Schizosaccharomyces pombe*: *SpUlp2p* (O13769, AS378-597), humanes *HsUlp2p* (AB018340, AS 665-768 und 977-1057), und *Caenorhabditis elegans*: *CeUlp2p* (AAA98019, AS 571-791). Die Bezeichnung der letzteren Proteine erfolgte wegen ihrer Ähnlichkeit zu *ScUlp2p*. Die potentiell zum aktiven Zentrum gehörenden Histidin- und Cystein-Aminosäurereste sind mit einem Stern markiert.

Zusammengenommen identifizierte die Sequenzanalyse und die in Abschnitt 3.5.1 beschriebenen biochemischen Daten das Ulp2-Protein als ein SUMO-dekonjugierendes Enzym. Überexpression von *ULP2* führt zu einer Reduktion von SUMO-Konjugaten während Disruption des *ULP2*-Gens zu einer erhöhten Menge solcher Konjugate führte. Gleichzeitig führte die Disruption von *ULP2* zu einer Suppression der Defekte des SUMO-aktivierenden Enzyms. Umgekehrt supprimierten Mutationen des *UBA2*-Gens Defekte in *ulp2*-Mutanten. Konjugation und Ulp2p-abhängige Dekonjugation müssen demnach im Gleichgewicht stehen, um ein normales Wachstum der Zellen zu ermöglichen (siehe auch 3.6.1.2).

3.6 SUMO-dekonjugierende Enzyme der Bäckerhefe

In *S. cerevisiae* existieren zwei SUMO-spezifische Proteasen, Ulp1p und Ulp2p. Die bisherige Charakterisierung des Ulp2-Proteins ergab, dass es für eine Reihe zellulärer Prozesse notwendig ist. Warum benötigen die Zellen zwei verschiedene dieser Enzyme?

Phänotypische und biochemische Vergleiche der beiden Genprodukte sollten darüber Aufschluss geben.

3.6.1 Ulp1p und Ulp2p haben unterschiedliche Funktionen

3.6.1.1 Biochemischer Vergleich der Ulp-Proteine

Die SUMO-spezifischen Proteasen müssen zwei verschiedene Funktionen in der Zelle erfüllen. Zum einen ist es notwendig, konjugierbares SUMO aus dem Vorläuferprotein zu generieren. Hierzu muss eine C-terminale Prozessierung erfolgen, damit reifes SUMO das für die Konjugation essentielle carboxyterminale Di-Glycinmotiv präsentiert. Zum anderen muss eine Freisetzung von SUMO aus den Konjugaten erfolgen, in dem die Amidbindungen zwischen dem C-terminalen Glycin des SUMO und internen Lysinresten der Substrate spezifisch gespalten wird. Von Li und Hochstrasser (1999) ist gezeigt worden, dass das Ulp1-Protein diese beiden Funktionen erfüllen kann. Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen sollten zeigen, ob auch das Ulp2-Protein beide Funktionen aufweist.

Das frei vorliegende und an Konjugate gebundene SUMO wurde in Proteinextrakten verschiedener Mutanten immunologisch detektiert. Verglichen wurden der Wildtypstamm, die *uba2*-*ts9*-Mutante, die beiden Einzelmутanten *ulp1*-*ts* und *ulp2*- Δ 1 sowie die *ulp1*, *ulp2*-Doppelmutante (Abb. 22A). Bei der verwendeten *ulp1*-Mutation handelt es sich um das von Li und Hochstrasser (1999) generierte konditionelle *ulp1*-333-Allel (*ulp1*-*ts*).

Der Vergleich des freien, also nicht konjugierten SUMO in der Zelle zeigte, dass Ulp2p scheinbar keine wichtige Rolle bei der Entstehung des reifen SUMO-Proteins *in vivo* spielt. Wie schon in vorhergehenden Analysen (siehe Abb. 20B) war in Wildtypextrakten nur eine geringe Menge des vorhandenen SUMO-Proteins nicht an Substrate gebunden. In diesen Extrakten war jedoch nur reifes SUMO detektierbar, keine Vorläuferproteine (Abb. 22A). Inhibierte man die Aktivierung von SUMO, zum Beispiel durch Mutation des *UBA2*-Gens, stieg der Spiegel an freiem, reifem SUMO drastisch an.

Das Ulp1-Protein ist notwendig für die Abspaltung der drei Aminosäurereste am C-Terminus von SUMO (Li und Hochstrasser 1999). Nachdem *ulp1*-Zellen für sechs Stunden bei der restriktiven Temperatur von 37°C inkubiert worden waren, kam es in diesen Zellen zur Akkumulation von SUMO-Vorläuferproteinen und Konjugaten, nicht aber von reifen SUMO-Proteinen (Abb. 22A). In diesen Zellen liegt aber das funktionale Wildtyp-Ulp2-Protein vor. Falls das Ulp2-Protein eine Rolle bei der Generierung des reifen SUMO spielen würde, dann dürfte es nicht zur drastischen Akkumulation des SUMO-Vorläufers in *ulp1*-Mutanten kommen. Es war aber kein reifes SUMO in dieser Mutante zu detektieren (Abb. 22A). Die Disruption des *ULP2*-Gens führte also nicht zu einer

derartigen Akkumulation. In *ulp2Δ*-Mutanten war kaum noch reifes SUMO zu detektieren, da sumoylierte Proteine akkumulierten, hingegen keine Vorläuferform des SUMO-Proteins. In der *ulp1, ulp2*-Doppelmutante häuften SUMO-Vorläuferproteine sich in gleichem Ausmaß wie in der *ulp1*-Einzelmutante an.

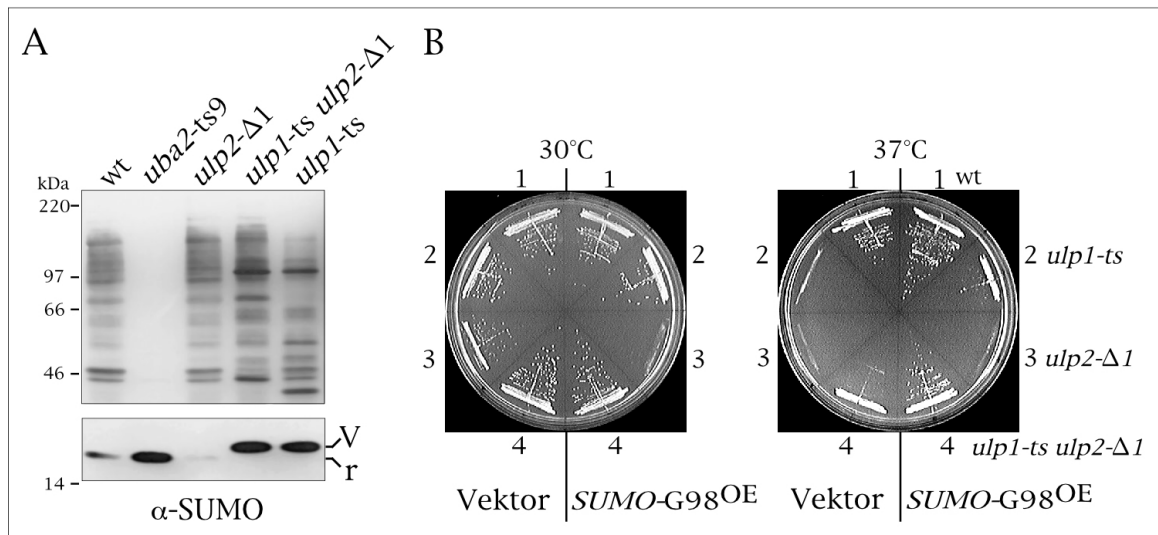


Abb. 22: Phänotypischer Vergleich von *ulp2*- und *ulp1*-Mutanten. Wildtyp-Zellen (wt, JD47-13C), *uba2-ts9*, *ulp2-Δ1*, *ulp1-ts* und einer *ulp2Δ, ulp1-ts*-Doppelmutante (IS70) wurden untersucht. **A)** Immunologische Detektion von SUMO und sumoylierten Proteinen in Proteinextrakten mit Hilfe des primären anti-SUMO-Antikörpers. Die Kulturen wurden für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. V, SUMO-Vorläuferprotein, r, reifes SUMO. **B)** Auswirkungen von überexprimiertem reifem SUMO (SUMO-G98^{OE}) auf das Wachstum der verschiedenen Mutanten. Die Zellen wurden drei Tage bei den angegebenen Temperaturen auf Selektivmedien mit 100μM Kupfersulfat zur Induktion der SUMO-Expression inkubiert.

Die beschriebenen Analysen zeigten, dass *in vivo* hauptsächlich Ulp1p für die Bereitstellung von reifem, konjugierbarem SUMO verantwortlich ist.

Da Ulp1p ebenfalls eine Funktion bei der Spaltung der Isopeptidbindungen zwischen den Substraten und SUMO aufweist, häuften sich in *ulp1*-Mutanten, ebenso wie in *ulp2*-Mutanten sumoylierte Proteine an. Die Molekulargewichte der detektierten Konjugate in den beiden untersuchten Einzelmutanten unterschieden sich jedoch voneinander (Abb. 22A). Scheinbar werden von den beiden SUMO-dekonjugierenden Enzymen Ulp1p und Ulp2p unterschiedliche sumoylierte Proteine erkannt und proteolytisch gespalten. Dieser Befund wurde durch die Untersuchung der *ulp1, ulp2*-Doppelmutante erhärtet. In diesen Zellen, in denen beide Enzyme defekt waren, akkumulierten sowohl Ulp1p- als auch Ulp2p-spezifische SUMO-Konjugate (Abb. 22A).

3.6.1.2 Gleichgewicht zwischen Konjugation und Dekonjugation

Für die Konjugation von SUMO wird konjugierbares reifes SUMO benötigt. Dieses kann entweder durch die Prozessierung des Vorläuferproteins entstehen, oder indem es von Substraten wieder dekonjugiert wird. Die oben beschriebenen Analysen zeigten, dass in *ulp1*-Mutanten die Prozessierung von SUMO inhibiert ist. Es sollte daher untersucht werden, ob die Temperatursensitivität der *ulp1*-Mutanten auf die ungenügende Bereitstellung des reifen SUMO-Proteins zurückzuführen sind.

Zellen des Wildtypstammes sowie der verschiedenen *ulp*-Mutanten wurden mit einem Plasmid transformiert, das reifes SUMO (SUMO-G98) unter Kontrolle des Kupferinduzierbaren *CUP1*-Promotors exprimierte (pIS50-T). Zur Kontrolle wurde auch ein leerer Vektor in die selben Mutanten eingebracht. Die verschiedenen Transformanten wurden auf Kupfer-haltigen Minimalmedien bei 30°C und 37°C für drei Tage inkubiert. Es zeigte sich, dass die Überexpression des reifen SUMO tatsächlich die Temperaturtoleranz der *ulp1*-Mutante erhöhte (Abb. 22B). Die Zellen waren in der Lage, bei erhöhter Temperatur zu wachsen.

Mutanten mit einem konditionalen *ulp1*-Allel arretieren nach Hitzeschock in der G₂/M-Phase (Li und Hochstrasser 1999). Es konnte in dieser Arbeit durch mikroskopische Untersuchungen gezeigt werden, dass *ulp1*-Mutanten bei Überexpression von reifem SUMO auch nach Hitzeschock keinen Zellzyklus-Arrest mehr eingehen (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde deuten an, dass die Phänotypen der *ulp1*-Mutante auf die inhibierte Prozessierung des SUMO-Vorläuferproteins zurückzuführen sind. Damit weist die *ulp1*-Mutanten offenbar hauptsächlich einen Defekt im Verlauf der SUMO-Konjugation und nicht der Dekonjugation auf.

Die Überexpression von SUMO war in *ulp2*-Mutanten toxisch (Abb. 22B). Vermutlich erhöhte sich durch die Überexpression die Konjugationseffizienz und es kam zur Akkumulation weiterer SUMO-Konjugate auf Grund der mangelnden Dekonjugation in *ulp2*-Zellen. Die verstärkte Akkumulation von SUMO-Konjugaten nach Überexpression von SUMO wurde schon bei der biochemischen Analyse der *ulp2*-Mutanten beobachtet (Abschnitt 3.5.1). In der Abbildung 20A sind sumoylierte Proteine nach Überexpression des SUMO-Vorläuferproteins gezeigt. Beim Vergleich der Konjugate in Wildtypzellen und *ulp2*-Mutanten in Abb. 20A und 22A fällt auf, dass bei SUMO-Überexpression wesentlich größere Mengen sumoylierte Proteine in *ulp2*-Mutanten akkumulieren. Die Induktion der SUMO-Expression führte bereits bei 30°C zur Inhibierung des Wachstums von *ulp2*-Zellen. Die beobachteten Phänotypen der *ulp2*-Mutante (Abschnitt 3.4) sind demzufolge auf einen Defekt bei der Desumoylierung und nicht, wie im Fall von *ulp1*-Mutanten, auf die Konjugation zurückzuführen.

Die phänotypischen Defekte der *ulp2*-Mutante lassen sich durch Mutationen des SUMO-Konjugationssystems supprimieren. Wie in den Abschnitten 3.3 und 3.4 gezeigt, weisen Doppelmutanten, in denen das SUMO-aktivierende Enzym mutiert (*uba2-ts9*) und das *ULP2*-Gen deletiert wurde, vergleichbare Wachstumseigenschaften auf wie

Wildtypzellen. Von Li und Hochstrasser (2000) wurde unterdessen gezeigt, dass auch Mutationen im SUMO-konjugierenden Gen *UBC9* die *ulp2*-Mutante supprimieren können. Es sollte daher untersucht werden, ob die *ulp1*-Mutation auch in der Lage ist, die *ulp2*-Mutante zu supprimieren. Eine Doppelmutante wurde erzeugt, die das konditionale *ulp1*-Allel trug und eine Deletion im *ULP2*-Gen. Diese war in der Lage, bei 37°C zu wachsen (Abb. 22B). Die *ulp1*- und *ulp2*Δ-vermittelten Defekte supprimierten sich zum Teil gegenseitig. Erstaunlicherweise zeigte sich, dass die Überexpression von reifem SUMO in der *ulp1, ulp2*-Doppelmutante zu einer zusätzlichen Verbesserung der Temperaturresistenz der Zellen führte. Die Suppression der *ulp2*-Mutante durch *ulp1*-ts kann demnach nicht nur mit der Inhibierung der SUMO-Konjugation erklärt werden. Es scheint, dass das Ulp1^{ts}-Protein außerdem die Anhäufung von toxischen Ulp2p-spezifischen Konjugaten verhindert (siehe Diskussion 4.3).

Die beschriebenen Daten zeigten, dass das Gleichgewicht der SUMO-Konjugation und Dekonjugation durch Mutation der beteiligten Gene oder durch Überexpression von SUMO gestört werden kann. Dies hatte zu unterschiedlichen phänotypischen Auswirkungen geführt. Im Folgenden werden weitere Überexpressionsstudien beschrieben, die zeigen, dass auch die Überexpression der beteiligten Enzyme das Wachstum der Zellen beeinflusst.

Die Deletion von *ULP2* führte wegen der mangelnden Dekonjugation von SUMO unter anderem zur Temperatursensitivität der Mutanten (siehe 3.4). Die Überexpression von *ULP2* führte zu einer drastischen Abnahme der sumoylierten Proteine (Abb. 20B). Dies hatte auch zur Folge, dass das Wachstum der Zellen inhibiert war (Abb. 23A). Schon bei 30°C zeigten Wildtyp-Zellen, in denen das *ULP2*-Gen unter Kontrolle des *CUP1*-Promotors überexprimiert wurde, ein verlangsamtes Wachstum. In *uba2*-Mutanten, ebenso wie in anderen Mutanten, in denen bereits die Konjugation reduziert ist, ist die Überexpression von *ULP2* letal (Abb. 23A, sowie Daten nicht gezeigt). Eine weitere Steigerung der *ULP2*-Expression durch Verwendung des starken Galaktose-induzierbaren *GAL10*-Promotors, war auch für Wildtypzellen letal (Daten nicht gezeigt). Die Toxizität des Ulp2p war jedoch nicht durch eine Fehllokalisierung des Proteins bedingt (Daten nicht gezeigt).

Die Überexpression der zweiten SUMO-spezifischen Protease Ulp1p hatte weder supprimierende noch inhibierende Auswirkungen auf das Wachstum von Wildtyp oder Konjugations-defizienten Mutanten (Abb. 23A/B). Allerdings reagierten *ulp2*-Mutanten ebenso hypersensitiv auf die Überexpression von aktivem Ulp1p wie auf die von SUMO (Abb. 23B, 22B).

Zu dem in diesen Studien verwandten *ULP1*-Allel ist anzumerken, dass dieses für ein N-terminal verkürztes Genprodukt codierte (*ULP1*-Δ72). Das von diesem Allel codierte Ulp1^{ΔN}-Protein weist nicht die ersten 72 Aminosäurereste der in der Datenbank veröffentlichten Ulp1-Sequenz auf. Allerdings war nur dieses Allel, aber nicht das

Volllängen-*ULP1* in der Lage, den temperatursensitiven Phänotyp der *ulp1*-Mutante zu komplementieren. Das Ulp1^{ΔN}-Protein scheint demnach funktional zu sein und normale Enzymaktivität aufzuweisen. Das in der Literatur zugrunde gelegte „Volllängen-Ulp1p“ hatte keinerlei Effekt, weder auf das Wachstum von *ulp2*- noch von *ulp1*-Mutanten (Daten nicht gezeigt). Dies legt den Schluss nahe, dass die codierende Sequenz des *ULP1*-Gens erst mit dem 73. Codon des angenommenen ORFs beginnt.

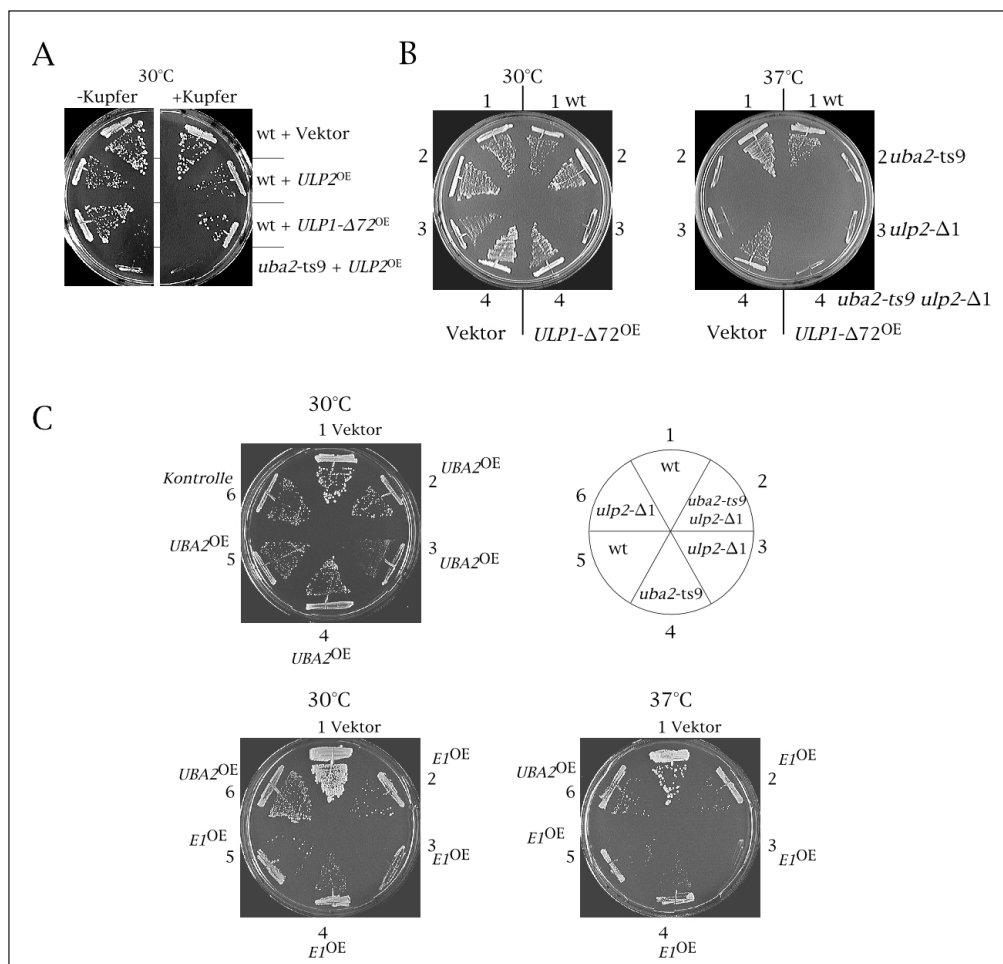


Abb. 23: SUMO-Konjugation und Dekonjugation müssen im Gleichgewicht sein um normale Zellteilung zu ermöglichen. A) *ULP2*-Überexpression (*ULP2*^{OE}) ist letal in *uba2*-Mutanten und Wachstum-inhibierend in Wildtypzellen. Die angegebenen induzierten Gene wurden unter Kontrolle des Kupfer-induzierbaren *CUP1*-Promotors exprimiert (+100μM Kupfer). **B)** Die Überexpression von aktivem *ULP1* (*ULP1-Δ72*^{OE}) ist synthetisch letal mit der *ulp2*-Mutation. Die angegebenen Stämme enthielten entweder eine Vektorkontrolle oder ein *P_{CUP1}*-kontrolliertes *ULP1*-exprimierendes Plasmid. Die Zellen wurden auf Minimalmedien mit 100μM Kupfersulfat ausgestrichen. **C)** Die Überexpression beider Untereinheiten des SUMO-aktivierenden Enzyms (*E1*^{OE}) ist toxisch für *ulp2*-deletierte Zellen. Die Überexpression von *UBA2* (*UBA2*^{OE}) alleine hingegen supprimiert partiell die *ulp2*Δ-vermittelte Temperatursensitivität. Die Angabe der überexprimierten Gene verdeutlicht die Kupfer- oder Galaktose-induzierte Expression von *AOS1*, bzw. *UBA2*. Die Angabe *E1*^{OE} verdeutlicht die gleichzeitige Induktion von *AOS1* und *UBA2*. (Die Zellen wurden drei Tage bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Verwendete Stämme: Wildtyp, JD47-13C; *uba2*-ts9, JD90-1B;pIS2-ts9; *ulp2*-Δ1, IS30a; *uba2*-ts9,*ulp1*-Δ1, IS69).

Weitere Expressionsstudien zeigten, dass nicht nur die Überexpression des dekonjugierenden Enzyms Ulp2p wachstumsinhibierend ist, sondern auch die des SUMO-aktivierenden Enzyms (Abb. 23). Das SUMO-aktivierende Enzym ist ein Heterodimer bestehend aus zwei Untereinheiten, Aosl1p und Uba2p (Johnson *et al.* 1997). Es wurde untersucht, ob die Überexpression eines der beiden Proteine oder aber beider Untereinheiten parallel, das Wachstum der Zellen beeinträchtigt. Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen Mutanten mit Plasmiden transformiert, die die beiden Gene *AOS1* und *UBA2* unter Kontrolle von Kupfer-, beziehungsweise Galaktose-induzierbaren Promotoren exprimierten. Durch die Wahl der Medien konnte dann die Expression entweder beider Gene gleichzeitig, oder aber nur eines der beiden, induziert werden. In Abbildung 23C sind nur die Medien gezeigt, in denen Kupfer und Galaktose zur Induktion der Gene enthalten war.

Es zeigte sich, dass die Überexpression beider Untereinheiten des SUMO-aktivierenden Enzyms, ebenso wie die von *ULP2*, in Wildtypzellen Wachstumsinhibierend und bei höheren Temperaturen toxisch war (Abb. 23C). Insbesondere *ulp2*-Mutanten reagierten hypersensitiv auf diese Induktion der SUMO-Aktivierung. Interessant war die Beobachtung, dass die Überexpression von *UBA2* alleine die Temperatursensitivität der *ulp2*-Mutante teilweise supprimierte (Abb. 23C). Dies wurde bei der Expression von *AOS1* nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt). Da die *ulp2*-Mutante durch Inhibierung des Konjugationssystems supprimiert werden kann (siehe oben), wird vermutlich durch die Überexpression von *UBA2* die Aktivierung von SUMO nicht verstärkt, sondern im Gegenteil reduziert. Denkbar wäre, dass die erhöhte intrazelluläre Konzentration von Uba2p inhibitorisch für die Interaktion mit Aosl1p ist.

Die verschiedenen Studien dieser Arbeit konnten zeigen, dass die Konjugation und Dekonjugation von SUMO ausgeglichen sein muss um ein normales Wachstum der Zellen zu erlauben.

3.6.2 Ulp1p und Ulp2p sind in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle lokalisiert

Die oben beschriebenen Experimente hatten gezeigt, dass die beiden SUMO-spezifischen Proteasen Ulp1p und Ulp2p in *S. cerevisiae* unterschiedliche Funktionen besitzen. Warum werden zwei verschiedene Enzyme benötigt? Ein Grund könnte sein, dass sie unterschiedliche spezifische Substrate erkennen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Proteine nicht in den selben Kompartimenten vorliegen. Um dieser Frage nach zu gehen, wurden Lokalisierungsstudien mit Ulp1p und Ulp2p durchgeführt.

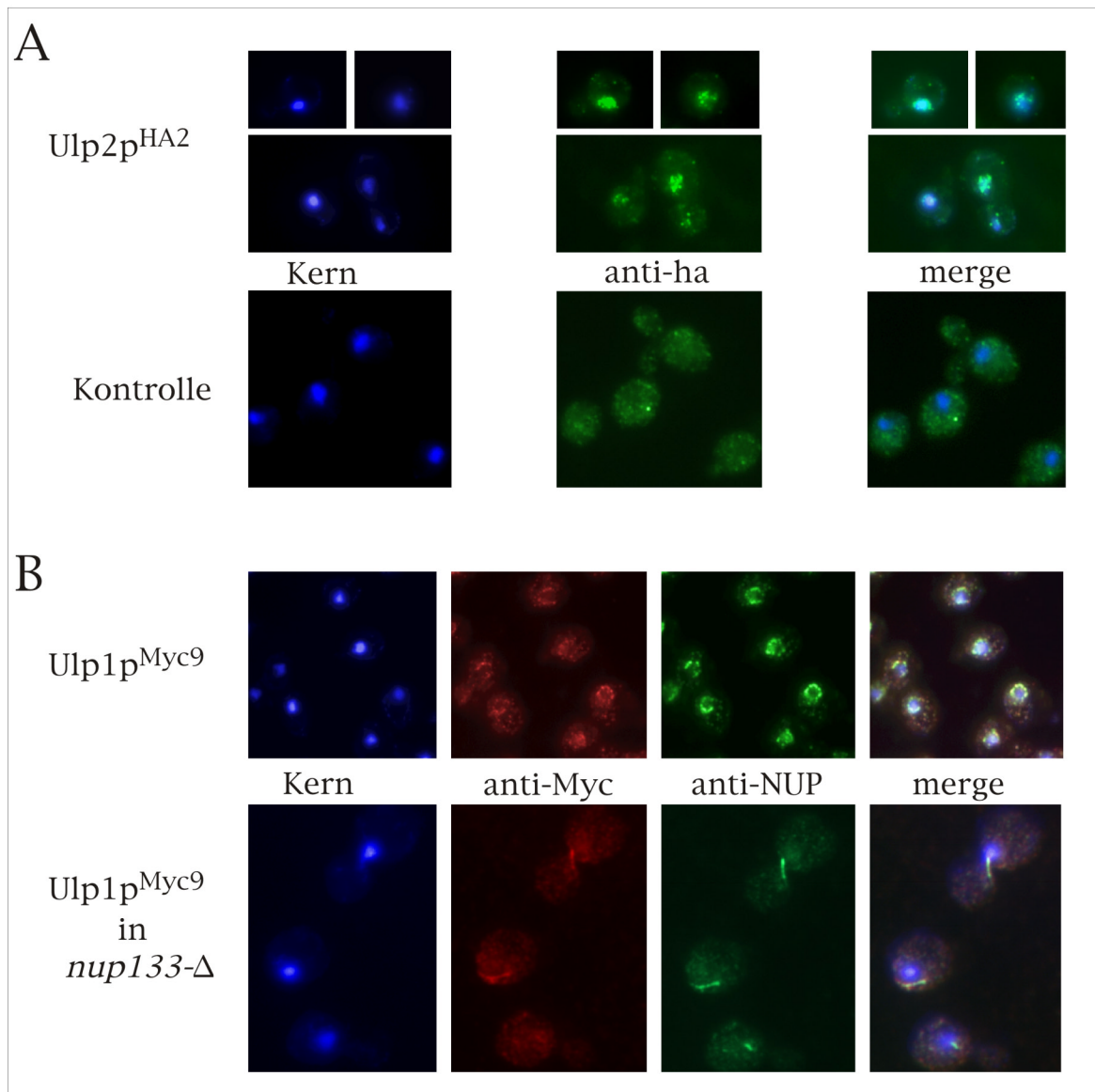


Abb. 24: Ulp1p und Ulp2p sind in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert. **A)** Detektion des Ulp2^{HA2}-Proteins. Proteine des nicht-markierten Stammes JD47-13C und des markierten Stammes IS31 wurden mit anti-HA-Antikörper (Klon 3F10) angefärbt. **B)** Detektion von Ulp1p^{MYC9} mittels anti-Myc-Antikörper (Klon 9E10). Die Kernporen wurden mit anti-Nukleoporin-Antikörper (anti-NUP) markiert. Zur Kolokalisierung von Ulp1p^{MYC9} mit Kernporenkomplexen wurden die Proteine im Wildtypstamm IS36 mit einem *nup133-Δ*-Stamm verglichen. Deletion von *NUP133* führt zur Anhäufung von Kernporenkomplexen an ein oder zwei Bereichen der Kernhülle. Die DNA der Zellen wurde mit dem interkalierenden Fluorochrom Hoechst Nr.33258 markiert. Zur Kolokalisierung wurden die Aufnahmen der verschiedenen Filtersätze übereinandergelegt (merge).

Die beiden Proteine wurden zur immunologischen Detektion mit carboxyterminalen Epitopen markiert. Das chromosomale *ULP1*-Gen wurde über *In-vivo*-Rekombination mit der Sequenz für ein neunfaches c-Myc-Epitop fusioniert (resultierender Stamm IS36). Zur Expression eines zweifach HA-markierten *ULP2* wurde ein integrativer *URA3*-markierter Vektor, der ein 5'-deletiertes *ulp2-HA₂*-Allel codierte, in den Leserahmen des *ULP2*-Gens

integriert. Der resultierende Stamm IS31 enthielt als Folge dieses Integrationsereignisses eine 3'-markierte Version des *ULP2*-Gens und eine 5'-deletierte unmarkierte Version ohne jeden Promotor. Letztere sollte somit kein Genprodukt hervorbringen. Beide markierten Stämme zeigten normale Wachstumseigenschaften, was auf volle Funktionalität und damit normale Lokalisierung der markierten Ulp-Proteine schließen ließ. Mit Hilfe von indirekter Immunfluoreszenz wurden die Epitop-markierten Proteine Ulp1p^{Myc9} und Ulp2p^{HA2} in der Zelle lokalisiert (Abb. 24).

Wie in Abbildung 24A gezeigt, wurde das Ulp2-Protein im Zellkern detektiert, ebenso wie dies zuvor für Uba2p und Ubc9p beschrieben worden war (Dohmen *et al.* 1995, bzw. Betting und Seufert 1996). Zwar war auch eine Hintergrundfärbung des Zytosols der Zellen zu detektieren, aber diese trat auch auf, wenn keinerlei HA-Epitope in den getesteten Zellen vorlagen.

Das nukleäre Ulp2^{HA2}-Protein war nicht homogen in den Kernen zu detektieren. Es zeigte sich eine granuläre Verteilung in den Zellkernen (Abb. 24A). Zur Überprüfung, ob auch das SUMO-aktivierende Enzym tatsächlich in ähnlichen Strukturen zu finden ist, wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz integrativ Epitop-markiertes Uba2^{Flag}-Protein lokalisiert. Bisherige Lokalisierungsstudien wurden mit überexprimiertem, GFP-markiertem *UBA2* durchgeführt (Dohmen *et al.* 1995). Die Lokalisierungsstudien zeigten, dass Ulp2p und Uba2p in vergleichbaren intranukleären Bereichen zu detektieren sind (Abb. 24, und Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu Ulp2p wurde das Ulp1^{MYC9}-Protein in einer punktierten Struktur rund um den Zellkern detektiert. Dieses Muster ist charakteristisch für Kernporen-assoziierte Proteine (Abb. 24B). Um nachzuweisen, dass es sich tatsächlich um eine Kernporen-Lokalisation handelte, wurde Ulp1p in einem *nup133*-Deletionsstamm Epitop-markiert. Die Entfernung des Nukleoporins Nup133p führt zu einer Aggregation von Kernporenkomplexen (Pemberton *et al.* 1995). In der Tat führte die Misslokalisierung von Nukleoporinen auch zur Aggregation von Ulp1p^{HA2} an identischer Stelle (Abb. 24B). Dies bestätigte die Vermutung, dass Ulp1p an den Kernporen lokalisiert ist.

Die beiden SUMO-dekonjugierenden Enzyme Ulp1p und Ulp2p sind somit an verschiedenen Stellen in der Zelle lokalisiert, Ulp2p im Inneren des Zellkerns, und Ulp1p an den Kernporen. Die unterschiedliche Lokalisierung könnte auch ein Grund für die unterschiedliche Substratspezifität der beiden Enzyme *in vivo* sein (siehe Diskussion 4.4).

3.7 Die Aktivität von Ulp2p wird Zellzyklus-abhängig kontrolliert

Es konnte gezeigt werden, dass das Uba2^{Flag}-Protein, ebenso wie Ulp2p^{HA2}, in nukleären Strukturen vorlag. Das bedeutete, dass SUMO-konjugierende Enzyme in den selben Kompartimenten zu finden waren wie das dekonjugierende Enzym Ulp2p. Um eine nutzlose antagonistische Wirkung der beiden Systeme auszuschließen, muss die Zelle deren Aktivität regulieren. Biochemische Untersuchungen des Ulp2-Proteins gaben darüber Aufschluss.

Im Verlauf der Lokalisierungsstudien wurde das Laufverhalten der Epitop-markierten Proteine Ulp1p und Ulp2p mit Hilfe von Western-Blotanalysen untersucht (Abb. 25). Wie bereits oben erwähnt, veränderten die C-terminalen Epitope nicht das Wachstumsverhalten der Zellen, was auf eine Funktionalität der codierten Genprodukte schließen ließ. Die Untersuchung der beiden dekonjugierenden Enzyme zeigte, dass sie in quantitativ vergleichbaren Mengen in der Zelle vorkommen (Abb. 25A).

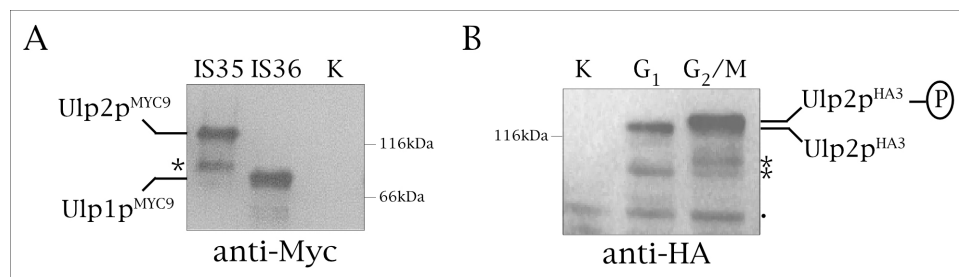


Abb. 25: Biochemische Analysen der SUMO-spezifischen Proteasen Ulp1p und Ulp2p. **A)** Ulp1p und Ulp2p liegen in gleichen Mengen in der Zelle vor. Die Myc-Epitop-markierten Proteine (Ulp1p^{MYC9}, Ulp2p^{MYC9}) wurden mittels Western-Blotanalysen unter Verwendung von anti-Myc-Antikörper (Klon 9E10) detektiert. **B)** Ulp2p^{HA3} wird in G₂/M-arretierten Stämmen posttranslational modifiziert. Die Zellzyklen wurden in der G₁- und G₂/M-Phase nach dreistündiger Inkubation bei 30°C nach Zugabe von α -Faktor (10 μ g/ml), bzw. Nocodazol (15 μ g/ml) arretiert. Die Detektion erfolgte mittels anti-HA-Antikörper (Klon 16B12). Verwendete Stämme: Ulp1p^{MYC9}, IS36; Ulp2p^{MYC9}, IS35; Ulp2p^{HA3}, IS31.

Wenn Zellen aus exponentiell wachsenden Kulturen aufgeschlossen wurden, trat im Fall von Ulp2p eine Doppelbande auf (Daten nicht gezeigt). Bei der zusätzlichen Bande konnte es sich nicht um Sumoylierung handeln, da diese auch in Extrakten auftrat, in denen keine sumoylierten Proteine detektierbar waren. Um die verschiedenen Formen des Ulp2-Proteins genauer zu untersuchen, wurden Zellzyklus-arretierte Kulturen untersucht. Mit Hilfe des Paarungspheromons α -Faktor wurden Zellen des *MATa*-Stammes IS35 (Ulp2p^{MYC9}) in der G₁-Phase arretiert. Zugabe der Mikrotubuli-destabilisierenden Substanz Nocodazol verhinderte in einem anderen Experiment die Verlängerung der Spindel, so dass die Zellen nicht in der Lage waren die Anaphase zu beenden (G₂/M-Arrest).

Aus so arretierten Kulturen extrahierte Ulp2^{MYC9}-Proteine wurden immunologisch über anti-Myc-Antikörper nachgewiesen. Es zeigte sich, dass das Ulp2-Protein in der

G₂/M-Phase in Polyacrylamidgelen ein höheres apparentes Molekulargewicht aufweist, als in der G₁-Phase (Abb. 25B). Das Ulp2-Protein wird also Zellzyklus-abhängig modifiziert.

Auf Grund der beobachteten Veränderung im Verlauf des Zellzyklus wurde eine Zusammenarbeit mit dem Labor von Wolfgang Seufert (Stuttgart) begonnen. Albert und Melanie Neutzner konnten dort zeigen, dass es sich bei der modifizierten Ulp2-Bande um phosphoryliertes Ulp2p handelte. Die bisherigen Daten lassen die Vermutung zu, dass die Aktivierung der Proteinkinase Cdc28p durch Assoziation mit B-Typ Cyclinen zu Beginn der G₂-Phase zur Phosphorylierung des Ulp2-Proteins führt. Die Aktivierung der Phosphatase Cdc14p führt dann nach Abschluss der Mitose wieder zur Dephosphorylierung von Ulp2p (Albert Neutzner, persönliche Mitteilung).

3.7.1 Einfluss von Ulp2p auf die Sumoylierung der Septine

Die oben beschriebenen Experimente zeigten, dass Ulp2p Zellzyklus-abhängig phosphoryliert wird. Die nukleäre Lokalisation des Ulp2-Proteins änderte sich scheinbar nicht durch die Phosphorylierung. Es wurden Zellen untersucht, die in der G₁- bzw. G₂/M-Phase arretiert waren. Das Ulp2^{HA3}-Protein wurde in beiden Zellzyklusphasen in den schon beschriebenen granulären Bereichen des Zellkerns detektiert (Daten nicht gezeigt). Die Phosphorylierung musste demnach eine andere Funktion haben. Daher wurden die SUMO-Konjugate in Wildtyp (JD47-13C) und *ulp2Δ*-Mutante im Vergleich untersucht (Abb. 26).

Kulturen der beiden oben genannten Stämme wurden durch Zugabe von α -Faktor oder Nocodazol zum Medium in der G₁- bzw. G₂/M-Phase arretiert und die sumoylierten Proteine extrahiert. Wie schon zuvor beschrieben (Johnson *et al.* 1999), akkumulieren SUMO-Konjugate in der G₂/M-Phase. In der G₁-Phase sind im Wildtyp nur sehr geringe Mengen sumoylierter Proteine zu detektieren (Abb. 26A). Im Unterschied dazu traten in der *ulp2*-Mutante in α -Faktor-arretierten Kulturen verstärkt sumoylierte Proteine auf. In den Nocodazol-arretierten Zellen hingegen waren die SUMO-Konjugate aus Wildtyp und *ulp2*-Mutante kaum zu unterscheiden. Die Menge an sumoylierten Proteinen in der Dekonjugations-defekten *ulp2*-Mutante nahm sogar in der G₂/M-Phase ab (Abb. 26A). Dies kann durch die geringe Menge des vorhandenen konjugierbaren SUMO-Proteins in den *ulp2*-Mutanten erklärt werden. Durch die in Folge der fehlenden Ulp2p-abhängigen Dekonjugation andauernde Akkumulation von SUMO-Konjugaten insbesondere in der G₁-Phase wird weniger SUMO für eine erneute Konjugation bereitgestellt. (siehe Abb. 22A). Das Ulp2-Protein scheint demnach eine Funktion bei der Dekonjugation sumoylierter Proteine vor allem in der G₁-Phase zu haben.

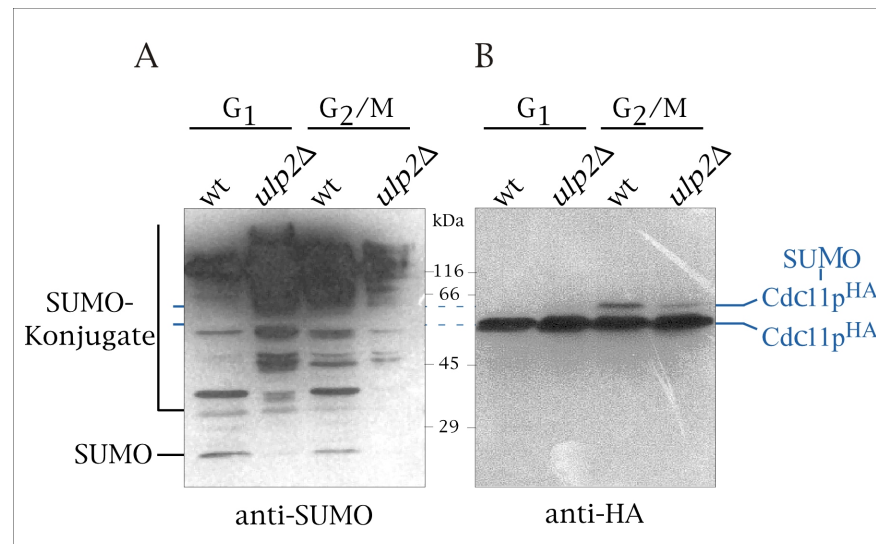


Abb. 26: Ulp2p ist in der G₁-Phase aktiv. Die Kulturen wurden nach Zugabe von α -Faktor, bzw. Nocodazol bei 30°C inkubiert. Nach mikroskopischer Überprüfung der Arreste, dass heißt mindestens 90% der Zellen einer Kultur zeigten einen G₁-, bzw. G₂/M-Arrest, wurden die Proteine aus sphäroplastierte Zellen extrahiert. **A)** Immunologische Detektion von SUMO-Konjugaten in Wildtypzellen (wt, EJY303) und *ulp2-Δ1*-Mutanten (JD293-7C) mittels anti-SUMO-Antikörper. **B)** Detektion von Epitop-markierten Cdc11^{HA}-Proteinen in wt und *ulp2-Δ1*. anti-HA-Antikörper, Klon 16B12.

Die einzigen bisher bekannten SUMO-Substratproteine der Hefe sind Proteine der Septin-Familie, die am Zytoskelet der Zelle beteiligt sind (Johnson und Blobel 1999). Septine bilden heteromultimere, ringförmige Komplexe die an der Knospungsstelle der Zelle lokalisiert sind und eine Rolle bei der Zellpolarität und Zytokinese spielen (Longtine *et al.* 1996). Zu Beginn der Anaphase werden drei (Cdc3p, Cdc11p und Sep7p) der fünf beteiligten Septine im Komplex sumoyliert. Die SUMO-Konjugation betrifft dabei nur den Teil der Septinringe die zur Mutterzellseite weisen. Sobald die Kernteilung abgeschlossen ist, wird SUMO von den Septinen wieder entfernt (Johnson und Blobel 1999). Der zeitliche Ablauf der Septin-Sumoylierung und Desumoylierung stimmt demnach überein mit der Phosphorylierung und Dephosphorylierung des dekonjugierenden Enzyms Ulp2p (siehe oben). Daher wurde untersucht ob die Deletion von *ULP2* einen Einfluss auf die Sumoylierung der Septine hat. Es wurden Stämme untersucht in denen jeweils eines der drei Septine mit carboxyterminalen HA-Epitopen markiert wurde (Johnson und Blobel 1999). In diesen Stämmen wurde das *ULP2*-Gen deletiert und mit Hilfe von Western-Blotanalysen die Sumoylierung der Septine in der G₁- und G₂/M-Phase untersucht (Abb. 26B zeigt die Ergebnisse am Beispiel von Cdc11p^{HA}).

Der Verlust des dekonjugierenden Enzyms Ulp2p reichte nicht aus, um eine Dekonjugation der Septine zu verhindern, da in G₁-arrestierten Zellen keine sumoylierten Septine auftraten (Abb. 26B). Da die Gesamtproteinmenge der vorhandenen Septine nicht reduziert war, kann dies nicht durch proteolytischen Abbau erklärt werden. Daher war anzunehmen, dass die zweite SUMO-spezifische Protease, Ulp1p, zumindest in *ulp2*-Deletionsstämmen in der Lage ist, die Septine zu dekonjugieren.

Wie schon bei der Analyse der gesamten SUMO-Konjugate festgestellt wurde, wiesen Nocodazol-arretierte *ulp2*-Mutanten eine geringere Menge sumoylierte Proteine auf. In dieser Zellzyklusphase sind in Wildtypzellen die sumoylierten Septine die dominanten Konjugate (Johnson und Blobel 1999). In *ulp2*-Mutanten häufen sich vor allem SUMO-Konjugate in der G₁-Phase an (siehe oben). Dies könnten Gründe für die Reduktion der Sumoylierung während der G₂/M-Phase sein und damit auch für die geringere Sumoylierung der Septine.

Da die Dekonjugation der Septine jedoch in der gleichen Zellzyklusphase abläuft, in der Ulp2p dephosphoryliert wird und die bisherigen Daten nicht auf eine Regulation der Ulp1p-Aktivität hindeuten, wurde untersucht, ob in Wildtypzellen die Dephosphorylierung von Ulp2p zur Dekonjugation der Septine führt.

Von Albert Neutzner konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Phosphatase Cdc14p zur Dephosphorylierung von Ulp2p führt (siehe oben 3.7, sowie Abb. 27). Das Cdc14-Protein wird am Ende der Anaphase aus dem Nukleolus in den Kern freigesetzt und dort aktiv (Visintin *et al.* 1999). Die Aktivierung erfolgt demnach zeitgleich mit der Dekonjugation der Septine.

Um zu überprüfen, ob Cdc14p-Aktivierung ein Auslöser der SUMO-Dekonjugation von Septinen *in vivo* ist, wurde die Phosphatase durch Induktion der *CDC14*-Expression in G₂/M-arretierten Zellen vorzeitig aktiviert (Abb. 27). Ein *CDC14*-Allel, dessen Expression vom Galaktose-induzierbaren *GAL1*-Promotor kontrolliert wurde, wurde in den *URA3*-Lokus *in vivo* rekombiniert. Dieses regulierbare Allel wurde in den Wildtyp und *ulp2-1* integriert (resultierende Stämme IS71 bzw. IS86). Die Kulturen wurden bei 30°C in Raffinose-haltigem Medium bis zur frühen exponentiellen Wachstumsphase inkubiert. Um modifizierte Septine sowie phosphoryliertes Ulp2p anzureichern, wurden die Zellen durch Zugabe von Nocodazol in der G₂/M-Phase arretiert. Nachdem mindestens 90% der Zellen große Knospen ausgebildet hatten und sich nicht weiter teilten, wurde Galaktose (2% Endkonzentration) ins Medium gegeben um die Expression von *CDC14* zu induzieren. Zu den in der Abbildung 27 angegebenen Zeitpunkten nach Galaktose-Zugabe wurden Zellen der Kulturen entnommen und immunologisch analysiert.

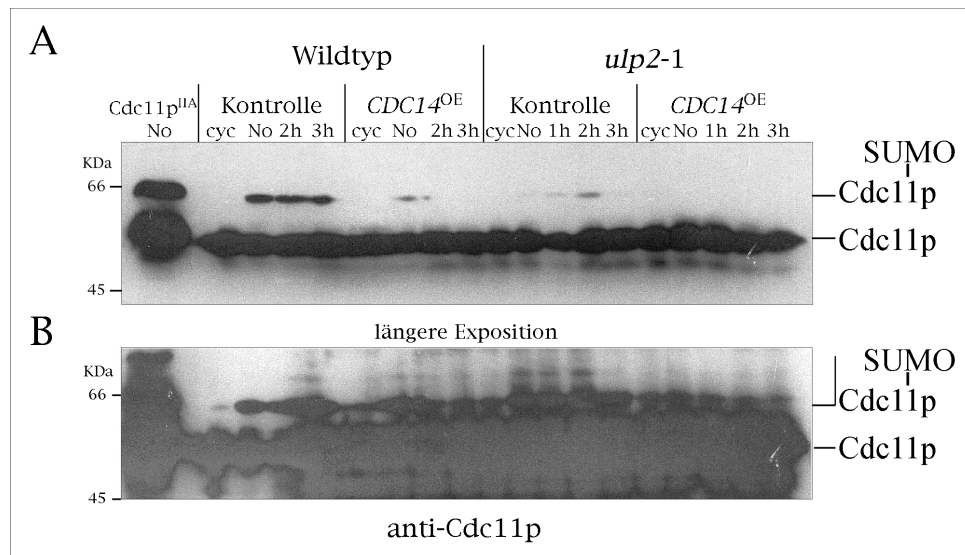


Abb. 27: Dephosphorylierung von Ulp2p führt zur Dekonjugation von Cdc11p-SUMO. Immunologische Detektion von Cdc11p mittels anti-Cdc11p-Antikörper. Versuchsdurchführung siehe Text. Die untere Abbildung zeigt eine längere Exposition.

In Zellen, in denen das vom *GAL1*-Promotor kontrollierte *CDC14* vorlag, konnte unter den verwendeten Bedingungen nur eine geringere Menge sumoyliertes Cdc11-Protein detektiert werden als in den jeweiligen Kontrollzellen. Um eine effiziente und schnelle Induktion des *GAL1*-Promotors zu ermöglichen, waren die Kulturen in Raffinose-haltigem Medium angezogen worden. Die Raffinose reprimierte zwar den *GAL1*-Promotor nicht, führt aber auch nicht zu dessen Induktion. Die mangelnde Repression könnte zu einer geringen Expression des *CDC14* beigetragen haben. Die Cdc14-Phosphatase könnte unter diesen Bedingungen das Ulp2-Protein zum Teil dephosphorylieren, das heißt aktivieren, und damit zur Reduktion der vorhandenen SUMO-konjugierten Septine führen.

Trotz der Detektionsschwierigkeiten zeigte sich, dass die Aktivierung von Cdc14p tatsächlich zu einer Dekonjugation des sumoylierten Septins Cdc11p führte (Abb. 27A, Wildtyp + *CDC14*^{OE}). In *ulp2*-Deletionsmutanten lag SUMO-konjugiertes Cdc11p in nur sehr geringen Mengen vor (siehe oben). Nach Induktion von Cdc14p kam es aber nicht zu einer weiteren signifikanten Reduzierung des SUMO-Cdc11p-Konjugats.

Zusätzlich wurden die Septinringe durch indirekte Immunfluoreszenz lokalisiert. Sowohl die Überexpression von *CDC14* in G₂/M-arretierten Zellen als auch die Überexpression von *ULP2* selber, führten je nach Länge der Induktion, zu einem Verlust der Septinringe. Nach fünfständiger Galaktose-Induktion von *CDC14* (Daten nicht gezeigt), beziehungsweise *ULP2* konnten in bis zu 40% der Zellen keine Septinringe mehr detektiert werden (siehe Abschnitt 3.8, Abb. 28). Die vorwiegend nukleäre Lokalisation des Ulp2-Proteins änderte sich auch bei starker Überexpression nicht.

Zusammengenommen weisen die Daten auf eine Inaktivierung des Ulp2-Proteins als Folge der Phosphorylierung in der Anaphase hin. Die Akkumulation von SUMO-Konjugaten in dieser Zellzyklusphase in Wildtypzellen ist daher wahrscheinlich auf die Inaktivierung des dekonjugierenden Enzyms Ulp2p zurückzuführen. Die Phosphatase Cdc14p ist zum Abschluss der Mitose demnach an der Aktivierung von Ulp2p beteiligt (siehe Diskussion).

3.8 SUMO-Substratproteine sind überwiegend nukleär

Bis auf Ulp1p sind alle bisher identifizierten, am SUMO-System beteiligten Enzyme im Kern lokalisiert (Abschnitt 3.6.2). Die einzigen bekannten Substrate dagegen, die Septine, liegen außerhalb des Zellkerns (siehe Einleitung 1.3.2). Die Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchung der SUMO-Konjugate in verschiedenen Mutanten mit defektem SUMO-Konjugations- und Dekonjugationssystem sollte Aufschluss über die Lokalisierung der weiteren sumoylierten Proteine geben.

Die biochemischen Analysen hatten gezeigt, dass in Wildtypzellen der Großteil des SUMO-Proteins an Akzeptorproteine konjugiert vorliegt. In Mutanten mit defektem SUMO-Konjugationssystem war dagegen hauptsächlich freies, nicht-konjugiertes SUMO zu detektieren. Die Disruption der SUMO-spezifischen Protease Ulp2p führte zur Akkumulation von sumoylierten Proteinen und der gleichzeitigen Abnahme des frei vorliegenden SUMO-Proteins (siehe Abb. 22A, Abschnitt 3.6.1). Diese biochemischen Informationen ermöglichten die Unterscheidung von freiem SUMO und sumoylierten Proteinen in Lokalisierungsstudien auf Grund der Zu- oder Abnahme von bestimmten Signalen in den verschiedenen Mutanten (Abb. 28). Das intrazelluläre SUMO, sei es an Substrate gebunden oder frei vorliegend, wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz detektiert.

Eine Folge der Inhibition der Konjugation, wie sie in *uba2*- und *ubc9*-Mutanten vorlag, war eine Abnahme der Zellkernfärbung. Auch in *ulp1*-Mutanten war auf Grund der Akkumulation des SUMO-Vorläuferproteins ein verstärktes diffuses zytoplasmatisches Signal des Fluoreszenz-markierten SUMO zu detektieren. In *ulp2*-Deletionsmutanten hingegen konnten nur der Zellkern und die Septinringe von dem anti-SUMO-Antikörper markiert werden (Abb. 28).

Im Einklang mit den biochemischen Daten ließ der Vergleich der Mutanten vermuten, dass die sumoylierten Proteine sich, mit Ausnahme der Septine, in den Zellkernen anhäuferten. Das freie SUMO lag scheinbar sowohl im Kern als auch im

Zytoplasma vor (Abb. 28). Auf Grund seiner geringen Größe ist es möglich, dass SUMO frei durch die Kernporen diffundieren kann.

Die Daten geben Hinweise darauf, dass entweder die Sumoylierung zu einer Kernlokalisierung der Substrate führt, oder dass, außer den Septinen, hauptsächlich nukleäre Proteine als Akzeptoren der Sumoylierung zur Verfügung stehen. Die Lokalisierung des SUMO-prozessierenden Enzyms Ulp1p an der Kernpore könnte eine Rolle bei der Zuführung des reifen SUMO-Proteins zu den aktivierenden und konjugierenden Enzymen im Zellkern spielen (siehe Diskussion).

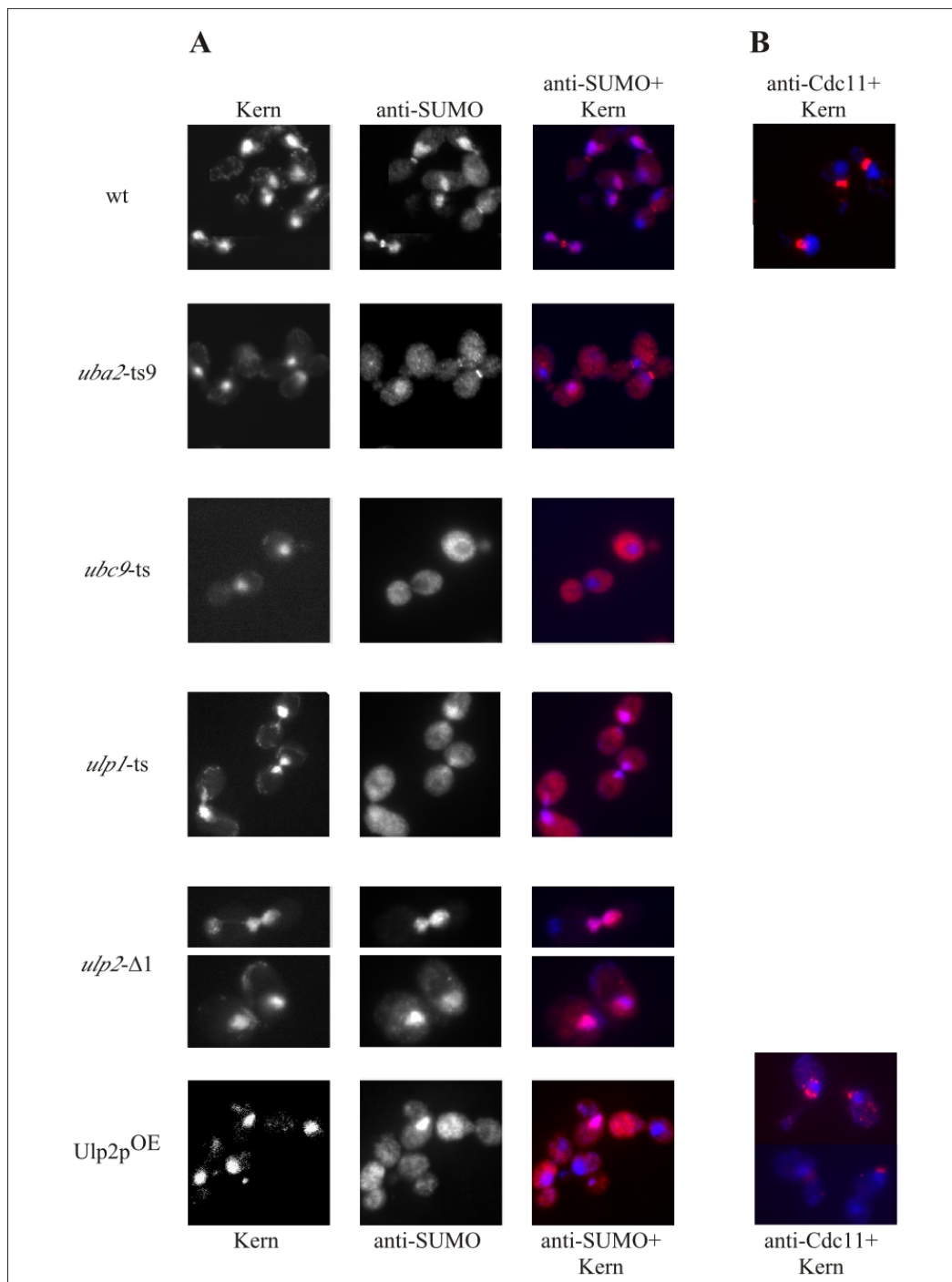


Abb. 28: Fluoreszenz-mikroskopische Lokalisierung von SUMO und SUMO-Konjugatproteinen. **A)** In Wildtypzellen (wt, JD47-13C), *uba2-ts9*, *ubc9-ts* (YW055), *ulp1-ts* (IS90-1B) und *ulp2-Δ1*-Mutanten (IS30a), sowie in Wildtypzellen bei Überexpression von *ULP2* (*ULP2^{OE}*) nach dreistündiger Erhöhung der Temperatur auf 37°C wurde durch indirekte Immunfluoreszenz SUMO lokalisiert. (Kern, blau, angefärbt mit Hoechst-Farbstoff; SUMO, rot, anti-SUMO-Antikörper) **B)** In Wildtypzellen mit und ohne Überexpression von *ULP2* wurden Septine durch Verwendung von primären anti-Cdc11p-Antikörpern detektiert. (blau, Kern; rot, Cdc11p).

4 Diskussion

Das an der posttranslationalen Proteinmodifikation mit dem kleinen Protein SUMO beteiligte Enzymsystem ist, ebenso wie das Ubiquitin-System, konserviert in allen Eukaryoten (Ergebnisse 3.1 und 3.5.2). Im Verlauf dieser Arbeit konnten einige wichtige Funktionen der Sumoylierung identifiziert werden.

4.1 Auswirkungen von Defekten des SUMO-aktivierenden Enzyms

Das SUMO-aktivierende Enzym ist ein Heterodimer bestehend aus Aos1p und Uba2p (Johnson *et al.* 1997). Ausgangspunkte dieser Arbeit bildeten Allele, die Punktmutationen im *UBA2*-Gen aufweisen und eine Hypersensitivität der Zellen gegenüber Hitze verursachen (Schwienhorst 1997).

Die Analysen zeigten, dass in den *uba2*-Mutanten die Konjugation von SUMO schon bei permissiver Temperatur drastisch reduziert ist (siehe Ergebnisse 3.2.4, Abb. 12). Da die *uba2*-Mutanten bei niedrigen Temperaturen ähnlich wie Wildtypzellen wuchsen, scheint diese stark reduzierte Sumoylierung für normale Wachstumsraten unter diesen Bedingungen auszureichen. Essentiell für die Zellteilung sind demnach nur einige wenige SUMO-Konjugate, oder aber solche die nur für kurze Zeit im Verlauf des Zellzyklus stabil sind. Die geringe Aktivität, und damit die herabgesetzte Konjugationseffizienz, mutierter Uba2^{ts}-Proteine reicht allerdings nicht aus um bei erhöhten Temperaturen das Wachstum der Zellen zu erlauben. Die konditionalen Mutationen der *uba2*-Allele können möglicherweise zu einer gesteigerten Degeneration des Genprodukts unter Hitzeeinwirkung führen, oder die noch vorhandene Restaktivität reicht unter diesen extremeren Bedingungen nicht mehr für die in erhöhtem Maße notwendigen Modifikationen aus (siehe 3.2.4).

Das wtUba2-Protein liegt in nur sehr geringen Mengen in der Zelle vor (Abb. 13). Die Uba2^{ts}-Proteine waren sowohl bei permissiven, als auch bei restriktiven Temperaturen in vergleichbaren Mengen vorhanden. Die Mutationen im *UBA2*-Gen führten demnach nicht zu einem Abbau der Proteine bei 37°C, wie dies bei temperatursensitiven *ubc9*-Allelen der Fall war (Betting und Seufert 1996). Diese Beobachtung war auf Grund der bereits bei permissiven Temperaturen reduzierten Aktivität der Uba2^{ts}-Proteine nicht verwunderlich. Die Phänotypen einiger *uba2*-Mutanten konnten durch Überexpression des SUMO-codierenden Gens *SMT3* und/oder der zweiten Untereinheit des aktivierenden Enzyms *AOS1* supprimiert werden (Schwienhorst 1997). Außerdem konnten die meisten *uba2*-Mutanten nach osmotischer Stabilisierung auch bei 37°C wachsen (Abb. 8). Dies deutete auf Uba2p^{ts}-bedingte Probleme bei der Ausbildung des trimeren Komplexes mit SUMO beziehungsweise Aos1p hin, und nicht auf den Abbau von Uba2p^{ts}.

Die immunologische Detektion der Uba2-Proteine führte zu einer weiteren interessanten Beobachtung. Wurde das SUMO-Protein stark überexprimiert, stieg auch die Proteinmenge von Uba2p an (Abb. 13, 3.2.4). Da allerdings in diesen Experimenten das

SUMO-codierende Gen *SMT3* unter Kontrolle des Galaktose-induzierbaren *GAL10*-Promotors exprimiert wurde, waren die Zellen mit einer anderen Kohlenstoffquelle angezogen worden. Weitere Untersuchungen müssten daher noch klären, ob eine gesteigerte Menge des freien SUMO's einen Einfluss auf die Expression des Uba2-Proteins besitzt, oder ob auf Galaktose-haltigem Medium mehr Uba2p benötigt wird (siehe auch Abschnitt 4.3).

Vor kurzem ist von Azuma, *et. al.* (2001) gezeigt worden, dass in menschlichen Zellen das UBA2-Protein, ebenso wie das konjugierende UBC9-Enzym, konstitutiv in allen Zellzyklusphasen exprimiert wird. Die Expression der zweiten Untereinheit des aktivierenden Enzyms, AOS1, steigt während der S-Phase an und sinkt in der G₂-Phase wieder ab. Diese Regulation von AOS1 schien einen Einfluss auf die Konjugation spezifischer Substrate auszuüben (Azuma *et al.* 2001). In *Drosophila melanogaster* hingegen wurde festgestellt, dass im Verlauf der Entwicklung die Uba2-Proteinmenge reguliert wird (Donaghue *et al.* 2001). Mit Hilfe von Northern-Blotanalysen der Uba2p-codierenden mRNA und weiteren immunologischen Detektionen des Uba2-Proteins unter verschiedenen Wachstumsbedingungen oder in Zellzyklus-arretierten Zellen könnte in der Zukunft untersucht werden, ob die SUMO-Konjugationsaktivität in Hefe über die Regulation der Uba2-Aktivität gesteuert wird.

4.1.1 Sumoylierung hat keinen direkten Einfluss auf die Proteinestabilität

Das kleine Protein SUMO wird ebenso wie Ubiquitin kovalent an Substratproteine gebunden (siehe Einleitung). Die Ubiquitylierung von Proteinen, insbesondere Polyubiquitylierung, führt meist zum Abbau der Substrate durch das Proteasom (zur Übersicht siehe Varshavsky 1997, Hershko und Ciechanover 1998).

Für eine Reihe verschiedener Hefemutanten mit Defekten in der Ubiquitin/Proteasom-vermittelten Proteolyse konnte eine Hypersensitivität gegenüber Stressbedingungen wie Hitze oder Inkubation auf Canavanin- oder Cadmium-haltigen Medien nachgewiesen werden, die auf eine Anhäufung von defekten oder geschädigten Proteinen zurückzuführen ist (Seufert und Jentsch 1990, Hilt *et al.* 1993, Jungmann *et al.* 1993). Auch *uba2*-Mutanten, mit Defekten bei der Aktivierung von SUMO, zeigten eine Hypersensitivität gegenüber einigen dieser Stressbedingungen. Die untersuchten *uba2*-Mutanten waren temperatursensitiv und nicht in der Lage auf Cadmium-haltigen Medien zu wachsen (siehe Ergebnisse 3.2). Trotzdem scheint kein direkter Zusammenhang zwischen dem SUMO-System und dem Ubiquitin-vermitteltem Proteinabbau zu bestehen, da die *uba2*-Mutanten keinen Defekt beim Abbau von Proteolyse-Testsubstraten aufwiesen und auf Medien wuchsen, die das Arginin-Analogon Canavanin enthielten (Schwienhorst 1997).

Die Identifizierung von Substratproteinen in Säugerzellen zeigte jedoch, dass die Sumoylierung einen indirekten Einfluss auf die Stabilität von Proteinen ausüben kann (siehe Einleitung 1.3.2). Die Konjugation von SUMO an I κ B α , dem Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF- κ B, verhindert die Ubiquitylierung des Proteins und damit

dessen Abbau. In diesem Fall wirkt die Konjugation von SUMO antagonistisch zu der von Ubiquitin (Desterro *et al.* 1998). Genau gegensätzlich verhalten sich die Auswirkungen der Sumoylierung auf die Stabilität des p53-Homologs p73 α . Es wurde beobachtet, dass die Konjugation von SUMO zu einem effizienteren Abbau durch das Ubiquitin/Proteasom-System führte (Minty *et al.* 2000). Dies könnte auf die veränderte Lokalisierung des SUMO-modifizierten p73 α zurückzuführen sein.

In der Hefe zeigten hitze-labile Ubc9^{ts}-Proteine einen Defekt beim Ubiquitin-vermittelten Abbau der B-Typ Cycline Clb2p und Clb5p (Seufert *et al.* 1995, Betting und Seufert 1996). Das Ubc9-Protein ist verantwortlich für die Konjugation von SUMO an Akzeptorproteine (siehe Einleitung 1.3.1). Es ist nicht bekannt, ob weitere Ubiquitin-Substrate in *ubc9*-Mutanten stabilisiert werden. Ebenso ist nicht bekannt, ob Komponenten der Centromerkomplexe einem Ubiquitin-vermittelten Abbau unterliegen. Nicht nur das SUMO-System wurde in Zusammenhang mit den Centromerkomplexen gebracht (siehe oben), auch das Ubiquitin-System scheint eine Rolle zu spielen. So kann der temperatursensitive Phänotyp einer *cbf2*-Mutante sowohl durch Überexpression von *UBA2* als auch durch die Überexpression von am Ubiquitin-System beteiligten Enzymen, wie das Ubiquitin-aktivierende Enzym Uba1p oder die deubiquitylierenden Enzyme Ubp1p, Ubp2p und Yuh1p supprimiert werden (Winkler *et al.* 2000).

Bei dem Vergleich der bisher bekannten potentiellen und verifizierten SUMO-Substrate fällt auf, dass die Mehrzahl der Substrate eine PEST-Sequenz tragen (Melchior 2000). Dieser Bereich eines Proteins dient häufig als Abbausignal für die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse. Vergleichbar der Phosphorylierung von Proteinen scheint in manchen Fällen die Sumoylierung einen zusätzlichen Regulationsmechanismus für den Proteinabbau darzustellen. Es kann aber keine generelle Aussage über einen Zusammenhang der Proteininstabilität und der Sumoylierung getroffen werden. Die Konjugation von SUMO kann die Interaktionseigenschaften, die Lokalisierung oder die Aktivität der Akzeptorproteine verändern, und damit unter anderem indirekt auch die Ubiquitin-Konjugation beeinflussen.

4.1.2 Bedeutung der SUMO-Konjugation für die Zellintegrität und den Zellzyklus

Die phänotypische Charakterisierung von temperatursensitiven *uba2*-Mutanten verdeutlichte die vielfältigen Funktionen der Sumoylierung in der Zelle. So spielt die Konjugation von SUMO eine Rolle bei der Stabilisierung der Zellwand (Ergebnisse 3.2.1). Die *uba2*-Mutanten wiesen eine Hypersensitivität gegenüber Ethanol und Koffein auf. Dies sind Phänotypen, die in Mutanten mit Defekten bei der Zellintegrität auftreten, wie zum Beispiel in der Proteinkinase C-Signaltransduktion (Jacoby *et al.* 1998). Daher wurde untersucht, ob Zellen mit *uba2*-Mutationen, bei Hitzeeinwirkung lysieren. Wie die Abbildungen 8 und 9 zeigen, war dies der Fall. Am Beispiel von *uba2*-ts9 konnte gezeigt werden, dass infolge von Hitzestress intrazelluläre Phosphatasen durch Zell-Lyse

freigesetzt werden. Darüber hinaus konnten die meisten der untersuchten *uba2*-Mutanten bei 37°C wachsen, wenn das umgebende Medium zur osmotischen Stabilisation der Zellen mit Sorbit versetzt worden war. Die molekularen Hintergründe der Bedeutung der Konjugation von SUMO für die Aufrechterhaltung der Zellwand werden erst nach Identifizierung der Substrate erklärbar sein.

Das SUMO-codierende Gen *SMT3* wurde als Überexpressionssuppressor einer Mutation im *MIF2*-Gen identifiziert (Meluh und Koshland 1995). Das Mif2-Protein ist mit dem Centromer der Hefe assoziiert und weist eine Homologie zu CENP-C in Säugern auf. Außerdem gab es zusätzliche Hinweise auf einen Zusammenhang der Chromosomentrennung mit dem SUMO-System. In Two-Hybrid-Interaktionsstudien wurde gezeigt, dass das SUMO-konjugierende Enzym Ubc9p mit Centromer-assoziierten Proteinen, wie dem Cbf3-Protein interagiert (Jiang und Koltin 1996). Auch das Uba2-Protein selber konnte in Zusammenhang mit Centromerproteinen gebracht werden. Die Überexpression von *UBA2* war in der Lage eine temperatursensitive *cbf2*-Mutante zu supprimieren (Winkler *et al.* 2000).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Zellen, die eine Mutation im SUMO-aktivierenden Gen *UBA2* tragen, einen Defekt bei der Verlängerung der mitotischen Spindel aufweisen. Diese Mutanten waren außerdem hypersensitiv gegenüber Mikrotubuli-destabilisierendem Thiabendazol (Abb. 10, Ergebnisse 3.2.2) und zeigten einen G₂/M-Zellzyklusarrest bei der restriktiven Temperatur. So häuften sich Zellen mit großen Knospen und zweifachem Chromosomensatz an. In diesen Zellen befand sich der Kern in der Nähe der Knospungsstelle und wies eine nur kurze Spindel auf. Ungewöhnlich war, dass die Ausrichtung der Spindel in einem Teil der Zellen um bis zu 90° gedreht war und sich nicht in der Mutter-/Tochterzellachse befand (Abb. 11).

Ein G₂/M-Zellzyklusarrest wurde auch in temperatursensitiven *ubc9*-Mutanten beobachtet (Betting und Seufert 1996). Das Ubc9-Protein ist für den zweiten Schritt der SUMO-Konjugation verantwortlich und überträgt das aktivierte SUMO-Protein auf die Substrate (Johnson und Blobel 1997). Es scheint, dass die mangelnde Konjugation von SUMO an bestimmte Substrate, verursacht durch Mutationen des aktivierenden oder konjugierenden Enzyms, ein Fortlaufen des Zellzyklus verhindert. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass die essentiellen Funktionen der Sumoylierung mit der Zellzyklusprogression zusammenhängen. Stämme die eine Deletion im *UBA2*-Gen, oder das *UBA2*-Gen unter Kontrolle eines reprimierbaren Promotors tragen, sind auch auf osmotisch stabilisiertem Medium, nicht in der Lage zu wachsen. Die Probleme der Zellwandstabilität scheinen demnach nicht die Auslöser für die mangelnde Teilungsfähigkeit zu sein. Die bisher in anderen Organismen identifizierten SUMO-Substrate geben keinen eindeutigen Hinweis auf die Funktionen der Sumoylierung im Verlauf des Zellzyklus (siehe Einleitung). In der Zukunft wird es daher wichtig sein, die beteiligten Substrate in der Hefe zu identifizieren. Aufgrund der genetischen Interaktion

des SUMO-Systems mit Centromer-assoziierten Proteinen und der Funktion bei der Spindelintegrität, ist zu erwarten, dass Proteine, die an diesen Systemen direkt beteiligt sind, sumoyliert werden. Erschwert wird die Identifikation dieser Substrate wahrscheinlich durch eine Zellzyklus-abhängige Regulation der Sumoylierung und einer sehr geringen Menge dieses Protein in der Zelle. Da die Proteine des Centromer-assoziierten CBF3-Komplexes alle mindestens eine potentielle Sumoylierungsstelle aufweisen, kann keine der Untereinheiten als potentielles Substrat ausgeschlossen werden.

4.2 Ulp2p ist ein SUMO-dekonjugierendes Enzym

Die Untersuchung eines intergenischen Suppressors von *uba2-ts9* führte zur Identifizierung und Charakterisierung eines bis dahin nicht näher beschriebenen Genproduktes, dem Ulp2-Protein. Bei der Mutation, die für die Suppression verantwortlich war, handelte es sich um eine Nonsense-Mutation. Sie führt zu einem vorzeitigen Abbruch der Peptidkette, wodurch nur $\approx 42\%$ des Proteins synthetisiert werden (Ergebnisse 3.3.1). Das *ulp2-1*-Allel vermittelte die selben phänotypischen Defekte wie ein *ulp2*-Deletionsallel.

Mutationen im *ULP2*-Gen führten zu einer partiellen Suppression aller in *uba2*-Mutanten beobachteten Phänotypen (siehe Ergebnisse 3.4). Daher war anzunehmen, dass das Ulp2-Protein einen generellen Einfluss auf das SUMO-System ausübt. Die biochemischen Analysen der SUMO-Konjugate in *ulp2*-Mutanten im Vergleich zu *uba2*- und Wildtypstämmen ließen Rückschlüsse auf die Funktion des Ulp2p zu (siehe unten, Ergebnisse 3.5).

Die Sumoylierung von Proteinen ist wie die Ubiquitylierung ein reversibeler Prozess. Die einzigen bekannten Substrate der Hefe, die Septine, werden Zellzyklus-abhängig sumoyliert und desumoyliert (Einleitung Abb. 5). Auch für andere Substrate aus höheren Eukaryoten wurde gezeigt, dass eine Dekonjugation von SUMO *in vivo* erfolgt (siehe Einleitung 1.3.2).

Die Analyse SUMO-modifizierter Proteine in *uba2*- und *ulp2*-Mutanten zeigte genau gegensätzliche Auswirkungen der beiden Allele. Wie schon erwähnt, waren in *uba2*-Mutanten kaum SUMO-Konjugate detektierbar. In Zellen, die eine Mutation im *ULP2*-Gen trugen hingegen, häuften sich sumoylierte Proteine sehr stark an (Abb. 20A, Ergebnisse 3.5.1). Diese Akkumulation wies auf einen Defekt der *ulp2*-Mutanten bei der SUMO-Dekonjugation hin. Ein weiteres Indiz für die Funktion des Ulp2-Proteins bei der Dekonjugation des SUMO-Proteins von seinen Substraten war die Beobachtung, dass *ULP2*-Überexpression in Wildtypzellen zu einer starken Reduktion der sumoylierten Proteine führte. Gleichzeitig stieg die Menge an freiem SUMO-Protein an (Abb. 20B).

Um die Funktion des Ulp2-Proteins näher zu charakterisieren, wurden Recherchen in verschiedenen Datenbanken zur Identifizierung von homologen Proteinen durchgeführt. Die größte Homologie wies dabei das später als Ulp1p bezeichnete Protein der Hefe auf. Die Verwandtschaft der beiden Proteine beschränkt sich dabei auf einen kleinen Teil von ungefähr 200 Aminosäureresten innerhalb der Proteinsequenzen, der für die Funktion dieser Proteine entscheidend ist (siehe unten).

Während der Charakterisierung des Ulp2-Proteins wurde in einer Veröffentlichung von Li und Hochstrasser (1999) die SUMO-spezifische Protease Ulp1p („Ubiquitin-like protein protease 1“) vorgestellt. Von den Autoren konnte gezeigt werden, dass das Ulp1-Protein zwei Funktionen aufweist: Einerseits ist es für die carboxyterminale Prozessierung des SUMO-Vorläuferproteins verantwortlich, andererseits kann es die Isopeptidbindung zwischen SUMO und den Substraten spalten.

Der mit Ulp2p verwandte Bereich des Ulp1-Proteins, umfasst das von Li und Hochstrasser (1999) postulierte aktive Zentrum des Ulp1-Proteins. Weitere computergestützte Recherchen in verschiedenen Genom-datenbanken erwiesen, dass diese Domäne der beiden SUMO-dekonjugierenden Hefeproteine auch in Proteinen anderer Organismen konserviert ist (siehe Ergebnisse 3.5.2, Abb. 21 sowie Tab. 11). In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* konnten außer Ulp1p und Ulp2p keine weiteren Proteine mit einer Ulp-spezifischen Domäne identifiziert werden.

Die Ulp-spezifischen Domänen weisen eine Homologie zu Cystein-Proteasen verschiedener Viren auf (Li und Hochstrasser 1999). Bestimmte adenovirale Proteasen zum Beispiel spalten virale Vorläuferproteine nach einem Glycinrest (Lee und Hruby 1994). Proteasen des afrikanischen Schweinefieber-Virus erkennen als Schnittstelle sogar eine Di-Glycinsequenz und greifen virale und zelluläre Proteine an (Lopez-Otin *et al.* 1989) Die Spaltung der Amidbindungen verläuft vermutlich analog zu der von Papain-ähnlichen Thiolproteasen vermittelten Proteolyse. Li und Hochstrasser (1999, 2000) konnten zeigen, dass die beiden SUMO-dekonjugierende Enzyme tatsächlich zu der Familie der Cystein-Proteasen gehören. Die konservierten Teilbereiche der Proteine weisen die für die Aktivität notwendigen Cystein- und Histidinreste auf (siehe Abb. 21, Ergebnisse).

Innerhalb des letzten Jahres konnten fünf SUMO-spezifische Hydrolasen des Menschen identifiziert werden (Tab. 11). Biochemische Analysen ermöglichten eine Unterscheidung zwischen drei Enzymklassen. Die SUMO-spezifischen C-terminalen Hydrolasen prozessieren das Vorläuferprotein von SUMO, spalten also lineare Fusionen. Es sind zwei SUMO-spezifische C-terminale Hydrolasen bekannt, SUSP1 und ein noch nicht molekular charakterisiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 30KDa (Suzuki *et al.* 1999, Kim *et al.* 2000). Die zweite Gruppe, so genannte Isopeptidasen, sind hauptsächlich an der Spaltung der Amidbindungen zwischen SUMO und den Substraten beteiligt. Die dritte Enzymklasse umfasst die Proteine, die beide Funktionen erfüllen können, wie das Ulp1-Protein (Li und Hochstrasser 1999). Die Untersuchungen der

menschlichen Ulp-Enzyme zeigte auch, dass diese unterschiedliche Substratspezifität aufweisen. So spaltet zum Beispiel das SENP1-Enzym *in vivo* SUMO-PML-Konjugate, aber scheinbar nicht sumoyliertes RanGAP1 (Gong *et al.* 2000, siehe unten).

Die Substratspezifität kann sich auch in einer Unterscheidung verschiedener SUMO-Proteine manifestieren. Das menschliche Genom weist drei SUMO-Proteine auf, wobei SUMO-2 und SUMO-3 nur unter Stressbedingungen, z. B. in Folge von DNA-Schädigung, exprimiert werden. *In vivo* ist die SMT3IP2-Protease anscheinend nur in der Lage, die SUMO-2-oder SUMO-3-Konjugatbindungen zu spalten (Nishida *et al.* 2001).

Die bisherigen Datenbankanalysen des menschlichen Genoms zeigten, dass zumindest drei weitere potentielle SUMO-spezifische Proteasen existieren.

Protease	Organismus	Funktion und/oder Lokalisierung	Referenz
Ulp2p	<i>S. cerevisiae</i>	Zellzyklus-spezifische Dekonjugation; nukleär	diese Arbeit
Ulp1p	<i>S. cerevisiae</i>	Prozessierung des SUMO-Vorläufers, Dekonjugation; Kernporen-assoziiert	diese Arbeit, sowie Li und Hochstrasser 1999, 2000
SMT3IP1	Mensch	Spezifisch für die Dekonjugation von SUMO-2; nukleoläres Protein	Nishida <i>et al.</i> 2000
SMT3IP2/ Axam2	Mensch	Potentiell Axin-bindend, <i>in vivo</i> Spaltung von SUMO-2 und -3 Isopeptidbindungen	Nishida <i>et al.</i> 2001
30kDa C-terminal hydrolase	Mensch	Prozessierung des SUMO-Vorläuferproteins	Suzuki <i>et al.</i> 1999
SUSP1	Mensch	Prozessierung des SUMO-1-Vorläuferproteins; zytoplasmatisch	Kim <i>et al.</i> 2000
SENP1	Mensch	Desumoyliert <i>in vivo</i> PML, aber nicht RanGAP1; nukleär	Gong <i>et al.</i> 2000
Yop1p	<i>Yersinia pestis</i>	Unterbricht MAP-Kinaseweg und die NF-κB Signaltransduktion;	Orth <i>et al.</i> 2000, Cornelis und Denecker 2001
31kDa- Genprodukt von S278R	Afrikanisches Schweinefieber- Virus	Direkte SUMO-spezifische Aktivität nicht gezeigt; zytoplasmatisch	Andres <i>et al.</i> 2001

Tab. 11: Bekannte SUMO-spezifische Proteasen. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Besonders interessant war die Entdeckung von viralen Proteasen die eine spezifische SUMO-Dekonjugationsaktivität aufweisen. Die Funktion dieser Proteasen ist zwar noch nicht bekannt, aber sie scheinen sich auf die Immunantwort der Zelle auszuwirken. Bei

einem der für die Virulenz essentiellen Proteine von *Yersinia pestis* handelt es sich beispielsweise um eine SUMO-spezifische Protease (Orth *et al.* 2000). Diese unterbricht den MAP-Kinaseweg und die NF- κ B-Signalkaskade, und damit die Immunantwort der Zelle. Viren nutzen also das SUMO-System als Angriffspunkt zur Manipulation zellulärer Funktionen.

Ein weiteres Beispiel für diese Ausnutzung des SUMO-Systems zeigt das Epstein-Barr Virus. Die Sumoylierung des viralen Transkriptionsfaktors BZLF1 disruptiert die intranukleären ND10-Körper (siehe Einleitung, Adamson und Kenney 2001). Diese ND10-Strukturen spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort und der Apoptose. Pathogene Organismen können demnach die Zellen entweder durch Inhibition der SUMO-Konjugation oder durch proteolytische Spaltung der SUMO-Konjugate angreifen.

4.3 Vergleich SUMO-dekonjugierender Enzyme der Hefe

In *S. cerevisiae* existieren zwei SUMO-dekonjugierende Enzyme, Ulp1p und Ulp2p (siehe oben). Die Frage, warum die Hefe zwei verschiedene Enzyme benötigt, wird im Folgenden diskutiert.

Die Homologie der beiden Proteine ist nur sehr gering und beschränkt sich auf einen Bereich um das aktive Zentrum (Abb. 21, Ergebnisse 3.5.2). Sowohl die amino- als auch die carboxyterminalen Bereiche weisen keine weitere Verwandtschaft auf. Vergleicht man bekannte Sequenzen aller bisher identifizierten SUMO-spezifischen Proteasen, zeigt sich das gleiche Bild. In allen Fällen besteht eine Verwandtschaft der Proteine nur in der Ulp-spezifischen Domäne (siehe oben).

4.3.1 Ulp1p ist das für die Reifung des SUMO-Vorläufers verantwortliche prozessierende Enzym

In der *ulp1*-Mutanten kommt es zu einer drastischen Akkumulation des SUMO-Vorläufers (3.6.1, Abb. 22A). Im Gegensatz zu allen anderen Enzymen des SUMO-Systems ist Ulp2p weder bei der meiotischen noch mitotischen Zellteilung essentiell. Die Deletion des *ULP2*-Gens verursacht aber ausgeprägte Defekte im Verlauf der Mitose und der Meiose (siehe Ergebnisse 3.4.1). Das Ulp2-Protein ist allerdings auch das erste Enzym, das keine Funktion bei der Konjugation von SUMO aufweist. Außerdem fielen im Verlauf der Untersuchung der phänotypischen Auswirkungen der Disruption von *ULP2* fielen deutliche Unterschiede zu Mutanten mit Konjugationsdefekten auf (siehe unten 4.4). Dies deutete darauf hin, dass das Ulp2-Protein hauptsächlich eine Rolle bei der Dekonjugation und nicht bei der Prozessierung des SUMO-Vorläufers und damit der Konjugation spielt.

Das von Li und Hochstrasser (1999) generierte konditionale *ulp1*-Allel verursacht, neben Temperatursensitivität auch einen Zellzyklus-Arrest der dieses Allel tragenden Zellen. Ebenso wie *uba2*- und *ubc9*-Mutanten (diese Arbeit, bzw. Seufert *et al.* 1995),

konnten *ulp1*-Mutanten die Anaphase nicht vollenden und arretierten mit großen Knospen und kurzen Spindeln (Li und Hochstrasser 1999).

Um zu überprüfen, ob die hauptsächliche Funktion des Ulp1-Proteins in der Bereitstellung ausreichender Mengen des reifen SUMO-Proteins bestand, wurden verschiedene Versuche durchgeführt. In *ulp1*-Mutanten wurde ein *SMT3*-Allel exprimiert, das nur für den reifen Teil des SUMO's codierte. Das bedeutet die Di-Glycinsequenz bildete den C-Terminus und es ist nicht notwendig das Protein zu prozessieren. Im Widerspruch zu den Daten von Li und Hochstrasser (1999) konnte die Temperaturtoleranz der *ulp1*-Mutante deutlich erhöht werden, wenn reifes SUMO überexprimiert wurde (Ergebnisse 3.6.1, Abb. 22B). Zusätzliche mikroskopische Untersuchungen der Zellen zeigten, dass diese bei SUMO-Überexpression nicht mehr in der G₂/M-Phase arretierten. dies deutet darauf hin, dass die SUMO-prozessierende Aktivität von Ulp1p und damit die Bereitstellung konjugierbaren SUMO-Proteins verantwortlich für dessen essentielle Bedeutung im Zellzyklus ist.

Alle bisher aufgeführten Daten sprechen somit dafür, dass die Rolle von Ulp2p bei der Dekonjugation zu suchen ist, während Ulp1p zum einen den SUMO-Vorläufer prozessiert und zum anderen SUMO von Substraten dekonjugiert.

4.3.2 Ulp1p und Ulp2p sind räumlich voneinander getrennt

Die Mehrzahl der SUMO-Substrate liegt im Zellkern vor (siehe 3.8). Auch das SUMO-aktivierende Enzym, sowie das konjugierende Ubc9-Protein sind hauptsächlich im Kern lokalisiert (Dohmen *et al.* 1995, bzw. Betting und Seufert 1996). Die hier durchgeführte immunologische Fluoreszenz-Markierung von Uba2p zeigte im Detail, dass es in granulären Strukturen im Kern verteilt vorliegt (Daten nicht gezeigt). Studien zur Lokalisierung der beiden SUMO-spezifischen Proteasen Ulp1p und Ulp2p zeigten, dass diese räumlich voneinander getrennt sind. Das Ulp1-Enzym kolokalisiert mit Kernporenkomplexen. Das Ulp2-Protein befindet sich, genauso wie SUMO-konjugierende Enzyme, in Strukturen innerhalb des Zellkerns (Abb. 24, Ergebnisse 3.6.2). Die räumliche Trennung verschiedener Ulp-Enzyme wurde auch bei den bisher daraufhin untersuchten menschlichen Proteasen beobachtet (siehe Tab. 11). Laut der bisherigen Daten wird SUMO-1 im Zytoplasma von der C-terminalen Hydrolase SUSP1 prozessiert (Kim *et al.* 2000). Das an Substrate innerhalb der nukleären ND10-Körper konjugierte SUMO-1 kann von SENP1 abgespalten werden. Dieses nukleäre Enzym kann *in vivo* keine zytoplasmatischen RanGAP1-SUMO-Konjugate auflösen. *In vitro* ist es dazu in der Lage (Gong *et al.* 2000).

Die Lokalisierung von Ulp1p und Ulp2p in verschiedenen Kompartimenten der Zelle erklärte auch die Akkumulation von unterschiedlichen SUMO-Konjugaten in *ulp1*-Zellen und *ulp2Δ*-Zellen (siehe 3.6.1, Abb. 22A). Die intranukleäre Lokalisation von Ulp2p könnte auch erklären, warum dieses Enzym *in vivo* keine Rolle bei der Prozessierung des

SUMO-Vorläufers spielt, obwohl Li und Hochstrasser (2000) eine solche Aktivität *in vitro* detektiert haben.

Auch für die menschliche Protease SMT3IP1 wurde gezeigt, dass sie *in vitro* in der Lage ist, sowohl SUMO-1, als auch SUMO-2 und -3-Konjugate zu spalten. Das nukleoläre Enzym scheint *in vivo* jedoch nur SUMO-2 und SUMO-3-Substrate zu erkennen (Nishida *et al.* 2000).

4.1.3 Ulp2p wird Zellzyklus-abhängig reguliert

In einer Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Wolfgang Seufert (Stuttgart) konnte gezeigt werden, dass das Ulp2-Enzym einer Zellzyklus-abhängigen Kontrolle unterliegt. Bisherige Daten deuten an, dass das Ulp2-Protein in der G₂-Phase von der Cyclin-abhängigen Kinase Cdc28p phosphoryliert wird. Nach Abschluss der Mitose spaltet vermutlich die Phosphatase Cdc14p die Phosphatgruppe wieder ab.

In Kapitel 3.7.1 (Abb. 26) ist gezeigt, dass in *ulp2*-Mutanten hauptsächlich in der G₁-Phase des Zellzyklus SUMO-konjugierte Proteine akkumulieren. In der G₂/M-Phase hingegen ist kaum ein Unterschied der konjugierten Substrate zwischen Wildtyp und *ulp2*-Mutante zu erkennen. Dies indiziert eine Funktion von Ulp2p im Verlauf der G₁-Phase. In der G₂-Phase hingegen scheint die Aktivität von Ulp2p keine Rolle zu spielen. In diesem Stadium des Zellzyklus häufen sich in Wildtypzellen SUMO-Substrate an (Abb. 26A). Die Ulp2p-abhängige Dekonjugation könnte wichtig sein für die Freisetzung von SUMO und Substraten zum Abschluss der mitotischen Kernteilung. Da in eben dieser Phase die Phosphorylierung von Ulp2p stattfindet, wird es offenbar in dieser Phase inaktiviert. In der Zukunft muss dieses durch *In-vitro*-Analysen nachgewiesen werden.

Die Phosphatase Cdc14p wird im Verlauf des Zellzyklus im Nukleolus durch Protein-Interaktion im RENT-Komplex („regulator of nucleolar silencing and telophase“) festgehalten. In der Telophase wird Cdc14p, als Reaktion auf ein Signal des GTP-bindenden Proteins Tem1p und der Proteinkinase Cdc15p, aus dem Nukleolus freigesetzt und verteilt sich in Zellkern und Zytoplasma (Shou *et al.* 1999). Cdc14p vermittelt durch Dephosphorylierung seiner Substrate unter anderem die Inaktivierung der mit B-Typ Cyclinen assoziierten Kinase Cdc28p und damit die Beendigung der Mitose (Visintin *et al.* 1999).

Die Substrate der Cdc14p-abhängigen Dephosphorylierung sind vielfältig. Es konnte in Zusammenarbeit mit Albert Neutzner und Wolfgang Seufert gezeigt werden, dass eines der Zielproteine vermutlich das phosphorylierte Ulp2p ist. Die Dephosphorylierung von Ulp2p zieht dann die Desumoylierung der Septine sowie wahrscheinlich anderer SUMO-Konjugate nach sich (siehe Abb. 27, Ergebnisse 3.7.1). In der Abwesenheit von Ulp2p findet trotzdem eine Dekonjugation der Septine statt (Abb. 26B). Vor kurzem wurde gezeigt, dass *in vitro* die Protease Ulp1p die Septine dekonjugieren kann (Takahashi *et al.*

2000). Da Ulp1p nach den bisherigen Ergebnissen keiner Zellzyklusregulation unterliegt, ist zu vermuten, dass *in vivo* Ulp1p nur in *ulp2*-Deletionsstämmen diese Aufgabe übernimmt. Das könnte zum Beispiel auf eine erhöhte Expression von *ULP1* in *ulp2*-Mutanten zurückzuführen sein, was experimentell überprüft werden kann.

Die Desumoylierung der Septine scheint zu einem Auseinanderfallen der Septinringe zu führen. Wird die Cdc14-Phosphatase, oder *ULP2* selbst unter der Kontrolle eines regulierbaren Promotors überexprimiert, sind nicht nur nukleäre sumoylierte Proteine nicht mehr detektierbar, sondern auch die Septinring-Strukturen fehlen (siehe Abb. 28). Die Gesamtproteinmenge zumindest der verschiedenen Septine ändert sich dabei anscheinend nicht (Albert Neutzner, persönliche Mitteilung und diese Arbeit, Abb. 27). Die dekonjugierten Septine werden offenbar nicht proteolytisch abgebaut.

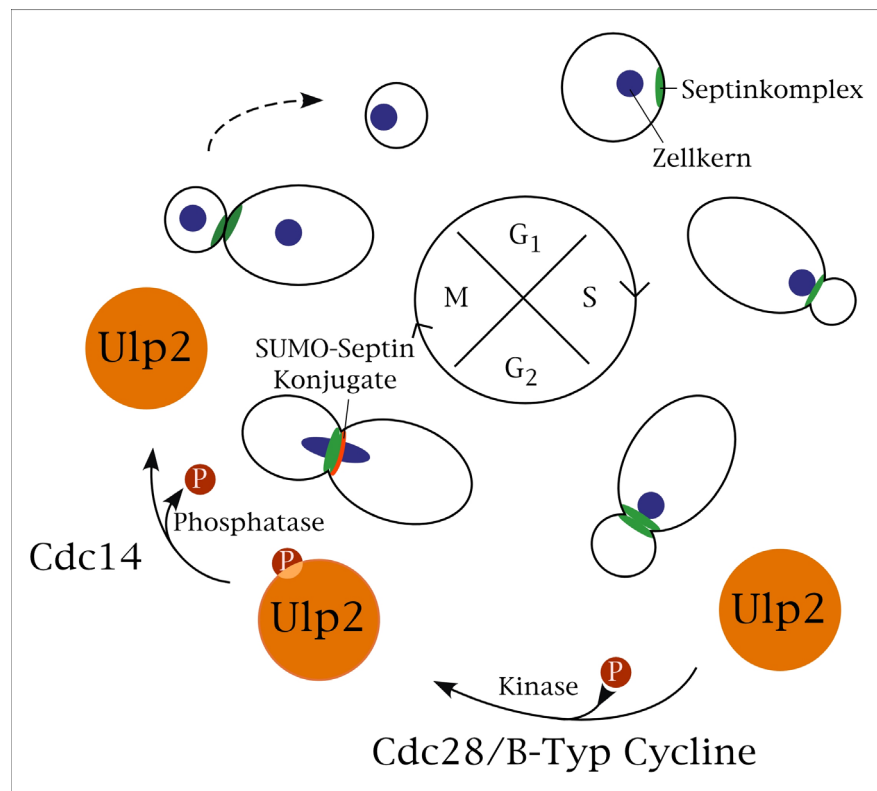


Abb. 29: Modell der Zellzyklus-abhängigen Regulation des Ulp2-Enzyms. Zu Beginn der Mitose wird Ulp2p von der Kinase Cdc28p, die mit den B-Typ Cyclinen Clb2p oder Clb5p assoziiert ist, durch Phosphorylierung inaktiviert. In diesem Stadium des Zellzyklus liegen die Septinkomplexe zum Teil sumoyliert vor. Kurz vor der Zytokinese wird die Phosphatase Cdc14p durch Freisetzung aus dem Nukleolus in den Zellkern aktiviert und dephosphoryliert Ulp2p. Das aktivierte Ulp2p kann die Septine und andere sumoylierte Proteine dekonjugieren und der Zellzyklus fortlaufen.

In der Hefe existieren weitere Phosphatasen die Zellzyklus-abhängig kontrolliert werden. Dies ist zum einen der Glc7p- und zum anderen der PPH22-Komplex (Hisamoto *et al.* 1994, Cid *et al.* 1995). Diese Phosphatase-Komplexe spielen unter anderem eine Rolle bei der Stresstoleranz, der Zellintegrität, und im Verlauf des Zellzyklus (Evans und

Stark 1997, Andrews und Stark 2000), somit Bereichen, an denen auch das SUMO-System beteiligt ist. Ob allerdings diese Phosphatasen einen Einfluss auf die Dephosphorylierung und damit die Aktivität von Ulp2p aufweisen, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

4.4 Funktionen der SUMO-Konjugation und Dekonjugation

Die Hefe benötigt für ein normales Wachstum ein im Gleichgewicht befindliches SUMO-System. Ein Nullallel des *ULP2*-Gens, das für ein SUMO-dekonjugierendes Enzym codiert, supprimiert den temperatursensitiven Phänotyp von *uba2*-Mutanten (siehe Abschnitte 3.3, 4.2). Dieser Defekt der Dekonjugation supprimiert auch alle weiteren Phänotypen die in *uba2*-Mutanten auftauchen.

Die supprimierenden Eigenschaften der beiden Allele *ulp2* Δ und *uba2*-ts9 beruhen auf Gegenseitigkeit. Zellen mit einer Disruption im *ULP2*-Gen weisen selbst verschiedenen Defekte wie zum Beispiel verminderte Temperaturtoleranz auf. Durch eine zusätzliche Mutation des *UBA2*-Gens werden diese Defekte supprimiert (Abb. 15, Ergebnisse 3.4).

4.1.1 Normale SUMO-Konjugation und Dekonjugation sind Voraussetzung für Stresstoleranz

Die phänotypische Charakterisierung der *ulp2*-Deletionsmutanten zeigte, dass diese Mutanten sich nicht wie Mutanten mit Defekten bei der SUMO-Konjugation verhielten. Zwar waren *ulp2*-Mutanten hypersensitiv gegenüber Hitze, Ethanol und Cadmium, aber der Grund für diese Phänotypen lag nicht an einer verminderten Zellintegrität. Die *ulp2*-disruptierten Zellen konnten durch osmotische Stabilisierung nicht zum Wachstum bei 37°C angeregt werden. Auch zeigten die *ulp2*-Zellen keine verstärkte Zell-Lyse, weder bei restriktiver noch permissiver Temperatur (Ergebnisse 3.4). Die Integrität der Zellwand scheint abhängig von einem funktionellen SUMO-Konjugationssystem zu sein. Die Ulp2p-abhängige Dekonjugation der Substrate spielt hier offenbar keine besondere Rolle.

Defekte bei der Temperatur- oder auch Ethanoltoleranz können durch eine insgesamt verminderte Stresstoleranz bedingt sein (Piper 1995). Auch in menschlichen Zellen ist das SUMO-System an der Stressantwort beteiligt. Für den Stress-induzierten Transkriptionsaktivator HSF2 wurde gezeigt, dass dieser erst durch Sumoylierung in die DNA-bindende Form versetzt wird (Goodson *et al.* 2001). In diesem Fall ist die Konjugation notwendig für die Stressantwort. Ob die Dekonjugation in menschlichen Zellen eine ähnliche physiologische Rolle spielt wie in *S. cerevisiae*, ist noch nicht untersucht.

4.1.2 Das SUMO-System und mitotische Zellteilungen

Der augenscheinlichste Defekt von *uba2*-Mutanten war der G₂/M-Zellzyklusarrest, bei restriktiver Temperatur (Ergebnisse 3.2.3, Abb. 11, Tab. 8). In *ulp2Δ*-Mutanten hingegen fiel auf, dass zwar ähnlich wie in *uba2*-Mutanten der Zellzyklus verlangsamt war, und die Zellen daher im Vergleich zu Wildtypzellen stark vergrößert waren, diese aber keinen charakteristischen G₂/M-Arrest aufweisen (Ergebnisse 3.4.2.2, Tab. 10). Zellen mit einem Defekt im *ULP2*-Gen verlieren oftmals die typische Morphologie von normalen *S. cerevisiae*-Zellen. Sie bilden elongierte Knospen aus, zum Teil auch mehrere. Die Tochterzelle bildet mitunter schon vor der Ablösung von der Mutterzelle eine neue Knospe aus.

Haploide Wildtyp-Hefezellen sind unipolar, das heißt, dass die Knospen alle an einem Ende der Mutterzelle ausgebildet werden. In *ulp2*-Mutanten ist scheinbar die Ausbildung der Zellachse gestört. Neue Knospen entstehen zum Teil an gegenüberliegenden Seiten (siehe Abb. 18A, Ergebnisse 3.4.2.2). Die Abnormalitäten der *ulp2Δ*-Zellen weisen auf einen Defekt der Zellpolarität in diesen Mutanten hin. Die Zellpolarität in *S. cerevisiae* wird unter anderem durch die Ausbildung von 10nm-Filamenten an der Stelle der neuen Knospe bestimmt. Diese Filamente bestehen aus Actinpolymeren und den Septinkomplexen. Die Septine bilden Ring-förmige Strukturen aus, die während des Wachstums der Knospe in den Hals zwischen Mutter- und Tochterzelle eingelagert werden. Genau zwischen diesen Strukturen wird die neue Plasmamembran ausgebildet (zur Übersicht siehe Chant 1996). Septinmutanten weisen ähnliche Phänotypen wie *ulp2*-Deletionsmutanten auf. Die axiale Zellteilung ist in Septinmutanten defekt. Mehrere und/oder stark elongierte Knospen werden ausgebildet und die Zytokinese kann nicht abgeschlossen werden (Longtine *et al.* 1996).

Die Septine sind die einzigen bisher bekannten SUMO-Substrate in der Hefe (Johnson und Blobel 1999). Die Sumoylierung der Septine ist jedoch nicht essentiell. Verhinderte man die Sumoylierung durch die Mutation aller Sumoylierungsstellen in den drei konjugierbaren Septinen, inhibierte dies nicht die Zellteilung. Die oben beschriebenen Phänotypen deuten darauf hin, dass, wenn eine Sumoylierung stattfindet, die Dekonjugation von SUMO-Substratbindungen eine Rolle bei der Ausbildung der Knospe und der Zytokinese spielen könnte.

Die Beobachtung, dass 70% der Zellen einer *ulp2Δ*-Kultur nicht mehr in der Lage waren sich zu teilen, sowie weitere zytologische Untersuchungen deuteten außerdem auf eine Funktion des Ulp2p bei der Verteilung des Erbmaterials hin (siehe 3.4.2.2). Die Disruption des *ULP2*-Gens führte zur Anhäufung von Zellen mit fragmentierten oder mehreren Zellkernen, Zellen mit abnormalen zytoplasmatischen Spindeln oder nicht detektierbaren Mikrotubuli (Abb. 18).

Weitere Hinweise auf einen Defekt bei der Chromosomen- und Kernteilung gaben die Analysen des DNA-Gehaltes in Kulturen der *ulp2*-Mutante (Abb. 18C). Die Verteilung der gemessenen DNA-Menge in den einzelnen Zellen zeigte an, dass die Mehrzahl dieser weder einen exakt einfachen, noch zweifachen Chromosomensatz aufweisen (siehe 3.4.2.2). Vor kurzem wurde gezeigt, dass das Ulp2-Protein tatsächlich mit Chromatin assoziiert ist und mit dem Condensinkomplex interagiert (Strunnikov *et al.* 2001). Die Condensine sind entscheidend für die mitotische Chromosomen-Kondensation und die Segregation (Freeman *et al.* 2000).

Die in Abbildung 18 und Tabelle 10 zusammengefassten Daten weisen auf einen Defekt bei der Synchronisierung von Chromosomen- und Zellkernteilung in *ulp2*-Mutanten hin.

Ein weiteres Indiz für einen direkten Zusammenhang der Dekonjugation von SUMO mit der Teilung der Chromosomen war die extreme Instabilität von Centromer-Plasmiden im Verlauf mitotischer Teilungen von *ULP2*-defizienten Zellen. In der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* führte die Disruption des dort nicht essentiellen SUMO-Homolog Pmt3p zu einer stark erhöhten Verlustrate von Minichromosomen (Tanaka *et al.* 1999), ähnlich wie der Verlust von *CEN*-Plasmiden in *ulp2*-Mutanten. Dagegen war die Verteilung von *CEN*-Plasmiden in *uba2*-Mutanten ähnlich wie beim Wildtyp. In *S. cerevisiae* ist demnach die SUMO-Dekonjugation wichtig für eine korrekte Verteilung der Chromosomen, in *S. pombe* hingegen scheint auch die Konjugation eine Rolle zu spielen. Erst die Identifizierung der beteiligten Substrate wird genaueren Aufschluss über die Funktion der SUMO-Modifikation bei der Chromosomenverteilung in diesen Organismen geben.

Hinweise auf die Identität dieser Substrate gaben die Untersuchungen zu genetischen Interaktionen des SUMO-Systems mit Centromer-assoziierten Proteinen. Sowohl das SUMO-codierende Gen *SMT3*, als auch das *ULP2/SMT4*-Gen wurden als Dosis-abhängige Suppressoren einer Mutation im *MIF2*-Gen identifiziert (Meluh und Koshland 1995). Das Mif2-Protein ist mit dem CBF3-Komplex am Centromer der Hefezelle assoziiert. Es ist wichtig für die strukturelle Integrität der Spindel während deren Elongation im Verlauf der Anaphase (Brown *et al.* 1993).

Im Verlauf dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Konjugations- und Dekonjugationsmutanten einen Defekt bei der Spindelintegrität aufweisen. Die Zellen reagieren hypersensitiv auf die Zugabe von Mikrotubuli-destabilisierendem Thiabendazol zum Medium (Ergebnisse 3.2.2, Abb. 10 und 3.4.2.1, Abb. 15). Untersuchungen zur genetischen Interaktion mit Centromerproteinen zeigten, dass die Disruption des *ULP2*-Gens synthetisch letal mit der *mif2-3*-Mutation ist (Abb. 17).

Die *mif2-3*-Mutation ist letal in einem *cep1*-Deletionshintergrund (Mellor *et al.* 1990). Das Cep1-Protein bildet den CBF1-Centromerkomplex und interagiert in dieser Funktion mit dem CBF3-Komplex. Die hier durchgeführten Versuche zeigten allerdings keine synthetischen Auswirkungen von Defekten im SUMO-System und der Deletion des

CEP1-Gens. Untersucht wurden das *ulp2*-Nullallel (Abschnitt 3.4.2.1) und *uba2*-Allele (Daten nicht gezeigt). Die Sumoylierung scheint somit die Interaktionen zwischen den beiden Centromer-assoziierten Komplexen CBF1 und CBF3 nicht zu tangieren. Festzuhalten bleibt also die im Detail noch unverstandene Rolle bei der Funktion des Mif2-Proteins und der Spindelintegrität.

Sowohl die Reduktion der SUMO-Konjugation, als auch die der Ulp2p-abhängigen Dekonjugation haben negative Auswirkungen auf die Spindelintegrität. Es zeigte sich, dass zumindest die SUMO-Dekonjugation einer Zellzykluskontrolle unterliegt (siehe oben 4.3). Es wäre denkbar, dass die Mutation im *MIF2*-Gen die Sumoylierung eines oder mehrerer Substrate in einem bestimmten Zellzyklusstadium verhindert, oder zum falschen Zeitpunkt begünstigt. Die Dekonjugation der Substrate andererseits muss in einer bestimmten Phase des Zellzyklus ablaufen. Die *mif2-3*-Mutante könnte durch Inhibition von spezifischen Proteininteraktionen auf beide Schritte einen Einfluss haben. Die Überexpression von SUMO und auch die von *ULP2* führt zu einer Erhöhung des Spiegels an freiem SUMO in den Zellen (Abb. 20). Möglicherweise führt dies zu einer effizienteren Konjugation der noch unbekannt, an der Chromosomenteilung beteiligten Substrate.

4.1.3 Ulp2p wird für die DNA-Reparatur benötigt

Die Untersuchungen der Toleranz gegenüber DNA-Schäden wurden in den verschiedenen Konjugations- und Dekonjugationsmutanten durchgeführt, da ein Zusammenhang des SUMO-Systems mit DNA-Reparaturmechanismen in Säugerzellen festgestellt worden war. In Two-Hybrid-Interaktionsstudien stellte sich heraus, dass das humane SUMO-konjugierende Enzym UBC9 sowie SUMO-1 selbst mit RAD51 interagiert (Kovalenko *et al.* 1996, Shen *et al.* 1996a, Shen *et al.* 1996b).

RAD51 stimuliert ähnlich wie RecA aus *E. coli* die Paarung zwischen homologer einzel- und doppelsträngiger DNA und hat daher eine generelle Bedeutung bei der DNA-Reparatur, unabhängig von der Art der Schäden (Benson *et al.* 1998).

Mutanten mit einem Defekt im *ULP2*-Gen weisen eine reduzierte Toleranz gegenüber unterschiedlichen DNA-schädigenden Einflüssen auf (Ergebnisse 3.4.3). Die *ulp2Δ*-Mutanten sind im Gegensatz zu *uba2*-Mutanten hypersensitiv sowohl gegenüber ultravioletter Strahlung als auch gegen die alkylierende Substanz Methylmethansulfonat (Abb. 19). Diese Resultate implizieren, dass die Ulp2p-abhängige Dekonjugation von SUMO von noch unbekannt Substraten entweder bei der DNA-Reparatur direkt, oder bei der Kontrolle des durch DNA-Schäden ausgelösten Zellzyklus-Arrestes eine Rolle spielt. In von Li und Hochstrasser (2000) durchgeführten Untersuchungen des Ulp2-Enzyms wurde gezeigt, dass anscheinend der Zellzyklus-Kontrollpunkt bei DNA-Schäden betroffen ist. Die Autoren zeigten, dass die Wiederaufnahme des Zellzyklus nach dem durch DNA-Schäden ausgelösten Arrest in *ulp2*-Deletionsmutanten beeinträchtigt ist (Li und Hochstrasser 2000).

In Abbildung 19 ist gezeigt, dass die Toleranz der *ulp2*-Mutante gegenüber DNA-Schäden erhöht werden kann, indem das SUMO-aktivierende Enzym inhibiert wird. Zellen mit Mutationen im *ULP2* und *UBA2*-Gen sind ebenso resistent gegenüber ultravioletter Strahlung und DNA-Alkylierung wie Wildtypzellen. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass an DNA-Reparaturmechanismen beteiligte Proteine sumoyliert werden. Für eine effiziente Reparatur und den Fortlauf des Zellzyklus ist demnach die Dekonjugation dieser Proteine unter Beteiligung des Ulp2-Enzyms notwendig.

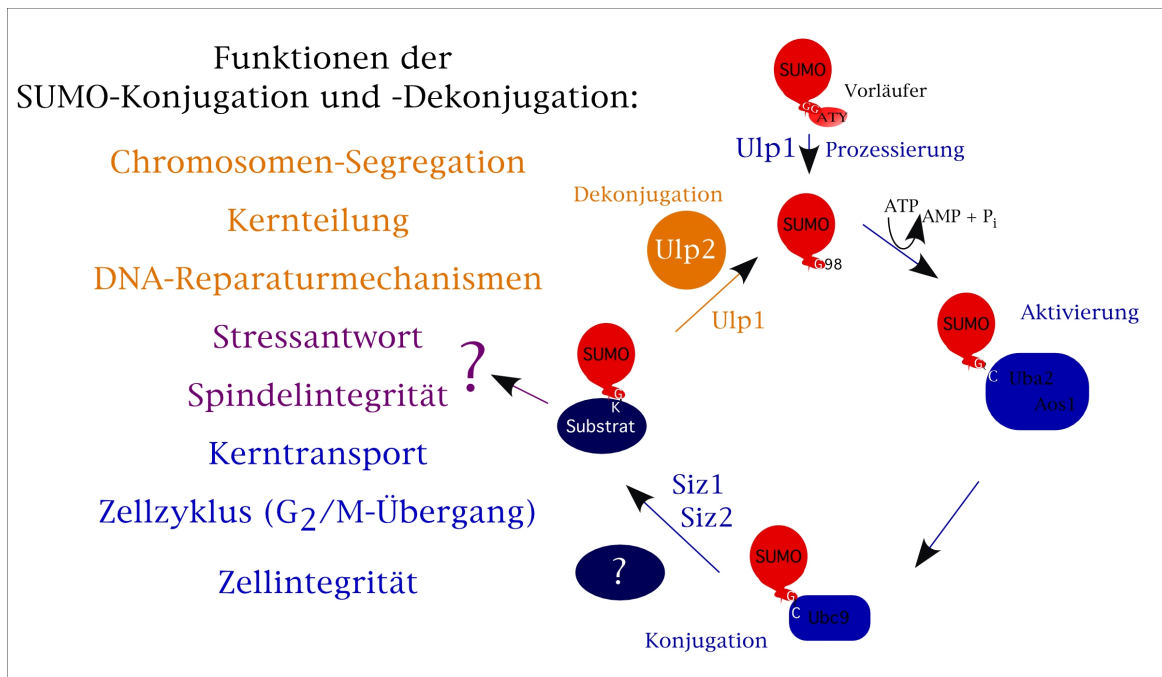


Abb. 30: Funktionen der posttranslationalen SUMO-Konjugation und Dekonjugation in der Hefe *S. cerevisiae*. Die blau unterlegten Pfeile stellen die verschiedenen Schritte und Funktionen der Konjugation, die Orangen die der Dekonjugation. Nähere Erläuterungen der einzelnen Funktionen siehe Text. Die beteiligten Enzyme wurden auch in der Einleitung (1.3.1, Abb. 3) näher beschrieben.

4.1.4 Balance der Konjugation und Dekonjugation von SUMO

Das Gleichgewicht der SUMO-Konjugation und Dekonjugation ist wichtig für ein normales Zellwachstum (siehe oben). Die Mutation oder aber die Überexpression der am SUMO-System beteiligten Gene führten zu einer ausgeprägten Reduzierung des Wachstums und der Stresstoleranz der Zellen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mutanten mit Defekten bei der Konjugation und Dekonjugation sich gegenseitig supprimieren können (Ergebnisse 3.4 und 3.6).

Die Charakterisierung einer *uba2,ulp2*-Doppelmutante zeigte, dass die Mehrzahl der in Wildtypzellen sumoylierten Proteine keine Rolle bei den hier untersuchten zellulären Funktionen spielen. In dieser Doppelmutante sind kaum sumoylierte Proteine detektierbar (Abb. 20A). Trotzdem wurden alle auftretenden Defekte der jeweiligen Einzelmutanten durch die zusätzliche zweite Mutation in der Doppelmutante supprimiert (Abb. 15, 16, 19, Tab. 9, 10). Dabei war die Suppression unabhängig davon, ob es sich um *uba2*- oder *ulp2*-spezifische Defekte handelte, wie im Fall der Zell-Lyse in *uba2*-Mutanten (Abb. 16) oder der Hypersensitivität gegenüber DNA-Schädigung in *ulp2*-Mutanten (Abb. 19).

In *uba2*-Mutanten ist die Aktivierung von SUMO und damit die Konjugation an die Substrate inhibiert (Abb. 12, Abschnitt 3.2.4). Die Konjugation reicht nicht aus, um alle Funktionen der Sumoylierung zu erfüllen. In *ulp2Δ*-Mutanten bleiben die Substrate in der konjugierten Form. Es findet keine Ulp2p-spezifische Dekonjugation mehr statt (siehe 3.5.1). Der Verlust von Ulp2p führt offenbar zur Anhäufung von toxischen Mengen SUMO-konjugierter Proteine. Wurde eines der an der Konjugation beteiligten Enzyme, das aktivierende Enzym (Uba2p/Aos1p), das konjugierende Ubc9-Protein oder SUMO selber in *ulp2*-Disruptionsmutanten in erhöhtem Maße exprimiert, führte dies zur Letalität der Zellen (Abb. 22B, 23C, *UBC9^{HC}*-Daten nicht gezeigt). Auch die Überexpression der zweiten SUMO-spezifischen Protease Ulp1p war toxisch für *ulp2*-Mutanten (Abb. 23B). Fügt man aber ein konditionales *ulp1*-Allel in *ulp2Δ*-Zellen ein, führte dies zur Suppression (Abb. 22B). Dies verdeutlicht, dass die Prozessierung des SUMO-Vorläuferproteins und damit die Bereitstellung konjugierbaren SUMO's, die Hauptfunktion von Ulp1p darstellt.

Auch die Überexpression des dekonjugierenden Enzyms Ulp2p ist toxisch für die Zelle (Kapitel 3.6.1). Erste Untersuchungen weisen darauf hin, dass größere Mengen des Ulp2-Proteins nicht mehr effizient phosphoryliert, und damit inaktiviert werden können (Daten nicht gezeigt).

Die Balance der SUMO-Modifikation ist essentiell für eine Reihe zellulärer Prozesse. Wird eine Seite des Systems, die Konjugation oder Dekonjugation inhibiert, müssen auch die gegensätzlichen Enzyme entsprechend reguliert werden, um ein normales Zellwachstum zu erlauben.

4.5 Ausblick

In Wildtypzellen liegt fast das gesamte vorhandene SUMO als Konjugat an Substrate gebunden vor (siehe Abb. 22A). Bis auf die Septine scheinen diese Konjugate im Kern lokalisiert zu sein (siehe Ergebnisse 3.8). Die hier durchgeführten Versuche können keinen Aufschluss über die direkten Auswirkungen der Sumoylierung geben. Erst wenn die Zielproteine identifiziert sind, wird es möglich sein zu bestimmen, ob Protein-modifikation durch Sumoylierung die Aktivität, Stabilität, Lokalisierung oder die Interaktion mit

anderen Proteinen verändert. All diese unterschiedlichen Effekte traten jeweils bei den verschiedenen bisher bekannten Substraten auf (siehe Einleitung). Es wäre auch denkbar, dass die Sumoylierung den Kernimport beeinflusst und daher die konjugierten Proteine vorwiegend im Kern lokalisiert sind.

In andauernder Zusammenarbeit mit Katrin Stade und Thomas Sommer (Max-Delbrück Laboratorium, Berlin) durchgeführte Experimente ergaben, dass die Konjugation von SUMO eine wichtige Rolle beim Kernimport von Proteinen über das Importin α/β -System spielt (Daten nicht gezeigt). Die Modifikation von SUMO ist anscheinend in der Hefe nicht notwendig für alle Kerntransport-Prozesse, wie in höheren Eukaryoten beobachtet wurde. In Säugerzellen wird RanGAP1, das die Hydrolase-Aktivität der GTPase Ran aktiviert, nur nach Modifikation mit SUMO an die Kernpore gebunden. Dies ist essentiell für die Aufrechterhaltung des Ran-GTP/Ran-GDP Gradienten zwischen Kern und Zytoplasma (Matunis *et al.* 1996, Mahajan *et al.* 1997, Mahajan *et al.* 1998, Matunis *et al.* 1998).

In den ersten in *S. cerevisiae* durchgeführten Untersuchungen konnte kein Zusammenhang des SUMO-Systems mit dem Ran-Zyklus nachgewiesen werden. Schon im Vorfeld wurde gezeigt, dass das homologe Protein der Hefe, Rna1p, kein Substrat für SUMO darstellt (Johnson *et al.* 1997). Die Analysen von verschiedenen Mutanten sowohl des Kerntransports, als auch des SUMO-Systems, sowie die Suche nach synthetisch letalen oder supprimierenden Effekten durch Überexpression beteiligter Gene, werden in der Zukunft Aufschluss über die Rolle des SUMO-Systems bei dem Kerntransport in der Bäckerhefe geben.

Abschließend sei erwähnt, dass die Charakterisierung von Mutanten mit Defekten im SUMO-System einige wichtige Aufschlüsse über die Funktion dieser Art der posttranslationalen Modifikation aufzeigte. Diese Informationen werden die weitere Suche nach SUMO-Substraten erleichtern.

Da die Funktionen der Sumoylierung, wie hier gezeigt, vielfältig sind, wird die Identifizierung eines einzigen Substrates wahrscheinlich nicht alle Fragen lösen können. Außerdem zeigte sich, dass die Schlüsselfunktionen der SUMO-Konjugation nur einen kaum detektierbaren Anteil der sumoylierten Proteine betrafen. *Uba2*-Mutanten waren nur unter Stressbedingungen nicht mehr in der Lage sich zu teilen, zeigten aber schon unter normalen Bedingungen kaum noch SUMO-modifizierte Proteine. Eben diese Substrate aber sind es, die Aufschluss über die essentiellen Funktionen von SUMO liefern werden.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden, zusätzlich zu den beschriebenen Untersuchungen, verschiedene Ansätze zur Identifizierung von SUMO-Akzeptorproteinen entwickelt. In der Zukunft sollen mit Hilfe von „Two-Hybrid“-Interaktionsklonierungen sowie durch die Identifizierung von intergenischen und Dosis-abhängigen Suppressoren Substrate oder zusätzliche am SUMO-System beteiligte Proteine identifiziert werden. In einem anderen, biochemischen Versuchsansatz soll versucht werden, über die Aufreinigung sumoylierter Proteine die Akzeptorproteine zu identifizieren. Aus potentiellen Kandidaten sollten

anhand der bekannten Informationen über die involvierten Mechanismen und die vorhandene Sumoylierungs-Konsensussequenz, schnell mögliche Substrate von eventuell unspezifisch reagierenden Proteinen unterschieden werden.

Die posttranslationale Modifikation von Proteinen mit SUMO ist ein konserviertes Mittel der Eukaryoten zur Regulation der Lokalisation, Stabilität oder Aktivität von Proteinen. Die Zahl der bekannten SUMO-Akzeptoren ist in den letzten zwei Jahren vor allem durch Untersuchungen von humanen Proteinen sehr rasch angestiegen (siehe Einleitung). Die präzisen biochemischen Auswirkungen der Sumoylierung blieben bisher aber meist im Dunkeln. Da die grundlegenden Mechanismen an denen das SUMO-System beteiligt ist in allen Eukaryoten konserviert zu sein scheint, können die phänotypischen Untersuchungen von Hefemutanten schon im Vorfeld der eigentlichen Substrat-Identifizierung Hinweise auf deren Funktion geben.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Konjugation und Dekonjugation von SUMO („Small Ubiquitin-related modifier“) in *Saccharomyces cerevisiae*. SUMO wird, analog zu Ubiquitin, posttranslational kovalent an andere Proteine (reversibel) konjugiert.

Die Charakterisierung von Mutanten mit Defekten in der SUMO-Konjugation zeigte, dass Sumoylierung für eine Reihe zellulärer Prozesse essentiell ist. Neben einer Funktion beim Durchlaufen der G₂/M-Phase des Zellzyklus, spielt die Konjugation eine Rolle bei der Antwort auf verschiedene Stressbedingungen, beim Kernimport, sowie bei der Aufrechterhaltung der mitotischen Spindel und der Zellintegrität.

Im Verlauf dieser Arbeit konnte die Funktion eines bisher nicht beschriebenen Proteins entschlüsselt werden. Spontane Suppressoren einer Mutante mit einem Defekt bei der Aktivierung von SUMO (*uba2-ts9*), und damit der Konjugation, wurden näher untersucht. Einer der Suppressoren wies eine Nullmutation im *ULP2*-Gen auf. Die Benennung erfolgte aufgrund der festgestellten Funktion von Ulp2p als SUMO-spezifische Protease („Ubiquitin-like protein protease 2). Es zeigte sich, dass Ulp2p eines von zwei dekonjugierenden Enzymen in Hefe ist. Es ist nicht essentiell, jedoch ebenso wie an der Konjugation beteiligte Enzyme wichtig für die zelluläre Antwort auf Stressbedingungen und die Spindelintegrität. Die Ulp2p-abhängige Dekonjugation ist außerdem wichtig für die Teilung der Chromosomen und des Zellkerns, sowie die Zellpolarität und DNA-Reparaturmechanismen.

Die hier beschriebenen Untersuchungen der beiden dekonjugierenden Enzyme der Hefe Ulp1p und Ulp2p zeigten, dass sie *in vivo* unterschiedliche Funktionen aufweisen und in verschiedenen Kompartimenten lokalisiert sind. Ulp1p ist mit den Kernporen assoziiert. Das Ulp2-Protein liegt ebenso wie Enzyme des Konjugationssystems Uba2p und Ubc9p in granulären Strukturen innerhalb des Kerns vor.

In Kollaboration mit der Gruppe von W. Seufert konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Ulp2-Proteins im Verlauf des Zellzyklus durch Phosphorylierung reguliert wird. Die Phosphorylierung des Ulp2p führt offenbar zu dessen Inaktivierung zu Beginn der G₂/M-Phase. Kurz vor Beginn der Zytokinese wird es dephosphoryliert und damit wieder aktiviert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das SUMO-System in allen Eukaryoten konserviert ist. Die Enzyme die sowohl an der Konjugation von SUMO, als auch an der Dekonjugation beteiligt sind wurden zum Teil identifiziert und näher charakterisiert. Es konnten wichtige Funktionen der Sumoylierung festgestellt werden und Vorarbeiten zur Identifizierung der SUMO-Substrate geleistet werden.

6 Literaturverzeichnis

- Adamson, A.L. und Kenney, S.** (2001) Epstein-Barr Virus Immediate-Early Protein BZLF1 Is SUMO-1 Modified and Disrupts Promyelocytic Leukemia Bodies. *J Virol* 75:2388-2399.
- Andres, G., Alejo, A., Simon-Mateo, C. und Salas, M.L.** (2001) African swine fever virus protease, a new viral member of the SUMO-1- specific protease family. *J Biol Chem* 276:780-7.
- Andrews, P.D. und Stark, M.J.** (2000) Type 1 protein phosphatase is required for maintenance of cell wall integrity, morphogenesis and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 113:507-20.
- Aristarkhov, A., Eytan, E., Moghe, A., Admon, A., Hershko, A. und Ruderman, J.V.** (1996) E2-C, a cyclin-selective ubiquitin carrier protein required for the destruction of mitotic cyclins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4294-9.
- Azuma, Y., Tan, S.H., Cavenagh, M.M., Ainsztein, A.M., Saitoh, H. und Dasso, M.** (2001) Expression and regulation of the mammalian SUMO-1 E1 enzyme. *Faseb J* 15:1825-7.
- Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R. und Becker, J.** (1998) Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280:275-86.
- Benson, F.E., Baumann, P. und West, S.C.** (1998) Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. *Nature* 391:401-4.
- Betting, J. und Seufert, W.** (1996) A yeast Ubc9 mutant protein with temperature-sensitive in vivo function is subject to conditional proteolysis by a ubiquitin- and proteasome- dependent pathway. *J Biol Chem* 271:25790-6.
- Bhaskar, V., Valentine, S.A. und Courey, A.J.** (2000) A functional interaction between dorsal and components of the smt3 conjugation machinery. *J Biol Chem* 275:4033-40.
- Brown, M.T., Goetsch, L. und Hartwell, L.H.** (1993) MIF2 is required for mitotic spindle integrity during anaphase spindle elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 123:387-403.
- Buschmann, T., Fuchs, S.Y., Lee, C.G., Pan, Z.Q. und Ronai, Z.** (2000) SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell* 101:753-62.
- Casadaban, M.J., Martinez-Arias, A., Shapira, S.K. und Chou, J.** (1983) Beta-galactosidase gene fusions for analyzing gene expression in *Escherichia coli* and yeast. *Methods Enzymol* 100:293-308.
- Chakrabarti, S.R. und Nucifora, G.** (1999) The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A. *Biochem Biophys Res Commun* 264:871-7.
- Chakrabarti, S.R., Sood, R., Ganguly, S., Bohlander, S., Shen, Z. und Nucifora, G.** (1999) Modulation of TEL transcription activity by interaction with the ubiquitin-conjugating enzyme UBC9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7467-72.
- Chakrabarti, S.R., Sood, R., Nandi, S. und Nucifora, G.** (2000) Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell- cycle-dependent assembly into nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13281-5.

- Chant, J.** (1996) Septin scaffolds and cleavage planes in *Saccharomyces*. *Cell* 84:187-90.
- Chelbi-Alix, M.K. und de The, H.** (1999) Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene* 18:935-41.
- Chen, A., Mannen, H. und Li, S.S.** (1998) Characterization of mouse ubiquitin-like SMT3A and SMT3B cDNAs and gene/pseudogenes. *Biochem Mol Biol Int* 46:1161-74.
- Cid, V.J., Duran, A., del Rey, F., Snyder, M.P., Nombela, C. und Sanchez, M.** (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 59:345-86.
- Cornelis, G.R. und Denecker, G.** (2001) *Yersinia* lead SUMO attack. *Nat Med* 7:21-3.
- del Olmo, M., Mizrahi, N., Gross, S. und Moore, C.L.** (1997) The Uba2 and Ufd1 proteins of *Saccharomyces cerevisiae* interact with poly(A) polymerase and affect the polyadenylation activity of cell extracts. *Mol Gen Genet* 255:209-18.
- Desterro, J.M., Rodriguez, M.S. und Hay, R.T.** (1998) SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell* 2:233-9.
- Desterro, J.M., Thomson, J. und Hay, R.T.** (1997) Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS Lett* 417:297-300.
- Dohmen, R.J., Stappen, R., McGrath, J.P., Forrova, H., Kolarov, J., Goffeau, A. und Varshavsky, A.** (1995) An essential yeast gene encoding a homolog of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem* 270:18099-109.
- Dohmen, R.J., Strasser, A.W., Honer, C.B. und Hollenberg, C.P.** (1991) An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* 7:691-2.
- Donaghue, C., Bates, H. und Cotterill, S.** (2001) Identification and characterisation of the *Drosophila* homologue of the yeast Uba2 gene. *Biochim Biophys Acta* 1518:210-4.
- Duprez, E., Saurin, A.J., Desterro, J.M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M.N., Solomon, E., de The, H., Hay, R.T. und Freemont, P.S.** (1999) SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J Cell Sci* 112:381-93.
- Evans, D.R. und Stark, M.J.** (1997) Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* type 2A protein phosphatase catalytic subunit reveal roles in cell wall integrity, actin cytoskeleton organization and mitosis. *Genetics* 145:227-41.
- Everett, R.D., Earnshaw, W.C., Pluta, A.F., Sternsdorf, T., Ainsztein, A.M., Carmena, M., Ruchaud, S., Hsu, W.L. und Orr, A.** (1999) A dynamic connection between centromeres and ND10 proteins. *J Cell Sci* 112:3443-54.
- Finley, D., Ozkaynak, E. und Varshavsky, A.** (1987) The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* 48:1035-46.
- Fogal, V., Gostissa, M., Sandy, P., Zacchi, P., Sternsdorf, T., Jensen, K., Pandolfi, P.P., Will, H., Schneider, C. und Del Sal, G.** (2000) Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *Embo J* 19:6185-95.
- Freeman, Aragon-Alcaide und Strunnikov** (2000) The condensin complex governs chromosome condensation and mitotic transmission of rDNA. *J Cell Biol* 149:811-824.
- Freemont, P.S.** (2000) RING for destruction? *Curr Biol* 10:R84-7.

- Funakoshi, M., Geley, S., Hunt, T., Nishimoto, T. und Kobayashi, H.** (1999) Identification of XDRP1; a *Xenopus* protein related to yeast Dsk2p binds to the N-terminus of cyclin A and inhibits its degradation. *Embo J* 18:5009-18.
- Furukawa, K., Mizushima, N., Noda, T. und Oshumi, Y.** (2000) A protein conjugation system in yeast with homology to biosynthetic enzyme reaction of prokaryotes. *J Biol Chem* 275:7462-7465.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. und Woods, R.A.** (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS- DNA/PEG procedure. *Yeast* 11:355-60.
- Gietz, R.D. und Sugino, A.** (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74:527-34.
- Gong, L., Kamitani, T., Millas, S. und Yeh, E.T.** (2000a) Identification of a novel isopeptidase with dual specificity for ubiquitin- and NEDD8-conjugated proteins. *J Biol Chem* 275:14212-6.
- Gong, L., Millas, S., Maul, G.G. und Yeh, E.T.** (2000b) Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin- specific protease. *J Biol Chem* 275:3355-9.
- Goodson, M.L., Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M.J., Park-Sarge, O.K. und Sarge, K.D.** (2001) SUMO-1 modification regulates the DNA-binding activity of heat shock transcription factor 2 (HSF2), a PML nuclear body associated transcription factor. *J Biol Chem* 15:15.
- Görlich, D. und Kutay, U.** (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:607-60.
- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S.E., Scheffner, M. und Del Sal, G.** (1999) Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J* 18:6462-71.
- Gray, W.M. und Estelle, M.** (2000) Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response. *Trends Biochem Sci* 25:133-8.
- Haas, A.L. und Rose, I.A.** (1982) The mechanism of ubiquitin activating enzyme. A kinetic and equilibrium analysis. *J Biol Chem* 257:10329-37.
- Hanahan, D.** (1985) Techniques of transformation of *E. coli*. IRL Press Oxford Oxford 1:109-135.
- Hay, R.T., Vuillard, L., Desterro, J.M. und Rodriguez, M.S.** (1999) Control of NF-kappa B transcriptional activation by signal induced proteolysis of I kappa B alpha. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:1601-9.
- Heinisch, J.J., Lorberg, A., Schmitz, H.P. und Jacoby, J.J.** (1999) The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 32:671-80.
- Hershko, A. und Ciechanover, A.** (1998) The Ubiquitin System. *Ann Rev Biochem* 67:425-479.
- Hilt, W., Heinemeyer, W. und Wolf, D.H.** (1993) Studies on the yeast proteasome uncover its basic structural features and multiple in vivo functions. *Enzyme Protein* 47:189-201.
- Hisamoto, N., Sugimoto, K. und Matsumoto, K.** (1994) The Glc7 type 1 protein phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for cell cycle progression in G2/M. *Mol Cell Biol* 14:3158-65.
- Hiyama, H., Yokoi, M., Masutani, C., Sugasawa, K., Maekawa, T., Tanaka, K., Hoeijmakers, J.H. und Hanaoka, F.** (1999) Interaction of hHR23 with S5a. The ubiquitin-like domain of

- hHR23 mediates interaction with S5a subunit of 26 S proteasome. *J Biol Chem* 274:28019-25.
- Hjerrild, M., Milne, D., Dumaz, N., Hay, T., Issinger, O.G. und Meek, D.** (2001) Phosphorylation of murine double minute clone 2 (MDM2) protein at serine-267 by protein kinase CK2 in vitro and in cultured cells. *Biochem J* 355:347-56.
- Hochstrasser, M.** (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 30:405-39.
- Hochstrasser, M.** (2000a) Biochemistry. All in the ubiquitin family. *Science* 289:563-4.
- Hochstrasser, M.** (2000b) Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nat Cell Biol* 2:E153-E157.
- Hofmann, H., Floss, S. und Stamminger, T.** (2000) Covalent Modification of the Transactivator Protein IE2-p86 of Human Cytomegalovirus by Conjugation to the Ubiquitin-Homologous Proteins SUMO-1 and hSMT3b. *J Virol* 74:2510-2524.
- Hori, T., Osaka, F., Chiba, T., Miyamoto, C., Okabayashi, K., Shimbara, N., Kato, S. und Tanaka, K.** (1999) Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8. *Oncogene* 18:6829-34.
- Howe, K., Williamson, J., Boddy, N., Sheer, D., Freemont, P. und Solomon, E.** (1998) The ubiquitin-homology gene PIC1: characterization of mouse (Pic1) and human (UBL1) genes and pseudogenes. *Genomics* 47:92-100.
- Huang, H.W., Tsoi, S.C., Sun, Y.H. und Li, S.S.** (1998) Identification and characterization of the SMT3 cDNA and gene encoding ubiquitin-like protein from *Drosophila melanogaster*. *Biochem Mol Biol Int* 46:775-85.
- Huxley, C., Green, E.D. und Dunham, I.** (1990) Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. *Trends Genet* 6:236.
- Jacoby, J.J., Nilius, S.M. und Heinisch, J.J.** (1998) A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the SLG1 gene. *Mol Gen Genet* 258:148-55.
- Jentsch, S. und Pyrowolakis, G.** (2000) Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol* 10:335-42.
- Jiang, W. und Koltin, Y.** (1996) Two-hybrid interaction of a human UBC9 homolog with centromere proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 251:153-60.
- Johnson, E.S. und Blobel, G.** (1997) Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J Biol Chem* 272:26799-802.
- Johnson, E.S. und Blobel, G.** (1999) Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J Cell Biol* 147:981-94.
- Johnson, E.S. und Gupta, A.A.** (2001) An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* 106:735-44.
- Johnson, E.S., Schwienhorst, I., Dohmen, R.J. und Blobel, G.** (1997) The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *Embo J* 16:5509-19.
- Jungmann, J., Reins, H.A., Schobert, C. und Jentsch, S.** (1993) Resistance to cadmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis. *Nature* 361:369-71.

- Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H.P., Fukuda-Kamitani, T. und Yeh, E.T.** (1998a) Characterization of a second member of the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *J Biol Chem* 273:11349-53.
- Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H.P., Wada, H., Fukuda-Kamitani, T. und Yeh, E.T.** (1998b) Identification of three major sentrinization sites in PML. *J Biol Chem* 273:26675-82.
- Kamitani, T., Nguyen, H.P., Kito, K., Fukuda-Kamitani, T. und Yeh, E.T.** (1998c) Covalent modification of PML by the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *J Biol Chem* 273:3117-20.
- Kamitani, T., Nguyen, H.P. und Yeh, E.T.** (1997) Preferential modification of nuclear proteins by a novel ubiquitin-like molecule. *J Biol Chem* 272:14001-4.
- Kamura, T., Conrad, M.N., Yan, Q., Conaway, R.C. und Conaway, J.W.** (1999) The Rbx1 subunit of SCF and VHL E3 ubiquitin ligase activates Rub1 modification of cullins Cdc53 and Cul2. *Genes Dev* 13:2928-33.
- Kawabe, Y., Seki, M., Seki, T., Wang, W.S., Imamura, O., Furuichi, Y., Saitoh, H. und Enomoto, T.** (2000) Covalent modification of the Werner's syndrome gene product with the ubiquitin-related protein, SUMO-1. *J Biol Chem* 275:20963-6.
- Kaye, F.J., Modi, S., Ivanovska, I., Koonin, E.V., Thress, K., Kubo, A., Kornbluth, S. und Rose, M.D.** (2000) A family of ubiquitin-like proteins binds the ATPase domain of Hsp70-like Stch. *FEBS Lett* 467:348-55.
- Kim, K.I., Baek, S.H., Jeon, Y.J., Nishimori, S., Suzuki, T., Uchida, S., Shimbara, N., Saitoh, H., Tanaka, K. und Chung, C.H.** (2000) A new SUMO-1-specific protease, SUSP1, that is highly expressed in reproductive organs. *J Biol Chem* 275:14102-6.
- Kim, Y.H., Choi, C.Y. und Kim, Y.** (1999) Covalent modification of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12350-5.
- Kinoshita, Y., Jarell, A.D., Flaman, J.M., Foltz, G., Schuster, J., Sopher, B.L., Irvin, D.K., Kanning, K., Kornblum, H.I., Nelson, P.S., Hieter, P. und Morrison, R.S.** (2001) Pescadillo, a novel cell cycle regulatory protein abnormally expressed in malignant cells. *J Biol Chem* 276:6656-65.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. und Schiebel, E.** (1999) Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* 15:963-72.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U. und Jentsch, S.** (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96:635-44.
- Kovalenko, O.V., Plug, A.W., Haaf, T., Gonda, D.K., Ashley, T., Ward, D.C., Radding, C.M. und Golub, E.I.** (1996) Mammalian ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 interacts with Rad51 recombination protein and localizes in synaptonemal complexes. *Proc Natl Acad Sci Usa* 93:2958-2963.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- Lammer, D., Mathias, N., Laplaza, J.M., Jiang, W., Liu, Y., Callis, J., Goebel, M. und Estelle, M.** (1998) Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin-related protein rub1p affects function of the SCFCdc4 complex. *Genes Dev* 12:914-26.

- Lapenta, V., Chiurazzi, P., van der Spek, P., Pizzuti, A., Hanaoka, F. und Brahe, C.** (1997) SMT3A, a human homologue of the *S. cerevisiae* SMT3 gene, maps to chromosome 21qter and defines a novel gene family. *Genomics* 40:362-6.
- Lee und Hruby** (1994) Proteolytic Cleavage of Vaccinia Virus Virion. *J Biol Chem* 269:8616-8622.
- Lee, G.W., Melchior, F., Matunis, M.J., Mahajan, R., Tian, Q. und 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.
- Lehembre, F., Badenhorst, P., Muller, S., Travers, A., Schweisguth, F. und Dejean, A.** (2000) Covalent modification of the transcriptional repressor tramtrack by the ubiquitin-related protein Smt3 in *Drosophila* flies. *Mol Cell Biol* 20:1072-82.
- Levine, A.J.** (1997) p53, the cellular gatekeeper. *Cell* 88:323-331.
- Li, S.J. und Hochstrasser, M.** (1999) A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* 398:246-51.
- Li, S.J. und Hochstrasser, M.** (2000) The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein. *Mol Cell Biol* 20:2367-77.
- Liakopoulos, D., Busgen, T., Brychzy, A., Jentsch, S. und Pause, A.** (1999) Conjugation of the ubiquitin-like protein NEDD8 to cullin-2 is linked to von Hippel-Lindau tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5510-5.
- Liakopoulos, D., Doenges, G., Matuschewski, K. und Jentsch, S.** (1998) A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system. *Embo J* 17:2208-14.
- Liu, Q., Jin, C., Liao, X., Shen, Z., Chen, D.J. und Chen, Y.** (1999a) The binding interface between an E2 (UBC9) and a ubiquitin homologue (UBL1). *J Biol Chem* 274:16979-87.
- Liu, Y.C., Pan, J., Zhang, C., Fan, W., Collinge, M., Bender, J.R. und Weissman, S.M.** (1999b) A MHC-encoded ubiquitin-like protein (FAT10) binds noncovalently to the spindle assembly checkpoint protein MAD2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4313-8.
- Loeb, K.R. und Haas, A.L.** (1994) Conjugates of ubiquitin cross-reactive protein distribute in a cytoskeletal pattern. *Mol Cell Biol* 14:8408-19.
- Long, X. und Griffith, L.C.** (2000) Identification and characterization of a SUMO-1 conjugation system that modifies neuronal Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 275:40765-76.
- Longtine, M.S., DeMarini, D.J., Valencik, M.L., Al-Awar, O.S., Fares, H., De Virgilio, C. und Pringle, J.R.** (1996) The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Curr Opin Cell Biol* 8:106-19.
- Lopez-Otin, Simon-Mateo, C., Martinez und Vinuela** (1989) Gly-Gly-X, a Novel Consensus Sequence for the Proteolytic Processing of Viral and Cellular Proteins. *J Biol Chem* 264:9107-9110.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. und Melchior, F.** (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88:97-107.

- Mahajan, R., Gerace, L. und Melchior, F.** (1998) Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. *J Cell Biol* 140:259-70.
- Maniatis, T., Fritsch, E. und Sambrook, J.** (1982) *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, N.Y. 1.25-1.31.
- Mannen, H., Tseng, H.M., Cho, C.L. und Li, S.S.** (1996) Cloning and expression of human homolog HSMT3 to yeast SMT3 suppressor of MIF2 mutations in a centromere protein gene. *Biochem Biophys Res Commun* 222:178-80.
- Mao, Y., Desai, S.D. und Liu, L.F.** (2000a) SUMO-1 conjugation to human DNA topoisomerase II isozymes. *J Biol Chem* 275:26066-73.
- Mao, Y., Sun, M., Desai, S.D. und Liu, L.F.** (2000b) SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4046-51.
- Matunis, M.J., Coutavas, E. und Blobel, G.** (1996) A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 135:1457-70.
- Matunis, M.J., Wu, J. und Blobel, G.** (1998) SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 140:499-509.
- Maul, G.G., Negorev, D., Bell, P. und Ishov, A.M.** (2000) Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *J Struct Biol* 129:278-87.
- Maul, G.G., Yu, E., Ishov, A.M. und Epstein, A.L.** (1995) Nuclear domain 10 (ND10) associated proteins are also present in nuclear bodies and redistribute to hundreds of nuclear sites after stress. *J Cell Biochem* 59:498-513.
- McGrath, J.P., Jentsch, S. und Varshavsky, A.** (1991) UBA1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *Embo J* 10:227-36.
- Melchior, F.** (2000) SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:591-626.
- Mellor, J., Jiang, W., Funk, M., Rathjen, J., Barnes, C.A., Hinz, T., Hegemann, J.H. und Philippsen, P.** (1990) CPF1, a yeast protein which functions in centromeres and promoters. *Embo J* 9:4017-26.
- Meluh, P.B. und Koshland, D.** (1995) Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. *Mol Biol Cell* 6:793-807.
- Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M. und Caput, D.** (2000) Covalent Modification of p73alpha by SUMO-1. *J Biol Chem* 275:36316-36323.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M. und Ohsumi, Y.** (1998) A protein conjugation system essential for autophagy [see comments]. *Nature* 395:395-8.
- Morimoto, M., Nishida, T., Honda, R. und Yasuda, H.** (2000) Modification of cullin-1 by ubiquitin-like protein Nedd8 enhances the activity of SCF(skp2) toward p27(kip1). *Biochem Biophys Res Commun* 270:1093-6.
- Müller, S., Berger, M., Lehembre, F., Seeler, J.S., Haupt, Y. und Dejean, A.** (2000) c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 275:13321-9.

- Müller, S., Matunis, M.J. und Dejean, A.** (1998) Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *Embo J* 17:61-70.
- Nishida, T., Kaneko, F., Kitagawa, M. und Yasuda, H.** (2001) Characterization of a novel mammalian SUMO-1/Smt3-specific isopeptidase, a homologue of rat Axam, which is an Axin-binding protein promoting beta-catenin degradation. *J Biol Chem* 6:6.
- Nishida, T., Tanaka, H. und Yasuda, H.** (2000) A novel mammalian Smt3-specific isopeptidase 1 (SMT3IP1) localized in the nucleolus at interphase. *Eur J Biochem* 267:6423-7.
- O'Connell, K.F. und Baker, R.E.** (1992) Possible cross-regulation of phosphate and sulfate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 132:63-73.
- Orth, K., Xu, Z., Mudgett, M.B., Bao, Z.Q., Palmer, L.E., Bliska, J.B., Mangel, W.F., Staskawicz, B. und Dixon, J.E.** (2000) Disruption of signaling by yersinia effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* 290:1594-7.
- Osaka, F., Kawasaki, H., Aida, N., Saeki, M., Chiba, T., Kawashima, S., Tanaka, K. und Kato, S.** (1998) A new NEDD8-ligating system for cullin-4A. *Genes Dev* 12:2263-8.
- Pemberton, L.F., Rout, M.P. und Blobel, G.** (1995) Disruption of the nucleoporin gene NUP133 results in clustering of nuclear pore complexes. *Proc Natl Acad Sci* 92:1187-91.
- Piper, P.W.** (1995) The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol Lett* 134:121-127.
- Podust, V.N., Brownell, J.E., Gladysheva, T.B., Luo, R.S., Wang, C., Coggins, M.B., Pierce, J.W., Lightcap, E.S. und Chau, V.** (2000) A Nedd8 conjugation pathway is essential for proteolytic targeting of p27Kip1 by ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4579-84.
- Poukka, H., Aarnisalo, P., Karvonen, U., Palvimo, J.J. und Janne, O.A.** (1999) Ubc9 interacts with the androgen receptor and activates receptor- dependent transcription. *J Biol Chem* 274:19441-6.
- Poukka, H., Karvonen, U., Janne, O.A. und Palvimo, J.J.** (2000) Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14145-50.
- Pringle, J.R., Preston, R.A., Adams, A.E., Stearns, T., Drubin, D.G., Haarer, B.K. und Jones, E.W.** (1989) Fluorescence microscopy methods for yeast. *Methods Cell Biol* 31:357-435.
- Ramos, P.C., Hockendorff, J., Johnson, E.S., Varshavsky, A. und Dohmen, R.J.** (1998) Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell* 92:489-99.
- Rangasamy, D. und Wilson, V.G.** (2000) Bovine papillomavirus E1 protein is sumoylated by the host cell ubc9 protein. *J Biol Chem* 275:30487-95.
- Rangasamy, D., Woytek, K., Khan, S.A. und Wilson, V.G.** (2000) SUMO-1 modification of bovine papillomavirus E1 protein is required for intranuclear accumulation. *J Biol Chem* 275:37999-8004.
- Read, M.A., Brownell, J.E., Gladysheva, T.B., Hottel, M., Parent, L.A., Coggins, M.B., Pierce, J.W., Podust, V.N., Luo, R.S., Chau, V. und Palombella, V.J.** (2000) Nedd8 modification of cul-1 activates SCF(beta(TrCP))-dependent ubiquitination of IkappaBalpha. *Mol Cell Biol* 20:2326-33.
- Robzyk, K. und Kassir, Y.** (1992) A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res* 20:3790.

- Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Midgley, C.A., Lane, D.P. und Hay, R.T.** (1999) SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo J* 18:6455-61.
- Rose, M.D., Novick, P., Thomas, J.H., Botstein, D. und Fink, G.R.** (1987) A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere- containing shuttle vector. *Gene* 60:237-43.
- Rose, M.D., Winston, F. und Hieter, P.** (1990) *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harb Lab Press
- Rothstein, R.J.** (1983) One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* 101:202-11.
- Saitoh, H. und Hinchey, J.** (2000) Functional Heterogeneity of Small Ubiquitin-related Protein Modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* 275:6252-6258.
- Saitoh, H., Pu, R., Cavenagh, M. und Dasso, M.** (1997) RanBP2 associates with Ubc9p and a modified form of RanGAP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3736-41.
- Saitoh, H., Sparrow, D.B., Shiomi, T., Pu, R.T., Nishimoto, T., Mohun, T.J. und Dasso, M.** (1998) Ubc9p and the conjugation of SUMO-1 to RanGAP1 and RanBP2. *Curr Biol* 8:121-4.
- Saltzman, A., Searfoss, G., Marcireau, C., Stone, M., Ressner, R., Munro, R., Franks, C., D'Alonzo, J., Tocque, B., Jaye, M. und Ivashchenko, Y.** (1998) hUBC9 associates with MEKK1 and type I TNF-alpha receptor and stimulates NFkappaB activity. *FEBS Lett* 425:431-5.
- Schauber, C., Chen, L., Tongaonkar, P., Vega, I., Lambertson, D., Potts, W. und Madura, K.** (1998) Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway. *Nature* 391:715-8.
- Schwarz, S.E., Matuschewski, K., Liakopoulos, D., Scheffner, M. und Jentsch, S.** (1998) The ubiquitin-like proteins SMT3 and SUMO-1 are conjugated by the UBC9 E2 enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:560-4.
- Schwienhorst, I.** (1997) Genetische Studien zur Funktion des essentiellen UBA2-Gens der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Schwienhorst, I., Johnson, E.S. und Dohmen, R.J.** (2000) SUMO conjugation and deconjugation. *Mol Gen Genet* 263:771-86.
- Seufert, W., Futcher, B. und Jentsch, S.** (1995) Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* 373:78-81.
- Seufert, W. und Jentsch, S.** (1990) Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *Embo J* 9:543-50.
- Shen, Z., Pardington-Purtymun, P.E., Comeaux, J.C., Moyzis, R.K. und Chen, D.J.** (1996) UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. *Genomics* 36:271-9.
- Shintani, T., Mizushima, N., Ogawa, Y., Matsuura, A., Noda, T. und Ohsumi, Y.** (1999) Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *Embo J* 18:5234-41.
- Shou, W., Seol, J.H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z.W., Jang, J., Charbonneau, H. und Deshaies, R.J.** (1999) Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* 97:233-44.

- Sikorski, R.S. und Hieter, P.** (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122:19-27.
- Sternsdorf, T., Jensen, K., Reich, B. und 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.
- Sternsdorf, T., Jensen, K. und Will, H.** (1997) Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *J Cell Biol* 139:1621-34.
- Strunnikov, A.V., Aravind, L. und Koonin, E.V.** (2001) *Saccharomyces cerevisiae* SMT4 encodes an evolutionarily conserved protease with a role in chromosome condensation regulation. *Genetics* 158:95-107.
- Suzuki, T., Ichiyama, A., Saitoh, H., Kawakami, T., Omata, M., Chung, C.H., Kimura, M., Shimbara, N. und Tanaka, K.** (1999) A new 30-kDa ubiquitin-related SUMO-1 hydrolase from bovine brain. *J Biol Chem* 274:31131-4.
- Takahashi, Y., Iwase, M., Konishi, M., Tanaka, M., Toh-e, A. und Kikuchi, Y.** (1999) Smt3, a SUMO-1 homolog, is conjugated to Cdc3, a component of septin rings at the mother-bud neck in budding yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 259:582-7.
- Takahashi, Y., Mizoi, J., Toh, E.A. und Kikuchi, Y.** (2000) Yeast ulp1, an Smt3-specific protease, associates with nucleoporins. *J Biochem (Tokyo)* 128:723-5.
- Tanaka, K., Nishide, J., Okazaki, K., Kato, H., Niwa, O., Nakagawa, T., Matsuda, H., Kawamukai, M. und Murakami, Y.** (1999) Characterization of a fission yeast SUMO-1 homologue, pmt3p, required for multiple nuclear events, including the control of telomere length and chromosome segregation. *Mol Cell Biol* 19:8660-72.
- Tashiro, K., Pando, M.P., Kanegae, Y., Wamsley, P.M., Inoue, S. und Verma, I.M.** (1997) Direct involvement of the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9/Hus5 in the degradation of IkappaBalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7862-7.
- Thomas, D., Cherest, H. und Surdin-Kerjan, Y.** (1989) Elements involved in S-adenosylmethionine-mediated regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* MET25 gene. *Mol Cell Biol* 9:3292-8.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-80.
- Varshavsky, A.** (1997) The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* 22:383-7.
- Vijay-Kumar, S., Bugg, C., Wilkinson, K., Vierstra, R., Hatfield, P. und Cook, W.a.** (1987) Comparison of the three-dimensional structures of human, yeast, and oat ubiquitin. *J Biol Chem* 262:6396-9.
- Visintin, R., Hwang, E.S. und Amon, A.** (1999) Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. *Nature* 398:818-23.
- Wada, H., Kito, K., Caskey, L.S., Yeh, E.T. und Kamitani, T.** (1998) Cleavage of the C-terminus of NEDD8 by UCH-L3. *Biochem Biophys Res Commun* 251:688-92.
- Wang, Z.G., Ruggero, D., Ronchetti, S., Zhong, S., Gaboli, M., Rivi, R. und Pandolfi, P.P.** (1998) PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat Genet* 20:266-72.
- Weissman, A.M.** (2001) Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:169-78.

- Wertman, K.F., Wyman, A.R. und Botstein, D.** (1986) Host/vector interactions which affect the viability of recombinant phage lambda clones. *Gene* 49:253-62.
- Winkler, A.A., Korstanje, R., Zonneveld, B.J., Hooykaas, P.J. und Steensma, H.Y.** (2000) Isolation and characterization of KIUBP2, a ubiquitin hydrolase gene of *Kluyveromyces lactis* that can suppress a ts-mutation in CBF2, a gene encoding a centromeric protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 38:17-22.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. und Graham, M.W.** (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* 17:3469-3478.
- Wu, K., Chen, A. und Pan, Z.Q.** (2000) Conjugation of Nedd8 to CUL1 enhances the ability of the ROC1-CUL1 complex to promote ubiquitin polymerization. *J Biol Chem*
- Xiao, W., Chow, B.L. und Rathgeber, L.** (1996) The repair of DNA methylation damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 30:461-8.
- Zhu, J., Koken, M.H., Quignon, F., Chelbi-Alix, M.K., Degos, L., Wang, Z.Y., Chen, Z. und de The, H.** (1997) Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci* 94:3978-83.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ARS	Autonom replizierende Sequenz
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CEN	Centromersequenz
Cys bzw. C	Cystein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dXTP	Desoxyribonukleotide
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
Gly bzw. G	Glycin
HA	Hämagglutinin-Epitop
His bzw. H	Histidin
KAc	Kalium-Acetat
KDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani (Vollmedium für <i>E. coli</i>)
Lys bzw. K	Lysin
MCS	„multi cloning site“; multiple Klonierungsstelle
min	Minute
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	„open reading frame“, offenes Leseraster
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SCF-Komplex	Skp1/Cullin/F-box-Protein Komplex
SDS	Natriumdodecylsulfat
SUMO	„small Ubiquitin-related Modifier“, codiert von <i>SMT3</i>
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ts	temperatursensitiv
Ub	Ubiquitin
Ulp	„Ubiquitin-like protein protease“
Upm	Umdrehungen pro Minute
Ü. N.	über Nacht
UV	ultraviolett
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid
YP	„Yeast“ (Hefe-)Extrakt/Pepton, (Vollmedium für <i>S. cerevisiae</i>)

8 Anhang

Veröffentlichung im Rahmen dieser Arbeit:

Schwienhorst, I., Johnson, E.S. und Dohmen, R.J. (2000) SUMO conjugation and deconjugation. *Mol Gen Genet* 263:771-786.

Abstract

Ligation of the ubiquitin-like protein SUMO (Smt3p) to other proteins is essential for viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Like ubiquitin (Ub), SUMO undergoes ATP-dependent activation by a specific activating enzyme. SUMO-activating enzyme is a heterodimer composed of Uba2p and Aos1p, polypeptides with sequence similarities, respectively, to the C- and N-terminal parts of Ub-activating enzyme. To study the function of SUMO conjugation, we isolated *uba2* mutants that were temperature-sensitive for growth. In these mutants conjugation of SUMO to other proteins was drastically reduced, even at the temperature permissive for growth. In a screen for spontaneous suppressors of the temperature-sensitive growth phenotype of the mutant *uba2-ts9*, we isolated a strain with a null mutation (*sut9*) in a gene of hitherto unknown function (*SUT9/YIL031W/SMT4*). This gene encodes a protein with similarities to Ulp1p, a dual-function protease that processes the SUMO precursor and deconjugates SUMO from its substrates. The novel protein was therefore termed Ulp2p. Inactivation of *ULP2* in a strain expressing wild-type SUMO-activating enzyme resulted in slow and temperature-sensitive growth, an accumulation of SUMO conjugates. Thus, mutations in SUMO-activating enzyme and mutations in Ulp2p suppress each other, indicating that SUMO conjugation and deconjugation must be in balance for cells to grow normally. Other phenotypes of *ulp2* mutants include a defect in cell cycle progression, hypersensitivity to DNA damage, and chromosome mis-segregation. Ulp2p is predominantly located within the nucleus, whereas Ulp1p colocalizes with nuclear pore complex proteins, indicating that the apparently distinct functions of the two SUMO deconjugating enzymes are spatially separated.

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Dohmen für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit. Die vielen wertvollen Anregungen und fruchtbaren Diskussionen im Verlauf der letzten Jahre machten diese Arbeit erst möglich.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Nils Johnsson möchte ich ganz besonders für die Übernahme des Koreferates danken.

Albert und Melanie Neutzner aus der Gruppe von Wolfgang Seufert (Institut für industrielle Genetik, Stuttgart) danke ich besonders für die Zusammenarbeit bei der Analyse der Zellzyklus-spezifischen Regulation des Ulp2-Enzyms.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Katrin Stade und Dr. Thomas Sommer (MDC, Berlin) für die Kollaboration bei der Untersuchung des Zusammenhangs von Kerntransport und SUMO.

Frau Dr. Erica Johnson danke ich für die Überlassung von Hefemutanten und Plasmiden.

Die sehr gute Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft, sowie die ausgiebigen Diskussionen, die mir im Laufe der Zeit nie die Lust an der Forschung genommen haben, ist den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Dohmen zu verdanken. Ganz besonders möchte ich Birgit Keck, Paula Ramos und Jörg Höckendorff danken, die lange Arbeitstage in Düsseldorf zu einem Vergnügen machten. Aber auch die momentanen Mitarbeiter in Köln: Markus, Marcel, Kristina, Annika und Maria, haben den Wechsel nach Köln und die Eingewöhnung in dieses Institut sehr erleichtert. Vielen Dank für alles!

Ein großer Dank gilt Markus London für das Korrekturlesen dieser Arbeit, und Elisabeth Stratmann für die Bereitstellung ihres Computers und damit das Lösen des Druckerproblems.

Für die seelische Unterstützung, insbesondere in den letzten Monaten, möchte ich allen meinen Freunden und ganz besonders Martina Schwienhorst, Birgit Keck und meinen Eltern danken.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. R. Jürgen Dohmen betreut worden.

Köln, September 2001

Ingrid Schwienhorst

Teilpublikationen im Rahmen dieser Arbeit:

Johnson, E.S., **Schwienhorst, I.**, Dohmen, R.J. und Blobel, G. (1997) Embo J. 16:5509-19.

Schwienhorst, I., Johnson, E.S. und Dohmen, R.J. (2000) Mol Gen Genet 263:771-786.