

Berichte aus der Biologie

Esther Owsianowski

**Untersuchungen zur Rolle
des SUMO-Modifikationssystems
bei der Kernteilung in
*Saccharomyces cerevisiae***

D 93 (Diss. Universität Stuttgart)

Shaker Verlag
Aachen 2007

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Stuttgart, Univ., Diss., 2006

Copyright Shaker Verlag 2007

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8322-6649-3

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

ZUSAMMENFASSUNG

Die Identifikation von mehr als 300 SUMO-Substraten aus verschiedensten Funktionsbereichen der Hefe *S. cerevisiae* durch Massenspektrometrie-basierte Ansätze seit dem Jahr 2004 weist auf die Bedeutung des SUMO-Systems für den Ablauf des Zellzyklus hin. Schon zuvor deuteten Beobachtungen auf eine Beteiligung des SUMO-Modifikationssystems an verschiedenen Aspekten der Kernteilung hin.

Das Hefe-SUMO, Smt3, wurde als Dosis-Suppressor einer temperatursensitiven Mutation von *MIF2* identifiziert. Ein anderes Kinetochorprotein, Cep3, interagiert in Untersuchungen mittels 2-Hybridsystem mit dem SUMO-konjugierenden Enzym Ubc9. Des weiteren arretieren Zellen, die ein temperatursensitives Allel von *UBC9* tragen, bei restriktiver Temperatur am G2/M-Übergang. In *ULP2*-Deletionsmutanten kommt es zu einem Kohäsionsverlust der Schwesterchromatiden im Bereich der Centromere. Diese Beobachtungen sowie bestehende Modelle zur möglichen Wirkungsweise von SUMO sprechen für eine Beteiligung des SUMO-Modifikationssystems z.B. an der Regulation oder dem Aufbau der Kinetochore oder an der Aktivierung von mitotischen Kontrollmechanismen.

Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit die Beteiligung des SUMO-Modifikationssystems bei der Kinetochorfunktion und der Kernteilung untersucht. Mit einem auf Immunpräzipitation basierten Nachweis, der zunächst charakterisiert wurde, wurden im Rahmen dieser Arbeit ausgewählte Kinetochor- und anderweitig an der Kernteilung beteiligte Proteine auf Modifikation durch Smt3 untersucht. Verschiedene dieser Proteine konnten als SUMO-Substrate identifiziert werden. Durch Austausch der Lysinreste in den vorhandenen Konsensusmotiven für SUMO-Modifikation wurden verwendete Modifikationsstellen bestimmt. Anschließende Untersuchung der nicht mehr modifizierbaren Proteine auf Funktionsänderung sollte Aufschluss über die Bedeutung der SUMO-Modifikation geben.

Um die Analyse der Funktion von SUMO bei der Kernteilung zu erweitern, wurden Untersuchungen zur SUMO-Isopeptidase Ulp2 durchgeführt. Ulp2 ist bisher wenig charakterisiert, jedoch ist es als Kern-lokalisiertes Protein beschrieben. Ulp2 unterscheidet sich von der zweiten Hefe-Isopeptidase, Ulp1, durch seine subzelluläre Lokalisation und sein Substratspektrum. Ulp2 liegt Zellzyklus-abhängig phosphoryliert vor, wobei das Ausmaß der Modifikation während der Mitose am größten ist. Da die Phosphorylierung eines Proteins sowohl seine Lokalisation als auch seine Aktivität beeinflussen kann, wurden diese beiden Aspekte untersucht. Eine Veränderung des Aufenthaltsortes von Ulp2 in der Zelle in Abhängigkeit von der Phosphorylierung konnte durch Lokalisationsstudien mit verschiedenen Epitop-markierten Formen von Ulp2 nicht nachgewiesen werden. In den Untersuchungen dieser Arbeit wurde eine eindeutige Kernlokalisation nur bei starker Überexpression einer Nterminal GFP-markierten Variante von Ulp2 beobachtet. Ansonsten war das Protein, unabhängig von der Zellzyklusphase und dem Phosphorylierungsstatus, relativ gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt mit einer leichten Anreicherung in der Kernperipherie. Diese Beobachtung könnte auf eine Lokalisation an der Kernhülle hindeuten. Für die Untersuchung der Aktivität der phosphorylierten und der nicht phosphorylierten Form von Ulp2 wurde ein *in vitro* Aktivitätsnachweis entwickelt. Mit diesem

konnte eine Aktivität von HA₃-Ulp2 aber nicht von Ulp2-Myc₉ nachgewiesen werden. Ein Unterschied zwischen der phosphorylierten und der nicht phosphorylierten Formen wurde in ersten Experimenten nicht gezeigt. Jedoch weisen einige gemachte Beobachtungen darauf hin, dass die Phosphorylierung einen Einfluss auf die Stabilität oder die Substratspezifität des Proteins besitzt. Zusammenfassend stellen die hier präsentierten Daten die Bedeutung des SUMO-Modifikationssystems für die Kernteilung heraus.