

**UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE DES
SUMO-MODIFIKATIONSSYSTEMS
BEI DER KERNTeilUNG IN
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von
Esther Owsianowski
aus Göttingen

Hauptberichter: Prof. Dr. W. Seufert
Mitberichter: Prof. Dr. D.H. Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2006

Institut für Industrielle Genetik
der Universität Stuttgart
2006

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

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Der Beginn aller Wissenschaft ist es immer gewesen,
dass die Dinge sind, wie sie sind.

Aristoteles

INHALT

Abkürzungsverzeichnis	11
1. Zusammenfassung	13
2. Summary	15
3. Einleitung	17
3.1. Die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Modellorganismus	17
3.2. Der Zellteilungszyklus in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
3.3. Das Kinetochor von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
3.3.1. Der Aufbau des Kinetochors	19
3.3.2. Biorientierung der Kinetochore in der Mitose	20
3.3.3. Chromosomensegregation und Austritt aus der Mitose	21
3.4. Das Nukleolusprotein Tof2	23
3.5. Posttranslationale Modifikationen	23
3.6. Der SUMO-Modifikationsweg	24
3.7. Umkehrbarkeit und Regulation der SUMO-Modifikation	25
3.8. Untersuchung der biologischen Funktion der bekannten SUMO-Modifikationen in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
3.9. Wirkungsweise von SUMO	29
3.10. Nachweis von SUMO-Modifikationen	30
3.11. SUMO und Kinetochorfunktion	32
3.12. Ziel der Arbeit	33
4. Material und Methoden	34
4.1. Nukleinsäuren	34
4.2. Enzyme	34
4.3. Proteine und Antikörper	34
4.4. Chemikalien	35
4.5. Sonstige Materialien	36
4.6. Geräte	37
4.7. Medien, Puffer und Lösungen	37
4.7.1. Bakterienmedien	37
4.7.2. Hefemedien	38
4.7.3. Puffer und Lösungen	39
4.8. Synthetische Oligonukleotide	41
4.9. Plasmide	46
4.10. Hefestämme	48
4.11. Arbeiten mit Bakterien	52
4.11.1. Kultivierung von Bakterienzellen in Flüssigmedium	52
4.11.2. Herstellung elektrokompeter <i>Escherichia coli</i> Zellen	53
4.11.3. Transformation von <i>Escherichia coli</i> durch Elektroporation	53

4.12. Arbeiten mit Hefen	53
4.12.1. Kultivierung von Hefezellen in Flüssigmedium	53
4.12.2. Aufbewahrung von Hefestämmen	54
4.12.3. Kreuzung haploider Hefestämme	54
4.12.4. Sporulation diploider Hefestämme und Tetradenanalyse	54
4.12.5. SGA-Analyse	55
4.12.6. Transformation von Hefe nach der Lithiumacetat-Methode	55
4.12.7. Untersuchung des Wachstums von Hefestämmen mittels Verdünnungsreihen	56
4.12.8. Arrest von Hefezellen	56
4.12.8.1. Arrest in der G1-Phase mit α -Faktor	56
4.12.8.2. Arrest in der G2/M-Phase durch Nocodazol	57
4.12.8.3. Arrest in der M-Phase durch Überexpression von <i>GAL10-clb2Δdb</i>	57
4.13. Färbung und Mikroskopie von Hefezellen	57
4.13.1. Fixierung von Hefezellen	57
4.13.1.1. Fixierung mit Ethanol	57
4.13.1.2. Fixierung mit Formaldehyd	57
4.13.2. Färbung von Hefezellen mit 4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	58
4.13.3. Indirekte Immunfluoreszenz	58
4.13.4. GFP-Fluoreszenz	59
4.13.5. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	59
4.14. Molekularbiologische Methoden	60
4.14.1. Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	60
4.14.1.1. Plasmid-Schnellisolation	60
4.14.1.2. Präparation von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse	60
4.14.1.3. Präparation von Plasmid-DNA in größerem Maßstab (JETSpin-Kit)	60
4.14.2. Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA	61
4.14.3. Isolierung von DNA aus Hefe	61
4.14.4. Restriktionsverdau und Phosphatasebehandlung von Plasmid-DNA	62
4.14.5. Agarosegelelektrophorese	62
4.14.6. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	63
4.14.7. Ligation von DNA-Fragmenten	63
4.14.8. Die Polymerase-Ketten-Reaktion	63
4.14.8.1. PCR zur Amplifikation und Klonierung von Genen	63
4.14.8.2. PCR zur Bestimmung der Integrationszahl von Plasmiden	64
4.14.8.3. PCR zur Bestimmung des Paarungstyps	65
4.14.8.4. PCR zur Epitopmarkierung oder Deletion von Proteinen	66
4.14.8.5. PCR zur gerichteten Mutagenese	67
4.15. Proteinbiochemische Methoden	68
4.15.1. Herstellung von Proteinextrakten aus Hefezellen	68

4.15.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	68
4.15.3. Westernblot-Analyse von Epitop-markierten Proteinen	69
4.15.4. Immunpräzipitation von Proteinen	70
4.15.5. Herstellung von SUMO-Konjugaten <i>in vitro</i>	71
5. Ergebnisse	72
5.1. Charakterisierung des SUMO-Nachweises	72
5.2. SUMO-Modifikation von Ndc10-Myc ₁₃	75
5.3. SUMO-Modifikation von Bir1-Myc ₁₃	79
5.4. Untersuchung der Modifikationsmutanten von <i>NDC10</i> und <i>BIR1</i>	83
5.4.1. Wachstumstest der <i>NDC10^m</i> -Mutanten	83
5.4.2. Ndc10-SUMOylierung und Meiose	85
5.4.3. Untersuchung der genetischen Interaktion der <i>NDC10(K651/695R)</i> -Mutante mit <i>CSE4-MYC₁₃</i>	85
5.4.4. SGA mit der <i>NDC10(K651/695R)</i> -Mutante	86
5.4.5. Immunfluoreszenzanalyse der <i>NDC10(K651/695R)</i> -Mutante	88
5.4.6. Wachstumstest der <i>BIR1^m</i> -Mutanten	89
5.5. SUMO-Modifikation weiterer Kinetochorproteine	92
5.6. SUMOylierung von Nukleolusproteinen	95
5.7. Untersuchung der SUMO-Isopeptidase Ulp2	101
5.7.1. Lokalisation verschiedener Ulp2-Konstrukte mittels Fluoreszenzmikroskopie	101
5.7.2. Untersuchung der Aktivität von Ulp2	102
5.7.3. Wachstumstests der verschieden markierten Ulp2-Formen	113
6. Diskussion	115
6.1. Charakterisierung des SUMO-Modifikationsnachweises	115
6.2. SUMO-Modifikation von Kinetochor- und Nukleolusproteinen	117
6.2.1. Kinetochorproteine	117
6.2.2. Nukleolusproteine	120
6.2.3. Modelle zur Wirkungsweise der SUMO-Modifikationen	121
6.3. Untersuchungen zu Ulp2	122
6.3.1. Lokalisation verschiedener Ulp2-Formen	122
6.3.2. Untersuchung des Einflusses der Phosphorylierung auf die Aktivität von Ulp2	124
6.4. Ausblicke	127
7. Literaturverzeichnis	129
8. Lebenslauf	139
9. Anhang	141
9.1. Abbildungsverzeichnis	141
9.2. Tabellenverzeichnis	142
Danksagung	143

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
α	anti-
Δ	Deletion
Amp	Ampicillin
APC	<i>anaphase promoting complex</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BIR	<i>bacculovirus inhibitor of apoptosis repeats</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Cdc	<i>cell division cycle</i>
CDK	Zyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin dependent kinase</i>)
CHIP	Chromatinimmunpräzipitation (<i>chromatin immuno precipitation</i>)
cNLS	klassische Kernlokalisationssequenz (<i>classical nuclear localization sequence</i>)
C-Terminus	Carboxyterminus eines Proteins
D	Glucose
Da	Dalton
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-diamin-N,N,N',N'-tetraacetat
FEAR	<i>Cdc fourteen early anaphase release</i>
G	Galaktose
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser (MilliQ)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse reddish peroxidase</i>)
kb	Kilobasen (1000 Basenpaare)
l	Liter
LB	Luria Bertani Broth
LRB	Laemmli Laufpuffer (<i>Laemmli running buffer</i>)
LSB	denaturierender Ladepuffer für Proteinproben (<i>Laemmli sample buffer</i>)
^m	verschiedene Mutanten eines Gens/Proteins
M	molar (Mol/Liter)
MEN	<i>mitotic exit network</i>
min	Minute
NPC	Kernporenkomplex (<i>nuclear pore complex</i>)
N-Terminus	Aminoterminus eines Proteins
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
p.a.	zur Analyse
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
R	Raffinose

RENT	<i>regulator of nucleolar silencing and telophase</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGA	<i>synthetic genetic array</i>
SPB	Spindelpolkörper (<i>spindle pole body</i>)
SUMO/Smt3	<i>small Ubiquitin-like modifier/suppressor of mif two</i>
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TB	Terrific Broth
TBS	Tris-gepufferte Saline
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>ts</i>	temperatursensitiv
U	Unit(Enzymmenge)
Ulp	<i>Ubiquitin-like specific protease</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (l/l)
w/v	Gewicht pro Volumen (g/l)
Wt	Wildtyp
XY	Vollmedium für Hefe

1. 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 N-terminal 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.

2. SUMMARY

Since 2004, more than 300 SUMO substrates from different functional areas in *S. cerevisiae* have been identified by mass-spectrometry based approaches. This data implies the importance of the SUMO modification system to cell cycle progression. Even before 2004, observations were made which imply an involvement of the SUMO modification system in specific aspects of nuclear division.

SUMO is involved in many cellular processes. The yeast homologue of SUMO, Smt3, has been identified as a dosage dependent suppressor of a temperature-sensitive mutation in the gene encoding the kinetochore protein Mif2. Another kinetochore protein, Cep3, has been found to interact with the SUMO conjugating enzyme Ubc9 in two hybrid analyses. Cells carrying a temperature-sensitive allele of *UBC9* arrested at the G2/M-transition, after shift to the restrictive temperature. Finally, *ULP2* deletion mutants show a loss of cohesion near the centromeres of sister chromatids, suggesting the involvement of *ULP2* in kinetochore action. These observations as well as the current models for possible modes of SUMO action allude to an involvement of the SUMO modification system in the regulation or assembly of kinetochores, as well as in the activation of mitotic checkpoints.

For the above reasons, this work analyses the role of SUMO in kinetochore function and nuclear division. First, the immunoprecipitation-based assay used for detection of SUMO-modifications was characterized. Selected kinetochore proteins and other proteins involved in nuclear division were analyzed for Smt3 conjugation. Several of these proteins were found to be SUMO substrates. The modification sites of these substrates were identified by site-directed mutagenesis of the lysine residues within consensus motives. Subsequent examination of yeast strains expressing the mutant proteins was performed, to assign functions to the different SUMO modifications.

To extend the analysis of SUMO's role in cell cycle division, the yeast SUMO isopeptidase Ulp2 was studied. So far, this protein has not been well characterized, though it is thought to be a nuclear protein. Ulp2 differs from the other yeast isopeptidase, Ulp1, in its subcellular localization pattern and substrate specificity. Ulp2 has been found to be phosphorylated in a cell cycle dependent manner, with a peak of modification during mitosis. Since phosphorylation of a protein can affect its localization as well as its activity, both of those aspects were analyzed. It is shown here, that a change of protein localization in the cell in consequence of the phosphorylation could not be detected by fluorescence microscopy studies of differently tagged Ulp2 versions. Also, localization of Ulp2 in the nucleus could only be observed when a N-terminally GFP-tagged version of the protein was strongly overexpressed from the inducible *GALI*-promoter. Otherwise the protein was rather evenly distributed over the whole cell, with a slight accumulation in the nuclear periphery. This observation implies Ulp2 localization not only in the nucleus but also at the nuclear envelope. This localization pattern was independent of the cell cycle stage and the phosphorylation status. For examination of the activity of the phosphorylated and non-phosphorylated forms of Ulp2, an *in vitro* assay was established. With

this assay, it was possible to detect an activity for HA₃-Ulp2 but not for Ulp2-Myc₉. A change in activity dependent on the phosphorylation status of Ulp2 could not be observed in the initial experiments with this system. Some observations described in the text imply an effect of Ulp2 phosphorylation on the stability or substrate specificity of the protein. In whole, the work described here points out the importance of the SUMO modification system in nuclear division processes.