

# **SUMO-abhängige Regulation der Ribosomenbiogenese am Beispiel des PELP1-TEX10-WDR18-Komplexes**

Dissertation der  
Fakultät für Biologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität  
München

**vorgelegt von  
Diplom-Biologin  
Elisabeth Finkbeiner**

April 2011

## **Ehrenwörtliche Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, den 21. 04. 2011

Promotionsgesuch eingereicht am	21. 04. 2011
Tag der mündlichen Prüfung	22. 06. 2011
Erster Gutachter	Prof. Dr. Stefan Jentsch
Zweite Gutachterin	Prof. Dr. Angelika Böttger

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Juni 2007 und April 2011 unter Anleitung von Dr. Stefan Müller (seit November 2010 Professor für Biochemie, Goethe-Universität Frankfurt) in der Abteilung von Prof. Dr. Stefan Jentsch am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt. Wesentliche Teile dieser Arbeit sind in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Finkbeiner E., Haindl M., Muller S. (2011). "The SUMO system controls nucleolar partitioning of a novel mammalian ribosome biogenesis complex." *EMBO J.* 30(6): 1067-78.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>2</b>
2.1	Aufbau und Funktion von Ribosomen	2
2.2	Nukleolus und Ribosomenbiogenese	3
2.3	Nukleoläre Kompartimentierung zellulärer Funktionen	8
2.4	Posttranslationale Modifikationen	10
2.4.1	Ubiquitin und Ubiquitin-ähnliche Proteine	10
2.4.2	Das SUMO-System	12
2.5	SUMO und Ribosomenbiogenese	22
2.6	Zielsetzung	23
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>24</b>
3.1	<b>SEN3 bindet an einen Proteinkomplex bestehend aus PELP1, TEX10 und WDR18</b>	<b>24</b>
3.1.1	SEN3 interagiert mit PELP1, TEX10 und WDR18	24
3.1.2	MDN1 und LAS1L sind mit PELP1 assoziiert	29
3.2	<b>PELP1, TEX10 und WDR18 lokalisieren im Nukleolus</b>	<b>31</b>
3.3	<b>PELP1, TEX10, WDR18 und MDN1 sind an der Ribosomenbiogenese beteiligt</b>	<b>33</b>
3.3.1	Die Depletion von PELP1, TEX10, WDR18 oder MDN1 führt zu Defekten der rRNA-Prozessierung	33
3.3.2	PELP1 ist mit rRNA und Präribosomen assoziiert	35
3.3.3	PELP1, TEX10, WDR1, MDN1 und SEN3 sind am Reifungsprozess der großen ribosomalen Untereinheit beteiligt	37
3.4	<b>PELP1 ist ein SUMO-Substrat und wird von SEN3 demodifiziert</b>	<b>39</b>
3.4.1	PELP1 interagiert nichtkovalent mit SUMO	39
3.4.2	PELP1 ist ein SEN3-sensitives Substrat für SUMO	40
3.4.3	Lysin 826 ist die Haupt-Sumoylierungsstelle von PELP1	42
3.4.4	Die Sumoylierung von PELP1 wird durch p14 <sup>ARF</sup> stimuliert	43
3.5	<b>Die nukleoläre Lokalisierung von PELP1 wird durch das SUMO-System kontrolliert</b>	<b>44</b>
3.5.1	Verstärkte Sumoylierung verhindert die nukleoläre Lokalisierung von PELP1	44
3.5.2	TEX10, LAS1L und MDN1 sind nach Verlust von SEN3 weitgehend aus dem Nukleolus ausgeschlossen	46
3.5.3	SUMO2/3 reguliert die subnukleäre Verteilung von PELP1	47
3.5.4	Die Modifikation von PELP1 durch SUMO bestimmt dessen subnukleäre Lokalisierung	47
3.5.5	Das PELP1-assoziierte Protein LAS1L wird ebenfalls von SUMO modifiziert	49
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>51</b>
4.1	<b>Der PELP1-TEX10-WDR18-Komplex ist an der Ribosomenbiogenese beteiligt</b>	<b>51</b>
4.2	<b>SEN3 kontrolliert die subzelluläre Verteilung des PELP1-TEX10-WDR18-Komplexes</b>	<b>54</b>
4.3	<b>PELP1 als wichtiges Zielprotein von ARF</b>	<b>55</b>

---

4.4	Das SUMO-System als möglicher Kontrollmechanismus für die Umgestaltung präribosomaler Partikel.....	56
4.5	Mögliche Mechanismen SUMO-regulierter Dynamik nukleolärer Proteine .....	57
4.6	Die Bedeutung von PELP1 für Tumorentstehung und Ribosomenbiogenese.....	59
<b>5</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>61</b>
5.1	Chemikalien .....	61
5.2	Mikrobiologische Methoden.....	61
5.2.1	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.....	61
5.2.2	Verwendeter <i>E. coli</i> -Vektor .....	61
5.2.3	Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i> .....	62
5.2.4	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	62
5.2.5	Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA .....	62
5.2.6	Rekombinante Proteinexpression .....	63
5.3	Zellbiologische Methoden .....	63
5.3.1	Zelllinien .....	63
5.3.2	Expressionsvektoren für Säugerzellen.....	63
5.3.3	Kultivierung von Säugerzellen.....	64
5.3.4	Lagerung von Säugerzellen .....	64
5.3.5	Transfektion von Säugerzellen mit Plasmid-DNA .....	64
5.3.6	Expression von Genen mit Hilfe des pRTS1-Systems.....	65
5.3.7	Transfektion von Säugerzellen mit siRNA-Oligonukleotiden.....	65
5.3.8	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	66
5.3.9	<i>In vivo</i> -Markierung ribosomaler RNA .....	68
5.3.10	Anreicherung präribosomaler Ribonukleoprotein-Komplexe.....	68
5.4	Molekularbiologische Methoden .....	68
5.4.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	68
5.4.2	Restriktionsverdau von DNA .....	70
5.4.3	Dephosphorylierung von DNA.....	70
5.4.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA .....	70
5.4.5	Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen.....	70
5.4.6	Ligation von DNA .....	71
5.4.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	71
5.4.8	Zielgerichtete Punktmutagenese.....	71
5.4.9	Sequenzierung von DNA.....	72
5.4.10	Verwendete Plasmide .....	73
5.4.11	Isolierung von RNA aus Säugerzellen .....	74
5.4.12	Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA .....	74
5.4.13	Reverse Transkription .....	75
5.4.14	<i>Real time</i> -PCR .....	75
5.5	Proteinbiochemische Methoden .....	77
5.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	77
5.5.2	Western Blot.....	77

---

5.5.3	Coomassiefärbung von Proteingelen .....	79
5.5.4	Lyse und Präparation von Zelllysaten .....	79
5.5.5	Immunpräzipitation (IP) .....	79
5.5.6	Identifikation von PELP1-Interaktionspartnern .....	80
5.5.7	RNA-Immunpräzipitation (RIP) .....	81
5.5.8	Fraktionierung zellulärer Kompartimente .....	81
5.5.9	Denaturierende Anreicherung von SUMO-Substraten <i>in vivo</i> .....	81
5.5.10	Bindungsstudien Matrix-gekoppelter Proteine .....	82
5.5.11	<i>In vitro</i> -Modifikation und -Demodifikation von Proteinen mit SUMO .....	82
<b>5.6</b>	<b>Computeranalysen .....</b>	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>96</b>
<b>7.1</b>	<b>Abbildungen .....</b>	<b>96</b>
<b>7.2</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>7.3</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>103</b>
<b>7.4</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>104</b>

# 1 Zusammenfassung

Die Biogenese eukaryotischer Ribosomen ist ein streng kontrollierter, dynamischer Prozess, der ein komplexes räumliches und zeitliches Zusammenspiel vieler verschiedener Proteine erfordert. Dabei wird zunächst ribosomale DNA mit Hilfe der RNA-Polymerase I im Nukleolus transkribiert. Das daraus resultierende rRNA-Vorläufer-Molekül wird anschließend umfassend prozessiert und modifiziert. Gleichzeitig assemblieren ribosomale Proteine mit der reifenden rRNA, um präribosomale Partikel zu bilden, die für weitere Reifungsschritte ins Nukleoplasma und Cytoplasma transportiert werden. Zum Verständnis des ribosomalen Reifungsprozesses haben bislang vor allem genetische und biochemische Studien in der Bäckerhefe beigetragen. In Säugerzellen sind dagegen die Komponenten der Ribosomenbiogenese wenig charakterisiert, und insbesondere unser Wissen über die Regulationsmechanismen ist lückenhaft.

Die posttranslationale Modifikation mit dem ubiquitinähnlichen SUMO-Protein reguliert eine Vielzahl wichtiger zellulärer Prozesse. SUMO-spezifische Isopeptidasen der SENP-Familie katalysieren die Abspaltung von SUMO von Zielproteinen und kontrollieren damit das Gleichgewicht zwischen Modifikation und Demodifikation.

Vorarbeiten zu dieser Arbeit haben eine entscheidende Rolle für die SUMO-Isopeptidase SENP3 während der nukleolären Schritte der Ribosomenbiogenese gezeigt. Allerdings waren die Substrate von SENP3 bei diesem Prozess weitgehend unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein SENP3-assoziiertes Proteinkomplex bestehend aus den Komponenten PELP1, TEX10 und WDR18 aufgereinigt. Als weitere Bindungspartner von PELP1 wurden außerdem MDN1 und LAS1L identifiziert. Durch RNAi-vermittelte Depletionsexperimente in Zellkultur konnte gezeigt werden, dass PELP1, TEX10 und WDR18, sowie die assoziierten Proteine MDN1 und LAS1L, ebenso wie SENP3 für die Reifung der 28S rRNA und den nukleolären Export der großen ribosomalen Untereinheit erforderlich sind. PELP1 und LAS1L wurden als SENP3-sensitive SUMO-Substrate charakterisiert. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass das Gleichgewicht zwischen Sumoylierung und Desumoylierung die subnukleäre Lokalisierung des Komplexes kontrolliert. Sumoylierung führt zum Ausschluss aus dem Nukleolus, während Desumoylierung die nukleoläre Kompartimentierung fördert.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass der Komplex aus den Proteinen PELP1, TEX10 und WDR18 die Ribosomenbiogenese reguliert. Außerdem deuten sie darauf hin, dass dessen SUMO-abhängige subzelluläre Verteilung Ablauf und Koordination der Ribosomenreifung kontrolliert.

## 2 Einleitung

### 2.1 Aufbau und Funktion von Ribosomen

Ribosomen werden zur Synthese zellulärer Proteine benötigt. Das Ribosom ist eine komplexe katalytische Maschinerie mit einer Größe von etlichen Megadaltons, die aus mehr als 50 Proteinen und mehreren ribosomalen RNA (rRNA)-Molekülen zusammengesetzt ist. Eine typische eukaryotische Zelle enthält einige Millionen Ribosomen in ihrem Cytoplasma, was verdeutlicht, dass die Herstellung von Ribosomen eine große Stoffwechselleistung der Zelle darstellt. Prokaryotische und eukaryotische Ribosomen sind sich in Aufbau und Funktion sehr ähnlich. Beide bestehen aus einer kleinen und einer großen Untereinheit, die in Eukaryoten aufgrund ihrer Sedimentationskoeffizienten 40S- bzw. 60S-Untereinheiten genannt werden. Die kleine (40S-) Untereinheit besteht in Säugern aus etwa 30 Proteinen und einer ribosomalen RNA (18S rRNA), die große (60S-) Untereinheit aus etwa 50 Proteinen und drei ribosomalen RNAs (28S, 5,8S und 5S rRNAs). Zusammen binden die beiden Untereinheiten als 80S-Ribosom an ein mRNA-Molekül, um die Synthese von Proteinen zu veranlassen. Hierbei wird die mRNA-Nukleotidsequenz in eine Aminosäuresequenz übersetzt, indem Aminoacyl-tRNAs als Adaptoren verwendet werden, um die jeweilige Aminosäure an das Ende der wachsenden Polypeptidkette anzuknüpfen. Dabei besitzen die rRNAs die eigentliche katalytische Funktion des Ribosoms, während die ribosomalen Proteine eher eine stabilisierende, strukturgebende Rolle spielen.

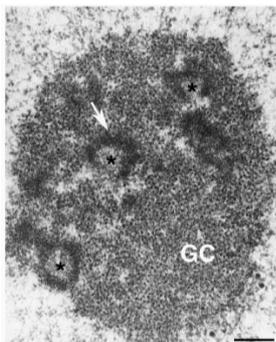
An der Herstellung von Ribosomen sind alle drei RNA-Polymerasen beteiligt. Die RNA-Polymerase I synthetisiert dabei einen 47S-rRNA-Vorläufer, wobei eine rDNA-Transkriptionseinheit als Matrize dient. Aus dieser Vorläufer-rRNA entstehen dann durch eine schrittweise Prozessierung die 28S, 18S und 5,8S rRNAs. Die 5S rRNA sowie die kleinen nukleolären RNAs (snoRNAs, *small nucleolar RNAs*), die an der rRNA-Prozessierung beteiligt sind, werden mit Hilfe der RNA-Polymerase III gebildet. Die RNA-Polymerase II wiederum ist für die Synthese der mRNAs verantwortlich, die für ribosomale und regulatorische nicht-ribosomale Proteine kodieren.

Wachstumsbedingungen sowie andere externe Faktoren wie z. B. Stress beeinflussen die Ribosomenbiogenese in pro- und eukaryotischen Zellen (Warner, 1999; Mayer und Grummt, 2005). Wachstumsfördernde Bedingungen aktivieren die Ribosomenproduktion; sind die Wachstumsbedingungen hingegen schlecht, wird auch die Ribosomenbiogenese heruntergefahren. Die Verfügbarkeit von Ribosomen ist also ein wichtiger Faktor für die Zellproliferation. Kommt es zu Fehlregulationen in diesem Prozess, kann dies zu unkontrolliertem Zellwachstum führen.

Auch verschiedene Erbkrankheiten des Menschen resultieren aus Defekten von ribosomalen Proteinen oder von Faktoren, die am Prozess der Ribosomenbiogenese beteiligt sind. Meist handelt es sich dabei um Knochenmarkserkrankungen, für die eine verminderte Anzahl an Blutzellen, insbesondere von Erythrozyten charakteristisch ist, was zu schweren Anämien führen kann. Viele dieser sogenannten Ribosomopathien sind auch mit einem erhöhten Krebsrisiko, insbesondere mit der Entwicklung von Leukämien, assoziiert (Ganapathi und Shimamura, 2008; Narla und Ebert, 2010).

## 2.2 Nukleolus und Ribosomenbiogenese

Der Nukleolus (auch Kernkörperchen genannt) ist mit 1–3µm Durchmesser die am besten sichtbare Struktur innerhalb des Kerns einer Säugerzelle und wurde bereits vor 200 Jahren zum ersten Mal lichtmikroskopisch untersucht (Valentin, 1836). Er verfügt über keine Membran, lässt sich aber vom Rest des Zellkerns funktionell abgrenzen. Erst Mitte der 1960er Jahre wurde die Bedeutung des Nukleolus bei der Synthese ribosomaler RNA klar. Nachfolgende Untersuchungen trugen zu einem genaueren Verständnis der Assemblierung ribosomaler Untereinheiten im Nukleolus bei. Es handelt sich dabei um einen mehrstufigen Prozess, dessen einzelne Schritte in bestimmten Substrukturen des Nukleolus stattfinden. Eine elektronenmikroskopische Aufnahme dieser Regionen ist in Abb. 1 zu sehen. Im Zentrum des Nukleolus befindet sich die FC (*Fibrillar Centre*)-Region, an die sich nach außen hin die DFC (*Dense Fibrillar Component*)-Region anschließt. Oftmals enthält ein Nukleolus mehrere von DFC umgebene fibrilläre Zentren. Die äußere Zone des Nukleolus wird GC (*Granular Component*) genannt.

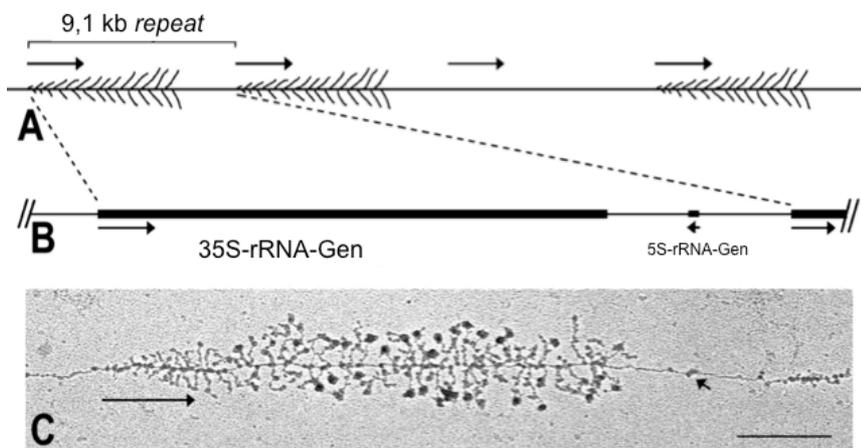


**Abb. 1 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Nukleolus aus HeLa-Zellen [aus (Hernandez-Verdun *et al.*, 2010)]**

Dargestellt ist ein Schnitt durch einen Nukleolus mit seinen drei nukleolären Subregionen: FC (Sternchen), DFC (weißer Pfeil), GC (GC). Maßstabsbalken: 0,5 µm.

Nukleoli bilden sich nach Ende der Zellkernteilung um die repetitiven Sequenzen der ribosomalen DNA (rDNA) herum. Diese chromosomalen Regionen, auch NORs (*Nucleolar Organizer Regions*) genannt, enthalten Gene, die für ribosomale RNAs kodieren. Diese Gene liegen beim Menschen auf den kurzen Armen der fünf akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22. Die Transkription dieser rDNA-Gene, die an der Grenze

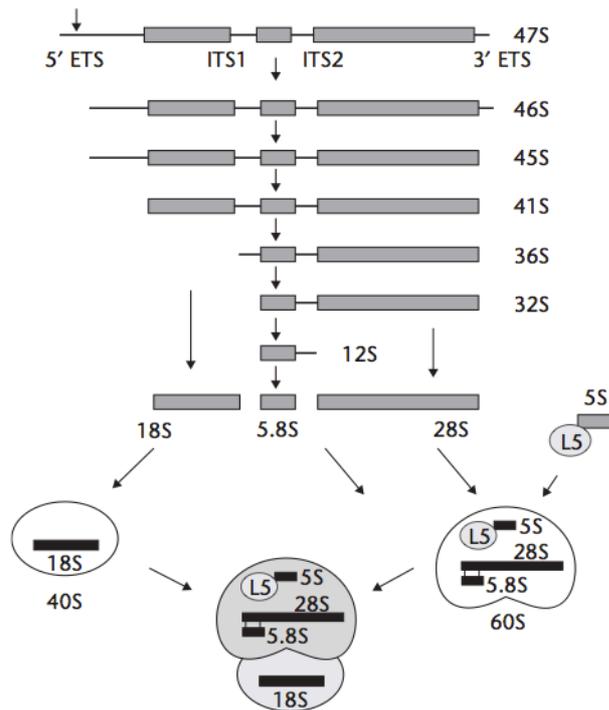
zwischen FC- und DFC-Region durch die RNA-Polymerase I erfolgt, führt zur Entstehung eines ca. 13000 Nukleotiden langen 47S rRNA-Vorläufer-Transkripts. Proteine und kleine nukleoläre RNAs (snoRNAs) beginnen mit den entstehenden prä-rRNA-Ketten zu assoziieren und bilden so das 90S präribosomale Partikel. Liegen die nukleolären Komponenten aufgespreizt vor (in sogenannten *Miller spreads*), können die wachsenden rRNA-Moleküle als Zweige eines Weihnachtsbaums mit „Christbaumkugeln“ (*terminal knobs*), die durch die assoziierten Komplexe ribonukleärer Proteine (RNP) dargestellt werden, angesehen werden (Mougey *et al.*, 1993) (Abb. 2).



**Abb. 2 Die repetitiven Einheiten der rRNA-Gene aus der Bäckerhefe [verändert nach (French *et al.*, 2003)]**

(A) Schematische Darstellung der vier repetitiven rRNA-Gen-Regionen mit transkriptionell aktiven und inaktiven Einheiten. (B) Darstellung einer Gen-Spacer-Einheit mit einem 35S-rRNA-Gen, das von der RNA-Polymerase I transkribiert wird (lange fette Linie), dem von der RNA-Polymerase III transkribierten 5S-rRNA-Gen (kurze fette Linie) und nichttranskribierten *spacer*-Regionen (dünne Linien). (C) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer rRNA-Gen-spacer-Einheit, bündig mit der Genkarte aus (B) angeordnet. Der lange Pfeil zeigt die Transkriptionsrichtung der Polymerase I an. Der kurze Pfeil weist auf die Struktur, die häufig an der Position des 5S-rRNA-Gens beobachtet werden kann. Maßstabsbalken: 0,4 µm.

Nach der Bildung dieser prä-RNP-Partikel folgt die Prozessierung der prä-rRNA zu reifen rRNAs. Frühe Spaltungsreaktionen ereignen sich dabei in der DFC-Region des Nukleolus, während spätere Prozessierungsschritte in der GC-Region stattfinden. Wie in Abb. 3 gezeigt, erfolgt die Herstellung reifer rRNAs in einer Reihe von Reaktionen, die zu immer kürzeren prä-rRNA-Zwischenstufen führen. Dabei werden Regionen im 5'-Bereich zuerst prozessiert. Zunächst erfolgen Spaltreaktionen innerhalb der sogenannten *Spacer*-Regionen (ETS: *External Transcribed Spacer*, ITS: *Internal Transcribed Spacer*), die durch Endonukleasen katalysiert werden, bevor Exonukleasen die entstandenen Fragmente von beiden Enden her kürzen. Dies führt schließlich zur Bildung reifer 18S-, 5,8S- und 28S-rRNA-Formen, die dann in der GC-Region des Nukleolus mit ribosomalen Proteinen und der 5S rRNA assemblieren und nachfolgend weiteren Reifungsschritten im Nukleoplasma unterliegen, bevor sie ins Cytoplasma exportiert werden.



**Abb. 3 Übersicht über die Schritte der rRNA-Prozessierung in Vertebraten [aus (Olson, 2010)]**

Das 47S-prä-rRNA-Transkript enthält eine 5'-ETS-Region, zwei ITS-Segmente (ITS1 und ITS2) und eine 3'-ETS-Region, die alle endonukleolytisch geschnitten und durch Exonukleasen abgebaut werden, um reife 18S, 5,8S und 28S rRNAs zu bilden. Die Verteilung der reifen rRNAs in den ribosomalen Untereinheiten ist im unteren Teil dargestellt. Die 5,8S rRNA ist mit dem 5'-Ende der 28S rRNA über Wasserstoffbrückenbindungen assoziiert. Die 5S rRNA bindet zunächst an das ribosomale Protein L5, bevor sie in das prä-RNP-Partikel assembliert. ETS: *External Transcribed Spacer*; ITS: *Internal Transcribed Spacer*.

Neben der frühen rRNA-Prozessierung finden auch posttranskriptionale Modifikationsreaktionen der rRNA, wie z. B. die Methylierung einzelner Basen und von Ribose sowie die Umwandlung von Uridin zu Pseudouridin, in der DFC-Region des Nukleolus statt. Diese Modifikationen werden von snoRNPs (*small nucleolar Ribonucleoproteins*) und zahlreichen nicht-ribosomalen Protein-Prozessierungsfaktoren vermittelt. snoRNAs spielen eine wichtige Rolle bei der Abfolge der einzelnen Spaltreaktionen und unterstützen die korrekte Faltung der rRNAs. Die Ausbildung von Basenpaarungen zwischen einer snoRNA und der prä-rRNA ist Voraussetzung für den korrekten Ablauf der rRNA-Prozessierung. SnoRNAs könnten so Nukleasen an die zu spaltenden Stellen bringen, indem sie bestimmte RNA-Faltungsmuster ausbilden, die dann durch die Nukleasen erkannt werden. Ungefähr 100 Nukleotide der Vertebraten-rRNA werden an den 2'-OH-Gruppen der Ribose mit Hilfe der snoRNAs methyliert. Diese Modifikation findet entweder während oder direkt nach der prä-rRNA-Synthese statt.

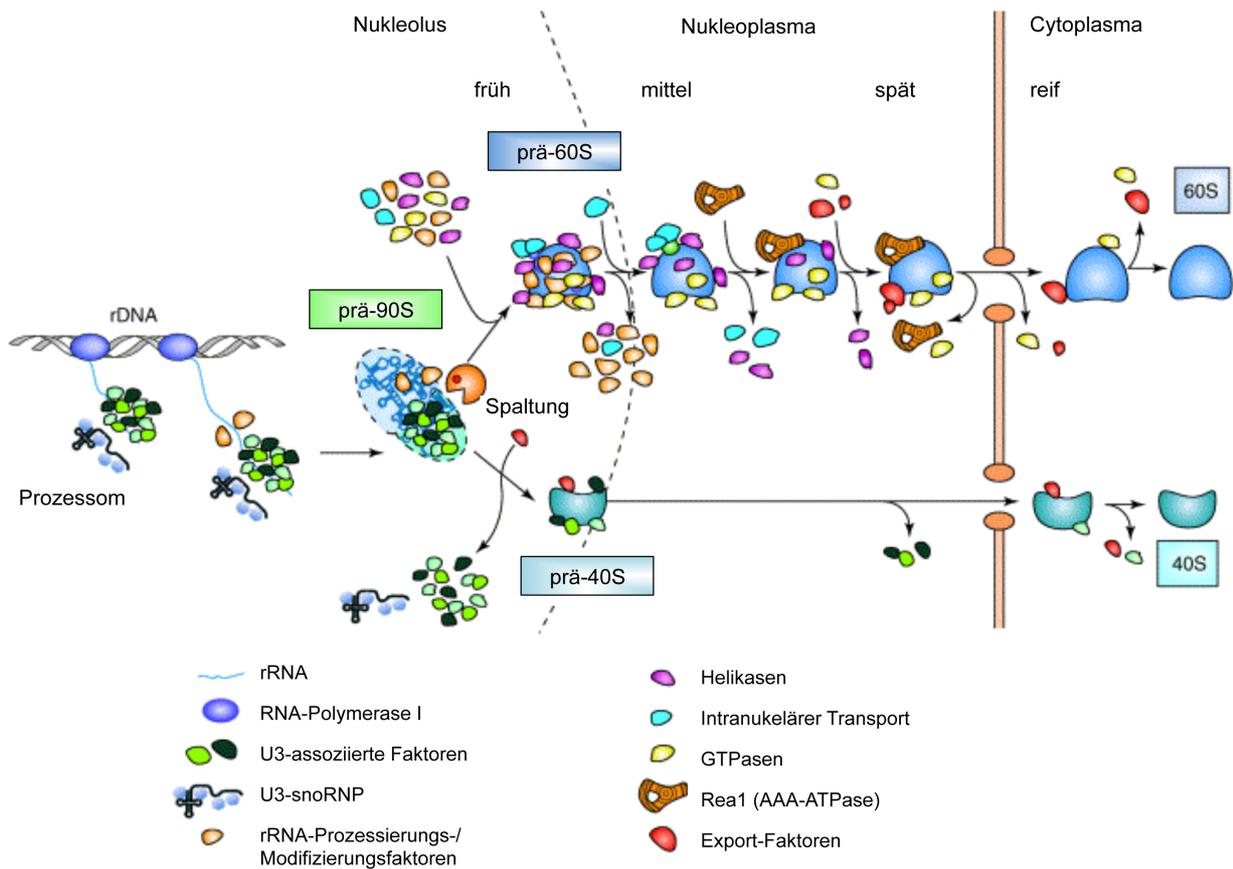
Eine weitere wichtige Modifikation der prä-rRNA ist die Pseudouridylierung, die Isomerisierung von Uridin zu Pseudouridin. Hierbei wird die N-glykosidische Bindung zwischen Base und Zucker durch eine C-glykosidische Bindung ersetzt. Pseudouridine kommen in der prä-rRNA ungefähr genauso oft vor wie Methylgruppen. In beiden Fällen befinden sich modifizierte Reste innerhalb konservierter Bereiche der reifen rRNAs.

Details über die Funktion beider Modifikationen sind bis *dato* noch nicht aufgeklärt (Olson, 2010).

Die Assemblierung der rRNAs zusammen mit ribosomalen Proteinen zu reifen Ribosomen erfordert die streng regulierte, koordinierte Aktivität von mehr als 200 Proteinen. Neben snoRNPs und Nukleasen binden weitere nicht-ribosomale Proteine wie RNA-Chaperone und -Helikasen, Kinasen, GTPasen und AAA-ATPasen, die die Assoziation und Dissoziation von Proteinen erleichtern, vorübergehend an die ribosomalen Vorläufer. Viele dieser Enzyme stellen die für den korrekten Ablauf der ribosomalen Prozessierung und Reifung benötigte Energie bereit und sind an ganz bestimmten Schritten der Ribosomenbiogenese beteiligt (Kressler *et al.*, 2010).

Während in Säugerzellen das Wissen über die beteiligten Proteine und deren Regulation bisher noch lückenhaft ist, konnten in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bereits viele dieser Faktoren durch Affinitätsreinigung einzelner Proteine und massenspektrometrische Analyse der assoziierten Proteinkomplexe identifiziert werden (Rigaut *et al.*, 1999). Dies ermöglichte einen detaillierten Einblick in die sequentielle Entstehung der als präribosomale Partikel bezeichneten Zwischenstufen (Nissan *et al.*, 2002; Schafer *et al.*, 2003).

Die prä-60S-Partikel können nach den in ihnen enthaltenen Markerproteinen in nukleoläre, nukleoläre/nukleoplasmatische, nukleoplasmatische, nukleoplasmatische/cytoplasmatische und cytoplasmatische Partikel eingeteilt werden. Die mit den prä-60S-Komplexen assoziierten nicht-ribosomalen Proteine können demnach in fünf verschiedene Klassen eingeteilt werden: 1. Faktoren, die nur mit den frühesten präribosomalen Partikeln im Nukleolus assoziiert sind und damit eine Rolle bei den sehr frühen Ereignissen während der prä-rRNA-Modifizierung spielen. 2. Faktoren, die früh im Nukleolus an die prä-60S-Untereinheiten binden und an diesen auf deren Weg in Richtung Kernpore gebunden bleiben. 3. Faktoren, die für den intranukleären Transport benötigt werden. 4. Faktoren, die an die späten prä-60S-Partikel im Nukleoplasma binden, aber vor dem Export ins Cytoplasma von den Partikeln dissoziieren. 5. Faktoren, die mit den Partikeln kurz vor deren Passage durch die Kernpore assoziieren und als Transportproteine ins Cytoplasma fungieren (Tschochner und Hurt, 2003).



**Abb. 4 Gängiges Modell der Reifung und des Exports der 40S und 60S ribosomalen Untereinheiten [verändert nach (Tschochner und Hurt, 2003)]**

Die früheste ribosomale Vorstufe ist das 90S-Partikel, das aus dem prä-rRNA-Transkript, dem U3 snoRNP-enthaltenden Prozessom und weiteren 40S-Synthesefaktoren besteht. Nach der ersten Spaltungsreaktion wird der 90S-Vorläufer in die 40S- und 60S-Untereinheiten aufgeteilt. Das Prozessom dissoziiert vom prä-40S-Partikel, und einige zusätzliche Proteine assoziieren mit dem reifenden 40S-Partikel, bevor es aus dem Kern exportiert wird. Die Mehrzahl der prä-60S-Faktoren assembliert nach der ersten Spaltung des prä-90S-Partikels. Viele dieser Proteine dissoziieren in darauffolgenden Schritten von der prä-60S-Untereinheit auf deren Weg vom Nukleolus zur Kernpore, während zu späteren Zeitpunkten wenige weitere Proteine vorübergehend mit dem Partikel assoziieren. Für den Export der Partikel bedarf es der Bindung weiterer Faktoren. Die letzten Reifungsschritte finden nach dem Transport durch die Kernpore statt. Die Exportproteine für die 40S-Untereinheit sind bisher nicht bekannt.

Mit den frühesten nukleolären prä-60S-Partikeln sind rund 50 nicht-ribosomale Proteine assoziiert. Nach Umformung der Partikel in Nukleolus und Nukleoplasma sind nach deren Export über den Kernporenkomplex ins Cytoplasma nur noch fünf dieser Faktoren gebunden (Nissan *et al.*, 2002). Dies macht deutlich, dass 60S-Präribosomen einer enormen Umgestaltung auf ihrem Weg vom Nukleolus ins Cytoplasma unterworfen sind (Abb. 4).

Ein Beispiel für einen nukleolären Komplex aus nicht-ribosomalen Ribosomenbiogenesefaktoren ist der Ytm1-Erb1-Nop7-Komplex aus der Bäckerhefe bzw. der dazu homologe Komplex aus Säugern, bestehend aus PES1, BOP1 und WDR12 (der sogenannte PeBoW-Komplex). Diese Proteinkomplexe spielen eine wichtige Rolle bei der rRNA-Prozessierung und damit bei der Reifung präribosomaler 60S-Untereinheiten (Holzel *et al.*, 2005; Miles *et al.*, 2005). Die nicht-ribosomalen Proteine Rix1, Ipi1 und Ipi3 sind

hingegen in der Bäckerhefe an späteren Reifungsschritten des präribosomalen Partikels im Nukleoplasma und an dessen Export aus dem Kern beteiligt (Galani *et al.*, 2004; Krogan *et al.*, 2004). Wie bereits oben erwähnt, haben AAA-ATPasen, wie Rix7 und Rea1 aus *S. cerevisiae*, eine wichtige Funktion im ribosomalen Reifungsprozess. Beide AAA-ATPasen sind für die Dissoziation nicht-ribosomaler Proteine von den präribosomalen Partikeln verantwortlich, was Voraussetzung für den weiteren Verlauf der Biogenese der 60S ribosomalen Untereinheiten ist (Kressler *et al.*, 2008). Rix7 ist für die Umwandlung des frühen nukleolären Nsa1-Partikels von Bedeutung, Rea1 scheint dagegen an zwei zentralen späteren Schritten mitzuwirken. Es entfernt im Verlauf des nukleolären/nukleoplasmatischen Transits den Ytm1-Erb1-Nop7-Komplex von frühen Partikeln und bindet zu einem späteren Zeitpunkt an das Rix1-enthaltende Partikel, um die Dissoziation des Rix1-lpi1-lpi3-Komplexes zu vermitteln (Ulbrich *et al.*, 2009; Bassler *et al.*, 2010). Nur so ist das Partikel klein genug, um durch die Kernpore ins Cytoplasma transportiert zu werden.

In der Bäckerhefe sind all diese erwähnten nicht-ribosomalen Proteine essentiell für die Lebensfähigkeit, was die Bedeutung der korrekten Regulation der Ribosomenbiogenese unterstreicht.

Im Gegensatz zur Reifung des 60S-Vorläufers ist die des 40S-Partikels weniger komplex. Die Assemblierung des Vorläufers der 40S ribosomalen Untereinheit, des sogenannten SSU (*S*mall *S*ubunit)-Prozessoms oder 90S-Partikels, erfolgt kotranskriptionell. Dieses Partikel enthält mehr als 20 nicht-ribosomale Proteine, die nach den ersten Spaltreaktionen der Vorläufer-rRNA zu einem Großteil dissoziieren. Nach der Bindung weiterer ribosomaler Proteine wird das prä-40S-Partikel zügig aus dem Nukleolus ins Cytoplasma exportiert, wo letzte Spalt- und Modifikationsreaktionen stattfinden (Fatica *et al.*, 2003; Schafer *et al.*, 2003; Schafer *et al.*, 2006) (Abb. 4). Nach abgeschlossener Reifung bindet die 40S zusammen mit der 60S ribosomalen Untereinheit an mRNA, was zur Bildung eines funktionalen Ribosoms führt.

Um eine reibungslose und korrekte Ribosomenreifung zu gewährleisten, sind Qualitätskontrollmechanismen unabdingbar. Entstehen falsch assemblierte prä-RNPs oder fehlerhafte rRNA-Zwischenformen, werden diese mit Hilfe des sogenannten TRAMP-Komplexes, der mit dem Exosom assoziiert ist, polyadenyliert und anschließend über das Exosom abgebaut (LaCava *et al.*, 2005).

## 2.3 Nukleoläre Kompartimentierung zellulärer Funktionen

Neben seiner Rolle bei der Entstehung von Ribosomen ist der Nukleolus außerdem für die Herstellung und Prozessierung kleiner RNAs und für die Assemblierung weiterer RNA-

Protein-Komplexe verantwortlich. Dazu gehören z. B. die Kürzung der 5'-Enden der tRNAs oder die Reifung der RNA-Komponente der SRPs (*Signal Recognition Particles*), die naszierende Membranproteine zum rauen endoplasmatischen Retikulum bringen (Wolin und Matera, 1999; Pederson und Politz, 2000). Außerdem wird im Nukleolus die U6 snRNA, eine Komponente des Spleißkomplexes U6 snRNP (*small nuclear Ribonucleoprotein*), durch snoRNAs modifiziert (Ganot *et al.*, 1999).

Der Nukleolus fungiert zudem als Zellkompartiment für die Sequestrierung regulatorischer Proteine. Ein wichtiges Beispiel hierfür ist die intranukleäre Lokalisierung der Proteinphosphatase Cdc14 aus der Bäckerhefe während des Zellzyklus. Während der G1-Phase ist Cdc14 an das nukleoläre Protein Net1 gebunden und damit inaktiv. Nach Eintritt der Zelle in die Mitose, während der Anaphase, wird Cdc14 von Net1 freigesetzt, was zu seiner Aktivierung und zum Übergang vom Nukleolus ins Nukleoplasma führt. Hier katalysiert es die Dephosphorylierung der Proteine Swi5, Sic1 und Cdh1, woraufhin die Zelle aus der Mitose austritt und in die Interphase übergeht (Visintin *et al.*, 1999).

Ein weiteres Beispiel der Bedeutung des Nukleolus für die Regulation von Proteinen durch intrazelluläre Kompartimentierung im Zusammenhang mit Zellzykluskontrolle und onkogenem Stress ist die Regulation des Tumorsuppressors p53 durch den nukleolären Tumorsuppressor ARF (humanes p14<sup>ARF</sup>, murines p19<sup>ARF</sup>). Unter normalen Bedingungen vermittelt die Ubiquitin-Ligase MDM2 den proteasomalen Abbau von p53 im Cytoplasma. MDM2 bewegt sich dabei zwischen Zellkern und Cytoplasma hin und her. Sind Zellen Stress ausgesetzt, z. B. durch DNA-Schäden oder Hitzeschock, wird p53 stabilisiert, was zum Anhalten des Zellzyklus führt oder die Apoptose der Zellen auslöst. Bei onkogenem Stress wird die Stabilität von p53 dabei hauptsächlich durch das Zusammenspiel von ARF und MDM2 reguliert. Die Expression von ARF wird unter onkogenem Stress gesteigert, was dann zur Bindung von ARF an MDM2 und dessen Sequestrierung im Nukleolus führt. Dadurch wird die Interaktion von MDM2 mit p53 unterbunden und die Stabilisierung von p53 verursacht (Tao und Levine, 1999). Interessanterweise führt die durch Störungen des Ribosomenbiogenesewegs verursachte Akkumulation freier ribosomaler Proteine zu einer vergleichbaren Inhibierung von MDM2: Für die ribosomalen Proteine L5, L11 und L23 konnte gezeigt werden, dass sie ähnlich wie ARF mit MDM2 assoziieren und dadurch zu dessen Inaktivierung führen. Dies wiederum erklärt die Stabilisierung und Aktivierung von p53 als Folge von sogenanntem ribosomalem Stress (Lohrum *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Dai und Lu, 2004; Jin *et al.*, 2004). Das Zurückhalten von Proteinen im Nukleolus bzw. deren Freisetzung ins Nukleoplasma spielt also eine wichtige Rolle bei der Regulation zellulärer Funktionen.

In Zellen höherer Eukaryoten ist die Dynamik des Nukleolus besonders deutlich während der Zellkernteilung zu sehen. Zu Beginn der Mitose, sobald die Transkription heruntergefahren wird, lösen sich die Nukleoli auf. Während der Mitose werden die einzelnen Komponenten der rDNA-Transkription und rRNA-Prozessierung neu verteilt: Die meisten Transkriptionsfaktoren sowie die RNA-Polymerase I bleiben mit den rDNA-Sequenzen assoziiert, während die Mehrzahl der rRNA-Prozessierungsproteine zusammen mit teilweise prozessierten rRNAs zunächst an die Oberfläche kondensierter Chromosomen bindet und daraufhin in sogenannte NDFs (*Nucleolar-Derived Foci*) und PNBs (*Pre-Nucleolar Bodies*) verpackt wird. Nach erfolgter Mitose kommt es schließlich zur Neubildung der Nukleoli aus diesen Strukturen (Boisvert *et al.*, 2007).

## 2.4 Posttranslationale Modifikationen

Nach erfolgreicher Prozessierung, Modifizierung und nukleärem Export ribosomaler Untereinheiten stehen diese für die Übersetzung (Translation) einer mRNA in ein Polypeptid, einer Kette aus Aminosäuren, im Cytoplasma bereit. Nach der Translation können die Eigenschaften und Funktionen des synthetisierten Proteins durch sogenannte posttranslationale Modifikationen moduliert und erweitert werden. Diese Modifikationen beinhalten z. B. die enzymatische Entfernung von Aminosäuren vom N-Terminus des Proteins oder proteolytische Spaltungen der Polypeptidkette. So entsteht beispielsweise aus Proinsulin das aktive Hormon Insulin. Des Weiteren zählen chemische Veränderungen von Aminosäuren zu posttranslationalen Modifikationen, wie z. B. die Isomerisierung von Prolin, oder die Desiminierung von Arginin zu Citrullin. Die Hauptgruppe posttranslationaler Modifikationen stellen kovalente Verbindungen von Molekülen oder Molekülgruppen dar. Dazu gehören Acetylierungen, Methylierungen, Phosphorylierungen, aber auch das Anbringen von Kohlenhydraten, Lipiden oder Proteinen an Aminosäuren einer Polypeptidkette. Die Phosphorylierung von Proteinen spielt eine wichtige Rolle bei der Verstärkung von Signalen während der Signaltransduktion, kann hier aber auch inhibitorisch wirken. Zuckermodifikationen erhöhen die Löslichkeit und Beweglichkeit von Proteinen und sind häufig in Membran- und Serumproteinen zu finden. Durch das Anbringen von Lipiden können Proteine stabil im hydrophoben Kern einer Zellmembran verankert werden.

### 2.4.1 Ubiquitin und Ubiquitin-ähnliche Proteine

Die posttranslationale Modifikation von Proteinen mit Proteinen wurde erstmals in den 1970er Jahren beschrieben (Ciechanover *et al.*, 1978; Hershko *et al.*, 1980). Das beteiligte

Modifikationsprotein wurde Ubiquitin genannt, nachdem es in vielen verschiedenen Organismen identifiziert werden konnte (Goldstein *et al.*, 1975; Wilkinson *et al.*, 1980). 1977 wurde es als kovalenter Bindungspartner der Histonvariante H2A nachgewiesen (Goldknopf und Busch, 1977). Ubiquitin ist ein hochkonserviertes Protein von 76 Aminosäuren, das als Vorläuferprotein synthetisiert wird und eine charakteristische Faltung aufweist (Abb. 5B).

Die Konjugation von Ubiquitin an Zielproteine (Ubiquitylierung) verläuft über einen mehrstufigen Prozess und erfolgt in der Regel an die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysinresten. Dabei wird das C-terminale Glycin aus dem charakteristischen Doppelglycinmotiv des Ubiquitins ATP-abhängig aktiviert und über eine Thioesterbindung mit einem Cystein des Ubiquitin-aktivierenden E1-Enzyms verknüpft (Vijay-Kumar *et al.*, 1987; Pickart, 2001). Anschließend erfolgt die Übertragung des durch diese Bindung aktivierten Ubiquitins auf ein Ubiquitin-konjugierendes E2-Enzym, was ebenfalls in Form einer Thioesterbindung abläuft. Schließlich wird das Ubiquitinmolekül kovalent mit Hilfe einer E3-Ligase mit seinem C-Terminus über eine Isopeptidbindung an die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines internen Lysinrests im Zielprotein konjugiert. Während nur zwei Ubiquitin-aktivierende Enzyme bekannt sind (Uba1 und Uba6) (Groettrup *et al.*, 2008), gibt es im menschlichen Organismus ca. 30 verschiedene E2-Enzyme und eine Vielzahl von Proteinen, die eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität zeigen. Ubiquitin-Ligasen lassen sich in zwei Hauptgruppen einteilen: RING-E3-Ligasen und HECT-E3-Ligasen. Erstere übertragen Ubiquitin direkt auf das Substrat, besitzen also keine katalytische Aktivität, sondern wirken vielmehr als Adaptoren zwischen E2 und Substrat. Dagegen gehen HECT-Ligasen eine Thioesterbindung mit Ubiquitin ein und übertragen es dann auf das Zielprotein des jeweiligen Substrats. Die Vielfalt substratspezifischer Ubiquitin-Ligasen ermöglicht es, eine große Zahl an zellulären Proteinen in einem regulierten Prozess mit Ubiquitin zu modifizieren (Pickart und Eddins, 2004).

Neben der posttranslationalen Modifikation eines Proteins mit einem einzelnen Ubiquitin-Molekül (Mono-Ubiquitylierung) können auch Ubiquitinketten unterschiedlicher Länge an Proteine angehängt werden (Multi- oder Poly-Ubiquitylierung). Bei der Verknüpfung dieser Ketten fungieren interne Lysinreste eines bereits konjugierten Ubiquitins als Akzeptorstellen für weitere Ubiquitinmoleküle. An der Kettenverlängerung bei der Poly-Ubiquitylierung können zusätzlich sogenannte E4-Proteine beteiligt sein (Koegl *et al.*, 1999).

Die Konsequenzen der Ubiquitylierung hängen von der Länge und Positionierung der Ubiquitinkette ab. Werden die Moleküle einer Kette über das Lysin 48 verknüpft, führt dies

über den sogenannten *Escort Pathway* zum Abbau des modifizierten Substrats durch das 26S-Proteasom (Richly *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu vermitteln Mono-Ubiquitylierungen oder die Verknüpfung von Ubiquitinketten über das Lysin 63 nicht-proteolytische Funktionen. Dazu gehört die Regulation von Prozessen wie Endozytose (Hicke und Dunn, 2003), Transkription (Muratani und Tansey, 2003) oder DNA-Reparatur (Hoegel *et al.*, 2002).

Bei der Ubiquitylierung handelt es sich um eine reversible Reaktion, da Ubiquitin nach Anheftung an ein Substrat mittels deubiquitylierender Enzyme (DUB) wieder abgespalten werden kann (Amerik und Hochstrasser, 2004). Dies schützt Ubiquitin zum einen vor dessen proteasomalem Abbau bei der Hydrolyse des jeweiligen Substrats; Ubiquitin wird also durch DUB recycelt. Zum anderen können DUB-Enzyme auch die Aktivität von Substraten durch die Abspaltung von Ubiquitin regulieren. Eine weitere Aufgabe der DUB-Proteine besteht darin, das inaktive Ubiquitin-Vorläufermolekül zu prozessieren, so dass das für die Konjugation wichtige Doppelglycinmotiv freigelegt wird.

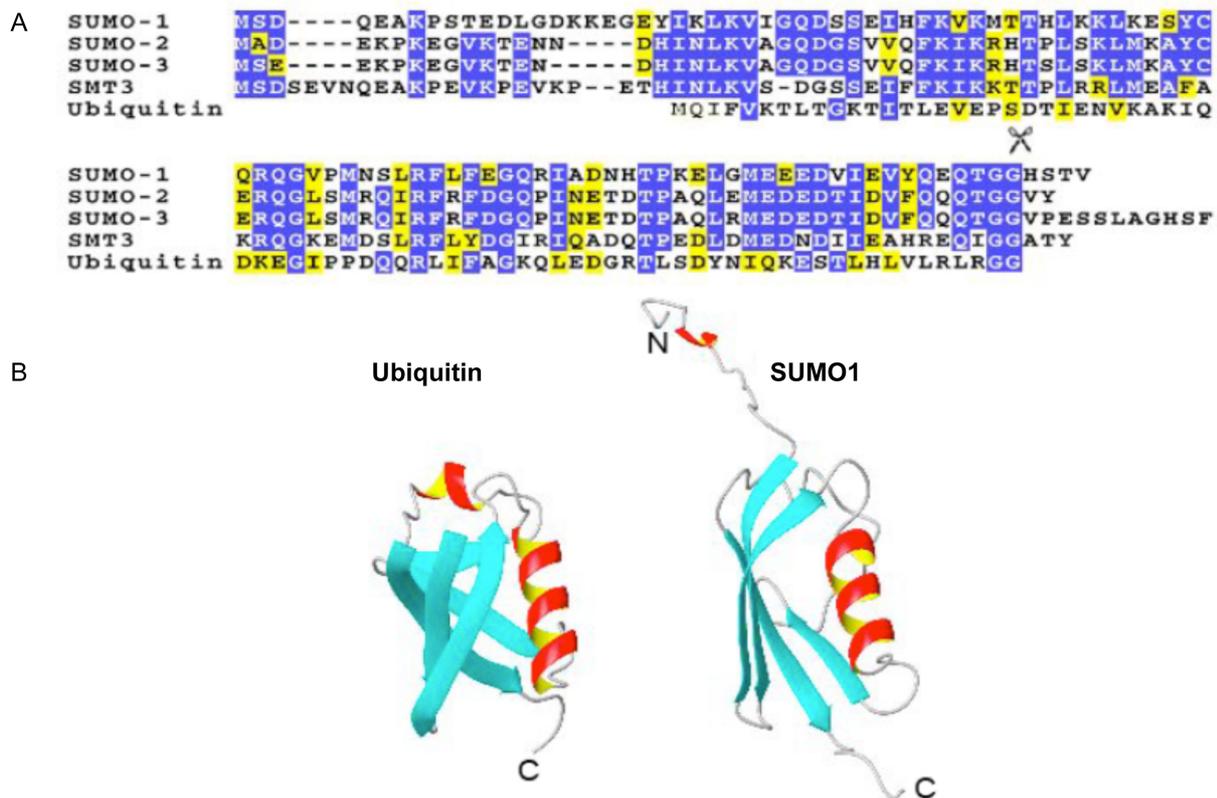
Nach der Identifizierung und Strukturaufklärung von Ubiquitin wurde eine Reihe weiterer Proteine beschrieben, die Ähnlichkeiten zu Ubiquitin in Sequenz und Struktur aufweisen. Diese werden zusammengefasst als Familie der UBL (*Ubiquitin Like*)-Proteine bezeichnet. Die meisten Mitglieder dieser Familie werden analog zu Ubiquitin mit einer spezifischen Konjugationsmaschinerie an das jeweilige Substrat geknüpft. UBL-Proteine sind an einer Vielzahl fundamentaler zellulärer Prozesse beteiligt, wie z. B. Proteinabbau, Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur, Apoptose oder Autophagie (Jentsch und Pyrowolakis, 2000). Prominente Vertreter dieser Proteinfamilie sind neben Ubiquitin die Proteine NEDD8, FAT10, ISG15, Atg8, Atg12, Urm1 und SUMO (Muller *et al.*, 2001; Schwartz und Hochstrasser, 2003; Welchman *et al.*, 2005).

#### 2.4.2 Das SUMO-System

Neben Ubiquitin ist SUMO das am besten charakterisierte Protein der UBL-Familie. SUMO ist in allen Eukaryoten konserviert und weist eine Sequenzidentität von ca. 20% zu Ubiquitin auf (Hay, 2005). Auf Strukturebene zeigt SUMO die typische globuläre Ubiquitinfaltung mit einer zusätzlichen flexiblen N-terminalen Domäne, die in Ubiquitin fehlt (Abb. 5B). In niederen Eukaryoten, wie z. B. der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, kommt nur eine SUMO-Form vor, die als Smt3 bezeichnet wird, während es in Pflanzen acht Versionen von SUMO gibt (Kurepa *et al.*, 2003). Im Menschen existieren vier SUMO-Isoformen, die sich hauptsächlich in ihrer N-terminalen Domäne unterscheiden. SUMO2 und -3 sind zu 97% identisch und zeigen eine Sequenzhomologie von 43% zu SUMO1

(Abb. 5A). Auch SUMO4 ist etwa 85% identisch mit SUMO2/3, über seine Funktion ist jedoch sehr wenig bekannt. Es enthält an Position 90 einen Prolin-Rest anstelle des Glutaminrestes in SUMO2/3, was vermutlich die C-terminale Prozessierung des Vorläufers verhindert. Dadurch unterbleibt offensichtlich die Freilegung des C-terminalen GG-Motivs und somit auch die kovalente Verknüpfung mit Substraten (Owerbach *et al.*, 2005).

Die funktionellen Unterschiede der verschiedenen SUMO-Formen sind noch nicht im Detail verstanden. Proteomikstudien belegen jedoch, dass sich das Spektrum der von SUMO1 und SUMO2/3 modifizierten Proteine unterscheidet. Dies reflektiert auch das unterschiedliche subzelluläre Verteilungsmuster. So ist SUMO1 neben seiner nukleoplasmatischen und nukleolären Verteilung in charakteristischer Weise an der Kernmembran konzentriert, wo sich mit RanGAP1 eines der Hauptsubstrate von SUMO1 findet. SUMO2 und SUMO3 sind dagegen in punktförmigen Strukturen des Zellkerns, die den sogenannten PML-*nuclear bodies* entsprechen, konzentriert und sind weitgehend aus dem Nukleolus ausgeschlossen (Ayaydin und Dasso, 2004).

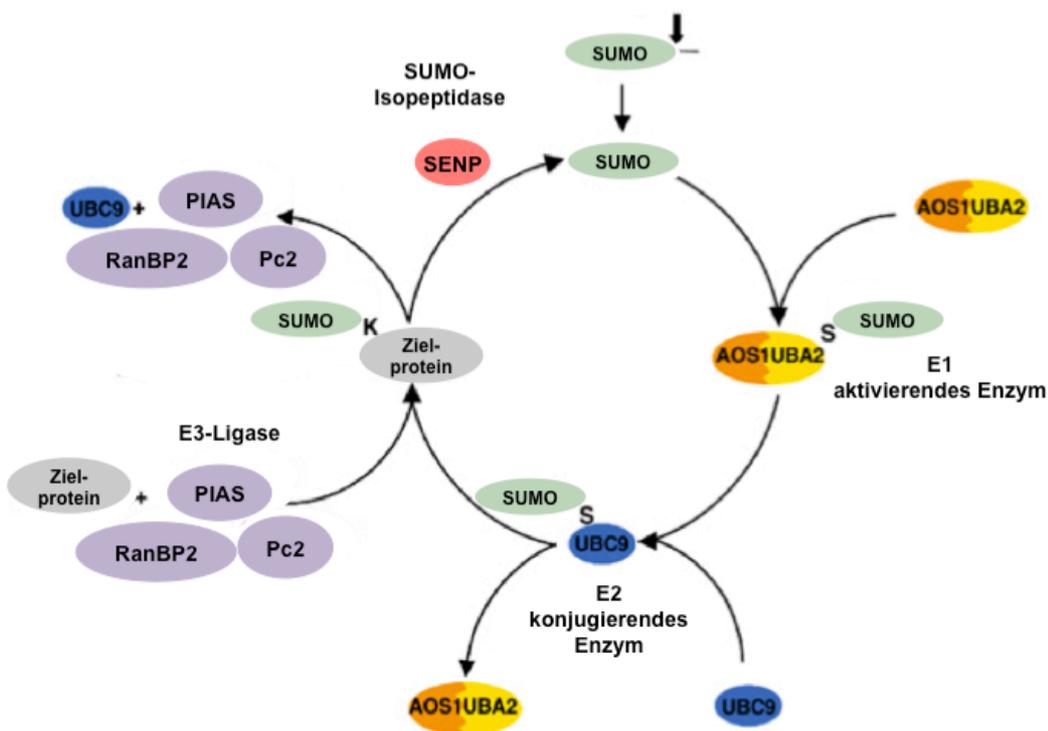


**Abb. 5 Sequenz- und Strukturvergleich von Ubiquitin und SUMO**

(A) Sequenzvergleich von humanem SUMO1, SUMO2 und SUMO3 mit Smt3 aus *S. cerevisiae* und humanem Ubiquitin [aus (Muller *et al.*, 2001)]. (B) Die Strukturen von Ubiquitin und SUMO1 im Vergleich. Ubiquitin wurde mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen ermittelt (Vijay-Kumar *et al.*, 1987), die Struktur von SUMO1 mittels NMR (Bayer *et al.*, 1998). SUMO1 weist eine typische Ubiquitin-faltung auf und zeichnet sich durch eine zusätzliche Ausdehnung in seinem N-Terminus aus.

### 2.4.2.1 Die enzymatische Kaskade der Sumoylierung

Die Konjugation von SUMO verläuft mechanistisch analog zu derjenigen von Ubiquitin. Wie für andere UBL-Proteine wird aber eine spezifische Konjugationsmaschinerie benötigt (Abb. 6). SUMO wird ebenfalls in Form eines inaktiven Vorläuferproteins synthetisiert. Durch die proteolytische Spaltung mittels SUMO-spezifischer Isopeptidasen (siehe 2.4.2.2) wird das C-terminale Doppelglycinmotiv freigelegt, was für die Konjugation von SUMO an ein Zielprotein benötigt wird. Das reife SUMO wird dann unter ATP-Verbrauch von dem heterodimeren E1-Aktivierungsenzym Aos1/Uba2 aktiviert. Dieses Enzym bildet dabei eine Thioesterverbindung zwischen dem C-terminalen Glycin von SUMO und einem internen Cystein aus (Johnson *et al.*, 1997). Im folgenden Schritt wird das aktivierte SUMO auf ein Cystein des konjugierenden E2-Enzyms übertragen.



**Abb. 6 Der Sumoylierungszyklus [verändert nach (Muller *et al.*, 2004)]**

SUMO wird als Vorläufermolekül synthetisiert und an seinem C-Terminus proteolytisch gespalten (Pfeil). An der SUMO-Konjugation sind ein E1 aktivierendes Enzym (Aos1/Uba2) und ein E2 konjugierendes Enzym (Ubc9) beteiligt, die Thioesterverbindungen (S) mit SUMO ausbilden. E3-Ligasen unterstützen die Konjugation von SUMO an einen Lysinrest im Zielprotein. SUMO-Isopeptidasen (SENP) vermitteln die Abspaltung von SUMO von einem Substrat.

Als konjugierendes Enzym ist in der Sumoylierungskaskade Ubc9 als einziges Protein beschrieben (Johnson und Blobel, 1997; Schwarz *et al.*, 1998). Dies steht im Gegensatz zur Ubiquitylierung, an der mehrere E2-Enzyme beteiligt sind. Obwohl Homologien zwischen Ubc9 und Ubiquitin-konjugierenden Enzymen bestehen, ist Ubc9 spezifisch für SUMO, was offensichtlich durch spezifische elektrostatische Wechselwirkungen der Ober-

flächen beider Proteine zu erklären ist (Johnson und Blobel, 1997). Im Gegensatz zu den E2-Enzymen aus der Ubiquitylierungskaskade kann Ubc9 Substrate direkt binden, weshalb zumindest *in vitro* keine E3-Ligase für eine Konjugation von SUMO benötigt wird. Das Akzeptorlysin eines Zielproteins findet sich häufig in einem Konsensusmotiv mit der Aminosäuresequenz  $\Psi$ KXE/D, wobei  $\Psi$  für eine aliphatische und X für eine beliebige Aminosäure stehen. Strukturdaten deuten darauf hin, dass diese Konsensussequenz Teil einer leicht zugänglichen Schleifenstruktur ist, die direkt in die katalytische Tasche von Ubc9 passt (Bernier-Villamor *et al.*, 2002). Da auch Lysine außerhalb eines solchen Konsensusmotivs sumoyliert werden können, muss es weitere Mechanismen für eine Substraterkennung geben. Erst vor kurzem wurden neue Motive für die SUMO-Konjugation entdeckt, wie z. B. ein umgekehrtes Konsensusmotiv oder Motive mit weiteren hydrophoben Aminosäuren im N-Terminus (Matic *et al.*, 2010). Außerdem existiert ein sogenanntes PDSM (*Phospho-Dependent SUMO Motif*) mit der Sequenz  $\Psi$ KXEXXSP. Wird das hierin enthaltene Serin phosphoryliert, führt dies zu einer verstärkten Sumoylierung (Hietakangas *et al.*, 2006).

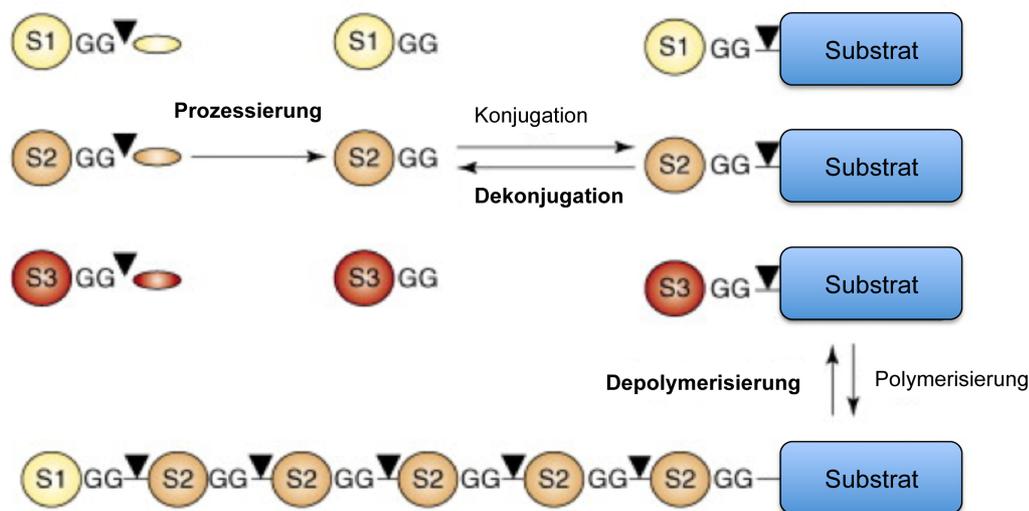
E3-Ligasen des SUMO-Systems dienen als eine Art Adaptoren, indem sie Ubc9, SUMO und das jeweilige Substrat so zueinander ausrichten, dass die SUMO-Konjugation optimal ablaufen kann (Reverter und Lima, 2005). Sie sind die Enzyme, die während einer SUMO-Konjugationsreaktion Substratspezifität vermitteln. Im Gegensatz zu den HECT-Ubiquitin-Ligasen besitzen die bisher identifizierten SUMO-Ligasen keine katalytische Aktivität; sie ähneln daher eher den RING-Ligasen aus dem Ubiquitin-System. Proteine der PIAS-Familie gehören zur größten Gruppe der SUMO-Ligasen und weisen eine SP-RING-Domäne auf, die der RING-Domäne von Ubiquitin-Ligasen der RING-Familie ähnelt (Schmidt und Muller, 2002). Als weitere SUMO-Ligasen neben Proteinen der PIAS-Familie konnten das Nucleoporin RanBP2 (Pichler *et al.*, 2002) und Pc2 (Kagey *et al.*, 2003), ein Mitglied der Polycombproteine, identifiziert werden. Diese besitzen keine SP-RING-Domäne und weisen keine offensichtliche Homologie zu PIAS-Proteinen oder Ubiquitin-E3-Ligasen auf.

Analog zu Ubiquitin können auch SUMO-Moleküle miteinander zu Ketten verknüpft werden. Kettenbildung scheint bevorzugt im Fall von SUMO2/3 stattzufinden. Hier erfolgt die Kettenverlängerung insbesondere über den Lysinrest an Position 11, da dieser in einer Sumoylierungs-Konsensusregion liegt (Tatham *et al.*, 2001). Es existieren auch gemischte SUMO-Ketten aus SUMO1 und SUMO2 und -3, wobei hier vorgeschlagen wurde, dass SUMO1 den Abschluss einer solchen Kette bildet (Matic *et al.*, 2008). Die Bildung von SUMO-Ketten kann beispielsweise durch zellulären Stress induziert werden (Saitoh und

Hinchey, 2000; Golebiowski *et al.*, 2009), die funktionellen Unterschiede zwischen Mono- und Poly-Sumoylierung sind jedoch derzeit noch weitgehend unklar. Offensichtlich existieren aber spezifische Erkennungsmotive für SUMO2/3-Ketten (Tatham *et al.*, 2008).

### 2.4.2.2 SUMO-spezifische Isopeptidasen vermitteln die Dekonjugation von SUMO

Wie die Ubiquitylierung ist auch die Sumoylierung ein dynamischer, reversibler Prozess. Die Abspaltung von SUMO von einem Substrat katalysieren Enzyme, die als SUMO-Proteasen/-Isopeptidasen bezeichnet werden. Diese Enzyme hydrolysieren eine Isopeptidbindung zwischen dem C-Terminus von SUMO und der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines internen Lysins im Substrat. Neben dieser dekonjugierenden Aktivität sind SUMO-Isopeptidasen auch für die Prozessierung des SUMO-Vorläufers zu seiner reifen Form verantwortlich (siehe 2.4.2.1). Außerdem spielen sie beim Prozess der SUMO-Ketten-Editierung eine Rolle, bei der Poly-SUMO-Ketten depolymerisiert werden (Abb. 7). SUMO-Isopeptidasen regulieren also den Vorrat an freiem, konjugierbarem SUMO und die Halbwertszeit von konjugierten SUMO-Formen.

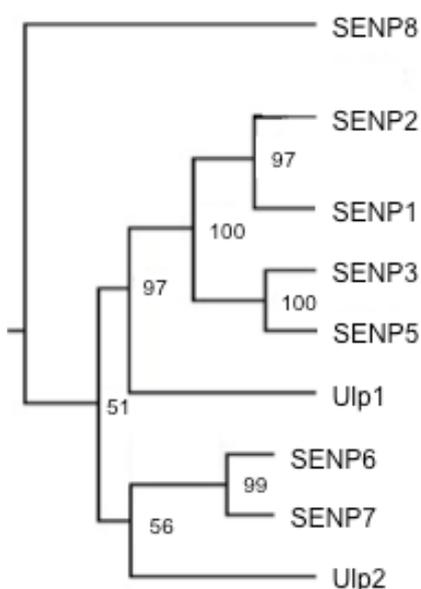


**Abb. 7 SENP-katalysierte Reaktionen [verändert nach (Hay, 2007)]**

Durch die Prozessierung werden C-terminale Aminosäuren des SUMO-Propeptids hydrolytisch abgespalten, so dass das Doppelglycinmotiv für die darauffolgende Konjugationsreaktion frei wird. Bei der Dekonjugation wird eine Isopeptidbindung zwischen dem C-Terminus von SUMO und der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins innerhalb eines Substrats gespalten. Die Depolymerisierungsreaktion ist chemisch identisch mit der Dekonjugationsreaktion. Allerdings werden hierbei ein oder mehrere SUMO-Moleküle von einer Poly-SUMO-Kette und nicht von einem Substratprotein abgeschnitten. Die fett dargestellten Reaktionen werden durch SENPs katalysiert (schwarze Pfeilköpfe).

SUMO-Isopeptidasen wurden ursprünglich in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gefunden (Li und Hochstrasser, 1999); diese wurden Ulp1 und Ulp2 benannt. Sie weisen keine Homologien zu Ubiquitin-dekonjugierenden Enzymen auf, gehören aber wie diese zur Familie der Cysteinproteasen und besitzen eine ca. 200 Aminosäuren lange Protease-

Domäne (C48-Domäne). Diese Domäne besteht aus einer typischen katalytischen Triade aus Histidin, Aspartat und Cystein. Datenbank-Analysen führten dann zur Identifizierung von sieben verwandten humanen Proteinen, die SENPs genannt wurden. SENP1, -2, -3 und -5 sind mit Ulp1 verwandt, wohingegen SENP6 und SENP7 eher Ulp2 ähneln (Abb. 8). SENP8 wurde später einem anderen Evolutionszweig zugeordnet und besitzt eine spezifische Proteaseaktivität gegenüber NEDD8, einem anderen Mitglied der UBL-Familie.



**Abb. 8 Phylogenetische Verwandtschaft innerhalb der SENP/Ulp-Familie [verändert nach (Hay, 2007)]**

Ein phylogenetischer Baum zeigt die Verwandtschaft zwischen den SUMO-Isopeptidasen Ulp1 und Ulp2 aus *S. cerevisiae* und den humanen SENPs. SENP8, eine NEDD8-spezifische Protease, ist zwar strukturell mit den SENPs verwandt, spaltet SUMO aber nicht. Die angegebenen Zahlen bezeichnen *Bootstrap*-Werte (in Prozent) und zeigen die Verlässlichkeit der gezeigten phylogenetischen Beziehungen an. SENP8 zweigt ab dem Ursprungspunkt des Stammbaumes von den übrigen SENPs/Ulps ab. Dies deutet darauf hin, dass diese Protease relativ früh während der Evolution der Eukaryoten von den restlichen SENPs abgewichen ist.

Das Auftreten mehrerer SUMO-Isopeptidasen in Hefe und im Menschen lässt vermuten, dass diese Enzyme spezifische SUMO-bezogene Funktionen erfüllen. Die SUMO-Proteasen aus Hefe, Ulp1 und Ulp2, sind nicht redundant; beide Proteine besitzen zwar eine C-terminale Hydrolase- und Isopeptidase-Aktivität, zeigen jedoch eine Präferenz für unterschiedliche Substrate und lokalisieren in der Zelle auch unterschiedlich: Ulp1 ist am Kernporenkomplex zu finden, während Ulp2 im Zellkern lokalisiert (Li und Hochstrasser, 2003). Zudem wurde gefunden, dass Ulp1 im Gegensatz zu Ulp2 neben der SUMO-Dekonjugation auch für die Prozessierung des SUMO-Vorläufers verantwortlich ist (Li und Hochstrasser, 1999; Li und Hochstrasser, 2000). Ulp1 ist essentiell und spielt eine wichtige Rolle bei Zellzyklus und DNA-Reparatur, aber auch beim Transport von Molekülen vom Zellkern ins Cytoplasma, unter anderem wohl auch beim Export der 60S präribosomalen Untereinheit (Panse *et al.* 2006). Ulp2 dagegen wird für die Depolymerisierung von Poly-SUMO-Ketten benötigt (Bylebyl *et al.*, 2003). Funktionell scheint es für den korrekten Ablauf der Meiose, eine exakte Segregation der Chromosomen und die

Wiederaufnahme des Zellzyklus nach Arretierung an Kontrollpunkten von Bedeutung zu sein (Li und Hochstrasser, 2000).

Auch die humanen SUMO-Isopeptidasen zeigen einen konservierten C-Terminus, der die katalytische Domäne enthält, wobei sie sich in ihren N-terminalen Regionen unterscheiden. Diese scheinen, wie bei den SUMO-Isopeptidasen aus der Hefe, für das unterschiedliche intrazelluläre Lokalisierungsmuster und die Substratspezifität der einzelnen SENPs verantwortlich zu sein.

Die oben beschriebene Verwandtschaft der humanen SENPs mit Ulp1 und -2 aus Hefe beschränkt sich nicht nur auf die Sequenzähnlichkeit, sondern lässt sich auch in Funktion und subzellulärer Lokalisierung erkennen. SENP1 zeigt beispielsweise analog zu Ulp1 Prozessierungs- und Dekonjugationsaktivität. Diese SUMO-Isopeptidase zeigt bei der Prozessierung Präferenz für SUMO1 (Xu und Au, 2005; Shen *et al.*, 2006). SENP1 lokalisiert im Nukleus und ist dort in distinkten subnukleären Domänen angereichert (Bailey und O'Hare, 2004). SENP2 ist unter den humanen SENPs am nächsten verwandt mit SENP1 (Nishida *et al.*, 2001) und weist hinsichtlich seiner Prozessierungsaktivität eine leichte Präferenz gegenüber SUMO2 auf (Reverter und Lima, 2006). Weder für SENP1 noch für SENP2 ist eine Präferenz gegenüber einer SUMO-Form in Bezug auf ihre Dekonjugationsaktivität bekannt (Gareau und Lima, 2010). SENP2 lokalisiert an den Filamenten des Kernporenkomplexes (Hang und Dasso, 2002; Zhang *et al.*, 2002) und akkumuliert auch in subnukleären Strukturen (*nuclear bodies*) (Girdwood *et al.*, 2003). Sowohl SENP1 als auch SENP2 besitzen sowohl ein nukleäres Lokalisationssignal als auch ein nukleäres Exportsignal, welche einen Transport der Proteine zwischen Zellkern und Nukleoplasma gewährleisten.

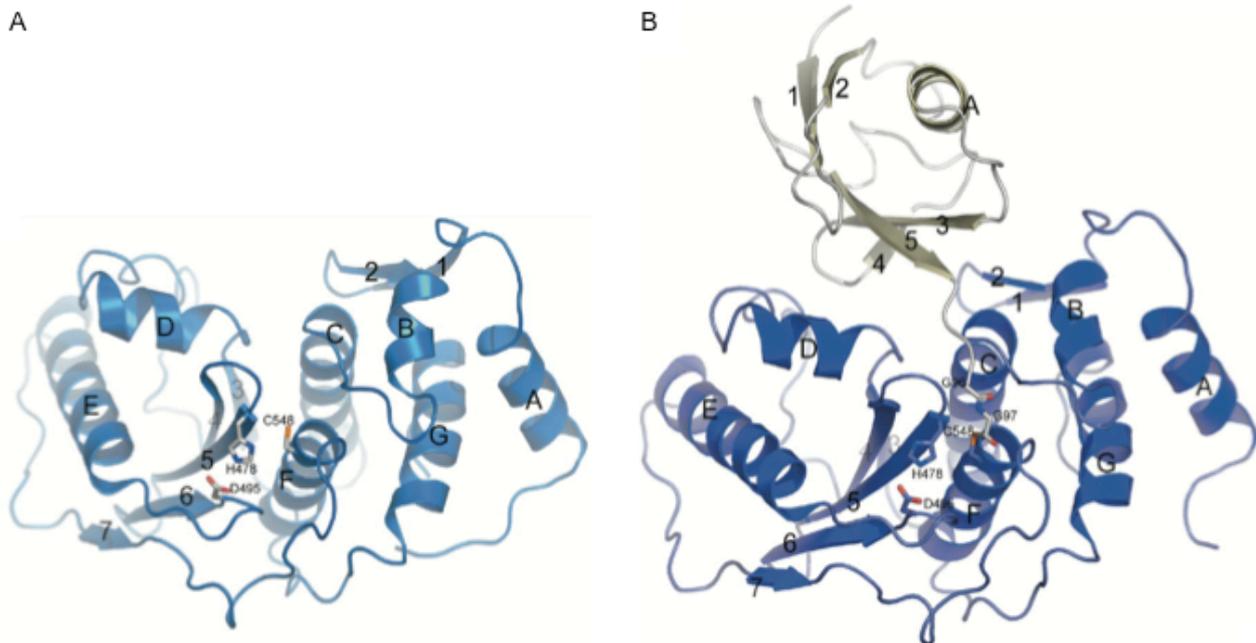
SENP3 und SENP5 sind weitere SUMO-Isopeptidasen innerhalb des Ulp1-Zweiges und bilden eine weitere Homologiegruppe. Beide Proteine lokalisieren im Nukleolus und weisen eine Präferenz für die Dekonjugation SUMO2- und -3-modifizierter Proteine auf; SENP5 zeigt diese Präferenz für SUMO3 auch bei der Prozessierung (Nishida *et al.*, 2000; Di Bacco *et al.*, 2006; Gong und Yeh, 2006). Die Konzentration von SENP3 und SENP5 im Nukleolus erklärt das weitgehende Fehlen von SUMO2- und -3-Konjugaten innerhalb dieses Kompartiments (Ayaydin und Dasso, 2004).

SENP6 und SENP7 sind mit Ulp2 näher verwandt. Ähnlich wie Ulp2 lokalisiert SENP6 vorwiegend im Nukleoplasma und ist aktiv gegenüber der Spaltung von Poly-SUMO-Ketten (Lima und Reverter, 2008). Für SENP7 ist ebenfalls ein nukleoplasmatisches Lokalisationsmuster beschrieben sowie eine spezifische Proteaseaktivität gegenüber Poly-

SUMO2/-3-Konjugaten (Shen *et al.*, 2009). Weder SENP6 noch SENP7 weisen Hydrolyseaktivität auf.

Zusammenfassend betrachtet zeigt sich, dass die durch die jeweiligen N-Termini vermittelte räumliche Eingrenzung der Aktivität der verschiedenen SENPs wichtig ist, um die räumlich kontrollierte Desumoylierung bestimmter Substrate zu regulieren.

Sequenzunterschiede in den konservierten C-terminalen Domänen lassen annehmen, dass sich SUMO-Isopeptidasen im Laufe der Evolution auf Prozessierung oder Dekonjugation spezialisierten und die Fähigkeit erlangt haben, zwischen verschiedenen SUMO-Formen zu unterscheiden. SENPs weisen eine gemeinsame Domäne auf, die aus einem fünffachen  $\beta$ -Faltblatt und zwei  $\alpha$ -Helices besteht und eine zentrale Spalte im Protein bildet (Mossessova und Lima, 2000; Reverter und Lima, 2004) (Abb. 9A). Diese schmale, flache Spalte kann das Doppelglycin-Motiv von SUMO umfassen (Abb. 9B) und ermöglicht die Annäherung des entsprechenden SUMO-Substrats an das aktive Zentrum der Protease, da die Größe der Spalte der Länge einer Lysinseitenkette entspricht.



**Abb. 9 Struktur von SENP2 und SENP2-SUMO1 [aus (Reverter und Lima, 2004)]**

(A) Darstellung der Sekundärstruktur der katalytischen Domäne von humanem SENP2.  $\beta$ -Faltblätter sind mit Nummern und  $\alpha$ -Helices mit Buchstaben gekennzeichnet. Die katalytischen Aminosäurereste sind nummeriert. (B) Darstellung der Sekundärstruktur der katalytischen Domäne von humanem SENP2 (dunkelblau) in einem Komplex mit humanem SUMO1 (grau).  $\beta$ -Faltblätter sind mit Nummern und  $\alpha$ -Helices mit Buchstaben gekennzeichnet. Die katalytischen Aminosäurereste von SENP2 sind nummeriert.

Strukturen der katalytisch inaktiven Versionen von SENP1 und SENP2, die an SUMO-Vorläufer bzw. an SUMO-modifiziertes RanGAP1 gebunden sind, zeigen, wie das Substrat in die richtige Orientierung für die Spaltung der Peptidbindung durch die Protease gebracht wird. Durch die *cis*-Stellung der Amidbindung innerhalb der (Iso-)Peptidbindung

wird diese in einem rechten Winkel relativ zum C-Terminus von SUMO1 geknickt und so die Carbonylgruppe optimal für die Katalyse positioniert.

Zusammen mit Messungen zur Kinetik der Spaltungsreaktion und Substratbindung liefern diese Strukturen eine Erklärung für die Spezifität gegenüber verschiedenen SUMO-Formen und die relativen Aktivitäten der SUMO-Proteasen als Isopeptidasen oder Hydrolasen.

### 2.4.2.3 Funktionelle Konsequenzen der Sumoylierung

Die generelle Funktion einer Modifikation mit SUMO ist die Modulierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen, die sich je nach Zielprotein beispielsweise auf dessen Stabilität, Lokalisierung oder Aktivität auswirken kann. Auf molekularer Ebene wird durch eine kovalente Bindung von SUMO die Oberfläche des jeweiligen Substrats verändert, was dessen Interaktion mit anderen Makromolekülen negativ oder positiv beeinflussen kann (Abb. 10A, B).

In vielen Fällen werden durch posttranslationale Modifikationen innerhalb eines Proteins Bindestellen für spezifische Protein-Interaktionsdomänen geschaffen. Die Phosphorylierung eines Tyrosinrestes eines Proteins führt z. B. zur Erkennung durch sogenannte SH2-Domänen. Sogenannte Chromodomänen hingegen binden an methylierte Lysinreste eines Zielproteins, Bromodomänen wiederum an acetylierte Lysinreste (Seet *et al.*, 2006). Für Ubiquitin wurden etwa 20 verschiedene Ubiquitin-Bindedomänen identifiziert, die zum Teil spezifisch an Mono-Ubiquitin oder Poly-Ubiquitin binden und hier wiederum den Typus der Kettenverknüpfung unterscheiden können (Dikic *et al.*, 2009).

Die Erkennung und Bindung von sumoylierten Proteinen verläuft in der Regel über SUMO-bindende Domänen, die als SIMs (*SUMO Interaction Motifs*) bezeichnet werden. Hierbei handelt es sich um kurze, hydrophobe Sequenzmotive mit der Aminosäureabfolge V/I-X-V/I-V/I oder V/I-V/I-X-V/I, wobei V für Valin, I für Isoleucin und X für eine beliebige Aminosäure steht. Abweichend von dieser Konsensussequenz können aber auch andere hydrophobe Aminosäuren in diesem sogenannten hydrophoben Kern eines SIMs vorkommen. Außerdem kann der hydrophobe Kern N- oder C-terminal von sauren Aminosäuren und/oder Serin-Resten flankiert sein (Minty *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2004; Hecker *et al.*, 2006). Durch Phosphorylierung der Serinreste und die dadurch entstehende negative Ladung kann dabei die Bindung zu SUMO zusätzlich verstärkt werden (Stehmeier und Muller, 2009).

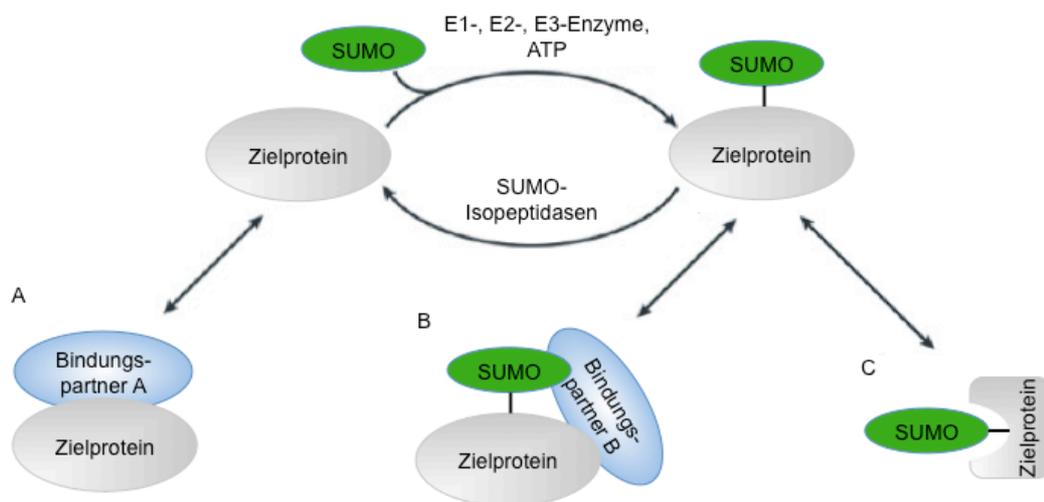
Ein prominentes Beispiel für eine SIM-SUMO-Interaktion stellt die Wechselwirkung zwischen dem SIM der SUMO-E3-Ligase RanBP2 und sumoyliertem RanGAP1, dem

GTP-aktivierenden Enzym des Kernimportfaktors Ran, dar. RanGAP1 bindet in seiner sumoylierten Form an das SIM im C-Terminus von RanBP2 und wird dadurch an die cytoplasmatische Seite des Kernporenkomplexes rekrutiert (Matunis *et al.*, 1996; Mahajan *et al.*, 1997).

Im Falle des Transkriptionsfaktors Sp3, der Kontext-spezifisch als Aktivator oder Repressor fungiert, führt die Sumoylierung wie bei vielen anderen Transkriptionsfaktoren zur Repression der Genexpression (Ross *et al.*, 2002; Sapetschnig *et al.*, 2002; Stielow *et al.*, 2008). Dies scheint aus der SUMO-vermittelten Rekrutierung von Korepressoren, wie Histondeacetylasen oder Methyltransferasen, zu resultieren, die SIM-Motive besitzen (Ouyang *et al.*, 2009).

Das DNA-Reparaturenzym Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) stellt ein Beispiel für eine intramolekulare Interaktion zwischen SUMO und SIM dar. Hier zieht dessen SUMO-Modifikation eine Konformationsänderung nach sich (Abb. 10C), die den Verlust der Bindung von TDG an DNA zur Folge hat. Diese Konformationsänderung entsteht durch die Interaktion des an TDG kovalent gebundenen SUMO mit einer SUMO-Bindestelle im selben Protein (Hardeland *et al.*, 2001; Baba *et al.*, 2005).

Ein weiteres bedeutendes Beispiel für eine SUMO-SIM-Interaktion wird durch die Assemblierung der PML-*nuclear bodies* (PML-NB), eines subnukleären Proteinkomplexes, veranschaulicht. PML, die konstituierende Komponente dieser Struktur, enthält ein SIM und wird an mehreren Stellen sumoyliert. Die SUMO/SIM-abhängige Entstehung von PML-PML-Multimeren ist dabei der erste Schritt auf dem Weg der Entstehung von PML-NB (Shen *et al.*, 2006). Neuere Daten zeigen außerdem, dass die kovalente Verknüpfung von PML mit Poly-SUMO-Ketten zu dessen Abbau führt. Dazu trägt die Ubiquitin-E3-Ligase RNF4 bei, die spezifisch poly-sumoyliertes PML über ihre SIMs erkennt, was daraufhin die Ubiquitylierung von PML und anschließend dessen Abbau zur Folge hat (Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2008; Tatham *et al.*, 2008). Damit verdeutlichen diese Daten auch exemplarisch das Zusammenspiel des SUMO- und Ubiquitinsystems.



**Abb. 10 Funktionelle Konsequenzen der Sumoylierung [verändert nach (Geiss-Friedlander und Melchior, 2007)]**  
 (A) Eine Sumoylierung kann die Wechselwirkung eines Zielproteins mit dessen Bindungspartner behindern; die Interaktion kann dann nur in Abwesenheit von SUMO stattfinden. (B) Eine Sumoylierung kann eine Bindestelle für einen Interaktionspartner bilden, z. B. über ein SUMO-Interaktionsmotiv (SIM). (C) Eine Sumoylierung kann eine Konformationsänderung im Zielprotein hervorrufen. Enthält das modifizierte Zielprotein ein SIM, kann eine intramolekulare Interaktion zwischen SUMO und dem SIM zu einem Konformationswechsel führen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Sumoylierung eine bedeutende, weit verbreitete und reversible posttranslationale Proteinmodifikation ist, die ganz unterschiedliche Folgen haben kann, wie z. B. Lokalisationsänderung eines Proteins, Enzymhemmung oder -aktivierung oder auch Proteinabbau. Diese verschiedenen Effekte kommen durch die Veränderung von inter- oder intramolekularen Wechselwirkungen des modifizierten Proteins zustande.

## 2.5 SUMO und Ribosomenbiogenese

Wie bereits im Kapitel 2.4.2.2 kurz angesprochen, konnten genetische und biochemische Studien in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* einen Zusammenhang zwischen dem SUMO-System und der Ribosomenbiogenese aufzeigen. Auf der Suche nach Faktoren, die am Export der 60S ribosomalen Untereinheit beteiligt sind, fanden Panse und Kollegen, dass Komponenten der Sumoylierungsmaschinerie hierfür benötigt werden. Ferner konnte diese Gruppe zeigen, dass Beeinträchtigungen der SUMO-Konjugation und -Dekonjugation frühe und späte Schritte der rRNA-Prozessierung hemmen. Außerdem beobachteten sie, dass viele Assemblierungsfaktoren im Verlauf der 60S- und 40S-Reifung sumoyliert werden. Da die SUMO-Isopeptidase Ulp1 am Kernporenkomplex verankert ist, lag die Vermutung nahe, dass dort SUMO-modifizierte Proteine aus präribosomalen Partikeln dekonjugiert werden, um exportiert werden zu können. Tatsächlich konnte eine Verbindung von Ulp1 zu dem 60S-Export-Faktor Mtr2 mittels genetischer Interaktionsexperimente hergestellt werden (Panse *et al.*, 2006).

Neuere Daten zeigen auch eine entscheidende Rolle des SUMO-Systems bei der Ribosomenbiogenese in Säugerzellen. So hat die nukleoläre SUMO-Isopeptidase SENP3 eine kritische Funktion bei der Reifung der 28S rRNA. Bei RNAi-vermittelter Depletierung von SENP3 erfolgt nur eine unvollständige Prozessierung des 32S-rRNA-Vorläufers zur 28S rRNA (Haindl *et al.*, 2008; Yun *et al.*, 2008). Ein Zielprotein und wichtiger Bindungspartner von SENP3 bei diesem Prozess ist Nucleophosmin (NPM1). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die SENP3-vermittelte Desumoylierung von NPM1 für dessen Funktion bei der 28S-rRNA-Reifung erforderlich ist. Außerdem scheint NPM1 die nukleoläre Lokalisierung und Stabilität von SENP3 zu bestimmen (Haindl *et al.*, 2008; Nishida und Yamada, 2008; Yun *et al.*, 2008).

## 2.6 Zielsetzung

Nachdem Vorarbeiten zu dieser Arbeit eine wichtige Rolle der nukleolären SUMO-Isopeptidase SENP3 bei der rRNA-Prozessierung und Ribosomenbiogenese aufzeigen konnten, war es Hauptziel der vorliegenden Arbeit, kritische Substrate von SENP3 zu identifizieren, die an diesem Prozess beteiligt sind. Durch die Identifizierung der relevanten Zielproteine sollte außerdem versucht werden, Mechanismen der SUMO-abhängigen Kontrolle der Ribosomenbiogenese zu entschlüsseln. Die Identifizierung SENP3-abhängiger SUMO-Substrate sollte somit zum Verständnis dieses komplexen Prozesses in Säugern beitragen und helfen, die Rolle des SUMO-Systems bei der Regulation dieses Signalweges zu verstehen.

Um diese Ziele zu erreichen, sollten zunächst Bindungspartner von SENP3 mittels Affinitätsreinigung isoliert und durch massenspektrometrische Analyse identifiziert werden. Die potentiellen Bindungspartner sollten dann charakterisiert werden, und es sollte insbesondere deren mögliche Rolle bei der rRNA-Prozessierung und Ribosomenbiogenese untersucht werden. Des Weiteren sollte analysiert werden, ob diese Proteine Substrate für eine Modifikation mit SUMO sind, und ob diese wiederum sensitiv gegenüber der SUMO-Isopeptidase SENP3 sind. Schließlich sollten die funktionellen Konsequenzen einer möglichen SUMO-Modifikation der entsprechenden Faktoren untersucht werden.

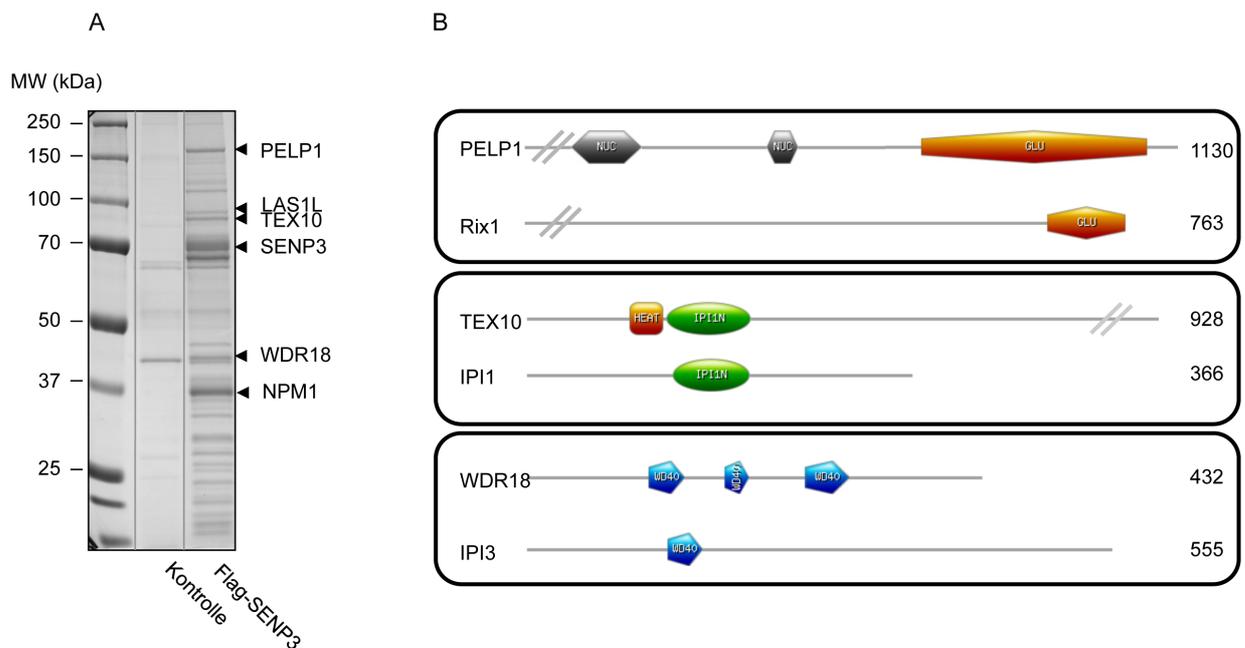
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 SENP3 bindet an einen Proteinkomplex bestehend aus PELP1, TEX10 und WDR18

##### 3.1.1 SENP3 interagiert mit PELP1, TEX10 und WDR18

Vorarbeiten zu dieser Arbeit haben gezeigt, dass die SENP3-vermittelte Desumoylierung von NPM1 für den korrekten Ablauf der Ribosomenbiogenese wichtig ist (Haindl *et al.*, 2008; Yun *et al.*, 2008). Da die Entstehung von Ribosomen in Eukaryoten das aufeinander abgestimmte Zusammenspiel einer Reihe zellulärer Bausteine erfordert, lag die Vermutung nahe, dass SENP3 in diesem Prozess neben NPM1 noch zusätzliche Faktoren reguliert.

Um weitere Interaktionspartner und mögliche Substrate von SENP3 zu finden, wurde mit einem Flag-Epitop versehenes SENP3 in HEK293T-Zellen exprimiert. Flag-SENP3 und damit assoziierte Proteine wurden mit Hilfe eines anti-Flag-Antikörpers, der kovalent an Agarose-Kügelchen gekoppelt war, aufgereinigt, über SDS-PAGE aufgetrennt und massenspektrometrisch untersucht. Neben SENP3 und NPM1 wurden dabei aus weiteren markanten Banden PELP1, LAS1L, TEX10 und WDR18 isoliert und identifiziert (Abb. 11A, Markus Haindl). TEX10 und WDR18 waren bisher weitgehend uncharakterisierte Proteine, während für PELP1 bislang eine Funktion als Koregulator des Östrogenrezeptors beschrieben ist (Vadlamudi und Kumar, 2007). LAS1L wurde erst vor Kurzem als Faktor der Ribosomenbiogenese charakterisiert (Castle *et al.*, 2010).



**Abb. 11 PELP1, LAS1L, TEX10 und WDR18 kopräzipitieren mit Flag-SENP3**

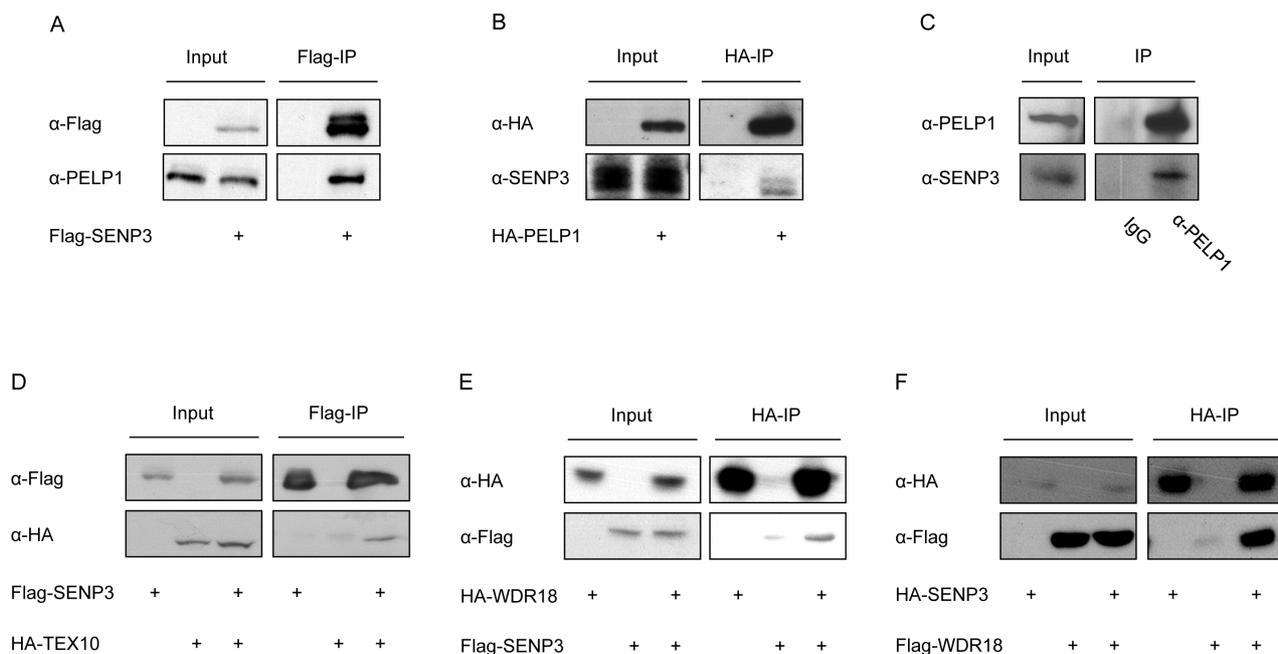
(A) Flag-SENP3 wurde in humanen HEK293T-Zellen exprimiert und über eine anti-Flag-M2-Agarosesäule affinitäts-gereinigt. Flag-SENP3 und assoziierte Proteine wurden mittels Flag-Peptid eluiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. PELP1, LAS1L, TEX10, WDR18 und NPM1 wurden mittels MASCOT-Algorithmen in einzelnen Banden wie angezeigt identifiziert. (B) Schematische Darstellung der konservierten Domänen von PELP1, TEX10 und WDR18 und deren homologer Proteine aus der Hefe *S. cerevisiae*. Die PELP1-Familie höherer Eukaryoten besitzt eine NUC201/202-Domäne (Pfam accession: PF08167). GLU stellt die Glutamat-reiche C-terminale Region von PELP1 und Rix1 dar. TEX10 und Ipi1 weisen beide eine Ipi1N-Domäne auf (Pfam accession: PF12333), die die eukaryotische TEX10/Ipi1-Familie definiert. In TEX10 kommt zusätzlich ein sogenanntes *HEAT repeat* (Pfam accession: PF00514) vor. WDR18 und IPI3 haben *WD40-repeats* (Pfam accession: PF00400) gemeinsam.

Um mehr Informationen über die identifizierten Bindungspartner von SENP3 zu erhalten, wurde ein Aminosäure-Sequenzvergleich mit Hilfe des *Psi-Blast*-Algorithmus durchgeführt. Daraus ergaben sich Sequenzhomologien (siehe Anhang Abb. 1, 2 und 3) und Gemeinsamkeiten im Aufbau einzelner Domänen zwischen PELP1, TEX10 und WDR18 und den Proteinen Rix1, Ipi1 und Ipi3 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Abb. 11B): PELP1 und Rix1 weisen eine Region zwischen Aminosäure 150 und 500 auf, die zu 20% identisch ist. Zudem besitzen beide Proteine eine Glutamat-reiche Region im C-Terminus. TEX10 und Ipi1 gleichen sich innerhalb einer N-terminalen Region, die sich über 200 Aminosäuren erstreckt. Diese Region beinhaltet eine Domäne, die als Ipi1N-Domäne bezeichnet wird. TEX10 ist zusätzlich durch einen ca. 500 Aminosäuren langen C-Terminus charakterisiert, der in Ipi1 komplett fehlt. WDR18 und Ipi3 gehören zur WD40-Proteinfamilie. Diese Proteine besitzen vier bis 16 repetitive Einheiten von ungefähr 40 Aminosäuren, die häufig mit einem Tryptophan-Aspartat(WD)-Dipeptid enden und eine Beta-Propeller-Struktur ausbilden. Sie sind in der Regel für die Koordination der Assemblierung von Multi-Protein-Komplexen verantwortlich, wobei die repetitiven Einheiten als stabiles Gerüst für Proteininteraktionen dienen. Die WD40-Proteine WDR18

und Ipi3 sind mit 25% Sequenzübereinstimmung im Vergleich zu PELP1/Rix1 und TEX10/Ipi1 am besten konserviert.

Interessanterweise wurden Rix1, Ipi1 und Ipi3 im Jahre 2004 als essentielle Bestandteile eines Proteinkomplexes beschrieben, der für Reifung und Kernexport der entstehenden ribosomalen 60S-Untereinheit mitverantwortlich ist (Krogan *et al.*, 2004; Nissan *et al.*, 2004). In höheren Organismen ist bisher noch kein entsprechender Komplex beschrieben worden.

Um zunächst die Interaktionen der in der massenspektrometrischen Analyse identifizierten Proteine mit SENP3 zu bestätigen und ihre Wechselwirkungen untereinander zu untersuchen, wurden Koimmunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Dabei wurde SENP3, versehen mit einem N-terminalen Flag-Epitop, in HeLa-Zellen exprimiert, über eine anti-Flag-Agarose-Matrix zusammen mit assoziierten Proteinen aus Zelllysaten aufgereinigt und über SDS-PAGE aufgetrennt. Danach wurden die Proben im Western Blot mit Hilfe eines anti-PELP1-Antikörpers getestet. Eine anti-PELP1-reaktive Proteinbande konnte auf der Höhe von ca. 150kDa in den Proben aus Flag-SENP3-exprimierenden Zellen, jedoch nicht in den Kontrollpräzipitaten detektiert werden (Abb. 12A). Im umgekehrten Experiment, bei dem HA-markiertes PELP1 in HeLa-Zellen exprimiert und nach Präzipitation über eine anti-HA-Agarose-Matrix eine Interaktion mit endogenem SENP3 untersucht wurde, konnte eine anti-SENP3-reaktive Bande auf Höhe von 75kDa nachgewiesen werden (Abb. 12B). Zusätzlich wurde auch eine Interaktion zwischen PELP1 und SENP3 bei endogenem Expressionsniveau beider Proteine gezeigt (Abb. 12C). Dazu wurde ein polyklonaler anti-PELP1-Antikörper für die Immunpräzipitation eingesetzt.



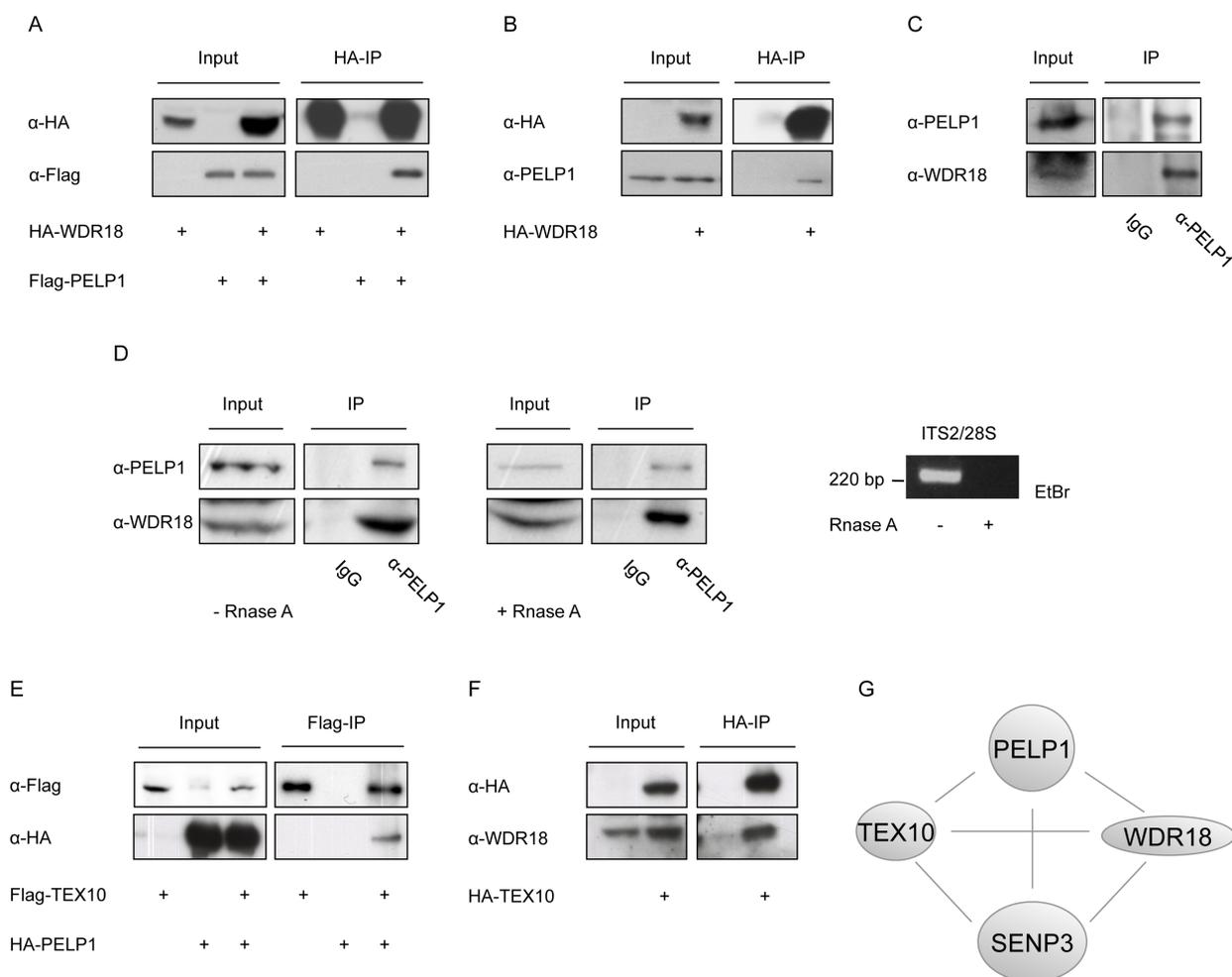
### Abb. 12 SENP3 interagiert mit PELP1, TEX10 und WDR18

(A, B) Flag-SENP3 oder HA-PELP1 wurde in HeLa-Zellen wie angegeben exprimiert und mit anti-Flag-Agarose bzw. anti-HA-Agarose immunpräzipitiert. Gebundene Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem anti-PELP1- bzw. anti-SENP3-Antikörper in einer Western-Blot-Analyse detektiert. (C) Endogenes PELP1 wurde aus HeLa-Zellen mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers immunpräzipitiert, und gebundenes Material wurde nach Auftrennung über SDS-PAGE auf Anwesenheit von SENP3 mit einem anti-SENP3-Antikörper in einem Western Blot getestet. (D-F) Flag- oder HA-markierte Proteine wurden in HeLa-Zellen exprimiert, zusammen mit ihren Bindungspartnern an anti-Flag- oder anti-HA-Agarosekügelchen gebunden und nach SDS-PAGE mit den angegebenen Antikörpern in einem Western Blot untersucht. In allen Experimenten machen die Inputs 2,5% des Gesamt-Zelllysats aus.

In weiterer Übereinstimmung mit den massenspektrometrischen Analysen konnte in Koimmunpräzipitationsexperimenten eine Wechselwirkung zwischen Flag-markiertem SENP3 und HA-markiertem TEX10 bzw. -WDR18, sowie zwischen HA-markiertem SENP3 und Flag-markiertem WDR18 detektiert werden (Abb. 12D–F).

Eine Interaktion zwischen PELP1 und WDR18 konnte nach ektopischer Expression von HA-WDR18 und Flag-markiertem PELP1 gezeigt werden (Abb. 13A). Außerdem bindet HA-markiertes WDR18 nach Präzipitation mittels HA-Agarose endogenes PELP1 (Abb. 13B). Auch diese Ergebnisse wurden durch eine anti-PELP1-Immunpräzipitation auf völlig endogenem Expressionsniveau bestätigt (Abb. 13C).

Die Wechselwirkung zwischen endogenem PELP1 und endogenem WDR18 war unabhängig von einer RNaseA-Behandlung der zellulären Extrakte; beide Proteine interagieren also auch in Abwesenheit von RNA miteinander (Abb. 13D).



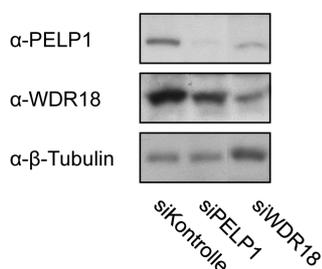
**Abb. 13 WDR18 und TEX10 sind mit PELP1 assoziiert**

(A, B) Flag-PELP1 und HA-WDR18 wurden in HeLa-Zellen exprimiert. HA-WDR18 wurde mittels anti-HA-Agarose immunpräzipitiert und zusammen mit kopräzipitierten Proteinen über SDS-PAGE aufgetrennt. In einer Western-Blot-Analyse wurde das Material auf Anwesenheit von exogenem Flag-markiertem oder endogenem PELP1 wie angegeben getestet. (C) Endogenes PELP1 wurde aus HeLa-Zellen mit einem polyklonalen Antikörper aufgereinigt, und Immunkomplexe wurden mit einem anti-WDR18-Antikörper gegen WDR18 in einem Western Blot analysiert. (D) Endogenes PELP1 wurde mit einem polyklonalen Antikörper aus HeLa-Zellextrakten immunpräzipitiert, die ohne bzw. mit RNaseA behandelt worden waren. Gebundene Proteine wurden nach Auftrennung über SDS-PAGE auf Anwesenheit von endogenem WDR18 wie angegeben in einem Western Blot getestet. Rechtes Feld: Überprüfung des erfolgreichen RNA-Verdaus durch RNaseA über reverse Transkription mit Oligonukleotiden, die den angegebenen rRNA-Bereich abdecken. (E) Flag-TEX10 wurde zusammen mit HA-PELP1 in HeLa-Zellen exprimiert und mittels anti-Flag-Agarosekügelchen immunpräzipitiert. Präzipitierte Proteine wurden nach ihrer Auftrennung wie angegeben im Western Blot untersucht. (F) HA-TEX10 wurde exprimiert, mittels anti-HA-Agarose immunpräzipitiert und zusammen mit assoziierten Proteinen aufgetrennt und auf die Anwesenheit von endogenem WDR18 in einer Western-Blot-Analyse getestet. Die Inputs machen in allen Experimenten 2,5% des Gesamt-Zelllysats aus. (G) Schematische Darstellung gegenseitiger Interaktionen zwischen PELP1, TEX10, WDR18 und SENP3.

Schließlich konnte auch eine Interaktion zwischen Flag-TEX10 und HA-PELP1 nach Immunpräzipitation von Flag-markiertem TEX10 mit anti-Flag-Agarose (Abb. 13E), sowie eine Wechselwirkung von HA-markiertem TEX10 mit endogenem WDR18 durch Aufreinigung der Extrakte mittels anti-HA-Agarose gezeigt werden (Abb. 13F).

Aus diesem Netzwerk gegenseitiger Interaktionen ergibt sich, dass PELP1, TEX10 und WDR18 einen Proteinkomplex bilden, der an SENP3 bindet (Abb. 13G).

Des Weiteren konnte die wechselseitige Abhängigkeit der Proteine innerhalb des Komplexes dadurch bekräftigt werden, dass durch Depletion von WDR18 mittels siRNA die Proteinmenge von PELP1 herabgesetzt wird, und umgekehrt die Menge von WDR18 deutlich abnimmt, sobald eine siRNA gegen PELP1 eingesetzt wurde (Abb. 14).

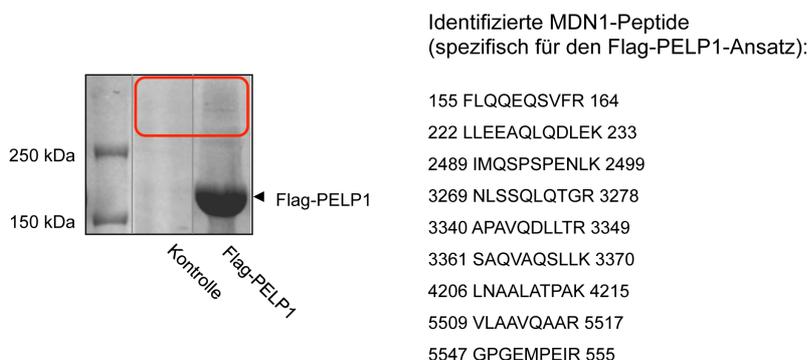


**Abb. 14 Wechselseitige Abhängigkeit von PELP1 und WDR18**

HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen siRNA-Oligonukleotiden transfiziert, und Proteinmengen wurden mittels Western-Blot-Analyse wie dargestellt untersucht. Die Detektion von  $\beta$ -Tubulin diente als Ladekontrolle.

### 3.1.2 MDN1 und LAS1L sind mit PELP1 assoziiert

Um weitere Komponenten des PELP1-TEX10-WDR18-Komplexes zu identifizieren, wurde ein mit einem Flag-Epitop versehenes PELP1 in HeLa-Zellen exprimiert, und kopräzipitierende Proteine wurden nach SDS-PAGE-Auftrennung mittels Massenspektrometrie analysiert. Interessanterweise wurde hierbei in einer höhermolekularen Bande die AAA-ATPase MDN1 gefunden (Abb. 15).



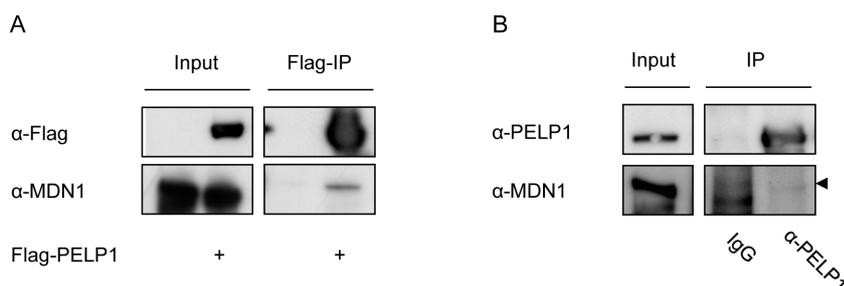
**Abb. 15 MDN1 kopräzipitiert mit PELP1**

Flag-PELP1 wurde in HeLa-Zellen exprimiert und über eine anti-Flag-M2-Agarosesäule affinitätsgereinigt. Das gebundene Material wurde über SDS-PAGE aufgetrennt, und der Bereich über 250kDa wurde aus dem Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht. Neun Peptide aus dem humanen MDN1, die spezifisch für den Flag-PELP1-Ansatz waren, konnten wie angegeben mittels MS/MS-Analyse identifiziert werden.

Um die Ergebnisse aus der Massenspektrometrie zu bestätigen, wurden gerichtete Koimmunpräzipitationsexperimente durchgeführt, für die entweder Flag-markiertes PELP1 in HeLa-Zellen exprimiert oder eine Bindung zwischen endogenem PELP1 und MDN1 mittels anti-PELP1-Antikörper untersucht wurde. In beiden Fällen konnte eine Interaktion zwischen PELP1 und MDN1 gezeigt werden (Abb. 16A, B).

Bei MDN1 handelt es sich um das Säugerhomolog des größten Proteins aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, der AAA-ATPase Rea1. Für diesen Faktor wurde beschrieben, dass er transient an den Proteinkomplex aus Rix1, Ipi1 und Ipi3 bindet und ebenfalls eine Rolle bei 60S-Partikel-Reifung und -Export spielt (Galani *et al.*, 2004; Nissan *et al.*, 2004; Ulbrich *et al.*, 2009).

Die beobachtete Bindung von MDN1 und PELP1 bekräftigt somit die Annahme, dass der PELP1-TEX10-WDR18-Komplex aus Säugern Analogien zum Rix1-Ipi1-Ipi3-Komplex der Hefe aufweist.

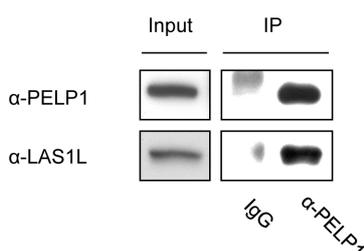


**Abb. 16 MDN1 ist ein Interaktionspartner von PELP1**

(A) Flag-PELP1 wurde in HeLa-Zellen exprimiert und mittels anti-Flag-Agarosekügelchen immunpräzipitiert. Nach Auftrennung der präzipitierten Proteine über SDS-PAGE wurde die Anwesenheit von endogenem MDN1 in einem Western Blot wie angegeben getestet. (B) Endogenes PELP1 wurde mit einem polyklonalen anti-PELP1-Antikörper aus HeLa-Zellen immunpräzipitiert, und gebundenes Material wurde mittels Western Blot auf Anwesenheit von MDN1 analysiert. Die Inputs machen 2,5% des Gesamt-Zelllysats aus.

Als weiterer potentieller Interaktionspartner von PELP1 konnte mit Hilfe massenspektrometrischer Analysen LAS1L identifiziert werden. Interessanterweise war LAS1L bereits als SENP3-assoziiertes Protein gefunden worden (siehe 3.1.1).

Um zu untersuchen, ob auch LAS1L Teil des beschriebenen Komplexes ist, wurde endogenes PELP1 mit einem anti-PELP1-Antikörper aus HeLa-Zellen präzipitiert und eine Bindung von LAS1L mittels Western Blot getestet. Auch in diesem Fall konnte das Ergebnis aus der Massenspektrometrie bestätigt werden (Abb. 17). Die Interaktion zwischen dem rRNA-Prozessierungsfaktor LAS1L und PELP1 deutet auf eine Rolle von PELP1 und seinen Bindungspartnern bei der Ribosomenbiogenese hin.

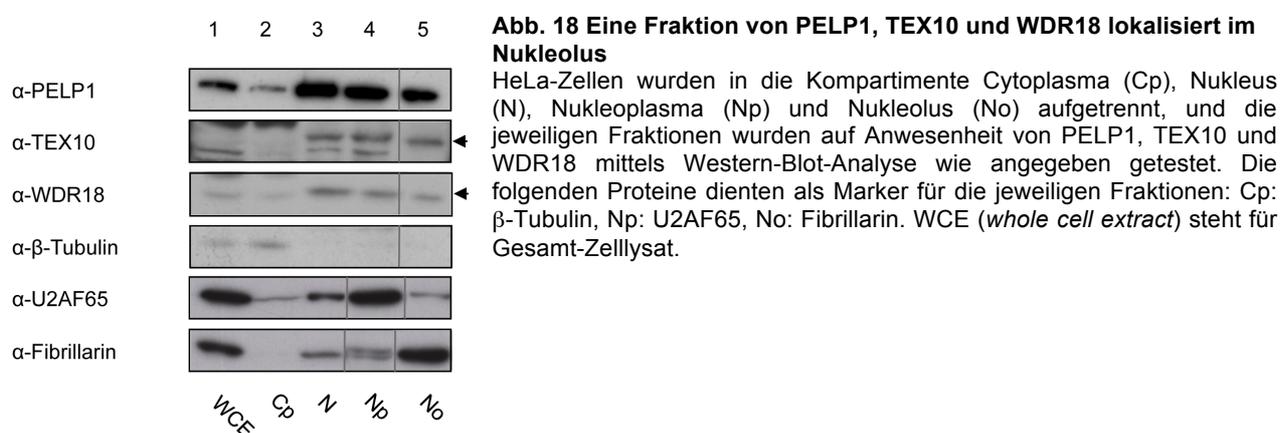


**Abb. 17 LAS1L kopräzipitiert mit PELP1**

Endogenes PELP1 wurde mit einem polyklonalen anti-PELP1-Antikörper aus HeLa-Zellen immunpräzipitiert, und präzipitierte Proteine wurden in einem Western Blot auf Anwesenheit von LAS1L analysiert. Die Inputs machen 2,5% des Gesamt-Zelllysats aus.

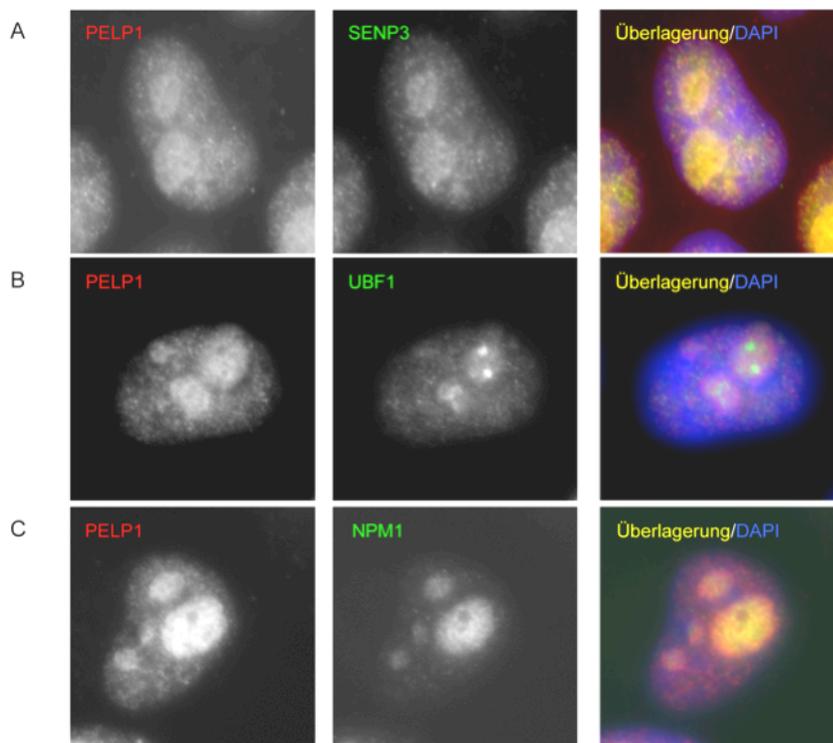
### 3.2 PELP1, TEX10 und WDR18 lokalisieren im Nukleolus

Da die frühen Schritte der Ribosomenbiogenese im Nukleolus stattfinden, und SENP3 als vorwiegend nukleoläre SUMO-Isopeptidase beschrieben ist, sollte untersucht werden, ob die Komponenten des PELP1-TEX10-WDR18-Komplexes auch im Nukleolus lokalisieren. Dies wurde zunächst in einem biochemischen Ansatz überprüft, bei dem HeLa-Zellen in ihre Kompartimente Cytoplasma, Nukleoplasma und Nukleoli aufgetrennt wurden, und die einzelnen Fraktionen dann im Western Blot auf Anwesenheit der entsprechenden Proteine getestet wurden. Als Markerproteine für die cytoplasmatische Fraktion wurde  $\beta$ -Tubulin, für die nukleoplasmatische Fraktion der Spleiß-Faktor U2AF65 und für die nukleoläre Fraktion Fibrillarin eingesetzt. Für PELP1, TEX10 und WDR18 konnte sowohl ein Signal im Nukleoplasma als auch in Nukleolus detektiert werden (Abb. 18).



Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde die Lokalisierung der beschriebenen Proteine auch mikroskopisch in Immunfluoreszenzexperimenten analysiert. Zunächst wurde die Lokalisierung von endogenem PELP1 und SENP3 in HeLa-Zellen untersucht. Wie in Abb. 19A deutlich wird, decken sich beide Signale nahezu vollständig. Sowohl für PELP1 als auch für SENP3 ist eine Konzentration im Nukleolus sowie ein nukleoplasmatisches Signal erkennbar. Um die Lokalisierung von PELP1 innerhalb des Nukleolus weiter einzugrenzen, wurden für Koimmunfluoreszenzexperimente Markerproteine nukleolärer Substrukturen hinzugezogen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, lässt sich der Nukleolus in verschiedene Regionen einteilen: Die innerste Region, auch *Fibrillar Centre* (FC) genannt, ist Ort der Transkription der ribosomalen DNA. Um zu untersuchen, ob PELP1 dort zu finden ist, wurde UBF1, ein Transkriptionsfaktor der RNA-Polymerase I und Markerprotein der FC-Region, zusammen mit PELP1 detektiert.

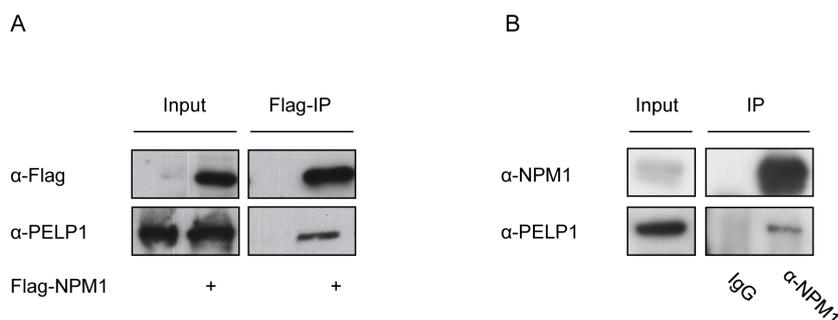
Wie aus Abb. 19B erkennbar, ist UBF1 in der punktförmigen FC-Region des Nukleolus konzentriert. Betrachtet man das PELP1-Signal, wird deutlich, dass diese Strukturen komplett davon ausgespart sind. Dies lässt darauf schließen, dass PELP1 wahrscheinlich nicht direkt an der Transkription der rDNA beteiligt ist.



**Abb. 19 PELP1 lokalisiert in der GC-Region des Nukleolus**

(A-C) Lokalisierung von endogenem PELP1, SENP3, UBF1 und NPM1 in HeLa-Zellen durch Detektion mittels Immunfluoreszenzfärbung. Zellkerne wurden mit Hilfe einer DAPI-Färbung sichtbar gemacht.

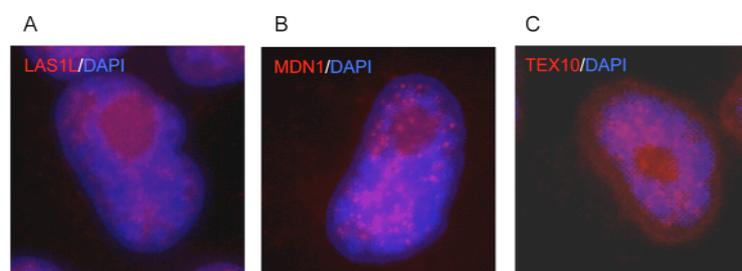
Außerdem wurde die Lokalisierung von PELP1 in der GC (*granular centre*)-Region des Nukleolus untersucht. Als Markerprotein für die GC-Region wurde NPM1 verwendet. Wie aus der Überlagerung der Signale deutlich wird, kolokalisieren PELP1 und NPM1 in dieser äußeren Nukleolusregion, in der die 32S-rRNA-Prozessierungsschritte stattfinden und die prä-60S ribosomale Untereinheit assembliert wird (Abb. 19C). Interaktionsstudien zwischen ektopisch exprimiertem oder endogenem PELP1 und endogenem NPM1 zeigen eine Bindung von NPM1 an PELP1 und bestätigen das Resultat der Immunfluoreszenz (Abb. 20). Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse vermuten, dass PELP1 eine Funktion in der GC-Subregion des Nukleolus hat.



**Abb. 20 NPM1 interagiert mit PELP1**

(A) Flag-NPM1 wurde in U2OS-Zellen mit anti-Flag-Agarose immunpräzipitiert und nach SDS-PAGE mit kopräzipitierten Proteinen in einem Western Blot auf die Anwesenheit von endogenem PELP1 getestet. (B) Endogenes NPM1 wurde aus OCI-AML3-Zellen mit Hilfe eines monoklonalen Maus-Antikörpers präzipitiert, mit gebundenen Proteinen über SDS-PAGE aufgetrennt und auf Anwesenheit von endogenem PELP1 in einem Western Blot analysiert. Die Inputs stellen 2,5% des Gesamt-Zelllysats dar.

Die Untersuchung der PELP1-assoziierten Proteine LAS1L und MDN1 ergab, dass auch diese Faktoren eine vorwiegend nukleoläre Lokalisierung aufweisen, aber auch im Nukleoplasma zu finden sind (Abb. 21A, B). TEX10 hingegen zeigt ein eher gleichmäßiges Lokalisierungsmuster im Nukleolus und Nukleoplasma (Abb. 21C).



**Abb. 21 LAS1L, MDN1 und TEX10 lokalisieren im Nukleolus**

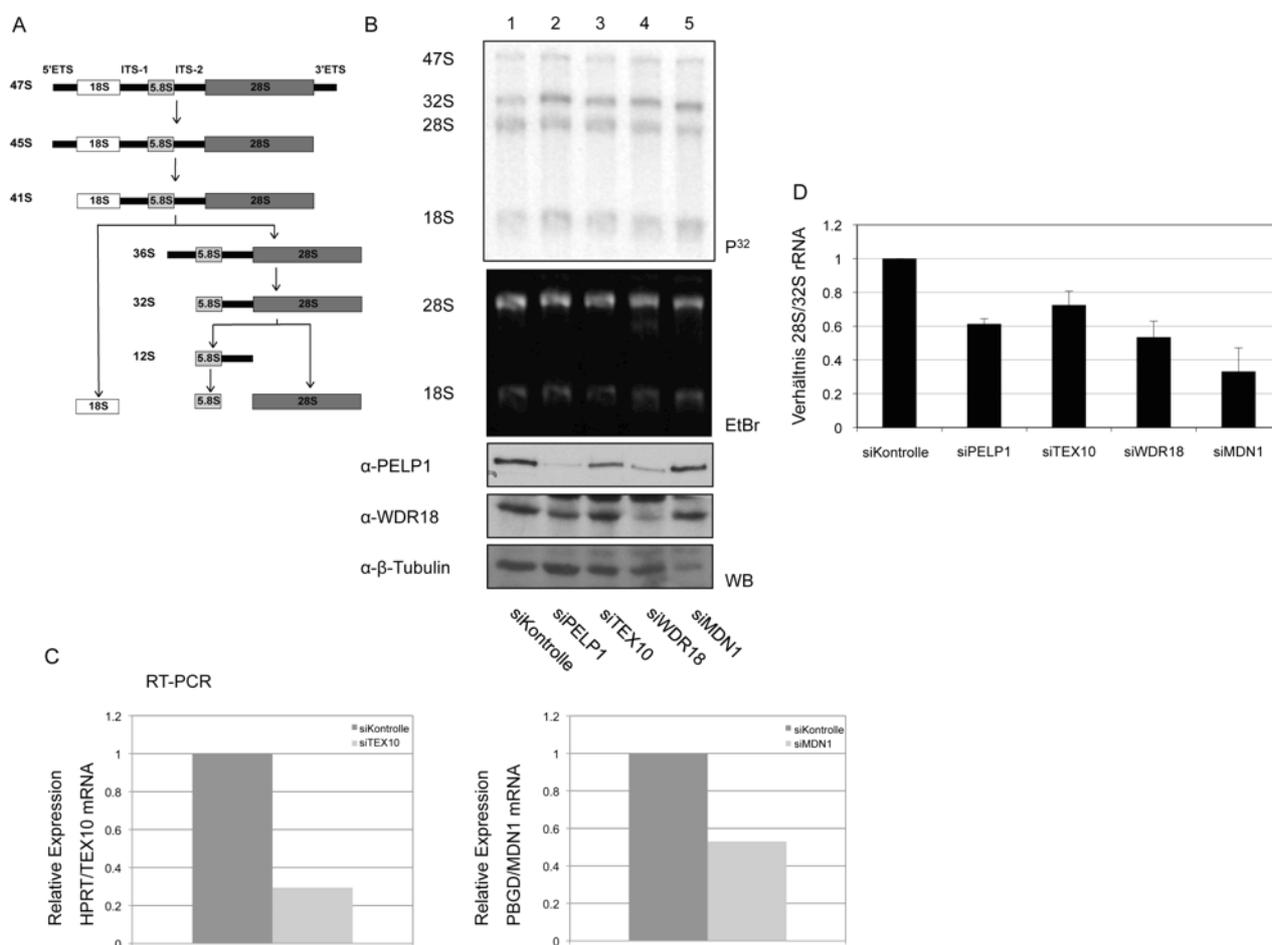
(A–C) Die Lokalisierung von LAS1L, MDN1 oder TEX10 wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Benutzung von anti-LAS1L-, anti-MDN1- bzw. anti-TEX10-Antikörpern untersucht. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

### 3.3 PELP1, TEX10, WDR18 und MDN1 sind an der Ribosomenbiogenese beteiligt

#### 3.3.1 Die Depletion von PELP1, TEX10, WDR18 oder MDN1 führt zu Defekten der rRNA-Prozessierung

Um eine mögliche Rolle von PELP1 und seinen Bindungspartnern TEX10, WDR18 und MDN1 bei der rRNA-Prozessierung zu untersuchen, wurde in HeLa-Zellen eine *in vivo*-Markierung der RNA mit  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat durchgeführt. Hierbei wurden die Proteinexpressionsniveaus der zu untersuchenden Faktoren durch Transfektion von siRNA-Oligonukleotiden herunterreguliert. Die Effizienz der Depletion wurde mittels Western-Blot-Analyse für PELP1 und WDR18 überprüft (Abb. 22B unten). Da zu diesem Zeitpunkt noch keine Antikörper gegen TEX10 und MDN1 verfügbar waren, wurde die effiziente RNAi-vermittelte Reduktion dieser Faktoren durch Quantifizierung der mRNA

verifiziert (Abb. 22C). 72h nach siRNA-Transfektion erfolgte dann die eigentliche Markierung der Zellen. Nach RNA-Aufreinigung und -Auftrennung auf einem denaturierenden Agarosegel können die einzelnen rRNA-Vorstufen durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden, und mögliche Defekte in der Prozessierung bestimmter rRNA-Vorläufer festgestellt werden. Schematisch dargestellt sind die wichtigsten Schritte der Prozessierung ribosomaler RNA in Abb. 22A. Wie aus Abb. 22B (oberes Feld) hervorgeht, führt die Depletion von PELP1, TEX10, WDR18 oder MDN1 zu Defekten in der Prozessierung der 32S rRNA. In Spur 2–5 ist, verglichen mit den Kontrollzellen in Spur 1, jeweils der 32S-rRNA-Vorläufer gegenüber der 28S rRNA angereichert. Das mittlere Feld in Abb. 22B zeigt das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel, das durch gleiche Intensität der 28- bzw. 18S-rRNA-Banden die gleichmäßige Beladung des Gels mit den entsprechenden RNA-Proben belegt. Aus der Quantifizierung von vier unabhängigen Experimenten (zwei für MDN1) wird deutlich, dass die Depletion von PELP1 das Verhältnis reifer 28S zur 32S-rRNA-Vorstufe auf ca. 60% herabsetzt. Die Depletion von TEX10, WDR18 oder MDN1 führt zu einer Abnahme des Verhältnisses auf jeweils ca. 75, 50 bzw. 30%. Als Referenz dienten bei dieser Quantifizierung die Kontrollzellen, deren 28S- zu 32S-rRNA-Verhältnis zu 1 gesetzt wurde (Abb. 22D). Dieses Ergebnis zeigt, dass PELP1, TEX10, WDR18 und MDN1 an der Reifung der 28S rRNA beteiligt sind.



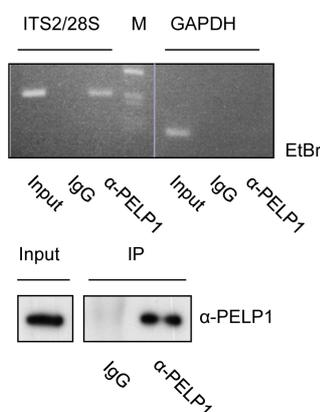
### Abb. 22 PELP1, TEX10, WDR18 und MDN1 sind an der rRNA-Prozessierung beteiligt

(A) Übersicht über die wichtigsten Schritte der Prozessierung ribosomaler RNA. (B) HeLa-Zellen wurden mit siRNA-Oligonukleotiden gegen PELP1, TEX10, WDR18, MDN1 oder mit einer Kontroll-siRNA transfiziert. 72h nach Transfektion wurden die Zellen 1h lang mit <sup>32</sup>P-Orthosphat markiert. Nach Entfernung des radioaktiven Mediums erfolgte eine weitere Inkubation der Zellen für 2,5h mit Standardmedium. Nach Isolierung der RNA wurde diese auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid (EtBr, mittleres Feld) gefärbt und nach Trocknung des Gels mittels Autoradiographie (oberes Feld) sichtbar gemacht. Die Depletion von PELP1 und WDR18 wurde in einem Western Blot (WB, untere 3 Reihen) überprüft. (C) Die Depletion von TEX10 und MDN1 wurde durch Quantifizierung der mRNA mittels *real time*-PCR kontrolliert. Die relativen Expressionsniveaus wurden durch Teilung der entsprechenden Werte für TEX10 und MDN1 durch diejenigen der angegebenen Kontrollgene (HPRT und PBGD) ermittelt. Die relativen Expressionsniveaus der mit Kontroll-siRNAs behandelten Zellen wurden auf 1 gesetzt. (D) Die Signalintensitäten der 28S- und 32S-rRNA-Formen wurden mit Hilfe eines *Phosphoimagers* analysiert, und das Verhältnis 28S:32S rRNA bestimmt. Die berechneten Werte stellen den Mittelwert aus vier (zwei für MDN1) unabhängigen Experimenten dar. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an.

### 3.3.2 PELP1 ist mit rRNA und Präribosomen assoziiert

Um eine mögliche direkte Rolle von PELP1 und seinen Bindungspartnern bei der rRNA-Prozessierung zu belegen, sollte geprüft werden, ob der Proteinkomplex RNA enthält. Dazu wurde zunächst eine Immunpräzipitation von endogenem PELP1 durchgeführt und anschließend aus dem präzipitierten Material RNA isoliert. Diese wurde daraufhin zu cDNA revers transkribiert. Anschließend erfolgte eine PCR mit Oligonukleotiden, die eine Region vom 3'-Ende der ITS2-Sequenz zum 5'-Ende der 28S-rRNA-Sequenz umspannen (Abb. 23, oben links). Um eine unspezifische RNA-Bindung auszuschließen, wurde das Haushaltsgen GAPDH als Kontrolle mit einbezogen (Abb. 23, oben rechts). Wie in Abb. 23

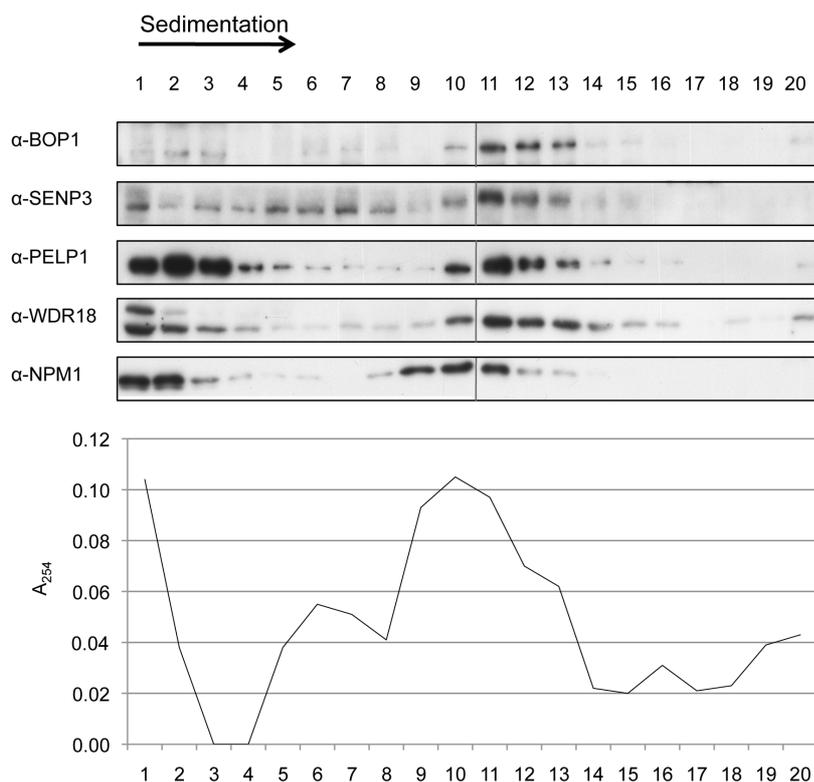
zu sehen ist, finden sich in anti-PELP1-Immunpräzipitaten (Abb. 23, unten) ITS2-enthaltende RNA-Formen, die in der IgG-Kontrolle nicht präzipitiert werden. RNA für GAPDH wurde in anti-PELP1-Immunpräzipitaten nicht detektiert, was die Spezifität der Bindung von PELP1 an ITS2-Sequenzen unterstreicht.



**Abb. 23 PELP1 ist mit ITS2-enthaltenden RNA-Formen assoziiert**

PELP1 wurde aus HeLa-Zellen immunpräzipitiert. 10% des präzipitierten Materials wurde in einem Western Blot analysiert (unteres Feld). Das restliche Material wurde für eine RNA-Isolierung mit anschließender cDNA-Synthese eingesetzt. Die cDNA wurde als Matrize für eine PCR-Reaktion verwendet. Es wurden Oligonukleotide innerhalb der ITS2/28S-Region bzw. der GAPDH-cDNA als Kontrolle eingesetzt (oberes Feld). Der Input bezieht sich auf 10% des Zellysats. M steht für Marker.

Nachdem gezeigt wurde, dass der Komplex aus PELP1, TEX10, WDR18 und MDN1 eine Rolle bei der Reifung der 28S rRNA spielt und rRNA-Spezies enthält, sollte nun analysiert werden, ob der Proteinkomplex und SENP3 mit Präribosomen assoziiert sind. Dazu wurden diese mittels Sucrose-Gradienten-Zentrifugation aus Zellkernen isoliert. Die zu untersuchende Probe wurde dabei auf einen nach oben hin dichter werdenden Sucrose-Gradienten gegeben, und die in der Probe enthaltenen Moleküle wurden während eines dreistündigen Zentrifugationsschrittes entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Danach wurden 20 Fraktionen daraus entnommen und diese, nach zunehmender Dichte angeordnet, auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Anschließend wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt, um die einzelnen Partikel auf Anwesenheit der entsprechenden Proteine hin zu testen. Als Markerprotein für Fraktionen, die nukleoläre prä-60S ribosomale Partikel enthalten, wurde BOP1, eine Komponente des PeBoW-Komplexes (siehe auch 2.2), eingesetzt. Neben BOP1 wurden SENP3, PELP1, WDR18 und NPM1 untersucht.



**Abb. 24 PELP1, WDR18, SENP3 und NPM1 sind mit Präribosomen assoziiert**

Präribosomen wurden über Sucrose-Gradienten-Ultrazentrifugation von Kernextrakten aufgetrennt. 20 Fraktionen wurden gesammelt und deren UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 254nm gemessen. Dabei traten zwei Scheitelpunkte auf, die die Vorläufer der kleinen bzw. großen Untereinheit beinhalten (unteres Feld). Die in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurden mit TCA gefällt und mittels SDS-PAGE und Western Blot unter Benutzung der angegebenen Antikörper analysiert (oberes Feld).

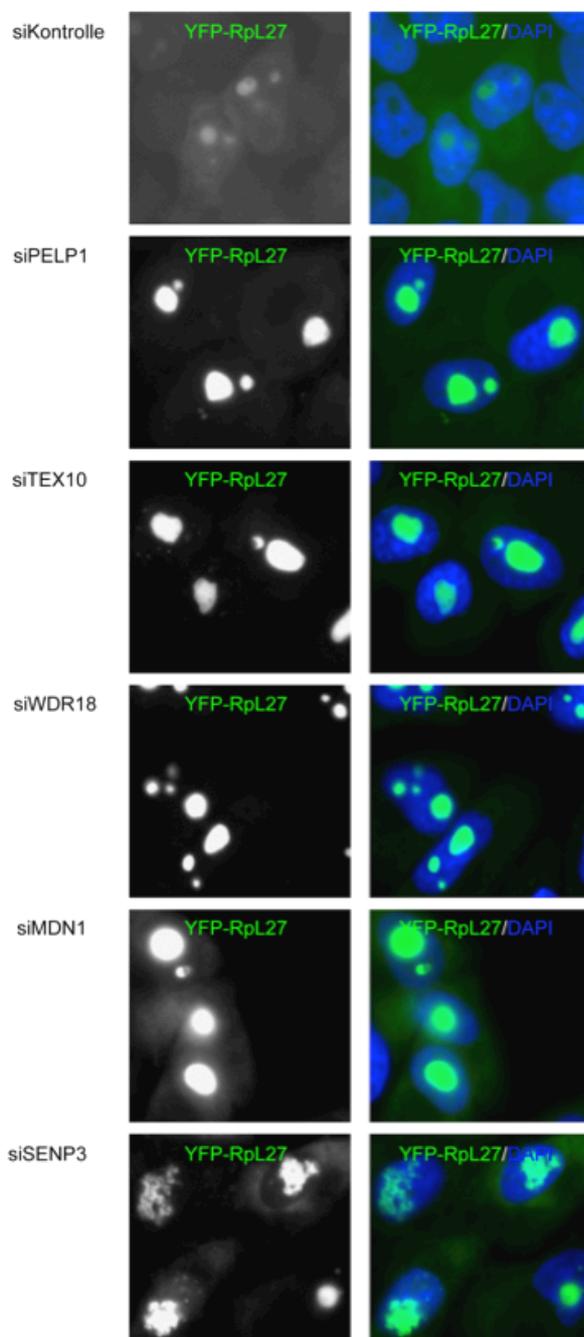
Wie aus Abb. 24 ersichtlich wird, sind PELP1 und WDR18 in denselben Fraktionen wie BOP1 zu finden (Spuren 10–13), was darauf hindeutet, dass beide Proteine mit nukleolären prä-60S-Partikeln assoziiert sind. Der anti-SENP3-Western Blot zeigt, dass auch SENP3 mit PELP1 und WDR10 kosedimentiert, jedoch ist hier ein zusätzliches Signal in den Fraktionen 5–8 erkennbar, die prä-40S-Partikeln entsprechen. Dies spricht möglicherweise dafür, dass SENP3 sowohl an der Biogenese der ribosomalen 60S-Untereinheit als auch der 40S-Untereinheit beteiligt ist. NPM1 weist ein ähnliches Verteilungsmuster im Western Blot wie BOP1, PELP1 und WDR18 auf, jedoch konnte hier reproduzierbar auch ein Signal in Fraktionen detektiert werden, die Partikeln mit geringerer Dichte entsprechen.

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass PELP1, WDR18, SENP3 und NPM1 mit 60S-Präribosomen assoziiert sind.

### 3.3.3 PELP1, TEX10, WDR1, MDN1 und SENP3 sind am Reifungsprozess der großen ribosomalen Untereinheit beteiligt

Um die Funktion von PELP1, TEX10, WDR18 und MDN1 im Reifungsprozess der großen ribosomalen Untereinheit genauer zu untersuchen, wurde die Lokalisierung eines YFP-RpL27-Fusionsproteins nach Depletion verschiedener Komponenten des Komplexes untersucht. RpL27 ist Bestandteil der großen ribosomalen Untereinheit und assembliert bereits im Nukleolus mit 60S präribosomalen Partikeln. YFP-RpL27 kann deshalb als Marker verwendet werden, um den Verlauf der Ribosomenbiogenese durch Fluoreszenz-

mikroskopie zu verfolgen. Nach Etablierung einer HeLa-Zelllinie, die das YFP-RpL27-Fusionsprotein stabil exprimierte, erfolgte die Transfektion mit siRNA-Oligonukleotiden. Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, zeigen das typische Lokalisierungsmuster von RpL27, das sowohl im Nukleolus in Form von unreifen prä-60S ribosomalen Partikeln als auch im Cytoplasma als Bestandteil reifer 60S-Untereinheiten detektierbar ist (Abb. 25 obere Reihe). Die RNAi-vermittelte Depletion von PELP1, TEX10, WDR18 oder MDN1 jedoch führt zu einer starken Anreicherung des nukleolären RpL27-Signals, sowie zu einer drastischen Vergrößerung der Nukleoli (Abb. 25, Reihen 2–5). Dieses Anschwellen der Nukleoli ist typischerweise die Konsequenz der Inaktivierung von Prozessierungsfaktoren (Rosby *et al.*, 2009; Wild *et al.*, 2010).



**Abb. 25 Der nukleoläre Export von prä-60S-Partikeln ist nach Depletion von PELP1, TEX10, WDR18, MDN1 oder SENP3 stark beeinträchtigt**

HeLa-Zellen, die YFP-RpL27 unter der Kontrolle eines induzierbaren Promoters exprimierten, wurden mit den angegebenen siRNA-Oligonukleotiden transfiziert. 24h später wurde die Expression der YFP-RpL27-Fusion induziert und 72h danach deren subzelluläre Lokalisierung beobachtet. Alle Abbildungen wurden mit identischer Belichtungszeit aufgenommen.

Die Depletion von SENP3 führte zu einem ähnlichen Rpl27-Lokalisierungsphänotyp, also zu einer nukleolären Akkumulation des YFP-Rpl27-Reporterproteins sowie zum Verlust des cytoplasmatischen Signals. Zusätzlich zeigten die Nukleoli einiger Zellen unter diesen Bedingungen auch eine veränderte Morphologie: Die normalerweise intakten, runden Strukturen erscheinen deformiert (Abb. 25, untere Reihe). Diese Ergebnisse unterstreichen die entscheidende Rolle der SENP3-vermittelten Desumoylierung während der Ribosomenreifung.

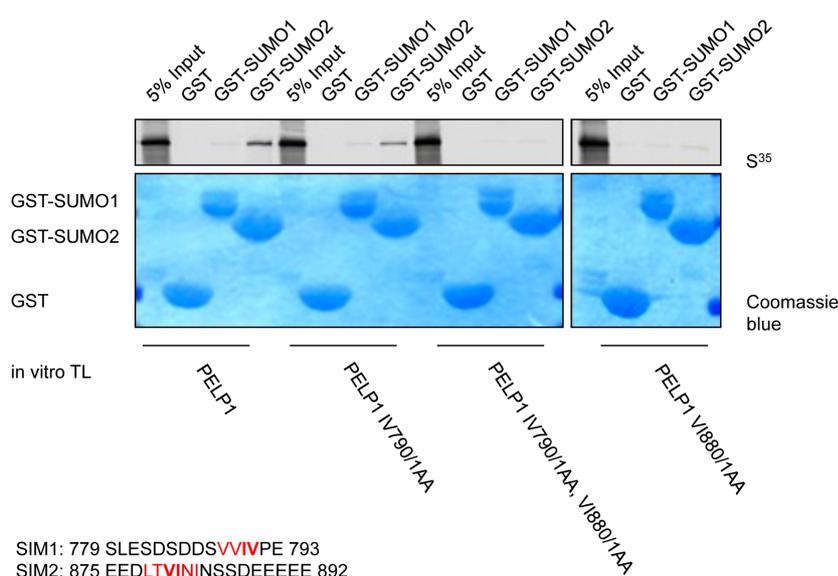
Insgesamt zeigen diese funktionalen Untersuchungen, dass PELP1 und seine Bindungspartner TEX10, WDR18, MDN1 und SENP3 für die Reifung und den Übergang der großen ribosomalen Untereinheit vom Nukleolus ins Nukleoplasma benötigt werden. Beim Fehlen der Proteine kommt der Reifungsprozess der 60S-Untereinheit offensichtlich auf einer frühen nukleolären Stufe zum Erliegen.

### **3.4 PELP1 ist ein SUMO-Substrat und wird von SENP3 demodifiziert**

#### **3.4.1 PELP1 interagiert nichtkovalent mit SUMO**

Da der Komplex aus PELP1 und seinen Bindungspartnern mit der SUMO-Isopeptidase SENP3 assoziiert ist, sollte herausgefunden werden, ob Komponenten des Komplexes Substrate für eine Modifikation mit SUMO sind.

Bereits 2006 wurde PELP1 in einer Studie von Rosendorff und Kollegen als nicht-kovalenter SUMO2-Bindungspartner identifiziert (Rosendorff *et al.*, 2006). Im Einklang mit diesem Ergebnis konnte in einem biochemischen Bindungsexperiment die Interaktion eines GST-SUMO2-Fusionsproteins mit <sup>35</sup>S-markiertem PELP1, das durch *in vitro*-Transkription und -Translation hergestellt wurde, bestätigt werden (Abb. 26). Mit GST-SUMO1 konnte dagegen lediglich eine sehr schwache Bindung zu PELP1 festgestellt werden. Da eine Interaktion zwischen SUMO und einem Bindungsprotein typischerweise über ein sogenanntes SIM (*SUMO Interaction Motif*) abläuft, wurde die Aminosäuresequenz von PELP1 auf diese Motive hin untersucht. Sie setzen sich in der Regel aus einem hydrophoben Kern und benachbarten sauren Aminosäureresten zusammen (Song *et al.*, 2004; Hecker *et al.*, 2006). Zwei solcher Motive konnten in PELP1 identifiziert werden: Der hydrophobe Kern des sogenannten „SIM1“ umspannt die Aminosäuren 788–791, wohingegen sich derjenige des „SIM2“ im Bereich der Aminosäuren 878–881 befindet (Abb. 26, unten).



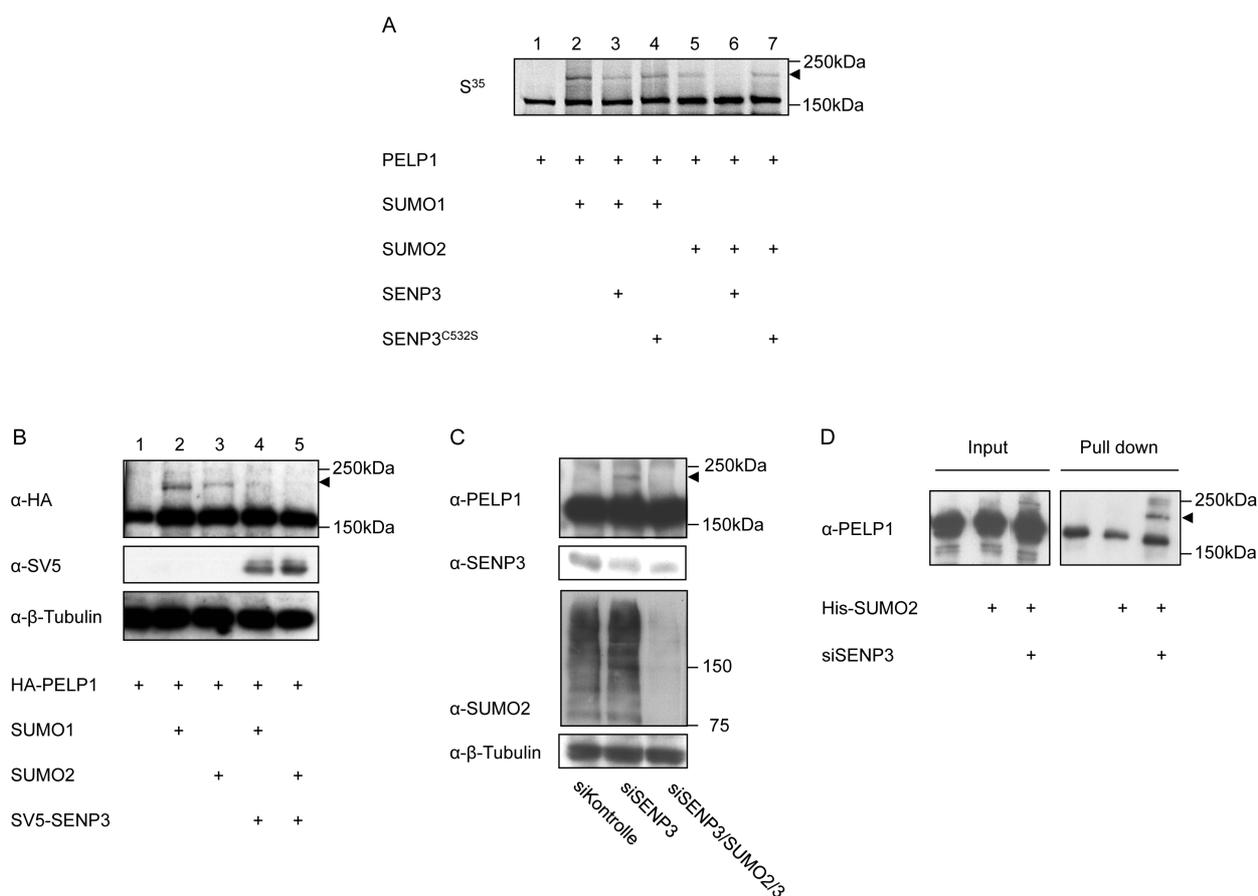
**Abb. 26 PELP1 besitzt zwei SIMs**  
 GST-SUMO1, GST-SUMO2 oder GST alleine wurden mit  $^{35}\text{S}$ -markiertem Wildtyp-PELP1 oder den angegebenen Mutanten inkubiert, die durch *in vitro*-Transkription und -Translation hergestellt worden waren. Nach Auftrennung über SDS-PAGE wurden gebundene Proteine durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Coomassie-Blaufärbung des Polyacrylamidgels diente als Ladekontrolle. Unten links: SIM1 und SIM2 in PELP1. Der hydrophobe Bereich ist rot hervorgehoben. Die in den Mutanten zu Alaninen mutierten Aminosäurereste sind fett markiert.

Um zu testen, ob diese Motive tatsächlich für die Interaktion mit SUMO verantwortlich sind, wurden je zwei hydrophobe Reste aus den jeweiligen SIMs zu Alaninen mutiert. Anschließend wurden mit diesen PELP1-Mutanten Bindungsstudien mit GST-SUMO durchgeführt. Im Gegensatz zum PELP1-Wildtyp zeigte sich für beide SIM-Mutanten eine verminderte Bindung an GST-SUMO2, wobei dieser Effekt für die Mutation im „SIM2“ noch stärker ist und nahezu zum Verlust der SUMO-Bindung führt. Unter Verwendung der „SIM1/2“-Doppelmutante wurde die Interaktion mit SUMO2 völlig aufgehoben (Abb. 26). PELP1 besitzt also zwei SUMO-Interaktionsmotive, über die es nichtkovalent mit SUMO2 interagiert.

### 3.4.2 PELP1 ist ein SENP3-sensitives Substrat für SUMO

Nach der Identifikation von PELP1 als nicht-kovalentem Interaktionspartner von SUMO sollte nun analysiert werden, ob PELP1 auch kovalent mit SUMO modifiziert werden kann. Dies wurde zunächst mit Hilfe eines *in vitro*-Sumoylierungsexperiments getestet. Dazu wurde  $^{35}\text{S}$ -markiertes PELP1 durch *in vitro*-Transkription und -Translation hergestellt und mit rekombinantem E1-Enzym, Ubc9 und SUMO1 bzw. SUMO2 inkubiert. In einer Kontrollreaktion ohne Zugabe von SUMO konnte für PELP1 nach Auftrennung durch SDS-PAGE und nachfolgender Autoradiographie erwartungsgemäß eine Proteinbande bei ca. 180kDa detektiert werden (Abb. 27A, Spur 1). Nach Zugabe von SUMO1 oder SUMO2 zum Reaktionsansatz entstand ein PELP1-SUMO-Konjugat mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 220kDa (Abb. 27A, Spuren 2 und 5). Um zu testen, ob diese PELP1-SUMO-Konjugate SENP3-sensitiv sind, wurde zu den Ansätzen zusätzlich durch *in vitro*-Transkription und -Translation hergestelltes Wildtyp-SENP3 oder die katalytisch inaktive

Mutante SENP3<sup>C532S</sup> gegeben. Wie in den Spuren 3, 4, 6 und 7 der Abb. 27A zu sehen ist, ist nur die Wildtyp-SUMO-Isopeptidase in der Lage, die PELP1-SUMO-Konjugate zu spalten, nicht aber SENP3<sup>C532S</sup>. Dabei ist die Aktivität von SENP3 gegenüber PELP1-SUMO2 etwas stärker als gegenüber PELP1-SUMO1, was dessen bekannte Präferenz für SUMO2/3-Konjugate bestätigt (Nishida *et al.*, 2000; Gong und Yeh, 2006; Haindl *et al.*, 2008).



#### Abb. 27 PELP1 ist ein SENP3-sensitives SUMO-Substrat

(A) PELP1 wurde durch *in vitro*-Transkription und -Translation hergestellt und mit rekombinanten E1- und E2-Enzymen und SUMO1 bzw. SUMO2 in Anwesenheit von ATP inkubiert. Die Kontrollreaktion (Spur 1) wurde ohne SUMO durchgeführt. SENP3 oder die katalytisch inaktive SENP3<sup>C532S</sup>-Variante wurde durch *in vitro*-Transkription und -Translation hergestellt und wo angegeben zum Sumoylierungsansatz hinzugefügt. (B) HA-PELP1 wurde ohne oder zusammen mit SUMO1 bzw. SUMO2 in Ab- oder Anwesenheit von SV5-markiertem SENP3 in HeLa-Zellen exprimiert. Die Expression der jeweiligen Proteine wurde nach Auftrennung über SDS-PAGE in einem Western Blot überprüft. (C) HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen siRNA-Oligonukleotiden transfiziert. Die SUMO-Modifizierung von endogenem PELP1 wurde mittels Western-Blot-Analyse unter Anwendung eines anti-PELP1-Antikörpers untersucht. Die Depletion der entsprechenden Proteine wurde in einem Western Blot kontrolliert (untere drei Felder). (D) HeLa-Zellen wurden mit einer siRNA gegen SENP3 und einem His-SUMO2-Plasmid wie angegeben transfiziert. His-SUMO-Konjugate wurden über magnetische NiNTA-Kügelchen unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und in einem Western Blot mit einem anti-PELP1-Antikörper analysiert. Pfeile kennzeichnen PELP1-SUMO-Konjugate.

Um zu untersuchen, ob PELP1 auch *in vivo* mit SUMO modifiziert werden kann, wurde HA-markiertes PELP1 in HeLa-Zellen entweder alleine oder mit SUMO1 bzw. SUMO2 exprimiert (Abb. 27B). Eine anschließende Western-Blot-Analyse zeigte für unmodifiziertes PELP1 in allen Ansätzen eine Proteinbande bei 180kDa. Nach zusätzlicher Expression

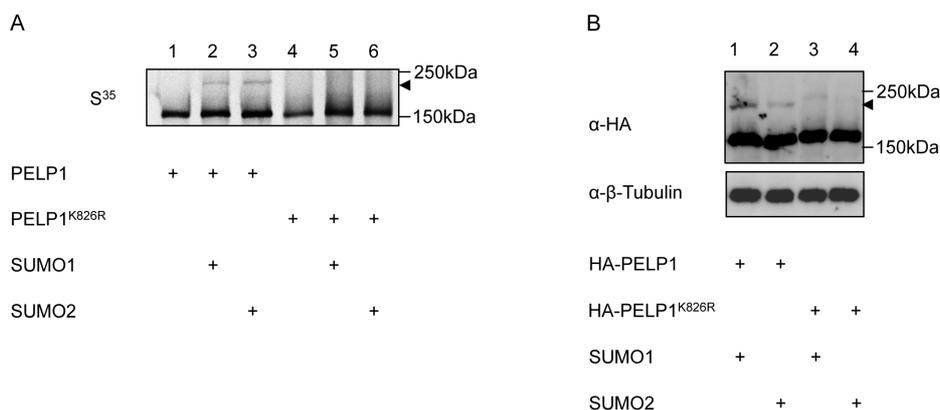
von SUMO1 oder SUMO2 wurde eine zweite Bande bei 220kDa sichtbar, die einem PELP1-SUMO-Konjugat entsprechen könnte (Abb. 27B, Spuren 2 und 3). Wurde nun SENP3 koexprimiert, gingen diese höhermolekularen Banden verloren, was für eine SENP3-vermittelte Demodifikation eines PELP1-SUMO-Konjugats spricht (Abb. 27B, Spuren 4 und 5).

Um zu testen, ob auch endogenes PELP1 mit SUMO modifiziert werden kann und ob die Modifikation durch endogenes SENP3 reguliert wird, wurde das SENP3-Expressionsniveau in HeLa-Zellen mit siRNA-Oligonukleotiden herunterreguliert, und PELP1 wurde mit einem anti-PELP1-Antikörper im Western Blot detektiert. Auch für endogenes PELP1 wurde nach SENP3-Depletion eine zusätzliche höhermolekulare anti-PELP1-reaktive Proteinbande bei 220kDa sichtbar, die kaum mehr nachweisbar war, sobald zusätzlich zelluläre SUMO2- und -3-Niveaus durch RNAi-vermittelte Depletion herabgesetzt wurden (Abb. 27C). Dies deutet darauf hin, dass die höhermolekulare Proteinbande tatsächlich einem PELP1-SUMO-Konjugat entspricht und vorwiegend eine mit SUMO2/3-modifizierte Form von PELP1 darstellt. Dass es sich tatsächlich um eine Modifikation von PELP1 mit SUMO handelt, konnte nach Transfektion eines mit einem His<sub>6</sub>-Epitop versehenen SUMO2 durch Aufreinigung von His<sub>6</sub>-SUMO-Konjugaten mittels NiNTA-Kügelchen bestätigt werden. Dabei konnte His<sub>6</sub>-SUMO2 modifiziertes PELP1 spezifisch aus HeLa-Zellen angereichert werden, in denen die SENP3-Expressionsniveaus herunterreguliert waren (Abb. 27D).

### 3.4.3 Lysin 826 ist die Haupt-Sumoylierungsstelle von PELP1

Da SUMO häufig an Lysinreste konjugiert wird, die in einer  $\Psi$ KXE-Konsensussequenz eingebettet sind, wurde die Aminosäuresequenz von PELP1 zunächst auf die Anwesenheit dieses Motivs hin untersucht. Hierbei konnten drei potentielle Sumoylierungsstellen an den Positionen 541, 770 bzw. 826 identifiziert werden.

Um zu analysieren, ob eines oder mehrere dieser Lysine in PELP1 sumoyliert werden, wurde ein jedes zu einem Arginin mutiert. Anschließend wurde in einem *in vitro*-Sumoylierungsexperiment untersucht, ob die jeweilige PELP1-Variante noch mit SUMO modifiziert werden kann. Dabei zeigte sich nur nach Mutation des Lysins an Position 826 sowohl in Ansätzen mit SUMO1 als auch mit SUMO2 eine starke Abschwächung der höhermolekularen PELP1-SUMO-Bande (Abb. 28A). Die Mutation der beiden Lysine 770 und 826, die ebenfalls in  $\Psi$ KXE-Motiven von PELP1 gefunden wurden, führte jedoch zu keiner wesentlichen Änderung des Sumoylierungsstatus von PELP1 (Daten nicht gezeigt).



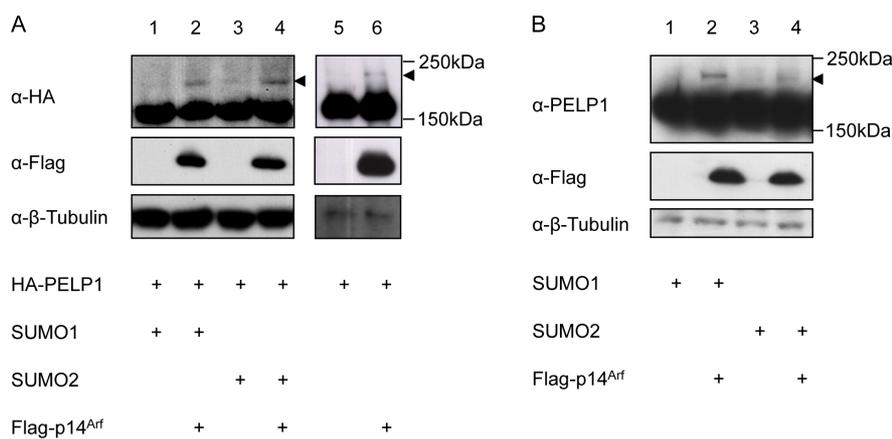
### Abb. 28 PELP1 wird hauptsächlich an Lysin 826 sumoyliert

(A) PELP1 bzw. PELP1<sup>K826R</sup> wurde durch *in vitro*-Transkription und -Translation hergestellt und in Anwesenheit von E1, E2, ATP und SUMO1 bzw. SUMO2 sumoyliert. In den Kontrollreaktionen (Spuren 1 und 4) wurde SUMO nicht hinzugefügt. (B) HA-PELP1 oder HA-PELP1<sup>K826R</sup> wurde in Anwesenheit von SUMO1 oder SUMO2 in HeLa-Zellen exprimiert. Die Expression der jeweiligen Proteine wurde nach Auftrennung über SDS-PAGE in einem Western Blot analysiert. Die Detektion von β-Tubulin diente als Ladekontrolle. Pfeile kennzeichnen PELP1-SUMO-Konjugate.

Um zu untersuchen, ob Lysin 826 auch *in vivo* als Sumoylierungsstelle fungiert, wurde der Sumoylierungsstatus von Wildtyp-PELP1 oder PELP1<sup>K826R</sup> nach Expression in HeLa-Zellen in einer Western-Blot-Analyse untersucht. Wie aus Abb. 28B hervorgeht, wird das Signal für die höhermolekularen PELP1-SUMO1- und PELP1-SUMO2-Konjugate (Spuren 1 und 2) nach Mutation des Lysins 826 deutlich schwächer (Spuren 3 und 4). Aus diesen *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen lässt sich folgern, dass das Lysin an Position 826 die Haupt-Sumoylierungsstelle von PELP1 ist.

### 3.4.4 Die Sumoylierung von PELP1 wird durch p14<sup>ARF</sup> stimuliert

Verschiedene Arbeiten zeigen, dass der Tumorsuppressor ARF als Gegenspieler von SENP3 fungiert, indem er möglicherweise die Stabilität der SUMO-Isopeptidase reguliert (Haindl *et al.*, 2008; Kuo *et al.*, 2008). Deshalb wurde die mögliche Rolle von p14<sup>ARF</sup> bei der Sumoylierung von PELP1 untersucht. Dazu wurde mit einem HA-Epitop versehenes PELP1 zusammen mit Flag-markiertem p14<sup>ARF</sup> in HeLa-Zellen exprimiert. Wie in Abb. 29A, Spur 6 zu sehen ist, führt die Expression von p14<sup>ARF</sup> zu einem deutlichen Anstieg der Sumoylierung von PELP1. Die zusätzliche Expression von SUMO1 oder SUMO2 verstärkt die Modifikation (Abb. 29A, Spuren 2 und 4). Auch die SUMO-Konjugation von endogenem PELP1 wird durch die Expression von p14<sup>ARF</sup> stimuliert (Abb. 29B, Spuren 2 und 4). Diese Beobachtungen lassen schließen, dass PELP1 ein Substrat der von p14<sup>ARF</sup> hervorgerufenen Sumoylierung ist.

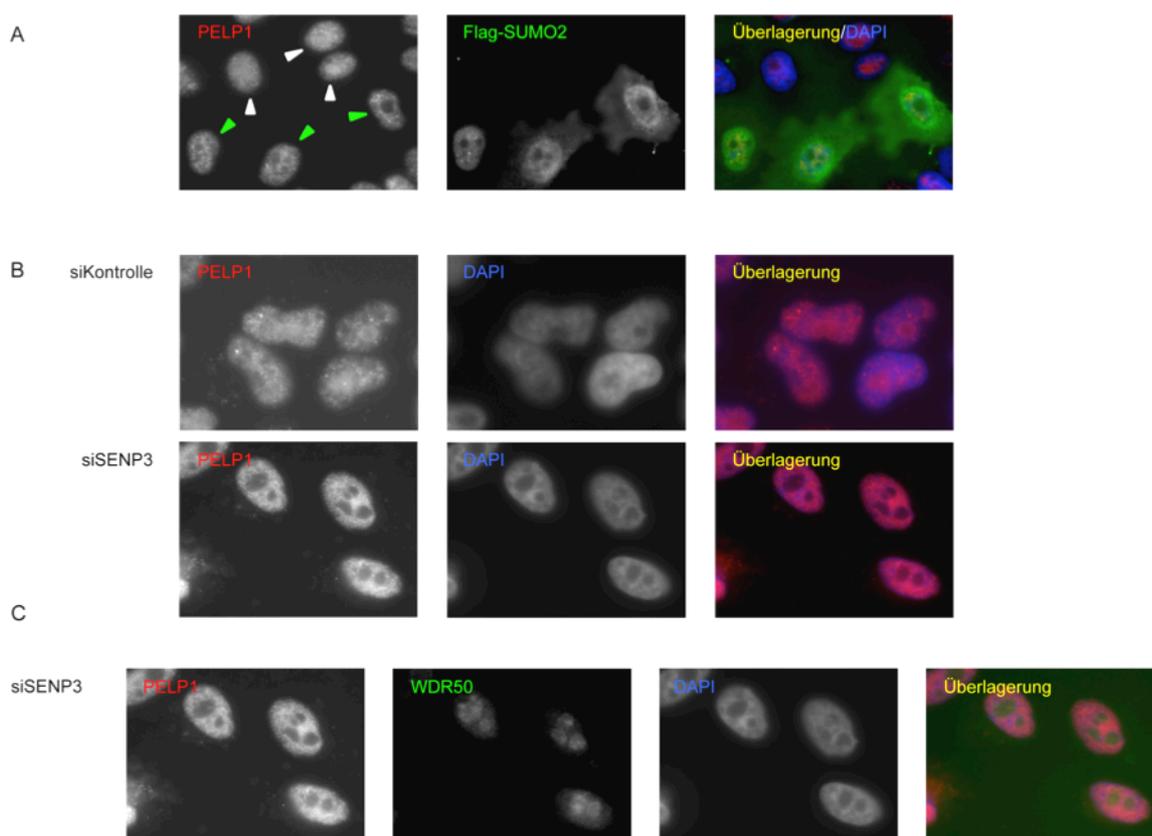


**Abb. 29 p14<sup>ARF</sup> induziert die Sumoylierung von PELP1**  
**(A, B)** Flag-p14<sup>ARF</sup> und SUMO wurden in HeLa-Zellen exprimiert, und die SUMO-Modifikation von exogenem HA-PELP1 bzw. endogenem PELP1 wurde in einem Western Blot mit anti-HA- oder anti-PELP1-Antikörpern wie angegeben untersucht. Pfeile kennzeichnen PELP1-SUMO-Konjugate.

### 3.5 Die nukleoläre Lokalisierung von PELP1 wird durch das SUMO-System kontrolliert

#### 3.5.1 Verstärkte Sumoylierung verhindert die nukleoläre Lokalisierung von PELP1

Die oben beschriebenen Ergebnisse identifizieren PELP1 als SENP3-sensitives Substrat von SUMO. Da SUMO in vielen Fällen für die Verteilung von Proteinen innerhalb der Zelle verantwortlich ist (Heun, 2007), sollte nun untersucht werden, ob sich eine Veränderung des zellulären Sumoylierungsstatus auf die subnukleäre Verteilung von PELP1 und seinen assoziierten Proteinen auswirkt. Dazu wurde zunächst ein mit einem Flag-Epitop versehenes SUMO2 in HeLa-Zellen exprimiert. Danach wurde die Lokalisierung von PELP1 in SUMO2-transfizierten mit der in untransfizierten Zellen mittels Immunfluoreszenz verglichen (Abb. 30A). SUMO2 lokalisiert wie beschrieben im Nukleoplasma, zeigt jedoch kein nukleoläres Signal (Ayaydin und Dasso, 2004) (Abb. 30A, zweites Feld). Interessanterweise ergab sich für die subzelluläre Verteilung von PELP1, dass es in SUMO2-positiven Zellen ebenfalls völlig von den Nukleoli ausgeschlossen ist und im Nukleoplasma akkumuliert. Damit unterscheidet sich die Lokalisierung drastisch von benachbarten Zellen, die SUMO2 nicht exprimieren und das typische Lokalisierungsmuster von PELP1 mit einer nukleolären und nukleoplasmatischen Verteilung aufweisen (Abb. 30A, erstes Feld).



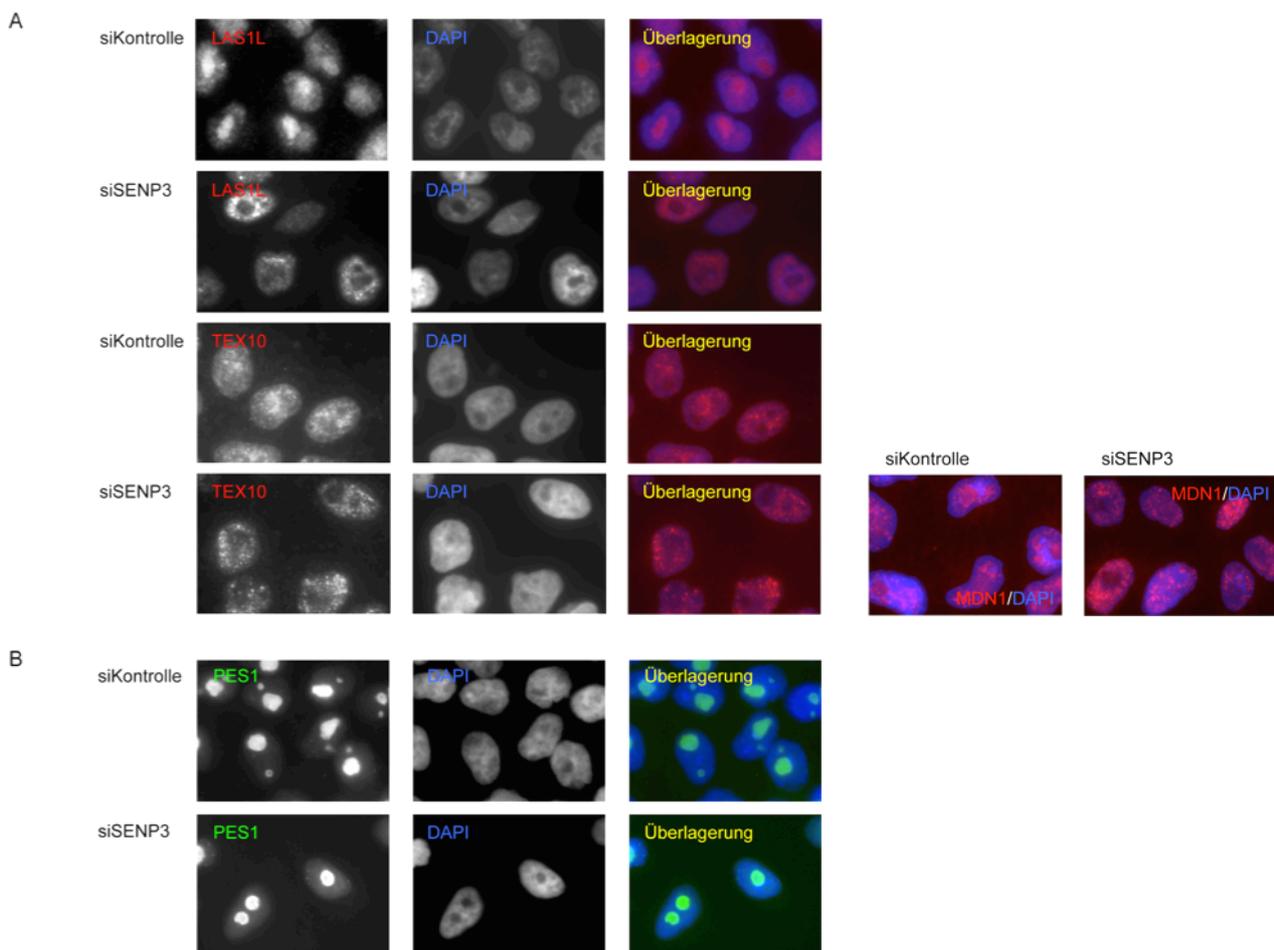
**Abb. 30 PELP1 lokalisiert nach gesteigerter Sumoylierung verstärkt im Nukleoplasma**

(A) HeLa-Zellen wurden mit Flag-SUMO2 transient transfiziert. Flag-SUMO2-exprimierende Zellen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Die Lokalisierung von endogenem PELP1 wurde in Flag-SUMO2-positiven (grüne Pfeile) oder untransfizierten Zellen (weiße Pfeile) mit einem anti-PELP1-Antikörper untersucht. (B, C) HeLa-Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA gegen Luciferase oder mit einer siRNA gegen SENP3 transfiziert, und die Lokalisierung von endogenem PELP1 bzw. WDR50 wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung der entsprechenden Antikörper analysiert.

In weiteren Experimenten wurde die Lokalisierung von PELP1 nach Depletion von SENP3 untersucht, da das Fehlen von SENP3 ebenfalls zur Steigerung des zellulären Sumoylierungsstatus führt. Auch die Abwesenheit von SENP3 hat eine Verschiebung der Lokalisierung von PELP1 aus dem Nukleolus ins Nukleoplasma zur Folge (Abb. 30B). Diese Daten sprechen dafür, dass die nukleoläre Lokalisierung von PELP1 durch gesteigerte Sumoylierung unterbunden wird, und umgekehrt die Desumoylierung durch SENP3 für die nukleoläre Verteilung von PELP1 wichtig ist. Um auszuschließen, dass die Depletion von SENP3 die Integrität des Nukleolus generell beeinträchtigt, wurde die Verteilung des nukleolären 18S-rRNA-Prozessierungsfaktors WDR50/hUTP18 in Abwesenheit von SENP3 untersucht (Abb. 30C). In diesem Fall hatte das Fehlen von SENP3 keinen Einfluss auf die Lokalisierung, was dafür spricht, dass die Nukleoli unter diesen Bedingungen intakt bleiben.

### 3.5.2 TEX10, LAS1L und MDN1 sind nach Verlust von SENP3 weitgehend aus dem Nukleolus ausgeschlossen

Nach der Analyse der Verteilung von PELP1 innerhalb der Zelle sollte nun auch die Lokalisierung der PELP1-assoziierten Komponenten LAS1L, TEX10 und MDN1 nach Depletion von SENP3 mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht werden. Hier zeigte sich eine ganz ähnliche Änderung des subzellulären Verteilungsmusters wie für PELP1 (Abb. 31A): Im Vergleich zu Kontrollzellen ist das nukleoläre Signal von LAS1L, TEX10 und MDN1 sehr stark reduziert. PES1, das als Komponente des PeBoW-Komplexes ebenfalls an der Reifung der 60S ribosomalen Untereinheit beteiligt ist, zeigt dagegen auch in der Abwesenheit von SENP3 eine nukleoläre Lokalisierung (Abb. 31B). Dies belegt, dass SENP3 nicht generell die nukleoläre Anreicherung von Faktoren der Reifung der 60S ribosomalen Untereinheit bestimmt.

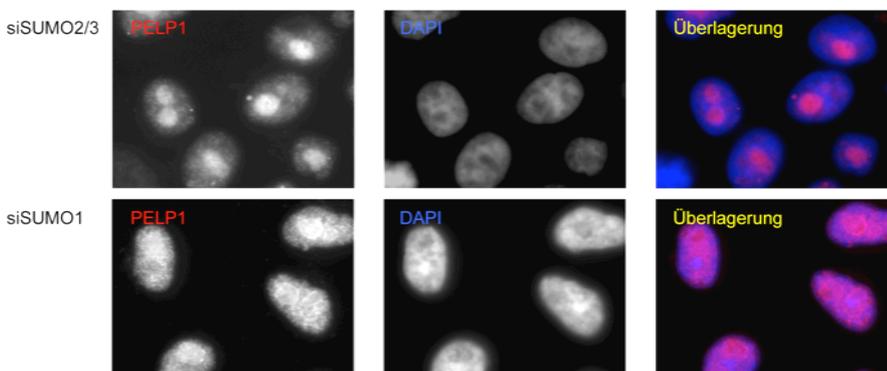


**Abb. 31 LAS1L, TEX10 und MDN1 zeigen nach Depletion von SENP3 eine verstärkte nukleoplasmatische Lokalisierung**

(A, B) HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert. Die subzelluläre Lokalisierung von endogenem TEX10, LAS1L, PES1 bzw. MDN1 wurde anhand immunologischer Färbung mit den entsprechenden Antikörpern analysiert. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

### 3.5.3 SUMO2/3 reguliert die subnukleäre Verteilung von PELP1

Um zu untersuchen, welche SUMO-Variante die Lokalisierung von PELP1 kontrolliert, wurden HeLa-Zellen mit siRNA-Oligonukleotiden, die gegen SUMO1 oder SUMO2/3 gerichtet sind, transfiziert. Anschließend wurde die Lokalisierung von PELP1 untersucht. Wie aus Abb. 32 (obere Reihe) ersichtlich wird, führt eine Depletion von SUMO2/3 zu einer drastisch verstärkten Anreicherung von PELP1 im Nukleolus verglichen mit Kontrollzellen (Abb. 30B, obere Reihe). Die Depletion von SUMO1 dagegen verändert die Verteilung von PELP1 nicht wesentlich (Abb. 32, untere Reihe). Diese Ergebnisse belegen, dass das Gleichgewicht von Sumoylierung und Desumoylierung die subnukleäre Lokalisierung von PELP1 bestimmt und zeigen, dass hierbei insbesondere SUMO2/3 erforderlich ist.



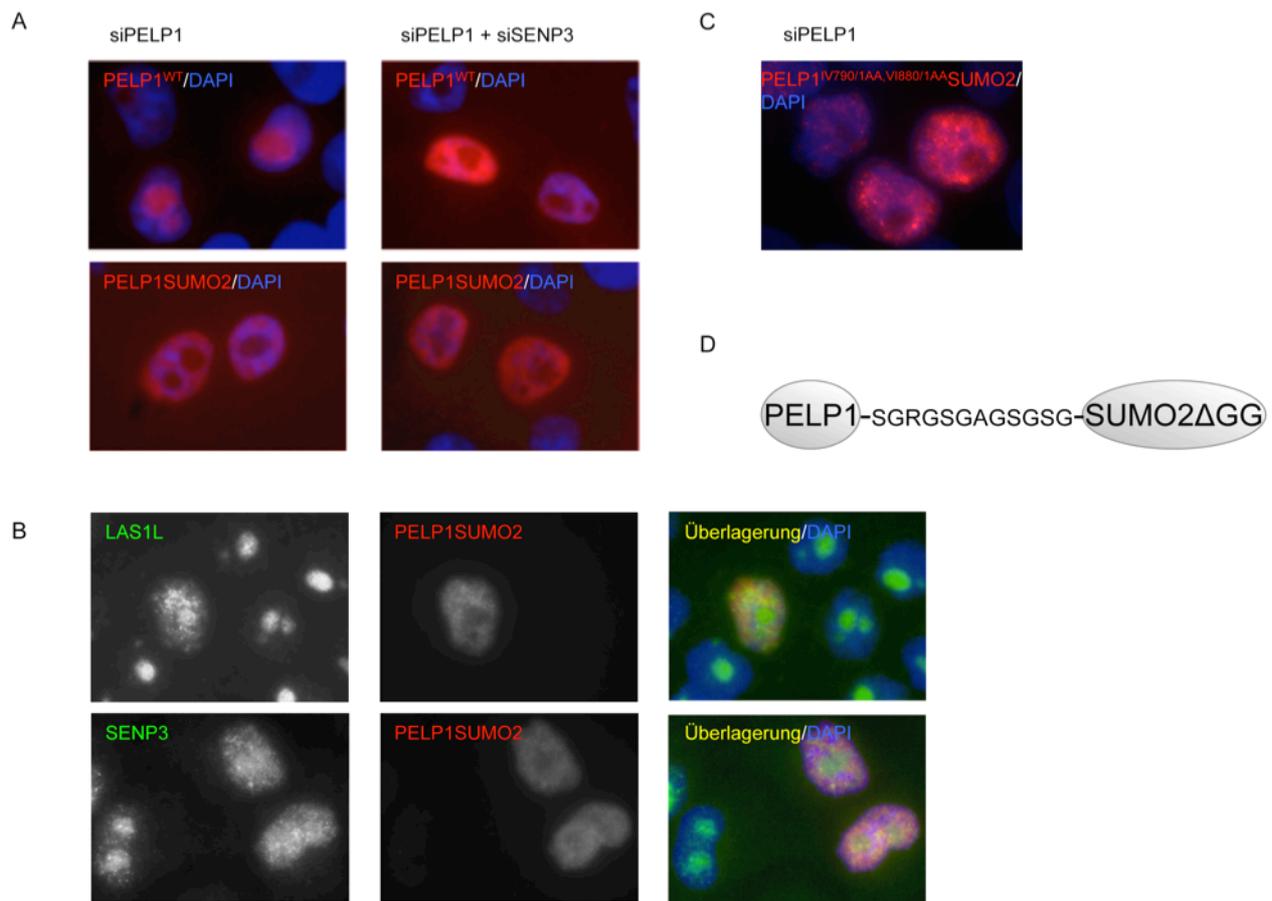
**Abb. 32 PELP1 akkumuliert im Nukleolus nach Depletion von SUMO2/3**

HeLa-Zellen wurden mit siRNA-Oligonukleotiden gegen SUMO1 bzw. SUMO2/3 transfiziert. Über indirekte Immunfluoreszenz wurde die Lokalisierung von PELP1 mit einem anti-PELP1-Antikörper untersucht. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

### 3.5.4 Die Modifikation von PELP1 durch SUMO bestimmt dessen subnukleäre Lokalisierung

Trotz der beobachteten Korrelation zwischen zellulärem Sumoylierungsstatus und Veränderungen der PELP1-Verteilung innerhalb des Zellkerns lassen die bisherigen Ergebnisse offen, ob die beobachtete Änderung der Lokalisierung von PELP1 eine direkte Konsequenz der Modifikation von PELP1 ist. Zur Klärung dieser Frage wurde SUMO2 linear an den C-Terminus von PELP1 fusioniert, um die konstitutive Sumoylierung nachzuahmen (Abb. 33D). Anschließend wurden HeLa-Zellen von endogenem PELP1 depletiert, durch PELP1-SUMO2 oder Wildtyp-PELP1 ersetzt, und die Lokalisierung der Proteine wurde untersucht. Wie endogenes PELP1 lokalisiert ektopisch exprimiertes PELP1 vorwiegend im Nukleolus. Sobald jedoch die SENP3-Expression herunterreguliert wird, verschiebt sich die Lokalisierung von PELP1 vom Nukleolus ins Nukleoplasma (Abb. 33A, obere Felder). Für die PELP1-SUMO2-Variante jedoch zeigt sich eine extranukleoläre Lokalisierung im Nukleoplasma bereits ohne Depletion von SENP3 (Abb. 33A, untere Felder).

Außerdem konnte festgestellt werden, dass PELP1-assoziierte Faktoren wie LAS1L und SENP3 in Anwesenheit der konstitutiv sumoylierten PELP1-Variante auch vom Nukleolus ins Nukleoplasma verlagert wurden (Abb. 33B).



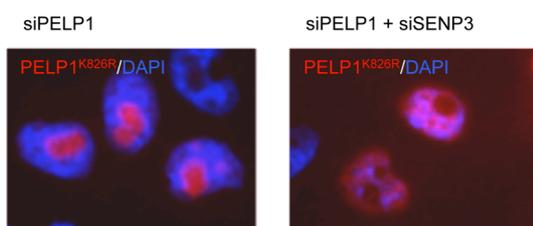
**Abb. 33 Die lineare PELP1-SUMO2-Fusion lokalisiert im Nukleoplasma**

(A) Das Expressionsniveau von endogenem PELP1 wurde in HeLa-Zellen mit Hilfe einer siRNA gegen PELP1 herunterreguliert. Die Zellen wurden mit siRNA-resistenten PELP1-Plasmiden, die entweder für den HA-markierten PELP1-Wildtyp oder eine mit einem Flag-Epitop versehene PELP1-SUMO2-Fusion kodierten, transfiziert. Die Lokalisierung der entsprechenden Proteine nach PELP1- bzw. PELP1- und SENP3-Depletion wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Benutzung von anti-HA- bzw. anti-Flag-Antikörpern analysiert. (B) Die Lokalisierung von LAS1L oder SENP3 wurde in HeLa-Zellen, die die PELP1-SUMO2-Fusion exprimierten, untersucht. Indirekte Immunfluoreszenz wurde mit LAS1L- bzw. SENP3-Antikörpern durchgeführt. (C) HeLa-Zellen wurden nach PELP1-Depletion mit einer siRNA-resistenten Variante von PELP1<sup>IV790/1AA, V1880/1AA</sup>-SUMO2 transfiziert. Mittels indirekter Immunfluoreszenz unter der Verwendung eines anti-Flag-Antikörpers wurde deren Lokalisierung detektiert. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. (D) Schematische Darstellung der PELP1-SUMO2-Fusion.

Ein PELP1-SUMO2-Fusionsprotein, das zusätzlich Mutationen im hydrophoben Bereich beider SIMs trug, zeigt ein ganz ähnliches Lokalisierungsmuster wie die unmutierte PELP1-SUMO2-Fusion: Auch dieses Protein wird vorwiegend im Nukleoplasma detektiert (Abb. 33C). Dies weist darauf hin, dass die kovalente Bindung von SUMO2 an PELP1 dessen subnukleäre Verteilung bestimmt.

### 3.5.5 Das PELP1-assoziierte Protein LAS1L wird ebenfalls von SUMO modifiziert

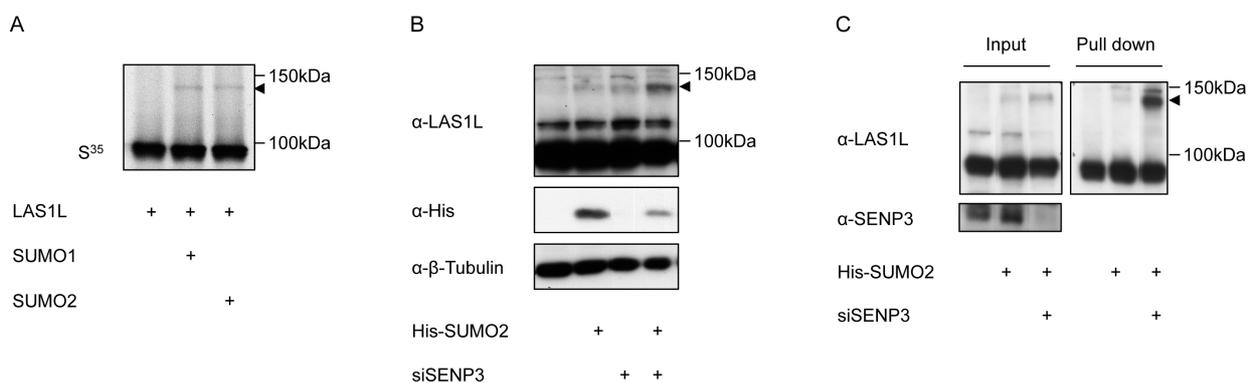
Eine weitere Frage war, ob PELP1 das alleinige kritische Zielprotein von SUMO bei der SENP3-regulierten subzellulären Verteilung des PELP1-TEX10-WDR18-Komplexes und der assoziierten Proteine LAS1L und MDN1 ist. Um dies zu untersuchen, wurde die Lokalisierung von PELP1<sup>K826R</sup>, bei dem die Hauptsumoylierungsstelle mutiert ist, in Abwesenheit von SENP3 untersucht. Immunfluoreszenzanalysen zeigen, dass PELP1<sup>K826R</sup> wie das PELP1-Wildtyp-Protein (Abb. 33A) nach SENP3-Depletion vorwiegend im Nukleoplasma zu finden ist (Abb. 34).



**Abb. 34 PELP1<sup>K826R</sup> ist nach SENP3-Depletion weitgehend aus den Nukleoli ausgeschlossen**

HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen siRNA-Oligonukleotiden und PELP1<sup>K826R</sup> transfiziert. In indirekten Immunfluoreszenzanalysen wurde dessen subzelluläre Lokalisierung mit einem anti-HA-Antikörper detektiert. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

Eine Erklärung für dieses Ergebnis wäre, dass eine Mutation im Lysin 826 von PELP1 dessen Sumoylierung nicht vollständig unterbindet. Dies stünde im Einklang mit den *in vivo*-Sumoylierungsdaten (Abb. 28B), wo in den Spuren 3 und 4 noch eine schwache höhermolekulare Bande sichtbar ist. Allerdings scheint es eher unwahrscheinlich, dass dieses geringe Ausmaß an Modifikation die beobachteten Effekte vermitteln kann. Eine zweite Erklärung wäre, dass es neben PELP1 noch weitere SENP3-abhängige SUMO2/3-Substrate gibt, die mit PELP1 assoziiert sind. Mit dieser Hypothese stimmt die Beobachtung überein, dass der PELP1-Interaktor LAS1L sumoyliert wird. Dies konnte zunächst in einem *in vitro*-Sumoylierungsexperiment für <sup>35</sup>S-markiertes LAS1L, das durch *in vitro*-Transkription und -Translation hergestellt worden war, mit SUMO1 und SUMO2 gezeigt werden (Abb. 35A). Darüberhinaus wird LAS1L auch *in vivo* mit SUMO2 modifiziert (Abb. 35B, C). Eine modifizierte LAS1L-Form wird nach Depletion von SENP3 verstärkt (Abb. 35B, Spuren 3 und 4). Dass es sich hierbei um eine SUMO-Modifikation handelt, konnte nach Transfektion einer His<sub>6</sub>-markierten SUMO2-Form durch Aufreinigung von His<sub>6</sub>-SUMO-Konjugaten unter denaturierenden Bedingungen im Western Blot mit einem anti-LAS1L-Antikörper bestätigt werden (Abb. 35C). Diese Ergebnisse zeigen, dass neben PELP1 mit LAS1L mindestens ein zweites Protein des Proteinkomplexes von SUMO modifiziert wird, und SENP3 als demodifizierendes Enzym den Sumoylierungsstatus reguliert. Diese Daten sprechen deshalb dafür, dass SENP3 die subnukleäre Verteilung dieses Ribosomenbiogenese-Komplexes durch die Desumoylierung mehrerer Komponenten reguliert.



**Abb. 35 LAS1L ist ein SENP3-sensitives SUMO-Substrat**

(A) LAS1L wurde durch *in vitro*-Transkription und -Translation hergestellt und mit rekombinanten E1- und E2-Enzymen und SUMO1 bzw. SUMO2 in Anwesenheit von ATP inkubiert. Der Kontrollreaktionsansatz (Spur 1) wurde ohne SUMO durchgeführt. (B) HeLa-Zellen wurden mit siRNA-Oligonukleotiden und Plasmiden wie angegeben transfiziert. Die Expression der entsprechenden Proteine wurde in einer Western-Blot-Analyse überprüft. Die Detektion von  $\beta$ -Tubulin diente als Ladekontrolle. (C) HeLa-Zellen wurden mit siRNAs und Plasmiden wie aufgeführt transfiziert. His-SUMO2-Konjugate wurden unter denaturierenden Bedingungen an magnetische NiNTA-Kügelchen gebunden und nach Auftrennung über SDS-PAGE in einem Western Blot unter Benutzung eines anti-LAS1L-Antikörpers untersucht.

## 4 Diskussion

Die Ribosomenbiogenese in Eukaryoten ist ein äußerst energieaufwändiger Prozess, dessen exakte Regulation das zeitlich und räumlich koordinierte Zusammenwirken einer Vielzahl von Proteinen erfordert. Nur durch dieses präzise Zusammenspiel kann letztlich die Proteinsynthese einer Zelle gewährleistet werden. In der vorliegenden Arbeit konnte ein neuer Proteinkomplex identifiziert werden, der mit der nukleolären SUMO-spezifischen Isopeptidase SENP3 assoziiert ist und wie SENP3 an der Biogenese der großen ribosomalen Untereinheit in Säugerzellen beteiligt ist. Dieser Komplex setzt sich aus den Proteinen PELP1, TEX10 und WDR18 zusammen und ist mit zwei weiteren Faktoren, MDN1 und LAS1L, assoziiert. PELP1 und LAS1L wurden als SENP3-sensitive SUMO-Substrate identifiziert, und es konnte gezeigt werden, dass die subzelluläre Verteilung des PELP1-TEX10-WDR18-Komplexes durch das Gleichgewicht von SUMO-Modifikation und -Demodifikation bestimmt wird.

### 4.1 Der PELP1-TEX10-WDR18-Komplex ist an der Ribosomenbiogenese beteiligt

Im Zuge dieser Arbeit konnten die Proteine PELP1, TEX10 und WDR18 mittels Affinitätsreinigung und anschließender massenspektrometrischer Analyse als Bindungspartner der SUMO-spezifischen Isopeptidase SENP3 identifiziert werden. Eine vergleichende Sequenzanalyse ergab, dass PELP1, TEX10 und WDR18 Ähnlichkeiten zu den Proteinen Rix1, Ipi1 bzw. Ipi3 aus der Hefe *S. cerevisiae* aufweisen, die zusammen einen Subkomplex der prä-60S ribosomalen Partikel bilden (Galani *et al.*, 2004; Krogan *et al.*, 2004; Nissan *et al.*, 2004). Obwohl die Homologie zwischen den entsprechenden Proteinen von Mensch und Hefe insgesamt begrenzt ist, konnten konservierte Regionen und Domänen identifiziert werden. Neben den Proteinen aus Hefe existieren auch Proteine in anderen Spezies, die konservierte Bereiche zu den humanen Proteinen aufweisen. Im Zebrafisch z. B. finden sich Homologe zu PELP1, TEX10 und WDR18, in *Drosophila melanogaster* zu TEX10 und WDR18, und in *C. elegans* existiert ein zu WDR18 orthologes Protein.

Die in der massenspektrometrischen Analyse beobachtete Bindung von PELP1, TEX10 und WDR18 an SENP3 wurde zunächst in Koimmunpräzipitationsexperimenten bestätigt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass PELP1, TEX10 und WDR18 auch untereinander interagieren und somit einen Proteinkomplex bilden. Wie diese Proteine jedoch innerhalb des Komplexes genau angeordnet sind und über welche Domänen sie

miteinander interagieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit noch nicht detailliert untersucht. Um dies zu klären, könnten Deletionsmutanten einzelner Komponenten hergestellt werden und deren Bindungsverhalten – idealerweise bei gleichzeitiger Depletion der jeweiligen endogenen Proteine – in Koimmunpräzipitationsexperimenten analysiert werden.

Dem Rix1/Ipi-Komplex und dessen assoziierter AAA-ATPase Rea1 wurde eine Funktion bei der Reifung der großen ribosomalen Untereinheit zugewiesen. Krogan und Kollegen zeigten, dass dieser Komplex für die Prozessierung des primären rRNA-Transkripts innerhalb der ITS2-Region benötigt wird. Diese Region trennt die Sequenz, die für die 25S rRNA (28S in Säugern) kodiert, von der 5,8S Region innerhalb des 27S-Vorläufers (32S in Säugern) (Krogan *et al.*, 2004). Die Spaltungsreaktion innerhalb der ITS2-Sequenz findet vorwiegend in der GC-Region des Nukleolus statt und führt zur Bildung der reifen 25S rRNA und einer 7S-rRNA-Zwischenstufe (12S in Säugern), deren Enden dann im Nukleoplasma durch das Exosom gekürzt werden, so dass die reife 5,8S rRNA entsteht.

Wird nun eine Komponente des Proteinkomplexes aus Rix1, Ipi1 und Ipi3 herunterreguliert, führt dies zu einer Abnahme der reifen 25S- und 5,8S-rRNA-Formen und gleichzeitig zu einer Anreicherung der entsprechenden Vorläufer, der 27S- und 7S-prä-rRNAs. Dies lässt darauf schließen, dass der Rix1/Ipi-Komplex sowohl an den nukleolären als auch an den nukleoplasmatischen Schritten der ITS2-Spaltung beteiligt ist (Wu *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2003; Krogan *et al.*, 2004).

Die Arbeitsgruppe um E. Hurt dagegen schlussfolgerte aus ihren Ergebnissen, dass der Proteinkomplex aus Rix1, Ipi1 und Ipi3, sowie dessen assoziierte AAA-ATPase Rea1 vorwiegend bei den extranukleolären Schritten der Ribosomenassemblierung eine Rolle spielt. Diese Proteine werden dabei spezifisch für die nukleoplasmatischen Prozessierungsschritte der 7S prä-rRNA und den nukleären Export des späten prä-60S-Partikels ins Cytoplasma benötigt (Galani *et al.*, 2004; Ulbrich *et al.*, 2009). In einer neueren Arbeit jedoch zeigt diese Arbeitsgruppe auch, dass zumindest Rea1 an mehreren Schritten der Ribosomenbiogenese beteiligt ist und auch für den Export des frühen prä-60S-Partikels aus dem Nukleolus ins Nukleoplasma mitverantwortlich ist (Bassler *et al.*, 2010).

Daten der vorliegenden Arbeit belegen, dass in humanen Zellen PELP1, TEX10 und WDR18 sowie MDN1, das humane Homolog von Rea1, an den nukleolären Schritten der prä-60S-Reifung beteiligt sind. Die Depletion jeder einzelnen Komponente dieses Proteinkomplexes beeinträchtigt die Prozessierung der 32S rRNA und verhindert gleichzeitig den nukleolären Export der prä-60S-Partikel. Neben MDN1 ist PELP1 mit dem erst kürzlich charakterisierten 32S-rRNA-Prozessierungsfaktor LAS1L assoziiert, was ein

weitere Anzeichen für eine Beteiligung des Proteinkomplexes aus PELP1, TEX10 und WDR18 an den nukleolären Reifungsschritten der 28S rRNA ist (Castle *et al.*, 2010). In Übereinstimmung hiermit wurde zumindest eine Fraktion jeder Komponente im Nukleolus gefunden, was wiederum von systemweiten massenspektrometrischen Analysen des Nukleolusproteoms untermauert wird (Andersen *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2009; Boisvert *et al.*, 2010) (siehe auch: <http://lamondlab.com/NOPdb>). Die detaillierte Untersuchung mittels Immunfluoreszenz zeigt eine Lokalisierung von PELP1 in der GC-Region des Nukleolus, was ebenfalls im Einklang mit einer Funktion bei der 32S-rRNA-Prozessierung ist.

Einen weiteren Hinweis für eine direkte Beteiligung von PELP1, TEX10 und WDR18 an der 28S-Reifung liefern die RNA-Immunpräzipitationsexperimente, die eine Bindung von PELP1 an ITS2-enhaltende 28S-rRNA-Vorläufer zeigen. Die Bindung des Proteinkomplexes an rRNA könnte möglicherweise von PELP1 selbst über dessen Zinkfingerdomäne vermittelt werden (Vadlamudi und Kumar, 2007), die dafür bekannt ist, mit DNA, aber auch mit RNA zu interagieren. Interessanterweise besitzt auch TEX10 eine putative RNA-Bindedomäne. In diesem Fall handelt es sich dabei um ein sogenanntes *HEAT repeat*, das auch für einige andere rRNA-Prozessierungsfaktoren charakteristisch ist (Dez *et al.*, 2007). RNA-Immunpräzipitationsexperimente mit PELP1- und TEX10-Varianten, in denen diese Domänen mutiert sind oder fehlen, könnten Aufschluss über eine Beteiligung dieser Regionen an der rRNA-Bindung des Proteinkomplexes geben.

Die Anreicherung von präribosomalen Partikeln mittels Sucrose-Gradienten-Zentrifugation zeigt darüber hinaus, dass PELP1 sowie TEX10 und WDR18 mit prä-60S-Partikeln kosedimentieren, in denen sich auch Komponenten des PeBoW-Komplexes finden. SENP3 ist ebenfalls mit diesen 60S-Vorläuferkomplexen assoziiert, zeigt aber auch eine Assoziation mit der kleinen ribosomalen Untereinheit (s. Abb. 24).

Zusammengenommen unterstreichen diese Ergebnisse die Rolle des PELP1-TEX10-WDR18-Komplexes und von SENP3 bei der Biogenese der großen ribosomalen Untereinheit. Die Anwesenheit von SENP3 in 40S-Vorläuferkomplexen spricht darüber hinaus für eine mögliche Beteiligung von SENP3 an der Reifung der kleinen Untereinheit. Passend dazu fanden Panse und Kollegen heraus, dass in der Bäckerhefe sowohl 40S- als auch 60S-präribosomale Partikel mit SUMO modifiziert werden (Panse *et al.*, 2006). Somit könnte SENP3 auch in höheren Eukaryoten für die Desumoylierung beider Partikel zuständig sein.

Eine über die 60S-Biogenese hinausgehende Rolle von SENP3 könnte auch den spezifischen Phänotyp der SENP3-depletierten Zellen erklären, der sich vom Phänotyp

unterscheidet, der nach Depletion von PELP1, TEX10, WDR18 oder MDN1 beobachtet wird (s. Abb. 25). Nach längerfristiger Depletion von SENP3 sind die Nukleoli in den SENP3-depletierten Zellen nicht nur größer als unter Kontrollbedingungen, sondern zeigen auch nicht mehr die typische abgerundete Form. Stattdessen scheint ihre Struktur beschädigt. Dieser verstärkte Effekt auf die Morphologie der Nukleoli nach einer Depletion von SENP3 könnte möglicherweise durch seine Rolle bei der Reifung beider ribosomaler Untereinheiten erklärt werden.

Zusammengefasst deuten diese Daten auf eine evolutionär konservierte Funktion des Proteinkomplexes aus PELP1, TEX10 und WDR18 aus höheren Eukaryoten und des Rix1/Ipi-Komplexes aus der Bäckerhefe bei der Prozessierung der ITS2-Sequenz und der Reifung der großen ribosomalen Untereinheit hin. Allerdings scheint der Proteinkomplex aus Säugern hauptsächlich an den nukleolären Schritten der Prozessierung beteiligt zu sein. Wie genau der Komplex aus PELP1, TEX10 und WDR18 die 32S-rRNA-Prozessierung vermittelt, ist unklar. Da keine der Komplexkomponenten eine Nukleasedomäne aufweist, ist es eher unwahrscheinlich, dass dem Proteinkomplex eine direkte Funktion bei der Spaltung der rRNA zukommt. Eher dürften die Komplexkomponenten als Gerüstproteine fungieren, die die Bindung einer (noch nicht identifizierten) Endonuklease an die Nukleinsäure ermöglichen.

#### **4.2 SENP3 kontrolliert die subzelluläre Verteilung des PELP1-TEX10-WDR18-Komplexes**

Für PELP1 konnte in *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten gezeigt werden, dass es mit SUMO modifiziert wird, und dass die SUMO-Isopeptidase SENP3 die Desumoylierung katalysiert. Interessant ist vor allem die Beobachtung, dass eine verstärkte Sumoylierung durch Expression von exogenem SUMO oder durch Depletion von SENP3 den Ausschluss von PELP1 und von PELP1-assoziierten Proteinen aus dem Nukleolus mit gleichzeitiger Verlagerung ins Nukleoplasma zur Folge hat.

Umgekehrt führt eine Abnahme des zellulären SUMO-Niveaus zur Anreicherung von PELP1 im Nukleolus. Dies konnte allerdings nur für eine Depletion von SUMO2 und -3 und nicht für SUMO1 gezeigt werden (siehe Abb. 32). Diese Beobachtung ist im Einklang mit den Ergebnissen aus den *in vivo*-Sumoylierungsexperimenten (siehe Abb. 27C), denn auch hier scheinen SUMO2 und -3 die SUMO-Varianten zu sein, die für die Modifikation von PELP1 wichtig sind.

Diese Daten deuten also insgesamt darauf hin, dass das Gleichgewicht zwischen SUMO-Modifikation und -Demodifikation die räumliche Verteilung des PELP1-TEX10-

WDR18-Komplexes und dessen assoziierter Faktoren MDN1 und LAS1L reguliert. Da eine lineare Fusion zwischen PELP1 und SUMO2 alleine ebenfalls zu einer Lokalisierungsverschiebung von PELP1 und seinen Bindungspartnern vom Nukleolus ins Nukleoplasma führt, kann die Kompartimentierung direkt über den Sumoylierungsstatus von PELP1 kontrolliert werden.

Allerdings zeigt auch eine PELP1-Mutante, bei der die Hauptsumoylierungsstelle ausgetauscht wurde (PELP1<sup>K826R</sup>), nach einer Depletion von SENP3 eine extranukleoläre Verteilung. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass SENP3 die nukleoläre Verteilung des Proteinkomplexes nicht ausschließlich durch Desumoylierung von PELP1 steuert, sondern dass zusätzlich andere SENP3-sensitive SUMO-Substrate im beschriebenen Komplex zu finden sind. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte neben PELP1 auch LAS1L als weiteres SENP3-sensitives SUMO-Substrat identifiziert werden. Ein möglicher experimenteller Ansatz, der diese Hypothese weiter untermauern könnte, wäre z. B. die Untersuchung der Lokalisierung von PELP1<sup>K826R</sup> in Abwesenheit von SENP3 und bei gleichzeitiger Depletion von LAS1L. Außerdem könnte das Lokalisierungsverhalten von PELP1 und anderen Komponenten des Proteinkomplexes im Kontext eines LAS1L-SUMO-Fusionsproteins analysiert werden.

Um direkt die Auswirkung des SUMO-vermittelten nukleolären Ausschlusses auf die 60S-Reifung zu untersuchen, könnte man in Rpl27-exprimierenden Zellen testen, ob ein PELP1-SUMO2-Fusionsprotein in der Lage ist, den durch Depletion von endogenem PELP1 verursachten 60S-Reifungsdefekt zu komplementieren.

### 4.3 PELP1 als wichtiges Zielprotein von ARF

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit eine Verstärkung der Sumoylierung von PELP1 durch Expression des Tumorsuppressors p14<sup>ARF</sup> beobachtet werden. p14<sup>ARF</sup> lokalisiert im Nukleolus und ist ein wichtiger negativer Regulator des Zellzyklus (Sherr, 2006). p14<sup>ARF</sup> wird durch onkogene Stimuli oder im Verlauf der replikativen Seneszenz transkriptionell aktiviert und verhindert als Bestandteil eines zellulären Sicherheitssystems die unkontrollierte Zellproliferation. p14<sup>ARF</sup> unterbindet das Voranschreiten des Zellzyklus über zwei unterschiedliche Wege. Zum einen vermittelt es die Stabilisierung von p53, indem es die Ubiquitin-Ligase MDM2 inhibiert, so dass p53 nicht mehr abgebaut werden kann. Dies hat einen Zellzyklusarrest oder die Apoptose der Zelle zur Folge. Zum anderen besitzt p14<sup>ARF</sup> aber auch eine weniger gut verstandene p53-unabhängige antiproliferative Funktion. Teil dieser Funktion ist offensichtlich die Hemmung der Ribosomenbiogenese, insbesondere durch die Inhibierung der Reifung der 28S rRNA (Sugimoto *et al.*, 2003;

Apicelli *et al.*, 2008). Neuere Daten deuten darauf hin, dass p14<sup>ARF</sup> als Gegenspieler von SENP3 fungiert und so die SUMO-Modifikation nukleolärer Proteine stimuliert (Haindl *et al.*, 2008). Erreicht wird dies durch die ARF-vermittelte Proteasom-abhängige Destabilisierung von SENP3 (Kuo *et al.*, 2008).

Die Daten der vorliegenden Arbeit erhärten die These, dass ein Anstieg der ARF-Spiegel die Funktion von SENP3 antagonisiert und lassen darauf schließen, dass PELP1 ein funktionell wichtiges Zielprotein im ARF/SENP3-Kreislauf ist. Eine attraktive Hypothese ist deshalb, dass die SUMO-regulierte nukleoläre Delokalisierung von PELP1, TEX10 und WDR18 an den inhibitorischen Effekten von p14<sup>ARF</sup> auf die Ribosomenbiogenese beteiligt ist (Abb. 36). Zukünftige Experimente in Primärzellen, beispielsweise in embryonalen Mäusefibroblasten, könnten diese Hypothese bestätigen. In diesen Zellen erfolgt im Verlauf der replikativen Seneszenz eine Induktion von ARF. Somit kann unter physiologischeren Bedingungen der ARF-Induktion der Sumoylierungsstatus von PELP1 und dessen subnukleäre Lokalisierung analysiert werden. Neben onkogenem Stress kann auch Hitzestress zu einer Steigerung des Sumoylierungsniveaus einer Zelle führen (Saitoh und Hinchey, 2000). In einem systemweiten Ansatz konnte PELP1 als eines der Proteine identifiziert werden, deren Sumoylierung nach Hitzeschock erhöht ist (Golebiowski *et al.*, 2009). Interessanterweise ist bereits seit 1996 bekannt, dass sich eine erhöhte Temperatur negativ auf die Prozessierung der rRNA auswirkt (Ghoshal und Jacob, 1996). Vor diesem Hintergrund wäre es in Zukunft auch interessant, die Lokalisierung des in dieser Arbeit identifizierten Proteinkomplexes unter Hitzestress zu beobachten.

#### **4.4 Das SUMO-System als möglicher Kontrollmechanismus für die Umgestaltung präribosomaler Partikel**

Die SUMO-abhängige Verteilung von PELP1 und dessen Bindungspartnern innerhalb des Zellkerns stellt möglicherweise einen wichtigen Mechanismus dar, um die Rate der Ribosomensynthese und den physiologischen Status einer Zelle aufeinander abzustimmen. Eine verstärkte Sumoylierung verschiebt die Aktivität der untersuchten Proteine vom Nukleolus ins Nukleoplasma, was eine Beeinträchtigung der Reifung der 60S ribosomalen Untereinheit und eine dadurch eingeschränkte Ribosomenbiogenese nach sich ziehen könnte. Ein denkbares Modell wäre, dass Sumoylierung die Dissoziation des Komplexes aus PELP1, TEX10 und WDR18 von den prä-60S-Partikeln verursacht. Als Folge der Depletion von SENP3 könnte es somit zu einer verfrühten Ablösung des Komplexes von den Partikeln kommen, oder es könnte die Bindung des Komplexes an diese Strukturen sogar völlig verhindert werden. Das kontrollierte Gleichgewicht zwischen

Sumoylierung und Desumoylierung würde daher eine korrekte zeitliche und räumliche Koordinierung der Bindung von PELP1 und seinen Interaktoren an die prä-60S-Untereinheit gewährleisten und somit einen Mechanismus zur Kontrolle der Umgestaltung präribosomaler Partikel liefern.

#### **4.5 Mögliche Mechanismen SUMO-regulierter Dynamik nukleolärer Proteine**

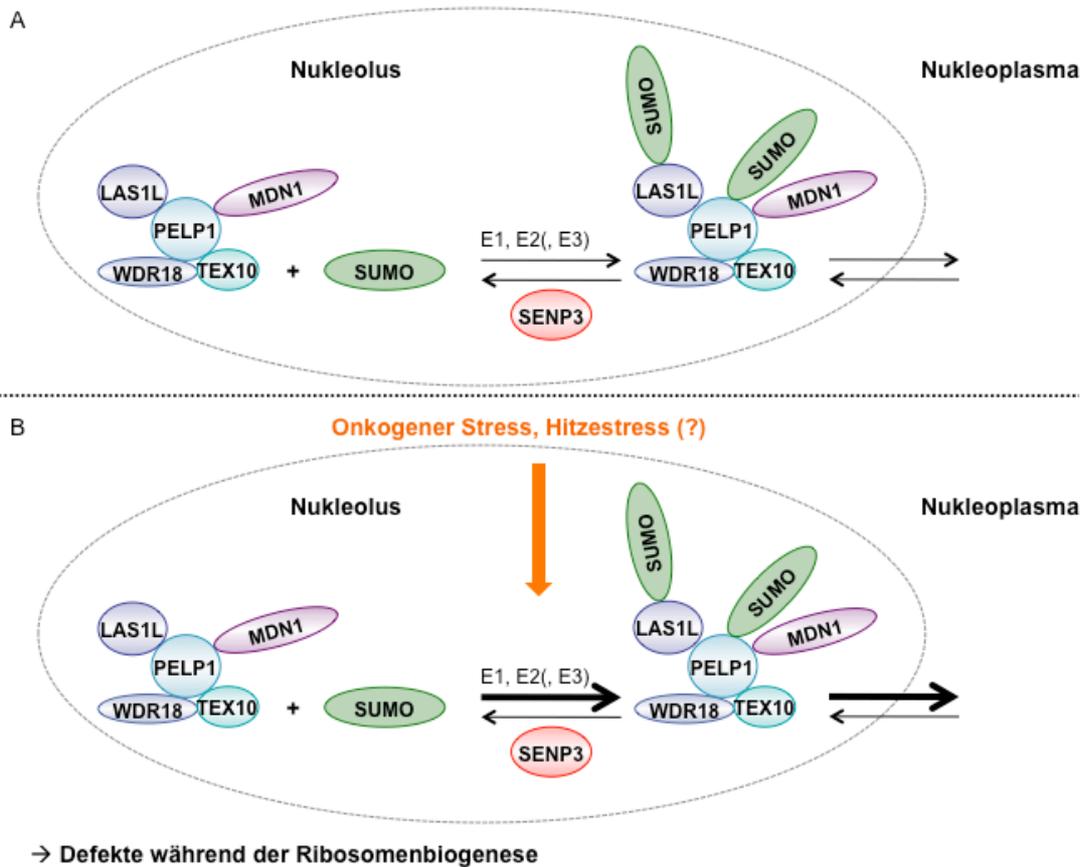
Zukünftige Arbeiten müssen die Mechanismen der SUMO-regulierten Dynamik präribosomaler Komplexe klären. Um die Konsequenzen der Sumoylierung auf die Zusammensetzung des PELP1-TEX10-WDR18-Komplexes detaillierter zu untersuchen, wurde PELP1 aus SENP3-siRNA- oder Kontroll-siRNA-behandelten Zellen immunpräzipitiert (Finkbeiner & Muller, unpublizierte Daten). Eine massenspektrometrische Analyse sollte dann Auskunft über qualitative und quantitative Unterschiede der PELP1-Interaktoren geben. Es konnte gezeigt werden, dass weder die Bindung von WDR18 noch von LAS1L an PELP1 durch die Abwesenheit von SENP3 und ein dadurch erhöhtes SUMO-Niveau beeinträchtigt war. Dies deutet darauf hin, dass eine verstärkte Sumoylierung nicht zu einer Auflösung des Proteinkomplexes führt. Es ist daher eher denkbar, dass die SUMO-Modifikation des intakten Komplexes eine Bindung an ein nukleoplasmatisches Protein begünstigt, oder aber die Interaktion mit einem nukleolären Protein oder mit ribosomaler RNA verhindert. In diesem Zusammenhang könnten zum einen in weiteren massenspektrometrischen Ansätzen differentielle nukleoläre bzw. nukleoplasmatische Bindungspartner von PELP1-Wildtyp verglichen mit einem PELP1-SUMO-Fusionsprotein analysiert werden. Außerdem könnte man die Zusammensetzung präribosomaler Partikel mittels Sucrose-Gradienten nach SENP3-Depletion untersuchen und mit einem Kontrollansatz vergleichen. Um hier einen direkten Einfluss der Sumoylierung von PELP1 zu ermitteln, könnte auch für diesen Ansatz das PELP1-SUMO-Fusionsprotein eingesetzt werden. Für die Analyse möglicher Veränderungen bezüglich der RNA-Bindung des Komplexes nach gesteigerter Sumoylierung könnten RNA-Immunpräzipitationsexperimente mit z. B. PELP1 und einer Region aus der 32S rRNA in An- und Abwesenheit von SENP3 durchgeführt werden und die Ergebnisse vergleichend analysiert werden.

Ein weiteres mögliches Szenario bezüglich der Konsequenz der SUMO-Modifikation von PELP1 wäre folgendes: Die Sumoylierung von PELP1 könnte durch eine intramolekulare Interaktion mit einem seiner SIMs zu Konformationsänderungen führen, ähnlich dem für das Enzym TDG beschriebenen Mechanismus (siehe 2.4.2.3). Diese Konformationsänderungen könnten dann für die Loslösung von PELP1 von einem nukleo-

---

lären Interaktionspartner oder von ribosomaler RNA verantwortlich sein und damit zu seiner Lokalisierungsänderung führen. Die Beobachtung, dass sowohl die SUMO-Konjugation als auch die nicht-kovalente SIM-vermittelte SUMO-Bindung von PELP1 bevorzugt über SUMO2 ablaufen, unterstützt diese Hypothese der intramolekularen Interaktion. Ein SUMO2-spezifisches SIM wurde bereits in anderen Proteinen identifiziert, der genaue Mechanismus der Paralog-Spezifität ist jedoch bislang nicht geklärt (Meulmeester *et al.*, 2008; Ouyang *et al.*, 2009). Im Fall von USP25 wurde gezeigt, dass die Integrität seines SIMs dabei eine Voraussetzung für die SUMO-Konjugation ist; für PELP1 scheint dies jedoch nicht der Fall zu sein (Finkbeiner & Muller, unpublizierte Daten).

Das Konzept des SUMO-vermittelten Ausschlusses aus dem Nukleolus ist bereits aus früheren Veröffentlichungen bekannt, in denen Topoisomerase I aus Säugern bzw. Rad52 aus der Bäckerhefe als Antwort auf DNA-Schäden SUMO-abhängig den Nukleolus verlassen (Mo *et al.*, 2002; Torres-Rosell *et al.*, 2007). Die Daten der vorliegenden Arbeit erweitern also das Konzept eines SUMO-vermittelten nukleolären Ausschlusses als generellen Mechanismus der Regulation nukleolärer Dynamik.



**Abb. 36 Modell der SUMO-kontrollierten subnukleären Verteilung des PELP1-TEX10-WDR18-Komplexes**

(A) Unter physiologischen Bedingungen herrscht ein Gleichgewicht zwischen der SUMO-Modifikation und -Demodifikation von PELP1 und LAS1L, sowie zwischen der nukleolären und nukleoplasmatischen Verteilung des gesamten Proteinkomplexes aus PELP1, TEX10, WDR18, MDN1 und LAS1L. (B) Wird das Gleichgewicht zwischen Sumoylierung und Desumoylierung in Richtung Sumoylierung verschoben, z. B. durch onkogenen Stress oder Hitzeschock, verlagert sich die intranukleäre Lokalisation des Komplexes ins Nukleoplasma. Dies hat zur Folge, dass die beteiligten Proteine ihre Funktion während der nukleolären Schritte der Ribosomenbiogenese nicht mehr oder nur noch ungenügend erfüllen können, was zu Defekten während der rRNA-Prozessierung und des nukleolären Exports der prä-60S-Partikel führt.

#### 4.6 Die Bedeutung von PELP1 für Tumorentstehung und Ribosomenbiogenese

Während p14<sup>ARF</sup> als negativer Regulator der Ribosomenbiogenese beschrieben ist, treibt das Protoonkogen c-myc diesen Prozess voran, indem es die Genexpression nukleolärer Proteine, die an der rRNA-Transkription oder deren Prozessierung beteiligt sind, induziert (van Riggelen *et al.*, 2010). Dies stellt sicher, dass während Zellwachstum und -Proliferation Ribosomen vermehrt hergestellt werden, trägt aber möglicherweise auch direkt zur malignen Transformation bei der Tumorentstehung bei. Interessanterweise wurden PELP1 und WDR18 als Zielgene von c-myc identifiziert, was darauf hindeutet, dass der Komplex aus PELP1, TEX10 und WDR18 auch von c-myc kontrolliert wird (Schlosser *et al.*, 2003; Zeller *et al.*, 2006). Bisherige Veröffentlichungen zeigen außerdem, dass die Expression von PELP1 in einer Vielzahl menschlicher Tumoren, wie z. B. in Brust-, Prostata- und Eierstockkrebs, fehlreguliert ist und deuten an, dass PELP1 selbst als

Protoonkogen wirken könnte (Rajhans *et al.*, 2007; Vadlamudi und Kumar, 2007; Dimple *et al.*, 2008). In diesen Arbeiten werden die wachstumsfördernden Effekte von PELP1 allerdings vorwiegend mit dessen Rolle als transkriptionellem Koaktivator des Östrogenrezeptors in Verbindung gebracht (Vadlamudi und Kumar, 2007).

Basierend auf den Resultaten der vorliegenden Arbeit lässt sich nun spekulieren, dass die pathologische Rolle von PELP1 während der Tumorentstehung in Zusammenhang mit der Fehlregulation der Ribosomensynthese, einem Charakteristikum vieler Tumorarten, steht (Ruggero und Pandolfi, 2003). Zukünftige Arbeiten sollten diesen wichtigen biomedizinischen Aspekt weiterverfolgen.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Chemikalien

Sofern nicht anders vermerkt, wurden analysenreine Chemikalien der Firmen Fluka (Seelze), Invitrogen/Gibco (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) verwendet. Molekularbiologische Reagenzien wurden von den Firmen Roche (Mannheim), Bioneers (Daejeon, Südkorea), Qiagen (Hilden) und NEB (Ipswich, USA) bezogen. DNA- und RNA-Oligonukleotide wurden individuell von MWG Eurofins (Martinsried) angefertigt. Radiochemikalien stammten von GE-Healthcare (Little Chalfont, UK), PerkinElmer (Rodgau) und Hartmann-Analytik (Braunschweig).

Für alle nachfolgend beschriebenen Methoden wurden entionisiertes, steriles Wasser sowie sterile Lösungen und Gefäße verwendet. Grundlage für die Ausführung der Methoden waren im Wesentlichen Standardprotokolle (Ausubel, 1987; Sambrook *et al.*, 1989).

### 5.2 Mikrobiologische Methoden

#### 5.2.1 Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamname / Bezugsquelle	Genotyp
XL10-Gold / Stratagene	Tet <sup>r</sup> Δ(mcrA) 183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Hte [F' proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> ) Amy Cam <sup>r</sup> ]
BL21pLys / Stratagene	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> ompT hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) dcm EndA Hte [argU ileY leuW Cam <sup>r</sup> ]
SURE / Agilent	e14 <sup>-</sup> (McrA <sup>-</sup> ) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan <sup>r</sup> ) uvrC [F' proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]

#### 5.2.2 Verwendeter *E. coli*-Vektor

Name	Bezugsquelle
pGEX4T1	GE-Healthcare

### 5.2.3 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Flüssigkulturen von *E. coli* wurden in LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, autoklaviert) bei 37°C geschüttelt (140rpm). Agarplatten (LB-Medium, 0,5% Agar) wurden bei 37°C inkubiert. Zur Selektion transformierter Bakterien wurden dem Medium Antibiotika in einer Konzentration von 50µg/ml (Ampicillin), 30µg/ml (Kanamycin) bzw. 34µg/ml (Chloramphenicol) zugefügt. Die Dichtemessung von *E.coli*-Kulturen erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600nm (OD<sub>600</sub>).

Sowohl *E.coli*-Flüssigkulturen als auch Ausstriche von *E.coli* auf Agarplatten wurden kurzfristig bei 4°C aufbewahrt. Für eine langfristige Lagerung wurden stationäre Flüssigkulturen mit Glycerin (17% Endkonzentration) versetzt und bei -80°C eingefroren.

### 5.2.4 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Für die Transformation und Vermehrung von Plasmid-DNA in *E. coli* wurden chemisch kompetente XL10-Gold-Zellen verwendet (Sambrook und Russel, 2001). Hierfür wurde mit einer frisch ausgestrichenen Einzelkolonie eine Übernachtskultur in 25ml LB-Medium (mit MgCl<sub>2</sub>, Endkonzentration 10mM) angesetzt. Mit 2,5ml dieser Kultur wurden 250ml LB-Medium angeimpft und bei 18°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,55 inkubiert. Nach Abkühlen der Kultur in Eiswasser für 10min wurden die Zellen bei 2500g und 4°C 10min lang sedimentiert. Alle weiteren Schritte erfolgten unter Verwendung von vorgekühlten Materialien und eiskalten sterilen Lösungen. Nach vollständiger Entfernung des Mediums wurden die Zellen vorsichtig in 80ml Inoue-Transformationspuffer (10mM PIPES [pH 6,7], 250mM KCl, 55mM MnCl<sub>2</sub> und 15mM CaCl<sub>2</sub>) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden vorsichtig in 20ml Inoue-Transformationspuffer aufgenommen und nach Zugabe von 1,5ml DMSO 10min auf Eis inkubiert. Aliquots zu 100µl dieser Suspension wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 5.2.5 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

Nach Auftauen der Bakterienzellen auf Eis wurden ca. 100–500ng Plasmid-DNA bzw. 4µl eines Ligationsansatzes mit 50µl der kompetenten Zellen vermischt, und die Suspension in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß 10min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 45sec bei 42°C und einer anschließenden Inkubation für 5min auf Eis wurde 1ml LB-Medium zugegeben und der Ansatz wurde für 1h bei 37°C geschüttelt. Transformierte Zellen wurden anschließend auf Selektionsplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

## 5.2.6 Rekombinante Proteinexpression

Für die Expression rekombinanter Proteine wurden kompetente BL21-Zellen mit GST-SUMO1- und -SUMO2-Plasmiden transformiert. Nach Animpfung einer Einzelkolonie folgte eine Kultivierung der Bakterienkultur für 12h bei 37°C in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum. Diese Vorkultur wurde dann 1:100 verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 weiterkultiviert. Dann erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5M). Nach weiterem dreistündigem Wachstum wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und in Lysepuffer (1% Triton, 1mM DTT, 100µM PMSF in PBS) resuspendiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen mit Hilfe eines Homogenisators (*Emulsi-Flex C5*, Avestin). Danach wurde das Lysat für 3h mit Glutathion-Sepharose 4B (Amersham) inkubiert, die Matrix dreimal für 10min mit Lysepuffer gewaschen und bei -20°C verwahrt.

## 5.3 Zellbiologische Methoden

### 5.3.1 Zelllinien

Name	Zelltyp	Bezugsquelle
HeLa	humanes Zervix-Adenokarzinom	ATCC (#CCL-2)
U2OS	humanes Osteosarkom	ATCC (#HTB-96)
OCI-AML3	humane akut myeloische Leukämie	DSMZ (#ACC 582)

### 5.3.2 Expressionsvektoren für Säugerzellen

Name	Bezugsquelle
pCI	Promega
pRTS-1	Bornkamm <i>et al.</i> , 2005
pcDNA3.1 (+)	Invitrogen
pSG5	Stratagene

### 5.3.3 Kultivierung von Säugerzellen

HeLa- und U2OS-Zelllinien wurden in Zellkulturschalen (PAA) bei 37°C, 7,5% CO<sub>2</sub> und 96% Luftfeuchtigkeit in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco-BRL) kultiviert. Das Nährmedium wurde mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (Biochrom), 100U/ml Penicillin und 100U/ml Streptomycin (PAA) ergänzt. Für die Kultivierung der OCI-AML3-Zellen wurde RPMI-1640-Medium (*Roswell Park Memorial Institute*, Gibco-BRL), versetzt mit 20% hitzeinaktiviertem FCS, verwendet. Um Zellen von der Oberfläche der Zellkulturschale abzulösen, wurde das Medium abgenommen, und die Zellen wurden einmal mit sterilem PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, [pH 7,4], sterilisiert durch Autoklavieren) gewaschen. Anschließend wurden 2,5ml Trypsin/EDTA-Lösung (PAA) pro 15cm-Kulturschale zugegeben, und die Zellen wurden damit für ca. 5min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 10ml Medium aufgenommen und für 3min bei 400g bei RT abzentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstands wurden die Zellen in frischem DMEM resuspendiert und je nach Bedarf zur weiteren Kultivierung 1:5 bis 1:10 verdünnt oder für Experimente in Kulturschalen ausgesät. Die Ermittlung der Zellzahl der Zellsuspension erfolgte hierfür mittels eines Z2<sup>TM</sup> Coulter Counter (Beckman-Coulter).

### 5.3.4 Lagerung von Säugerzellen

Zur Langzeitlagerung wurden Säugerzellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden exponentiell wachsende Zellen bei ca. 80% Konfluenz wie in 5.3.3 beschrieben geerntet, in FCS mit 10% DMSO resuspendiert und die Zellsuspension in Einfrierröhrchen (Nalgene) aliquotiert. Die Zellen wurden sofort in einem mit Isopropanol gefüllten Einfriergefäß (Nalgene) bei -80°C eingefroren. Nach ein bis zwei Tagen konnten die Zellen dann in flüssigen Stickstoff überführt und bei -180°C gelagert werden.

### 5.3.5 Transfektion von Säugerzellen mit Plasmid-DNA

HeLa- und U2OS-Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz FuGENE-HD (Roche) transfiziert. Hierfür wurden am Tag vor der Transfektion  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte bzw.  $1,5 \times 10^6$  Zellen pro 10cm-Schale und  $2,5 \times 10^6$  Zellen pro 15cm-Schale ausgesät. Für die Transfektion von Zellen in einer 6-Loch-Platte wurden 2µg DNA in 100µl Opti-MEM (Gibco-BRL) verdünnt und mit 5µl FuGENE-HD versetzt. Nach einer Inkubation von 15min wurde die Transfektionslösung tropfenweise zu den ausgesäten Zellen gegeben und diese dann zur Expression der cDNA für weitere 48h inkubiert. Für die

Transfektion von Zellen in einer 10cm- bzw. 15cm-Schale wurde das Transfektionsgemisch um das fünf- bzw. zehnfache erhöht.

### 5.3.6 Expression von Genen mit Hilfe des pRTS1-Systems

Das pRTS1-System ist ein konditionales Expressionssystem, mit Hilfe dessen die Transkription eines Gens in Anwesenheit von Doxycyclin induziert werden kann (Bornkamm *et al.*, 2005). Der pRTS1-Vektor leitet sich vom EBV ab und repliziert daher episomal. Er enthält eine bicistronische Expressionskassette, die für ein Doxycyclin-sensitives rtet-Transaktivator- und ein tet-Repressorprotein kodiert. Das zu exprimierende Gen wird von einem bidirektionalen Promotor kontrolliert, der die simultane Expression zweier Gene erlaubt. In Abwesenheit von Doxycyclin bindet der Repressor an den Promotor, wodurch eine strenge Expressionsregulation gewährleistet wird. Zugabe von Doxycyclin führt zur Aufhebung der Repressorbindung und aktiviert den Promotor durch die Bindung des Transaktivatorproteins.

Die Transfektion von pRTS1-Plasmiden in U2OS- und HeLa-Zellen erfolgte wie in 5.3.5 beschrieben. 24h nach Transfektion wurden pRTS1-positive Zellen durch Zugabe von 400µg/ml Hygromycin selektiert. Die Induktion der Genexpression wurde mit 1µg/ml Doxycyclin erreicht.

### 5.3.7 Transfektion von Säugierzellen mit siRNA-Oligonukleotiden

Für RNA-Interferenz-Experimente wurde zum einen das Transfektionsreagenz Oligofectamin (Invitrogen) verwendet. Am Tag vor der Transfektion wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte bzw.  $9 \times 10^5$  Zellen pro 10cm-Schale und  $1,5 \times 10^6$  Zellen pro 15cm-Schale ausgesät. Für die Transfektion von Zellen in einer 6-Loch-Platte wurden 1,2µl einer 100µM siRNA-Oligonukleotid-Lösung in 200µl Opti-MEM verdünnt und mit 4µl Oligofectamin versetzt. Nach einer Inkubation von 15min wurde der Transfektionsansatz tropfenweise zu den ausgesäten Zellen gegeben und diese bis zum maximalen Abbau der entsprechenden mRNA 72–96h inkubiert. Für die Transfektion von Zellen in einer 10cm- bzw. 15cm-Schale wurde das Transfektionsgemisch um das fünffache bzw. zehnfache erhöht.

Alternativ zur Transfektion von siRNA-Oligonukleotiden mit Oligofectamin fand die Transfektion mittels Nukleoporation (Amaxa-Kit R) gemäß Herstellerprotokoll Verwendung (Lonza).

Folgende siRNA-Oligonukleotide wurden in dieser Arbeit verwendet:

Name	Sequenz 19mer (5' > 3')
siKontrolle	cguacgcggaauacuucga
siPELP1	ggaaugaaggcuuguauga
siTEX10	agaugcuaauguacgauua
siWDR18	aucgggaccuguucgacuu
siMDN1	ggaaugccgaagccauuaa
siSENP3	cuggcccugucucagccau
siSUMO2/3	gucaaugaggcagaucaga

### 5.3.8 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden HeLa-Zellen in 6-Loch-Platten auf sterilen Deckgläschen ausgesät und wie im jeweiligen Experiment angegeben transfiziert. Nach 48–96h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit 3,7% Paraformaldehyd in PBS für 5min bei RT. Nach dreimaligem Waschen in PBS-T (0,05% Tween-20 in PBS) wurden die Zellen durch Zugabe von 0,5% Triton-X100 in PBS für 10min bei RT permeabilisiert. Vor Zugabe der primären Antikörper wurden die Zellen wieder dreimal mit PBS-T gewaschen. Monoklonale Antikörper wurden wie unten aufgeführt mit PBS verdünnt, und die Lösung wurde für 1h bei RT auf die Zellen gegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS-T folgte die Inkubation der Zellen mit den sekundären Antikörpern. Sekundäre Antikörper wurden ebenfalls mit PBS verdünnt, und die Zellen wurden darin für 1h bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung der Zellkerne durch eine zweiminütige Zugabe von 50µg/ml 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Merck) in PBS. Schließlich wurden die Zellen fünfmal mit PBS-T gewaschen, bevor die Deckgläschen kopfüber auf Objektträger mit *mounting medium* (0,5% para-Phenyldiamin in 20mM Tris/HCl [pH 9,0], 90% Glycerin) gelegt und mit Nagellack versiegelt wurden. Die Präparate konnten nun mit Hilfe eines AX10-Mikroskops (Zeiss), das mit einer CCD-Kamera ausgestattet war, über die Bildgebungssoftware *Axiovision Rel. 4.8* visualisiert werden.

Folgende primäre Antikörper wurden in dieser Arbeit für Immunfluoreszenz-Experimente verwendet:

<b>Name (Kat.-Nr.)</b>	<b>Typ</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
anti-HA (16B12)	monoklonal (Maus)	1:500	Covance
anti-Flag (M2)	monoklonal (Maus)	1:500	Sigma-Aldrich
anti-Flag (F7425)	polyklonal (Kaninchen)	1:250	Sigma-Aldrich
anti-SENP3 (G3)	monoklonal (Maus)	1:10	Santa Cruz
anti-PELP1 (A300-180A)	polyklonal (Kaninchen)	1:250	Bethyl
anti-TEX10 (Peptid QLKEDGTLPTNNRKL)	polyklonal (Kaninchen)	1:100	Eurogentech SA
anti-MDN1 (HPA029666)	polyklonal (Kaninchen)	1:100	Sigma-Aldrich
anti-LAS1L (AV34629)	polyklonal (Kaninchen)	1:100	Sigma-Aldrich
anti-UBF1 (F9)	monoklonal (Maus)	1:250	Santa Cruz
anti-NPM1/B23 (NA24)	monoklonal (Maus)	1:500	Santa Cruz
anti-PES1	monoklonal (Ratte)	1:10	D. Eick, Helmholtz-Zentrum, München
anti-WDR50	monoklonal (Ratte)	1:10	D. Eick, Helmholtz-Zentrum, München

Folgende sekundäre Antikörper wurden in dieser Arbeit für Immunfluoreszenz-Experimente verwendet:

<b>Name (Kat.-Nr.)</b>	<b>Typ</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Alexa Fluor 555 (A-21428)	Ziege anti-Kaninchen	1:250	Invitrogen
Alexa Fluor 488 (A-11008)	Ziege anti-Kaninchen	1:250	Invitrogen
Alexa Fluor 488 (A-11006)	Ziege anti-Ratte	1:250	Invitrogen
Cy3 (115-166-003)	Ziege anti-Maus	1:500	Jackson
FITC (715-096-151)	Esel anti-Maus	1:500	Jackson

### 5.3.9 *In vivo*-Markierung ribosomaler RNA

Für die metabolische Markierung ribosomaler RNA wurden HeLa-Zellen in phosphatfreiem DMEM (GIBCO-BRL) mit 10% dialysiertem FCS (SIGMA) 30min vorinkubiert. Danach wurde das Medium mit phosphatfreiem DMEM/10% FCS ersetzt, das mit 15  $\mu\text{Ci/ml}$   $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat (Hartmann Analytik) supplementiert war. Nach 1h wurde dieses Medium abgenommen, die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und für weitere 3h in Vollmedium inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert (siehe 5.4.11), auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt (siehe 5.4.12), und  $^{32}\text{P}$ -markierte Banden wurden mit Hilfe eines *Phosphoimagers* (BAS-2500, Fuji) quantifiziert.

### 5.3.10 Anreicherung präribosomaler Ribonukleoprotein-Komplexe

Zunächst wurden zwei Lösungen aus RNase-freier Sucrose hergestellt (5% bzw. 20% Sucrose, 100mM KCL, 2mM EDTA, steril filtriert). Mit Hilfe eines Gradientenmischers und einer peristaltischen Pumpe wurden nun beide Lösungen so gemischt, dass in Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (9/16x3  $\frac{1}{2}$  in., 14x89mm, Beckman) ein Gradient mit abnehmender Konzentration nach oben hin aufgebaut wurde. Die Röhrchen wurden bis zu ihrer Verwendung max. 24h bei 4°C gelagert. Für die Zentrifugation wurde wie in Pestov *et al.* beschrieben vorgegangen (Pestov *et al.*, 2008). Nach dem Ultrazentrifugationsschritt wurden 600 $\mu\text{l}$ -Fraktionen von Hand gesammelt und deren Absorption bei einer Wellenlänge von 254nm photometrisch bestimmt (Nanodrop, peqlab). Nach TCA-Fällung wurden die Protein-Pellets mit 25 $\mu\text{l}$  Harnstoff-Probenpuffer (62,5mM Tris/HCl [pH 6,8], 3M Harnstoff, 2% SDS, 0,01% Bromphenolblau, 0,1M DTT) gelöst. 7 $\mu\text{l}$  jeder Fraktion wurden schließlich auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (siehe 5.5.1).

## 5.4 Molekularbiologische Methoden

### 5.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Sequenzen wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Die PCR-Bedingungen wurden je nach Anforderungen wie Länge der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz oder Länge und GC-Gehalt der verwendeten Oligonukleotide („Primer“) variiert. Die Reaktionen wurden stets in 50 $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen durchgeführt und setzten sich in der Regel wie folgt zusammen:

	µl
5x Phusion PCR-Puffer (NEB)	10
dNTP-Mix, je 10mM (NEB)	1
5'-Primer, 10µM	2
3'-Primer, 10µM	2
Matrizen-DNA (100ng/µl)	1
Phusion DNA-Polymerase, 2U/µl (NEB)	1
ddH <sub>2</sub> O	33

Standardmäßig wurde folgendes PCR-Programm verwendet (*Tpersonal Thermocycler*, Biometra):

	Temperatur (°C)	Dauer
1) Initiale Denaturierung	94	2min
2) Denaturierung	94	30sec
3) Hybridisierung	55–60	45sec
4) Elongation	72	30sec/kb DNA
5) terminale Elongation	72	10min

Es wurden in der Regel 33 Zyklen der Schritte 2) bis 4) eingestellt.

Die Hybridisierungstemperatur wurde in der Regel so gewählt, dass sie etwa 5°C unter der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer lag. Die Elongationszeit wurde der Länge der zu vervielfältigenden Matrizen-DNA angepasst.

Nach erfolgter PCR wurden die Reaktionsansätze auf 4°C heruntergekühlt. Anschließend wurde das PCR-Produkt durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe 5.4.4 und 5.4.5). In Fällen, in denen die Auftrennung nicht notwendig war, wurde der PCR-Ansatz direkt mit Hilfe des *QIAquick* PCR-Aufreinigungs-Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### 5.4.2 Restriktionsverdau von DNA

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurde nach den Empfehlungen des Herstellers (NEB) durchgeführt. Es wurden in der Regel 10U Enzym pro 1µg DNA eingesetzt. Die Restriktionsansätze wurden mindestens 30min für analytische und etwa 3h für präparative Zwecke bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von DNA-Probenpuffer (siehe 5.4.4) abgestoppt.

### 5.4.3 Dephosphorylierung von DNA

Um die Religation eines linearisierten Vektors während einer Ligationsreaktion zu vermeiden, wurden die 5'-Phosphatgruppen der geschnittenen Vektor-DNA hydrolytisch abgespalten. Dazu wurde nach erfolgtem Verdau von Vektoren ca. 5U CIP (*calf intestinal phosphatase*, NEB) zum Restriktionsansatz gegeben und für weitere 30min bei 37°C inkubiert.

### 5.4.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA für analytische und präparative Isolierungen erfolgte über Gelelektrophorese, wobei je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente 0,7- bis 2%ige Agarosegele verwendet wurden. Die Agarose wurde in 1x TAE (40mM Tris/HCl, 0,1% Essigsäure, 1mM EDTA, pH 8,3) durch Aufkochen gelöst, nach Abkühlen mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine Flachgelkammer mit Kamm gegossen. Zu den DNA-Proben wurde 1/6Vol 6x DNA-Probenpuffer (15% Glycerol, 0,25% *OrangeG*) gegeben, bevor die Taschen des ausgehärteten Gels damit beladen wurden. Die DNA wurde anschließend bei einer Spannung von 70V mit 1x TAE als Laufpuffer aufgetrennt. Schließlich konnte die DNA unter UV-Licht der Wellenlänge 324nm auf einem UV-Illuminator (Genosmart, VWR) sichtbar gemacht, fotografiert und ausgeschnitten werden. Durch das Auftragen eines Größenstandards (1kb-DNA-Leiter, Invitrogen) konnte die Größe der DNA-Fragmente ermittelt werden.

### 5.4.5 Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Sollten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel isoliert werden, wurde die entsprechende Bande unter langwelligem UV-Licht (324nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe eines DNA-Extraktionskits (Bioneer) gemäß Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 50µl entionisiertem Wasser.

#### 5.4.6 Ligation von DNA

Für die Ligation wurden Vektor-DNA und DNA-Fragmente im molaren Verhältnis von 1:10 mit 1µl T4-DNA-Ligase (NEB) in 20µl 1x T4-Ligasepuffer mit 2mM ATP über Nacht bei 16°C inkubiert.

#### 5.4.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Plasmid-DNA wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aus Flüssigkulturen isoliert (Birnboim, 1983). Kleine DNA-Mengen („Miniprep“) wurden aus 2,5ml Übernachtskultur, größere Mengen („Maxiprep“) aus 250ml Übernachtskultur mit Hilfe von Anionenaustauschersäulen nach Angaben des Herstellers gewonnen (Qiagen Plasmid-Handbuch). Die DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers (Nanodrop, peqlab) bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt.

#### 5.4.8 Zielgerichtete Punktmutagenese

Für den gezielten Austausch einzelner Basen wurde der *QuikChangeXL*-Kit (Stratagene), basierend auf einer PCR-Reaktion, nach den Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wurden zwei komplementäre Oligonukleotide verwendet, die eine oder mehrere Punktmutationen gegenüber der Matrize aufwiesen. In 5'- und 3'-Richtung wurden die Oligonukleotide dann um noch jeweils mindestens zwölf Basen entsprechend der Matrizen-DNA verlängert.

Die Reaktionen setzten sich in der Regel wie folgt zusammen:

	µl
10x Reaktionspuffer	5
dNTP-Mix, je 10mM (NEB)	1
5'-Primer, 10µM	1
3'-Primer, 10µM	1
Matrizen-DNA (100ng/µl)	1
Quik-Lösung	3
<i>pfuUltra</i> HF DNA-Polymerase (2,5U/µl)	1
ddH <sub>2</sub> O	37

Standardmäßig wurde folgendes Mutagenese-Programm verwendet (*Tpersonal Thermocycler*, Biometra):

	Temperatur (°C)	Dauer
1)	95	1min
2)	95	50sec
3)	60	50sec
4)	68	1min/kb Plasmid
5)	68	7min

Die Schritte 2) bis 4) wurden in 18 Zyklen wiederholt. Nach Ablauf der Reaktion wurden die Proben auf 4°C heruntergekühlt.

Sollten mehrere Basen einer DNA-Sequenz ausgetauscht werden, die nicht von einem Oligonukleotid abgedeckt werden konnten, wurde der *QuikChangeMulti*-Kit (Stratagene) gemäß Herstellerprotokoll verwendet. Das Design der Oligonukleotide erfolgte nach demselben Prinzip wie oben, allerdings wurde nur ein Oligonukleotid pro Basenmutation eingesetzt.

Da eine Mutagenesereaktion zur Vervielfältigung des gesamten Plasmids führt, wurde anschließend 1µl der Restriktionsendonuklease DpnI (NEB) für 2h bei 37°C zum Ansatz gegeben, die spezifisch die methylierte Matrize verdaut. 4µl des Ansatzes wurden daraufhin in *E.coli*-XL10-Gold transformiert (siehe 5.2.5). Die eingefügten Mutationen wurden mittels Sequenzierung überprüft.

#### 5.4.9 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden mit einem *ABI 3730* 48-Kapillar-Sequenzierer (Perkin Elmer) in der *Core Facility* des Max-Planck-Institutes für Biochemie, Martinsried durchgeführt. Die Sequenzierreaktion sowie die nachfolgende Probenaufbereitung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem *ABI BigDye*-Kit Version 3.1 (Applied Biosystems). Ein Sequenzieransatz enthielt 0,5µg Plasmid-DNA und 10pmol Primer.

## 5.4.10 Verwendete Plasmide

Name	Quellennachweis
pCI-HA-PELP1	diese Arbeit
pCI-Flag-PELP1	diese Arbeit
pCI-HA-PELP <sup>K826R</sup>	diese Arbeit
pCI-Flag-PELP1 <sup>IV790/1AA</sup>	diese Arbeit
pCI-Flag-PELP1 <sup>VI880/1AA</sup>	diese Arbeit
pCI-Flag-PELP1 <sup>IV790/1,VI880/1AA</sup>	diese Arbeit
pCI-HA-PELP1, resistent gg. siPELP1	diese Arbeit
pCI-HA-PELP1 <sup>K826R</sup> , resistent gg. siPELP1	diese Arbeit
pCI-HA-PELP1 <sup>IV790/1,VI880/1AA</sup> , resistent gg. siPELP1	diese Arbeit
pCI-Flag-PELP1 <sup>Z&gt;G</sup> -SUMO2 <sup>GG</sup> , resistent gg. siPELP1	diese Arbeit
pCI-Flag-PELP1 <sup>IV790/1,VI880/1AA, Z&gt;G</sup> -SUMO2 <sup>GG</sup> , resistent gg. siPELP1	diese Arbeit
pCI-Flag-TEX10	diese Arbeit
pCI-HA-TEX10	diese Arbeit
pCI-Flag-WDR18	diese Arbeit
pCI-HA-WDR18	diese Arbeit
pCI-HA-LAS1L	diese Arbeit
pCI-Flag-SEN3	M. Haindl, s. Haindl <i>et al.</i> , 2008
pCI-Flag-SEN3 <sup>C532S</sup>	M. Haindl, s. o.
pCI-HA-SEN3	R. Ullmann, Institut für Biochemie II, Uniklinik Frankfurt
pcDNA3(+)-SV5-SEN3	M. Haindl, s. o.
pSG5-His-SUMO1	S. Müller, Institut für Biochemie II, Uniklinik Frankfurt

pSG5-His-SUMO2	M. Haindl, s. o.
pCI-Flag-SUMO2	diese Arbeit
pcDNA3-Flag-p14 <sup>ARF</sup>	M. Oren, Weizmann Institute, Rehovot, Israel
pCI-Flag-NPM1	M. Haindl, s. o.
pRTS1-YFP-RPL27	D. Eick, Helmholtz-Zentrum, München
pGEX-SUMO1	S. Müller, s.o.
pGEX-SUMO2	P. Stehmeier, s. Stehmeier & Muller, 2009

#### 5.4.11 Isolierung von RNA aus Säugerzellen

Die Isolierung von RNA aus Säugerzellen erfolgte mit Hilfe des *High pure RNA-Isolation-Kits* (Roche) wie vom Hersteller angegeben. Nach Elution der RNA mit RNase-freiem Wasser wurden die Proben bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert. Die RNA-Konzentration der Proben wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm (Nanodrop, peqlab) ermittelt.

Im Zusammenhang mit der RNA-Immünpräzipitation (siehe 5.5.7) wurde die RNA mit Hilfe von TRIZOL isoliert. Dabei wurde bis auf folgende Ausnahme nach Herstellerprotokoll vorgegangen (Invitrogen): Anstatt die Zellen direkt mit TRIZOL zu lysieren, wurde hier TRIZOL zum immunpräzipitierten Material und zu den entsprechenden Inputs mit einem dreifachen Volumen-Überschuss gegeben. Die Volumina aller weiteren hinzuzufügenden Reagenzien wurden entsprechend angepasst.

#### 5.4.12 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

Die Elektrophorese von RNA wurde denaturierend unter der Verwendung von MOPS-gepufferten (200mM MOPS [pH 7,0], 50mM Natriumacetat, 1mM EDTA) Formaldehyd-gelen (1% Agarose, 1x MOPS, 6,25% Formaldehyd) durchgeführt. Für die Denaturierung der RNA-Proben vor dem Gellauf wurden jeweils 2µg RNA mit 20µl RNA-Probenpuffer (50% Formamid, 6,25% Formaldehyd, 1x MOPS, 0,1% Bromphenolblau, 10µg/ml Ethidiumbromid) versetzt und bei 55°C für 10min inkubiert. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gekühlt und auf das Gel geladen. Die Auftrennung der RNA erfolgte dabei mit 1x MOPS als Laufpuffer unter einer Spannung von 30V für 3–6h. Danach

wurden die geladene RNA-Menge und die Unversehrtheit der RNA durch Sichtbarmachung der 28S und 18S rRNA unter UV-Licht der Wellenlänge 324nm auf einem UV-Illuminator (Genosmart, VWR) überprüft. Schließlich wurde das Gel auf einem *Whatman*-Filterpapier unter Vakuum für 1,5h bei 80°C getrocknet, bevor eine Quantifizierung der <sup>32</sup>P-markierten rRNA-Spezies mit einem *Phosphoimager* (BAS-2500, Fuji) und der Quantifizierungssoftware *ImageGauge 4.23* (Fuji) erfolgte.

#### 5.4.13 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription von RNA wurde nach Extraktion der RNA (siehe 5.4.11) der *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis*-Kit (Roche) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wurden *random hexamer*-Primer eingesetzt. Für jede Probe wurde eine Kontrollreaktion ohne reverse Transkriptase miteinbezogen. 2µl der entstandenen cDNA wurden anschließend für die *real time*-PCR eingesetzt.

#### 5.4.14 Real time-PCR

Die quantitative *real time*-PCR wurde im *LightCycler*-System 480 (Roche) durchgeführt. Dabei wurde der interkalierende Farbstoff *SYBR Green* eingesetzt, der unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet. Die Fluoreszenzintensität dieses interkalierenden Stoffes verhält sich proportional zur neugebildeten DNA, was die Quantifizierung der ursprünglich eingesetzten DNA-Menge ermöglicht. Da der im *LightCycler 480 SYBR Green I*-Kit (Roche) enthaltene Mix bereits MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, *SYBR Green*, PCR-Puffer und *FastStart taq*-DNA-Polymerase beinhaltet, mussten lediglich folgende Komponenten pro Ansatz hinzugefügt werden:

	µl
2x LightCycler 480 SYBR Green I Master	10
5'-Primer, 10µM	1
3'-Primer, 10µM	1
ddH <sub>2</sub> O	6
cDNA	2

Folgendes Programm wurde verwendet:

	Temperatur (°C)	Dauer
1) Initiale Denaturierung	95	5min
2) Denaturierung	95	10sec
3) Hybridisierung	58	15sec
4) Elongation	72	25sec
5) Analyse des Schmelzverhaltens der amplifizierten DNA		

Die Schritte 2) bis 4) wurden in 40 Zyklen wiederholt. Nach vollständigem Ablauf der Reaktionen wurde der PCR-Block auf 4°C heruntergekühlt.

Die Analyse der Schmelzkurve (Schritt 5) diente als Qualitätskontrolle über spezifische Primer. Liegen spezifische Primer vor, wird nur ein einziges PCR-Produkt pro Reaktion amplifiziert.

Neben der zu analysierenden cDNA wurde für jede Probe parallel die cDNA eines Haushaltsgens (HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) bzw. PBGD (Porphobilinogen-Deaminase)) quantifiziert und jeweils das Verhältnis aus beiden cDNAs berechnet. Nach Erstellen einer Standardkurve für jedes eingesetzte Primerpaar (Verdünnungsreihe 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) und Errechnung der relativen RNA-Mengen durch die *LightCycler 480*-Software (Roche) konnten so die relativen RNA-Mengen des zu untersuchenden Gens aus verschiedenen Proben miteinander verglichen werden. Als Negativkontrollen dienten Reaktionsansätze ohne cDNA-Matrize.

Folgende Primer wurden in dieser Arbeit für die *real time*-PCR verwendet:

Zielgen	5'-Primer (5' > 3')	3'-Primer (5' > 3')
TEX10	caggaacagaaagaaaatccccatgc	ggccttcatccacaccactcagtcc
MDN1	gggagcttgaagaacaagaaga	tgccactatccaagttgtcatc
HPRT	tggacaggactgaacgtcttg	cagtcataggaatggatctatcac
PBGD	ccctggagaagaatgaagtgg	ttctctggcagggtttctagg

## 5.5 Proteinbiochemische Methoden

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

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese diente zur qualitativen Proteinanalyse und wurde unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Als Elektrophoresekammern wurden Gelapparaturen aus der technischen Werkstatt des Max-Planck-Instituts für Biochemie, Martinsried verwendet. Typischerweise wurden 7- bis 10%ige Trenngele gegossen (7- bzw. 10% Acrylamid/Bisacrylamid [29:1], 390mM Tris [pH 8,8], 0,1% SDS, 0,2% TEMED, 0,2% APS) und sofort mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Gels wurde der Isopropanol vorsichtig abgenommen und ein 5%iges Sammelgel (5% Acrylamid/Bisacrylamid [29:1], 125mM Tris [pH 6,8], 0,1% SDS, 0,2% TEMED, 0,2% APS) auf das Trenngel gegossen. Für die Ausbildung von Probestaschen wurde in das noch flüssige Sammelgel sofort ein Teflonkamm gesteckt.

Proteinproben konnten anschließend auf das Gel geladen werden. Dazu wurden diese in 1x SDS-Probenpuffer (62,5mM Tris [pH 6,8], 10% Glycerin, 2% SDS, 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,01% Bromphenolblau) aufgenommen, durch Erhitzen vollständig denaturiert und nach Auftragen auf das Gel bei einer Stromstärke von 24mA in SDS-Laufpuffer nach ihrer Größe aufgetrennt. Als Größenstandard für das Abschätzen des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine wurde der *Precision Prestained Plus Protein Standard* (Biorad) mit aufgetragen.

Für hochmolekulare Proteine wurden kommerzielle 3- bis 8%ige *NuPAGE* Tris-Acetat-Gele (Invitrogen) verwendet. Als Laufpuffer diente hier 1x Tris-Acetat-Puffer (25mM Tris, 25mM Trizin, 0,05% SDS, pH 8,25).

### 5.5.2 Western Blot

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Polyacrylamidgele für 5min in 1x Transferpuffer (25mM Tris, 19,2mM Glycin, 0,01% SDS, 20% Methanol, [pH 8,5]) gelegt und anschließend auf eine PVDF-Membran (Millipore) überführt, die sandwichartig in je drei Lagen *Whatman*-Filterpapiere eingebettet wurde. Die Filterpapiere wurden dazu ebenfalls in Transferpuffer getränkt, ebenso die Membran, die zuvor bereits in Methanol getränkt worden war. Der „Sandwich“ wurde auf einer *Semidry*-Apparatur (angefertigt in der technischen Werkstatt des Max-Planck-Institutes für Biochemie, Martinsried) luftblasenfrei aufgebaut. Anschließend konnten die Proteine aus dem Gel bei einer konstanten Stromstärke von  $2\text{mA}/\text{cm}^2$  Membran für 2h auf die Membran transferiert werden.

Für hochmolekulare Proteine erfolgte der Transfer alternativ im Tankblot (Amersham) mit *Swift*-Puffer (G-Biosciences, St. Louis, USA) für 2h bei konstanter Stromstärke von 200mA bei 4°C.

Zur Besetzung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran mit den immobilisierten Proteinen für mindestens 30min in *blocking*-Puffer (5% Magermilchpulver in PBS-T) geschwenkt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in PBS-T über Nacht bei 4°C. Danach wurde die Membran mindestens dreimal für 10min bei RT in PBS-T gewaschen und anschließend mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Dianova, Hamburg) in PBS-T bei RT für 1h inkubiert. Nach drei weiteren zehnmütigen Waschschritten mit PBS-T wurden die Signale durch eine Chemolumineszenzreaktion mit ECL (GE-Healthcare) gemäß Herstellerprotokoll gewonnen. Die Signaldetektion erfolgte mit Hilfe von Chemolumineszenzfilmen (GE-Healthcare) und der Entwicklermaschine *Agfa CP1000B* (Agfa).

Folgende Primärantikörper wurden in dieser Arbeit für Western Blots eingesetzt:

<b>Name</b> (Kat.-Nr.)	<b>Typ</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
anti-HA (16B12)	monoklonal (Maus)	1:7000	Covance
anti-Flag (M2)	monoklonal (Maus)	1:7000	Sigma-Aldrich
anti-SV5 (R960-25)	monoklonal (Maus)	1:7000	Invitrogen
anti-RGS-(His) <sub>6</sub> (34610)	monoklonal (Maus)	1:5000	Qiagen
anti-SEN3	polyklonal (Kaninchen)	1:2000	M. Haindl, s. Haindl <i>et al.</i> , 2008
anti-SEN3 (G3)	monoklonal (Maus)	1:100	Santa Cruz
anti-PELP1 (A300-180A)	polyklonal (Kaninchen)	1:7000	Bethyl
anti-TEX10 (173721AP)	polyklonal (Kaninchen)	1:400	ProteinTech Group
anti-WDR18 (151651AP)	polyklonal (Kaninchen)	1:400	ProteinTech Group
anti-MDN1 (HPA029666)	polyklonal (Kaninchen)	1:1000	Sigma-Aldrich
anti-LAS1L (AV34629)	polyklonal (Kaninchen)	1:1000	Sigma-Aldrich
anti-NPM1/B23 (NA24)	monoklonal (Maus)	1:2000	Santa Cruz
anti-NPM1 (32-5200)	monoklonal (Maus)	1:1000	Invitrogen

anti-U2AF65 (37483)	polyklonal (Kaninchen)	1:2000	abcam
anti-Fibrillarin (ab5821)	polyklonal (Kaninchen)	1:2000	abcam
anti-BOP1	monoklonal (Ratte)	1:50	D. Eick, Helmholtz-Zentrum, München
anti- $\beta$ -Tubulin (E7)	monoklonal (Maus)	1:2000	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-Vinculin (hVIN-1)	monoklonal (Maus)	1:10000	Sigma-Aldrich

Folgende Sekundärantikörper wurden in dieser Arbeit für Western Blots eingesetzt:

Typ	Verdünnung	Bezugsquelle
Ziege anti-Maus	1:5000	Dianova
Ziege anti-Kaninchen	1:5000	Dianova
Esel anti-Ratte	1:5000	Dianova

### 5.5.3 Coomassiefärbung von Proteingelen

Um Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden Polyacrylamidgele für 2–5h bei RT in *PageBlue Protein Staining*-Lösung (Fermentas) gefärbt und anschließend durch mehrfaches Waschen mit Wasser wieder entfärbt.

### 5.5.4 Lyse und Präparation von Zelllysaten

Zelllysate aus Säugerzellen, die direkt über SDS-PAGE und Western Blot analysiert werden sollten, wurden nach einmaligem Waschen mit PBS durch sofortige Zugabe von SDS-Probenpuffer (400 $\mu$ l/10cm<sup>2</sup>) lysiert. Das Lysat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und 5min bei 95°C aufgekocht, bevor die Proben auf ein Polyacrylamidgel geladen wurden.

### 5.5.5 Immunpräzipitation (IP)

Zur Isolierung von Proteinen aus einem Zellextrakt wurden  $9 \times 10^6$  HeLa-Zellen aus einer 15cm-Kulturschale mit ca. 90% Konfluenz einmal mit PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 1ml Immunpräzipitationspuffer (50mM HEPES [pH 7,4], 150mM NaCl, 2mM EDTA, 0,5% NP40, Proteaseinhibitoren [*Complete*, Roche]) mit einem Zellschaber

von der Schale abgekratzt. Die Zellyse erfolgte durch Rotation für 30min bei 4°C. Unlösliche Zellbestandteile wurden danach für 30min bei 20000g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit 20µl anti-Flag-M2-Agarose (Sigma-Aldrich) bzw. mit anti-HA-Agarose (Roche) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Für die Immunpräzipitation endogener Proteine wurde der Überstand zunächst durch eine 60minütige Inkubation mit 20µl ProteinA/G-Agarose (Calbiochem) von Proteinen mit unspezifischer Bindung an die Agarose gereinigt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Antikörper (3–10µg) über Nacht bei 4°C. Daraufhin wurden erneut 20µl ProteinA/G-Agarose für 1–2h zu den Lysaten hinzugefügt, um den Antikörper daran zu koppeln. Als Kontrolle für Immunpräzipitationen auf endogenem Niveau dienen die jeweiligen IgGs, die entsprechend der verwendeten Antikörper eingesetzt wurden.

Nach Inkubation mit der Agarose wurden die Lysate dreimal mit IP-Puffer gewaschen. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, und die Proteine wurden in 20µl 2x SDS-Probenpuffer durch fünfminütiges Aufkochen von der Matrix eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot (siehe 5.5.1 und 5.5.2) nachgewiesen.

Für Immunpräzipitationen, in denen WDR18 als kopräzipitierendes Protein von endogenem PELP1 nachgewiesen werden sollte, wurde ein Vernetzungskit (*Crosslink Immunoprecipitation Kit*, Pierce, Rockford, USA) verwendet. Da WDR18 auf derselben Höhe wie die schwere IgG-Kette auf einem Polyacrylamidgel läuft, musste in diesem Fall der Antikörper mit der eingesetzten Agarose irreversibel vernetzt werden, um ein WDR18-Signal ohne IgG-Hintergrund auf der Membran detektieren zu können.

### 5.5.6 Identifikation von PELP1-Interaktionspartnern

Zur Identifikation von PELP1-Interaktionspartnern wurden jeweils fünf 15cm-Schalen HeLa-Zellen transient mit Flag-PELP1 oder Leervektor transfiziert. Die Lyse und Bindung an die anti-Flag-M2-Agarose erfolgte wie in 5.5.5 beschrieben, jedoch wurde dem IP-Puffer zusätzlich N-Ethylmaleimid hinzugefügt, um SUMO-Isopeptidasen zu inaktivieren. Für die Elution des gebundenen Materials von der Matrix wurden 150µl einer Flag-Peptid-Lösung (0,2mg/ml) in Lysepuffer für 1h bei RT mit den an die Agarose gebundenen Proteinen inkubiert. Anschließend erfolgte eine TCA-Präzipitation der Eluate für 15min auf Eis. Die so gefällten Proteine wurden für 20min bei 20000g und 4°C abzentrifugiert und einmal mit eiskaltem Ethanol gewaschen. Nach Trocknen und Aufkochen der Proteine in SDS-Probenpuffer wurden diese über SDS-PAGE (siehe 5.5.1) aufgetrennt und durch Coomassiefärbung (siehe 5.5.3) sichtbar gemacht. Alle Proteinbanden wurden ausgeschnitten und im Gel tryptisch verdaut. Die aus dem Gel eluierten Peptide wurden

anschließend im *MALDI-TOF*-Massenspektrometer analysiert. Die Identifikation der Proteine erfolgte über deren Peptidmassen unter Benutzung des Programmes *Mascot*.

### 5.5.7 RNA-Immunpräzipitation (RIP)

Für die Isolierung PELP1-assoziiierter RNAs wurden  $8 \times 10^7$  HeLa-Zellen eingesetzt. Diese wurden in IP-Puffer (25mM Tris/HCl [pH 7,2], 100mM KCl, 2,5mM EDTA, 10% Glycerol, 1,4% NP-40, 0,2% Na-Deoxycholat, 2mM DTT, 20U/ml RNase-Inhibitor [Roche], Protease-inhibitoren [*Complete*, Roche]) lysiert, bevor eine Immunpräzipitation (siehe 5.5.5) mit einem polyklonalen PELP1-Antikörper erfolgte.

10% des präzipitierten Materials wurde für Western Blot (siehe 5.5.2) eingesetzt, um eine effiziente IP zu gewährleisten. Der Rest wurde für eine RNA-Extraktion mit Hilfe von TRIZOL (Invitrogen) (siehe 5.4.11) verwendet. Die RNA wurden mit DNase (Turbo DNA-free, Ambion, Darmstadt) behandelt und einer reversen Transkription (siehe 5.4.13) unterzogen. Die dabei entstandene cDNA wurde als Matrize für eine anschließende PCR-Reaktion (siehe 5.4.1) verwendet, in der die ITS2/28S-Region vervielfältigt wurde. Als Kontrolle dienten Oligonukleotide für das Haushaltsgen GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase):

Zielsequenz	5'-Primer (5' > 3')	3'-Primer (5' > 3')
ITS2/28S	gctctctctcccgtcgcctctc	cctgttcactcgccgttactgagg
GAPDH	tgacaactttggtatcgtggaag	cagtagaggcagggatgatggt

### 5.5.8 Fraktionierung zellulärer Kompartimente

Für die nukleoläre Isolierung wurden pro Ansatz fünf 15cm-Schalen HeLa-Zellen verwendet, die zum Zeitpunkt der Ernte ca. 80% konfluent waren. Für die weiteren Schritte wurde wie unter <http://www.lamondlab.com/f7nucleolarprotocol.htm> beschrieben vorgegangen.

### 5.5.9 Denaturierende Anreicherung von SUMO-Substraten *in vivo*

HeLa-Zellen wurden in 10cm-Zellkulturschalen mit der jeweiligen His<sub>6</sub>-markierten SUMO-Variante transfiziert. 48h nach Transfektion wurden die Zellen in 1ml denaturierendem Nickel-Lysepuffer (6M Guanidiniumhydrochlorid, 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris/HCl [pH 8,4]) aufgenommen und in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß 3x 15s bei 20% Leistung sonifiziert (*Sonopuls HD2200*, Bandelin). Nach Zentrifugation bei 13000g für 10min wurden 100µl des Überstandes als Input abgenommen und anschließend TCA-präzipitiert.

Die gefällten Proteine wurden dann in 200µl 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C aufgeköcht. Die restlichen 900µl des Überstandes wurden über Nacht bei RT mit 20µl magnetischen Kügelchen (Qiagen) auf einem Drehrad inkubiert. Danach wurden die an die Kügelchen gebundenen Proteine dreimal mit Waschpuffer A (8M Harnstoff, 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris/HCl [pH 8,0]), zweimal mit Waschpuffer B (8M Harnstoff, 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris/HCl [pH 6,8]) sowie einmal mit PBS gewaschen und für 5min in 50µl 1x SDS-Probenpuffer aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben zusammen mit den Inputs über SDS-PAGE und Western Blot (siehe 5.5.1 und 5.5.2) analysiert.

#### 5.5.10 Bindungsstudien Matrix-gekoppelter Proteine

Für *in vitro*-GST-Bindungsstudien wurden <sup>35</sup>S-markierte, durch *in vitro*-Transkription und -Translation (TNT *quick coupled reticulocyte lysate system*-Kit, Promega) hergestellte Proteine eingesetzt. Diese wurden in Bindungspuffer (50mM HEPES [pH 7,0]), 120mM NaCl, 0,14% NP-40, 1mM PMSF, 1mM DTT) mit den entsprechenden an Glutathion-Sepharose gekoppelten GST-Fusionsproteinen für 3h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Bindungspuffer für je 10min wurden die Proteine durch Aufkochen in 1x SDS-Probenpuffer für 5min bei 95°C eluiert und mittels SDS-PAGE (siehe 5.5.1) und Autoradiographie unter der Verwendung von *Biomax-MR*-Filmen (Kodak) analysiert.

#### 5.5.11 *In vitro*-Modifikation und -Demodifikation von Proteinen mit SUMO

Substrate wurden durch *in vitro*-Transkription und -Translation (TNT *quick coupled reticulocyte lysate system*-Kit, Promega) gemäß Herstellerangaben erzeugt und durch Zugabe von <sup>35</sup>S-Methionin während der Reaktion radioaktiv markiert. Anschließend wurden für eine Modifikation mit SUMO 2µl des Translatats mit 100ng E1, bestehend aus GST-Aos1 und His<sub>6</sub>-Uba2, 50ng E2 (Ubc9) und 3µg His<sub>6</sub>-SUMO1 bzw. -SUMO2 im entsprechenden Modifikationspuffer (50mM Tris/HCl [pH 7,5], 5mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM ATP) für 90min bei 30°C inkubiert. Sollte zusätzlich eine Demodifikation des Substrats untersucht werden, wurden 4µl der entsprechenden *in vitro* translatierten SUMO-Isopeptidase und 150mM NaCl zugegeben und für weitere 90min bei 30°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 6x SDS-Probenpuffer abgestoppt, für 5min bei 95°C aufgeköcht und durch SDS-PAGE (siehe 5.5.1) aufgetrennt. Nach Trocknung des Polyacrylamidgels unter Vakuum bei 80°C erfolgte die Detektion des *in vitro* translatierten Substrats und seiner SUMO-modifizierten Form(en) mittels Autoradiographie.

## 5.6 Computeranalysen

Datenbankrecherchen wurden mit Hilfe der Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt. Für Sequenzvergleiche, Erstellen von Restriktionskarten, Auswertungen von Sequenzierungen und Design von Oligonukleotiden wurde das Programmpaket *DNA-Star* (DNA Star Inc.) verwendet. Die Quantifizierung von  $^{32}\text{P}$ -markierter RNA erfolgte mit Hilfe der Quantifizierungssoftware *ImageGauge 4.23* (Fuji). Die Erstellung von Texten, Tabellen und Abbildungen wurde mit dem *Microsoft Office*-Paket (Microsoft Corp.) durchgeführt.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ahmad, Y., Boisvert, F. M., Gregor, P., Cobley, A. and Lamond, A. I.** (2009). "NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update." *Nucleic Acids Res* 37(Database issue): D181-4.
- Amerik, A. Y. and Hochstrasser, M.** (2004). "Mechanism and function of deubiquitinating enzymes." *Biochim Biophys Acta* 1695(1-3): 189-207.
- Andersen, J. S., Lam, Y. W., Leung, A. K., Ong, S. E., Lyon, C. E., Lamond, A. I. and Mann, M.** (2005). "Nucleolar proteome dynamics." *Nature* 433(7021): 77-83.
- Apicelli, A. J., Maggi, L. B., Jr., Hirbe, A. C., Miceli, A. P., Olanich, M. E., Schulte-Winkeler, C. L., Saporita, A. J., Kuchenreuther, M., Sanchez, J., Weilbaecher, K. and Weber, J. D.** (2008). "A non-tumor suppressor role for basal p19ARF in maintaining nucleolar structure and function." *Mol Cell Biol* 28(3): 1068-80.
- Ausubel, F.** (1987). "Current protocols in molecular biology." Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience: J. Wiley.
- Ayaydin, F. and Dasso, M.** (2004). "Distinct in vivo dynamics of vertebrate SUMO paralogues." *Mol Biol Cell* 15(12): 5208-18.
- Baba, D., Maita, N., Jee, J. G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugasawa, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H. and Shirakawa, M.** (2005). "Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1." *Nature* 435(7044): 979-82.
- Bailey, D. and O'Hare, P.** (2004). "Characterization of the localization and proteolytic activity of the SUMO-specific protease, SENP1." *J Biol Chem* 279(1): 692-703.
- Bassler, J., Kallas, M., Pertschy, B., Ulbrich, C., Thoms, M. and Hurt, E.** (2010). "The AAA-ATPase Rea1 drives removal of biogenesis factors during multiple stages of 60S ribosome assembly." *Mol Cell* 38(5): 712-21.
- Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R. and Becker, J.** (1998). "Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1." *J Mol Biol* 280(2): 275-86.
- Bernier-Villamor, V., Sampson, D. A., Matunis, M. J. and Lima, C. D.** (2002). "Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1." *Cell* 108(3): 345-56.
- Birnboim, H. C.** (1983). "A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA." *Methods Enzymol* 100: 243-55.

- Boisvert, F. M., Lam, Y. W., Lamont, D. and Lamond, A. I.** (2010). "A quantitative proteomics analysis of subcellular proteome localization and changes induced by DNA damage." *Mol Cell Proteomics* 9(3): 457-70.
- Boisvert, F. M., van Koningsbruggen, S., Navascues, J. and Lamond, A. I.** (2007). "The multifunctional nucleolus." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7): 574-85.
- Bornkamm, G. W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J. M., Laux, G., Bachl, J., Korndoerfer, M., Schlee, M., Holzelt, M., Malamoussi, A., Chapman, R. D., Nimmerjahn, F., Mautner, J., Hillen, W., Bujard, H. and Feuillard, J.** (2005). "Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system." *Nucleic Acids Res* 33(16): e137.
- Bylebyl, G. R., Belichenko, I. and Johnson, E. S.** (2003). "The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast." *J Biol Chem* 278(45): 44113-20.
- Castle, C. D., Cassimere, E. K., Lee, J. and Denicourt, C.** (2010). "Las1L is a nucleolar protein required for cell proliferation and ribosome biogenesis." *Mol Cell Biol* 30(18): 4404-14.
- Ciechanover, A., Hod, Y. and Hershko, A.** (1978). "A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 81: 1100-1105.
- Dai, M. S. and Lu, H.** (2004). "Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5." *J Biol Chem* 279(43): 44475-82.
- Dez, C., Dlakic, M. and Tollervey, D.** (2007). "Roles of the HEAT repeat proteins Utp10 and Utp20 in 40S ribosome maturation." *RNA* 13(9): 1516-27.
- Di Bacco, A., Ouyang, J., Lee, H. Y., Catic, A., Ploegh, H. and Gill, G.** (2006). "The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division." *Mol Cell Biol* 26(12): 4489-98.
- Dikic, I., Wakatsuki, S. and Walters, K. J.** (2009). "Ubiquitin-binding domains - from structures to functions." *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(10): 659-71.
- Dimple, C., Nair, S. S., Rajhans, R., Pitcheswara, P. R., Liu, J., Balasenthil, S., Le, X. F., Burow, M. E., Auersperg, N., Tekmal, R. R., Broaddus, R. R. and Vadlamudi, R. K.** (2008). "Role of PELP1/MNAR signaling in ovarian tumorigenesis." *Cancer Res* 68(12): 4902-9.
- Fatica, A., Oeffinger, M., Dlakic, M. and Tollervey, D.** (2003). "Nob1p is required for cleavage of the 3' end of 18S rRNA." *Mol Cell Biol* 23(5): 1798-807.
- French, S. L., Osheim, Y. N., Cioci, F., Nomura, M. and Beyer, A. L.** (2003). "In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined

by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes." *Mol Cell Biol* 23(5): 1558-68.

- Galani, K., Nissan, T. A., Petfalski, E., Tollervey, D. and Hurt, E.** (2004). "Rea1, a dynein-related nuclear AAA-ATPase, is involved in late rRNA processing and nuclear export of 60 S subunits." *J Biol Chem* 279(53): 55411-8.
- Ganapathi, K. A. and Shimamura, A.** (2008). "Ribosomal dysfunction and inherited marrow failure." *Br J Haematol* 141(3): 376-87.
- Ganot, P., Jady, B. E., Bortolin, M. L., Darzacq, X. and Kiss, T.** (1999). "Nucleolar factors direct the 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of U6 spliceosomal RNA." *Mol Cell Biol* 19(10): 6906-17.
- Gareau, J. and Lima, C.** (2010). "The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition." *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11(12): 861-71.
- Geiss-Friedlander, R. and Melchior, F.** (2007). "Concepts in sumoylation: a decade on." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(12): 947-56.
- Ghoshal, K. and Jacob, S. T.** (1996). "Heat shock inhibits pre-rRNA processing at the primary site in vitro and alters the activity of some rRNA binding proteins." *J Cell Biochem* 62(4): 506-15.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O. A., Thain, A., Anderson, L. A., Snowden, A. W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N. D. and Hay, R. T.** (2003). "P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification." *Mol Cell* 11(4): 1043-54.
- Goldknopf, I. L. and Busch, H.** (1977). "Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(3): 864-8.
- Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D. H., Niall, H. D. and Boyse, E. A.** (1975). "Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(1): 11-5.
- Golebiowski, F., Matic, I., Tatham, M. H., Cole, C., Yin, Y., Nakamura, A., Cox, J., Barton, G. J., Mann, M. and Hay, R. T.** (2009). "System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock." *Sci Signal* 2(72): ra24.
- Gong, L. and Yeh, E. T.** (2006). "Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3." *J Biol Chem* 281(23): 15869-77.
- Groettrup, M., Pelzer, C., Schmidtke, G. and Hofmann, K.** (2008). "Activating the ubiquitin family: UBA6 challenges the field." *Trends Biochem Sci* 33(5): 230-7.

- Haindl, M., Harasim, T., Eick, D. and Muller, S.** (2008). "The nucleolar SUMO-specific protease SENP3 reverses SUMO modification of nucleophosmin and is required for rRNA processing." *EMBO Rep* 9(3): 273-9.
- Hang, J. and Dasso, M.** (2002). "Association of the human SUMO-1 protease SENP2 with the nuclear pore." *J Biol Chem* 277(22): 19961-6.
- Hardeland, U., Bentele, M., Lettieri, T., Steinacher, R., Jiricny, J. and Schar, P.** (2001). "Thymine DNA glycosylase." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68: 235-53.
- Hay, R. T.** (2005). "SUMO: a history of modification." *Mol Cell* 18(1): 1-12.
- Hay, R. T.** (2007). "SUMO-specific proteases: a twist in the tail." *Trends Cell Biol* 17(8): 370-6.
- Hecker, C. M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P. and Dikic, I.** (2006). "Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs." *J Biol Chem* 281(23): 16117-27.
- Hernandez-Verdun, D., Roussel, P., Thiry, M., Sirri, V. and Lafontaine, D. L. J.** (2010). "The Nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism." *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 1(3): 415-431.
- Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A. L. and Rose, I. A.** (1980). "Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(4): 1783-6.
- Heun, P.** (2007). "SUMO organization of the nucleus." *Curr Opin Cell Biol* 19(3): 350-5.
- Hicke, L. and Dunn, R.** (2003). "Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins." *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 141-72.
- Hietakangas, V., Anckar, J., Blomster, H. A., Fujimoto, M., Palvimo, J. J., Nakai, A. and Sistonen, L.** (2006). "PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(1): 45-50.
- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S.** (2002). "RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO." *Nature* 419(6903): 135-41.
- Holzel, M., Rohrmoser, M., Schlee, M., Grimm, T., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Hiddemann, W., Bornkamm, G. W. and Eick, D.** (2005). "Mammalian WDR12 is a novel member of the Pes1-Bop1 complex and is required for ribosome biogenesis and cell proliferation." *J Cell Biol* 170(3): 367-78.
- Jentsch, S. and Pyrowolakis, G.** (2000). "Ubiquitin and its kin: how close are the family ties?" *Trends Cell Biol* 10(8): 335-42.
- Jin, A., Itahana, K., O'Keefe, K. and Zhang, Y.** (2004). "Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23." *Mol Cell Biol* 24(17): 7669-80.

- Johnson, E. S. and Blobel, G.** (1997). "Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p." *J Biol Chem* 272(43): 26799-802.
- Johnson, E. S., Schwienhorst, I., Dohmen, R. J. and Blobel, G.** (1997). "The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer." *EMBO J* 16(18): 5509-19.
- Kagey, M. H., Melhuish, T. A. and Wotton, D.** (2003). "The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3." *Cell* 113(1): 127-37.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U. and Jentsch, S.** (1999). "A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly." *Cell* 96(5): 635-44.
- Kressler, D., Hurt, E. and Bassler, J.** (2010). "Driving ribosome assembly." *Biochim Biophys Acta* 1803(6): 673-83.
- Kressler, D., Roser, D., Pertschy, B. and Hurt, E.** (2008). "The AAA ATPase Rix7 powers progression of ribosome biogenesis by stripping Nsa1 from pre-60S particles." *J Cell Biol* 181(6): 935-44.
- Krogan, N. J., Peng, W. T., Cagney, G., Robinson, M. D., Haw, R., Zhong, G., Guo, X., Zhang, X., Canadien, V., Richards, D. P., Beattie, B. K., Lalev, A., Zhang, W., Davierwala, A. P., Mnaimneh, S., Starostine, A., Tikuisis, A. P., Grigull, J., Datta, N., Bray, J. E., Hughes, T. R., Emili, A. and Greenblatt, J. F.** (2004). "High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes." *Mol Cell* 13(2): 225-39.
- Kuo, M. L., den Besten, W., Thomas, M. C. and Sherr, C. J.** (2008). "Arf-induced turnover of the nucleolar nucleophosmin-associated SUMO-2/3 protease Senp3." *Cell Cycle* 7(21): 3378-87.
- Kurepa, J., Walker, J. M., Smalle, J., Gosink, M. M., Davis, S. J., Durham, T. L., Sung, D. Y. and Vierstra, R. D.** (2003). "The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in Arabidopsis. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress." *J Biol Chem* 278(9): 6862-72.
- LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A. and Tollervey, D.** (2005). "RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex." *Cell* 121(5): 713-24.
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.
- Lallemand-Breitenbach, V., Jeanne, M., Benhenda, S., Nasr, R., Lei, M., Peres, L., Zhou, J., Zhu, J., Raught, B. and de The, H.** (2008). "Arsenic degrades PML or PML-

- RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway." *Nat Cell Biol* 10(5): 547-55.
- Li, S. J. and Hochstrasser, M.** (1999). "A new protease required for cell-cycle progression in yeast." *Nature* 398(6724): 246-51.
- Li, S. J. and Hochstrasser, M.** (2000). "The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein." *Mol Cell Biol* 20(7): 2367-77.
- Li, S. J. and Hochstrasser, M.** (2003). "The Ulp1 SUMO isopeptidase: distinct domains required for viability, nuclear envelope localization, and substrate specificity." *J Cell Biol* 160(7): 1069-81.
- Lima, C. D. and Reverter, D.** (2008). "Structure of the human SENP7 catalytic domain and poly-SUMO deconjugation activities for SENP6 and SENP7." *J Biol Chem* 283(46): 32045-55.
- Lohrum, M. A., Ludwig, R. L., Kubbutat, M. H., Hanlon, M. and Vousden, K. H.** (2003). "Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11." *Cancer Cell* 3(6): 577-87.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. and Melchior, F.** (1997). "A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2." *Cell* 88(1): 97-107.
- Matic, I., Schimmel, J., Hendriks, I., van Santen, M., van de Rijke, F., van Dam, H., Gnad, F., Mann, M. and Vertegaal, A.** (2010). "Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif." *Mol Cell* 39(4): 641-52.
- Matic, I., van Hagen, M., Schimmel, J., Macek, B., Ogg, S. C., Tatham, M. H., Hay, R. T., Lamond, A. I., Mann, M. and Vertegaal, A. C.** (2008). "In vivo identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy." *Mol Cell Proteomics* 7(1): 132-44.
- Matunis, M. J., Coutavas, E. and Blobel, G.** (1996). "A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex." *J Cell Biol* 135(6 Pt 1): 1457-70.
- Mayer, C. and Grummt, I.** (2005). "Cellular stress and nucleolar function." *Cell Cycle* 4(8): 1036-8.
- Meulmeester, E., Kunze, M., Hsiao, H. H., Urlaub, H. and Melchior, F.** (2008). "Mechanism and consequences for paralog-specific sumoylation of ubiquitin-specific protease 25." *Mol Cell* 30(5): 610-9.

- Miles, T. D., Jakovljevic, J., Horsey, E. W., Harnpicharnchai, P., Tang, L. and Woolford, J. L., Jr.** (2005). "Ytm1, Nop7, and Erb1 form a complex necessary for maturation of yeast 66S preribosomes." *Mol Cell Biol* 25(23): 10419-32.
- Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M. and Caput, D.** (2000). "Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif." *J Biol Chem* 275(46): 36316-23.
- Mo, Y. Y., Yu, Y., Shen, Z. and Beck, W. T.** (2002). "Nucleolar delocalization of human topoisomerase I in response to topotecan correlates with sumoylation of the protein." *J Biol Chem* 277(4): 2958-64.
- Mossessova, E. and Lima, C. D.** (2000). "Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast." *Mol Cell* 5(5): 865-76.
- Mougey, E. B., O'Reilly, M., Osheim, Y., Miller, O. L., Jr., Beyer, A. and Sollner-Webb, B.** (1993). "The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes." *Genes Dev* 7(8): 1609-19.
- Muller, S., Hoegge, C., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S.** (2001). "SUMO, ubiquitin's mysterious cousin." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(3): 202-10.
- Muller, S., Ledl, A. and Schmidt, D.** (2004). "SUMO: a regulator of gene expression and genome integrity." *Oncogene* 23(11): 1998-2008.
- Muratani, M. and Tansey, W. P.** (2003). "How the ubiquitin-proteasome system controls transcription." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(3): 192-201.
- Narla, A. and Ebert, B. L.** (2010). "Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction." *Blood* 115(16): 3196-205.
- Nishida, T., Kaneko, F., Kitagawa, M. and Yasuda, H.** (2001). "Characterization of a novel mammalian SUMO-1/Smt3-specific isopeptidase, a homologue of rat axam, which is an axin-binding protein promoting beta-catenin degradation." *J Biol Chem* 276(42): 39060-6.
- Nishida, T., Tanaka, H. and Yasuda, H.** (2000). "A novel mammalian Smt3-specific isopeptidase 1 (SMT3IP1) localized in the nucleolus at interphase." *Eur J Biochem* 267(21): 6423-7.
- Nishida, T. and Yamada, Y.** (2008). "SMT3IP1, a nucleolar SUMO-specific protease, deconjugates SUMO-2 from nucleolar and cytoplasmic nucleophosmin." *Biochem Biophys Res Commun* 374(2): 382-7.

- Nissan, T. A., Bassler, J., Petfalski, E., Tollervey, D. and Hurt, E.** (2002). "60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm." *EMBO J* 21(20): 5539-47.
- Nissan, T. A., Galani, K., Maco, B., Tollervey, D., Aebi, U. and Hurt, E.** (2004). "A pre-ribosome with a tadpole-like structure functions in ATP-dependent maturation of 60S subunits." *Mol Cell* 15(2): 295-301.
- Olson, M. O.** (2010). "Nucleolus: Structure and Function." *Encyclopedia of Life Science*.
- Ouyang, J., Shi, Y., Valin, A., Xuan, Y. and Gill, G.** (2009). "Direct binding of CoREST1 to SUMO-2/3 contributes to gene-specific repression by the LSD1/CoREST1/HDAC complex." *Mol Cell* 34(2): 145-54.
- Ouyang, J., Valin, A. and Gill, G.** (2009). "Regulation of transcription factor activity by SUMO modification." *Methods Mol Biol* 497: 141-52.
- Owerbach, D., McKay, E. M., Yeh, E. T., Gabbay, K. H. and Bohren, K. M.** (2005). "A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation." *Biochem Biophys Res Commun* 337(2): 517-20.
- Panse, V. G., Kressler, D., Pauli, A., Petfalski, E., Gnadig, M., Tollervey, D. and Hurt, E.** (2006). "Formation and nuclear export of preribosomes are functionally linked to the small-ubiquitin-related modifier pathway." *Traffic* 7(10): 1311-21.
- Pederson, T. and Politz, J. C.** (2000). "The nucleolus and the four ribonucleoproteins of translation." *J Cell Biol* 148(6): 1091-5.
- Peng, W. T., Robinson, M. D., Mnaimneh, S., Krogan, N. J., Cagney, G., Morris, Q., Davierwala, A. P., Grigull, J., Yang, X., Zhang, W., Mitsakakis, N., Ryan, O. W., Datta, N., Jojic, V., Pal, C., Canadien, V., Richards, D., Beattie, B., Wu, L. F., Altschuler, S. J., Roweis, S., Frey, B. J., Emili, A., Greenblatt, J. F. and Hughes, T. R.** (2003). "A panoramic view of yeast noncoding RNA processing." *Cell* 113(7): 919-33.
- Pestov, D. G., Lapik, Y. R. and Lau, L. F.** (2008). "Assays for ribosomal RNA processing and ribosome assembly." *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 22: Unit 22 11.
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J. S., Dejean, A. and Melchior, F.** (2002). "The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity." *Cell* 108(1): 109-20.
- Pickart, C. M.** (2001). "Mechanisms underlying ubiquitination." *Annu Rev Biochem* 70: 503-33.
- Pickart, C. M. and Eddins, M. J.** (2004). "Ubiquitin: structures, functions, mechanisms." *Biochim Biophys Acta* 1695(1-3): 55-72.

- Rajhans, R., Nair, S., Holden, A. H., Kumar, R., Tekmal, R. R. and Vadlamudi, R. K.** (2007). "Oncogenic potential of the nuclear receptor coregulator proline-, glutamic acid-, leucine-rich protein 1/modulator of the nongenomic actions of the estrogen receptor." *Cancer Res* 67(11): 5505-12.
- Reverter, D. and Lima, C. D.** (2004). "A basis for SUMO protease specificity provided by analysis of human Senp2 and a Senp2-SUMO complex." *Structure* 12(8): 1519-31.
- Reverter, D. and Lima, C. D.** (2005). "Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex." *Nature* 435(7042): 687-92.
- Reverter, D. and Lima, C. D.** (2006). "Structural basis for SENP2 protease interactions with SUMO precursors and conjugated substrates." *Nat Struct Mol Biol* 13(12): 1060-8.
- Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoege, C. and Jentsch, S.** (2005). "A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting." *Cell* 120(1): 73-84.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. and Seraphin, B.** (1999). "A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration." *Nat Biotechnol* 17(10): 1030-2.
- Rosby, R., Cui, Z., Rogers, E., deLivron, M. A., Robinson, V. L. and DiMario, P. J.** (2009). "Knockdown of the Drosophila GTPase nucleostemin 1 impairs large ribosomal subunit biogenesis, cell growth, and midgut precursor cell maintenance." *Mol Biol Cell* 20(20): 4424-34.
- Rosendorff, A., Sakakibara, S., Lu, S., Kieff, E., Xuan, Y., DiBacco, A., Shi, Y. and Gill, G.** (2006). "NXP-2 association with SUMO-2 depends on lysines required for transcriptional repression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(14): 5308-13.
- Ross, S., Best, J. L., Zon, L. I. and Gill, G.** (2002). "SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization." *Mol Cell* 10(4): 831-42.
- Ruggero, D. and Pandolfi, P. P.** (2003). "Does the ribosome translate cancer?" *Nat Rev Cancer* 3(3): 179-92.
- Saitoh, H. and Hinchev, J.** (2000). "Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3." *J Biol Chem* 275(9): 6252-8.
- Sambrook, J., Maniatis, T. and Fritsch, E. F.** (1989). "Molecular Cloning: A laboratory Manual." CSH Laboratory Press, 2.
- Sambrook, J. and Russel, D. W.** (2001). "Molecular Cloning: A laboratory Manual." CSH Laboratory Press, 3.

- Sapetschnig, A., Rischitor, G., Braun, H., Doll, A., Schergaut, M., Melchior, F. and Suske, G.** (2002). "Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1." *EMBO J* 21(19): 5206-15.
- Schafer, T., Maco, B., Petfalski, E., Tollervey, D., Bottcher, B., Aebi, U. and Hurt, E.** (2006). "Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit." *Nature* 441(7093): 651-5.
- Schafer, T., Strauss, D., Petfalski, E., Tollervey, D. and Hurt, E.** (2003). "The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes." *EMBO J* 22(6): 1370-80.
- Schlosser, I., Holzel, M., Murnseer, M., Burtscher, H., Weidle, U. H. and Eick, D.** (2003). "A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing." *Nucleic Acids Res* 31(21): 6148-56.
- Schmidt, D. and Muller, S.** (2002). "Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5): 2872-7.
- Schwartz, D. C. and Hochstrasser, M.** (2003). "A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers." *Trends Biochem Sci* 28(6): 321-8.
- Schwarz, S. E., Matuschewski, K., Liakopoulos, D., Scheffner, M. and 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(2): 560-4.
- Seet, B. T., Dikic, I., Zhou, M. M. and Pawson, T.** (2006). "Reading protein modifications with interaction domains." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(7): 473-83.
- Shen, L. N., Dong, C., Liu, H., Naismith, J. H. and Hay, R. T.** (2006). "The structure of SENP1-SUMO-2 complex suggests a structural basis for discrimination between SUMO paralogues during processing." *Biochem J* 397(2): 279-88.
- Shen, L. N., Geoffroy, M. C., Jaffray, E. G. and Hay, R. T.** (2009). "Characterization of SENP7, a SUMO-2/3-specific isopeptidase." *Biochem J* 421(2): 223-30.
- Shen, T. H., Lin, H. K., Scaglioni, P. P., Yung, T. M. and Pandolfi, P. P.** (2006). "The mechanisms of PML-nuclear body formation." *Mol Cell* 24(3): 331-9.
- Sherr, C. J.** (2006). "Divorcing ARF and p53: an unsettled case." *Nat Rev Cancer* 6(9): 663-73.
- Song, J., Durrin, L. K., Wilkinson, T. A., Krontiris, T. G. and Chen, Y.** (2004). "Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(40): 14373-8.
- Stehmeier, P. and Muller, S.** (2009). "Phospho-regulated SUMO interaction modules connect the SUMO system to CK2 signaling." *Mol Cell* 33(3): 400-9.

- Stielow, B., Sapetschnig, A., Wink, C., Kruger, I. and Suske, G.** (2008). "SUMO-modified Sp3 represses transcription by provoking local heterochromatic gene silencing." *EMBO Rep* 9(9): 899-906.
- Sugimoto, M., Kuo, M. L., Rousset, M. F. and Sherr, C. J.** (2003). "Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing." *Mol Cell* 11(2): 415-24.
- Tao, W. and Levine, A. J.** (1999). "P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleocytoplasmic shuttling of Mdm2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(12): 6937-41.
- Tatham, M. H., Geoffroy, M. C., Shen, L., Plechanovova, A., Hattersley, N., Jaffray, E. G., Palvimo, J. J. and Hay, R. T.** (2008). "RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation." *Nat Cell Biol* 10(5): 538-46.
- Tatham, M. H., Jaffray, E., Vaughan, O. A., Desterro, J. M., Botting, C. H., Naismith, J. H. and Hay, R. T.** (2001). "Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9." *J Biol Chem* 276(38): 35368-74.
- Torres-Rosell, J., Sunjevaric, I., De Piccoli, G., Sacher, M., Eckert-Boulet, N., Reid, R., Jentsch, S., Rothstein, R., Aragon, L. and Lisby, M.** (2007). "The Smc5-Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus." *Nat Cell Biol* 9(8): 923-31.
- Tschochner, H. and Hurt, E.** (2003). "Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm." *Trends Cell Biol* 13(5): 255-63.
- Ulbrich, C., Diepholz, M., Bassler, J., Kressler, D., Pertschy, B., Galani, K., Bottcher, B. and Hurt, E.** (2009). "Mechanochemical removal of ribosome biogenesis factors from nascent 60S ribosomal subunits." *Cell* 138(5): 911-22.
- Vadlamudi, R. K. and Kumar, R.** (2007). "Functional and biological properties of the nuclear receptor coregulator PELP1/MNAR." *Nucl Recept Signal* 5: e004.
- Valentin, G. G.** (1836). "Repertorium für Anatomie und Physiologie." Verlag von Huber und Comp., Band 1.
- van Riggelen, J., Yetil, A. and Felsher, D. W.** (2010). "MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis." *Nat Rev Cancer* 10(4): 301-9.
- Vijay-Kumar, S., Bugg, C. E. and Cook, W. J.** (1987). "Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution." *J Mol Biol* 194(3): 531-44.
- Visintin, R., Hwang, E. S. and Amon, A.** (1999). "Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus." *Nature* 398(6730): 818-23.
- Warner, J. R.** (1999). "The economics of ribosome biosynthesis in yeast." *Trends Biochem Sci* 24(11): 437-40.

- Welchman, R. L., Gordon, C. and Mayer, R. J.** (2005). "Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(8): 599-609.
- Wild, T., Horvath, P., Wyler, E., Widmann, B., Badertscher, L., Zemp, I., Kozak, K., Csucs, G., Lund, E. and Kutay, U.** (2010). "A protein inventory of human ribosome biogenesis reveals an essential function of exportin 5 in 60S subunit export." *PLoS Biol* 8(10): e1000522.
- Wilkinson, K. D., Urban, M. K. and Haas, A. L.** (1980). "Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes." *J Biol Chem* 255(16): 7529-32.
- Wolin, S. L. and Matera, A. G.** (1999). "The trials and travels of tRNA." *Genes Dev* 13(1): 1-10.
- Wu, L. F., Hughes, T. R., Davierwala, A. P., Robinson, M. D., Stoughton, R. and Altschuler, S. J.** (2002). "Large-scale prediction of *Saccharomyces cerevisiae* gene function using overlapping transcriptional clusters." *Nat Genet* 31(3): 255-65.
- Xu, Z. and Au, S. W.** (2005). "Mapping residues of SUMO precursors essential in differential maturation by SUMO-specific protease, SENP1." *Biochem J* 386(Pt 2): 325-30.
- Yun, C., Wang, Y., Mukhopadhyay, D., Backlund, P., Kolli, N., Yergey, A., Wilkinson, K. D. and Dasso, M.** (2008). "Nucleolar protein B23/nucleophosmin regulates the vertebrate SUMO pathway through SENP3 and SENP5 proteases." *J Cell Biol* 183(4): 589-95.
- Zeller, K. I., Zhao, X., Lee, C. W., Chiu, K. P., Yao, F., Yustein, J. T., Ooi, H. S., Orlov, Y. L., Shahab, A., Yong, H. C., Fu, Y., Weng, Z., Kuznetsov, V. A., Sung, W. K., Ruan, Y., Dang, C. V. and Wei, C. L.** (2006). "Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(47): 17834-9.
- Zhang, H., Saitoh, H. and Matunis, M. J.** (2002). "Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex." *Mol Cell Biol* 22(18): 6498-508.
- Zhang, Y., Wolf, G. W., Bhat, K., Jin, A., Allio, T., Burkhardt, W. A. and Xiong, Y.** (2003). "Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway." *Mol Cell Biol* 23(23): 8902-12.





```

Human_WDR18      1  MAAPREVAVCGDDSAAPMNSCIWMEHSGANLITPRGCGQAGPRGLAIIINGEYLAAPLGRVYHSAWELQ---KRDQLQKIKCPGPRVGLFAS
Yeast_IPI3       1  --MDPQVITFTWSSGTLASVHSEEDQIN---LRGCEIYGRNSCVQYGN-KYLPINLQKALLNVAKNSGSPFKKESVQKMLPDELKNGEYVY

Human_WDR18      93 -----LVTALGVAREIHL--WVSSGNTI-VLISRHYQVSCDQFEGDSSHFESGNDCLVHWMS--LGSVLQADPS
Yeast_IPI3      89  GVQYDRIQGVNHNLPDFNIPYLLLIGSTESGKMYIWHNSGILINLVKPMKHVYQSLIKKSLINGEYIIFSGHDSRVIHWQVLDIVSASNDDE-

Human_WDR18     163  APRKWSHHAATLWDLHCGE--FGDPLARVAH-----SLDQVVKIWEVSSGE--LILSVLPDVSMAVWMDLAEHH
Yeast_IPI3     180  KPLCLHNDHLEFVWDFQVSSSQCKTISCUDKILFVSGDATTICVDLSLIGSKKKQKANENDVSLGKTPVTLAFTTPYSKSIWEDPADRA

Human_WDR18     233  GSGEGSLIQVDTFTWPGQREERERFDEQDNGK--VPRFG-----HRN-----QVFGIIVSPDGSVILISGSH
Yeast_IPI3     275  GLAEG-CQSHNMFYKLGK-NALVNIILQSAQVNVWQKGVFSLVQKNSLIGGENEDLDALYANGQLVGENVINSWVSGEHSMDGELIILIGDT

Human_WDR18     293  VRWVWVQSKQCTRWVALK-----GPTVMAALITLAPVSNL-----SDFRPS-----PLDPHKKHLIGALHGDPEPRHG
Yeast_IPI3     368  VSIATVYKSKQLRRLIQFTLWTSQDSVCEVWV---LITNPRRLERGNILFEGEISKGQKQSNNGHNFKIPMLIQRVIFDQKMRGCHLDIVYQIG

Human_WDR18     357  -----LTLRLG-----DHQ-----QSGEPG-----YLDRLFEQLQAVLCSWQKSVTGG--QDQTRVAVFTIIDEVRMNRKINRDI
Yeast_IPI3     460  AETDPMALPNDPNAAYLDFQVAKTQSGSLIASHIGKVSNSVAVIDNKLDAHSSLDNAKADDELIEIKWITLALITAAKSLPDMHHRKIVREHQVH

Human_WDR18     423  SRRFTRPAK
Yeast_IPI3     555  Q-----

```

Anhang Abb. 3 Aminosäure-Sequenzvergleich zwischen humanem WDR18 (accession Q9BV38) und Ipi3 aus *S. cerevisiae* (accession P53877) mit Hilfe des *Psi-Blast*-Algorithmus

Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt, Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften sind grau markiert.

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
AAA-ATPase	<i>ATPases associated with diverse cellular activities</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	<i>alternative reading frame</i>
Atg	<i>autophagy-related protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BOP	<i>block of proliferation</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCD	<i>charge coupled device</i>
Cdc	<i>cell division cycle</i>
Cdh	<i>CDC20 homolog</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
c-myc	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DFC	<i>dense fibrillar component</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleotid (N=A,T,G,C)
DTT	Dithiothreitol
DUB	<i>deubiquitinating</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Erb	<i>eukaryotic ribosome biogenesis protein</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>

---

ETS	<i>external transcribed spacer</i>
FC	<i>fibrillar centre</i>
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
g	a) Gramm, b) Gravitationskoeffizient (9,81 m/sec <sup>2</sup> )
GC	<i>granular component</i>
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde ( <i>hour</i> )
HA	Hämagglutinin-Epitop
HEAT	Huntingtin, EF3, PP2A, TOR1
HECT	<i>homologous to E6-AP C-terminus</i>
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
Ipi1	<i>involved in processing ITS2 protein 1</i>
Ipi3	<i>involved in processing ITS2 protein 3</i>
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LAS1L	<i>LAS1-like</i>
LB	Luria Bertani
M	Mol/l, molar
mA	Milliampere
MDM	<i>mouse double minute</i>
MDN	<i>MIDAS-containing protein</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOPS	3-N-Morpholinopropan-sulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Mtr	<i>mRNA transport regulator</i>
NB	<i>nuclear body</i>
NEDD	<i>neural precursor cell expressed developmentally down-regulated</i>

---

Net	<i>nucleolar silencing establishing factor and telophase regulator</i>
NDF	<i>nucleolar-derived foci</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
nm	Nanometer
Nop	<i>nucleolar protein</i>
NOR	<i>nucleolar organizer region</i>
NP-40	Nonidet P-40
NPM	Nucleophosmin
Nsa	<i>NOP7-associated protein</i>
N-terminal	Amino-terminal
N-Terminus	Amino-Terminus
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda=600\text{nm}$
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer ( <i>phosphate buffered saline</i> )
Pc	<i>polycomb</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDSM	<i>phospho-dependent SUMO motif</i>
PELP	<i>proline, glutamate and leucine rich protein</i>
PES	<i>pescadillo homolog</i>
PIAS	<i>Protein inhibitor of activated STAT protein</i>
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNB	<i>pre-nucleolar body</i>
RanBP	<i>Ran-binding protein</i>
RanGAP	<i>Ran GTPase-activating protein</i>
Rea	<i>ribosome export/assembly protein</i>
RING	<i>really interesting new gene</i>
Rix	<i>ribosomal export protein</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RNP	<i>Ribonucleoprotein</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute (-Medium)</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	a) reverse Transkription, b) Raumtemperatur

---

s.	siehe
s. o.	siehe oben
sec	Sekunde
S	Sedimentationskoeffizient (Svedberg)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SENP	<i>Sentrin-specific protease</i>
Sic	<i>substrate/subunit inhibitor of Cyclin-dependent protein kinase</i>
SIM	<i>SUMO Interaction Motif</i>
Smt	<i>suppressor of mif two</i>
sn	<i>small nuclear</i>
sno	<i>small nucleolar</i>
siRNA	small interfering RNA
SRP	<i>signal recognition particle</i>
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
Swi	<i>switching deficient</i>
TCA	Trichloressigsäure
TDG	<i>Thymin-DNA-Glycosylase</i>
TEMED	N, N, N', N', - Tetramethyldiamin
TEX	<i>testis expressed</i>
Tris	Tris(-Hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	<i>unit</i>
Uba	<i>ubiquitin-associated domain</i>
Ubc	<i>ubiquitin conjugating</i>
UBF	<i>Upstream-binding factor</i>
UBL	<i>ubiquitin-like protein</i>
Ulp	<i>ubiquitin-like protease</i>
Urm	<i>ubiquitin-related modifier</i>
UV	ultraviolett
WDR	<i>WD repeat-containing protein</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
z. B.	zum Beispiel

### 7.3 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Stefan Müller für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine ständige Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und Aufgeschlossenheit bedanken.

Prof. Dr. Stefan Jentsch danke ich ganz herzlich für die Übernahme des Erstgutachtens. Die gute Atmosphäre in seiner Abteilung und seine Unterstützung, insbesondere während der letzten Monate, waren mir eine große Hilfe. Vielen Dank, dass ich so unproblematisch hier am MPI meine Arbeit fertig stellen konnte.

Bei Prof. Dr. Angelika Böttger möchte ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken. Zudem möchte ich allen Mitgliedern meiner Prüfungskommission meinen Dank für ihr Interesse und ihre Zeit aussprechen.

Prof. Dr. Dirk Eick danke ich dafür, dass er uns die anti-PeBoW-Antikörper großzügig zur Verfügung gestellt hat.

Allen Mitgliedern der Abteilung für molekulare Zellbiologie danke ich für ihre Hilfsbereitschaft. Besonderer Dank geht hier an Markus, Per, Rebecca, Nithya, Tim und Flo. Außerdem möchte ich Uschi ganz herzlich für ihre hervorragende technische Unterstützung im letzten Jahr danken.

Großer Dank gilt Franz und Stef, für die „rg“ Zeit, die wir hier zusammen hatten und die gute Freundschaft.

Ich danke meinen Eltern und Geschwistern ganz herzlich dafür, dass sie mich während der gesamten Promotionszeit unterstützt haben und immer hinter mir stehen. Meiner Schwester Rita danke ich für das kritische Lesen dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei John bedanken, für seine stetige, liebevolle Unterstützung, sein Verständnis und seine Geduld.

## 7.4 Lebenslauf

**Name** Elisabeth Finkbeiner

### Schulbildung

1987–1991 Konrad-Kocher-Schule Ditzingen

1991–2000 Gymnasium in der Glemsaue Ditzingen  
Abschluss mit Abitur im Juni 2000

### Studium

2000–2006 Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.  
Studiengang Biologie (Diplom)

2002/2003: Universidad Autónoma, Madrid  
Auslandsstudienjahr im Rahmen des Sokrates-Austauschprogramms

Dezember 2006: Abschluss mit Diplom  
Diplomarbeit in der Abteilung Molekulare Genetik der Fakultät für  
Biologie, Universität Freiburg (Prof. Dr. Ralf Baumeister)  
Thema: „Funktionelle Analyse des Adapterproteins SHC-1 in  
*C. elegans*“

### Doktorarbeit

Seit Juni 2007 Arbeitsgruppe Dr. Stefan Müller, Abteilung für Molekulare Zellbiologie  
(Prof. Dr. Stefan Jentsch), Max-Planck-Institut für Biochemie,  
Martinsried