

Aus dem Bereich Medizinische Biochemie und Molekularbiologie  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Funktionelle Charakterisierung der  
SUMOylierung des Nukleoporins Nup2 in  
*Saccharomyces cerevisiae***

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften*  
**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2020

vorgelegt von: Hanne Traute Folz  
geb. am: 21.04.1989 in Püttlingen

Tag der Promotion: 16. Juni 2020

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Gabriel Schlenstedt

Prof. Dr. Bruce Morgan

## In Liebe meiner Mama

„If you stop to think about it, you'll have to admit that all the stories in the world consist essentially of twenty-six letters. The letters are always the same, only the arrangement varies. From letters words are formed, from words sentences, from sentences chapters, and from chapters stories.“

Michael Ende „The neverending story“

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Kernporenkomplex: Aufbau und Funktion.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Kernimport und Kernexport .....</b>	<b>4</b>
<b>2.3. Der klassische NLS-Import.....</b>	<b>5</b>
<b>2.4. Eigenschaften und Lokalisation von Nup2 .....</b>	<b>7</b>
<b>2.5. Funktionen von Nup2 .....</b>	<b>8</b>
2.5.1. Nup2 und der cNLS-Transport.....	8
2.5.2. Nup2 und sein Interaktionspartner Nup60 .....	8
2.5.3. Nup2 und Osmosestress .....	9
2.5.4. Nup2 und sein Einfluss auf die Genaktivität.....	11
2.5.5. Nup2 und Meiose .....	12
<b>2.6. Posttranslationale Modifikationen (PTM) .....</b>	<b>14</b>
2.6.1. Ubiquitinierung .....	14
2.6.2. SUMOylierung.....	15
2.6.3. SUMOylierung in <i>S. cerevisiae</i> .....	17
2.6.4. PTMs der Komponenten der nukleären Korbstruktur.....	19
2.6.5. Nup2 und posttranslationale Modifikationen .....	20
<b>2.7. Zielsetzung .....</b>	<b>21</b>
<b>3. Materialien und Methoden.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1. Materialien .....</b>	<b>22</b>
3.1.1. Geräte .....	22
3.1.2. Verbrauchsmaterialien .....	23
3.1.3. Enzyme .....	24
3.1.4. Software.....	24
3.1.5. Biochemikalien und Chemikalien.....	24
3.1.6. Kits.....	25
3.1.7. Antikörper.....	25
3.1.8. Medien .....	27
3.1.9. Plasmide .....	29
3.1.10. Organismen.....	31
3.1.11. Bakterienstämme .....	31

3.1.12.	Hefestämmen.....	31
3.1.13.	Oligonukleotide .....	33
<b>3.2.</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>34</b>
3.2.1.	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	34
3.2.2.	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	34
3.2.3.	Photometrische Dichtebestimmung von Bakterien- und Hefekulturen.....	35
3.2.4.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	35
3.2.5.	Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	37
3.2.6.	Insertion von DNA-Fragmenten in Plasmide.....	38
3.2.7.	Spaltung der Plasmid-DNA mittels Restriktionsendonukleasen .....	38
3.2.8.	Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase .....	39
3.2.9.	Behandlung mit Klenow-Polymerase.....	39
3.2.10.	DNA-Ligation.....	40
3.2.11.	Sequenzierung von Plasmid-DNA .....	40
3.2.12.	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	41
3.2.13.	Ortsspezifische Mutagenese .....	42
3.2.14.	Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel.....	43
3.2.15.	Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA .....	45
3.2.16.	Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA.....	46
3.2.17.	Herstellen kompetenter Zellen.....	46
3.2.18.	Transformation .....	47
3.2.19.	Hefegenomische Methoden.....	47
3.2.20.	Integration genomischer Modifikationen in <i>S. cerevisiae</i> .....	47
<b>3.3.</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>48</b>
3.3.1.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	48
3.3.2.	Visuelle Darstellung von Proteinen im Polyacrylamid-Gel.....	50
3.3.3.	Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau .....	50
3.3.4.	Färbung mit kolloidalem Coomassie.....	51
3.3.5.	Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran.....	52
3.3.6.	Immunologische Detektion und Analyse der Proteine.....	53
3.3.7.	Proteinfällung mit Trichloressigsäure.....	54
3.3.8.	Affinitätsreinigung von Antikörpern .....	56
3.3.9.	Reinigung von rekombinanten Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i> .....	57
<b>3.4.</b>	<b>Analyse posttranslationaler Proteinmodifikationen sowie von Protein-Protein-Interaktionen.....</b>	<b>61</b>
3.4.1.	<i>In vitro</i> -SUMOylierung .....	61

3.4.2.	Reinigung und Analyse SUMOylierter Proteine <i>in vivo</i> .....	62
3.4.3.	Kultivieren und Ernten der Zellen .....	62
3.4.4.	Zelllyse .....	62
3.4.5.	Reinigung modifizierter Proteine über Ni-NTA-Agarose.....	63
3.4.6.	Tandemaffinitätsreinigung (TAP) .....	64
3.4.7.	Zellkultivierung und Herstellung der Zellpellets.....	66
3.4.8.	Mechanische Lyse der Zellen .....	67
3.4.9.	Affinitätsreinigung über IgG-Sepharose.....	67
3.4.10.	Affinitätsreinigung über Calmodulin-Sepharose.....	68
3.4.11.	TCA-Fällung der eluierten Proteine .....	68
3.4.12.	Co-Immunpräzipitation (Co-IP) .....	68
<b>3.5.</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>70</b>
3.5.1.	<i>In vivo</i> -Fluoreszenzmikroskopie .....	70
3.5.2.	Wachstum von <i>S. cerevisiae</i> unter Stressbedingungen.....	70
3.5.3.	Untersuchung der Stressantwort auf Agar-Platten.....	70
3.5.4.	Untersuchung des Zellwachstums in KCl-haltigem Flüssigmedium .....	71
3.5.5.	Lokalisierung chromosomaler Loci mittels Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung des LacI/LacO Systems .....	71
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>74</b>
<b>4.1.</b>	<b><i>In vivo</i>-SUMOylierung von Nup2.....</b>	<b>74</b>
4.1.1.	Nup2 wird <i>in vivo</i> nach Osmosestress SUMOyliert.....	74
4.1.2.	Nup2-2xKR wird nicht SUMOyliert.....	77
4.1.3.	Der Lysinrest an Position 170 ist die essentielle SUMOylierungsstelle .....	78
4.1.4.	Die NLS-Importmutante <i>spr1-54</i> sowie $\Delta nup60$ zeigen eine stärkere SUMOylierung von Nup2 .....	79
4.1.5.	Das Fehlen von Ulp2 führt zur PolySUMOylierung von Nup2 .....	80
4.1.6.	Ulp1 und Ulp2 sind in ihrer DeSUMOylierungsfunktion bezüglich Nup2 nicht redundant .....	81
4.1.7.	Das Fehlen der MAP-Kinase Hog1 hat einen verstärkenden Einfluss auf die SUMOylierung von Nup2 .....	83
4.1.8.	Die SUMOylierung von Nup2 unterscheidet sich in den DeSUMOylierungs- mutanten sowie der $\Delta hog1$ -Mutante und dem Wildtyp in Muster und Intensität .....	85
4.1.9.	Die SUMOylierung von Nup2 wird nicht nur durch die Abwesenheit von Nup60 beeinflusst, sondern zeigt noch stärkere Effekte in der <i>NUP60-SUMO-KR</i> -Mutante .....	86
4.1.10.	Die SUMOylierung von Nup2 erfolgt nicht über eine einzelne E3-Ligase.....	88

<b>4.2. Osmotischer Schock und Ethanolstress haben keinen Einfluss auf die Lokalisation von Nup2</b>	<b>90</b>
<b>4.3. Die Fusion von Smt3 an den N-Terminus von Nup2 hat keinen Einfluss auf dessen Lokalisation sowie den NLS-Import</b>	<b>90</b>
<b>4.4. Die Lokalisation von Nup2 ändert sich nicht in Abwesenheit der Komponenten des Y-Komplexes Nup84 und Nup133</b>	<b>94</b>
<b>4.5. Die SUMOylierbarkeit von Nup2 hat keinen Einfluss auf die Aktivität der chromosomalen Loci <i>GAL1</i> und <i>INO1</i></b>	<b>95</b>
<b>4.6. Nup2 wird ebenso wie auch sein Interaktionspartner Nup60 ubiquitiniert</b>	<b>97</b>
4.6.1. Die Ubiquitinierung von Nup2 steigt infolge von osmotischem Stress an	97
4.6.2. Die SUMOylierungsstellen von Nup2 entsprechen unter normalen Wachstumsbedingungen nicht den Ubiquitinierungsstellen von Nup2	99
4.6.3. Nup2 hat mehr als nur eine Ubiquitinierungsstelle	101
<b>4.7. Nup2-Mutanten zeigen keine Änderungen im Wachstum unter osmotischem Stress</b>	<b>102</b>
<b>4.8. Interaktionsstudien von Nup2</b>	<b>106</b>
4.8.1. Die Salzkonzentration des Lysepuffers hat sowohl Einfluss auf die Lyse als auch auf die Bindungseffizienz während der TAP-Reinigung	107
4.8.2. Optimierung der IP unter Verwendung zweier Detergenzien	110
4.8.3. Die Effizienz der Immunpräzipitation von Nup2 ist zeitabhängig	111
4.8.4. Die Salzkonzentration spielt eine Rolle bei der IP	113
4.8.5. Optimierung der Elutionsbedingungen: Salzelution	113
4.8.6. Optimierung der Elutionsbedingungen: Quervernetzung des Antikörpers und saure Elution mit Glycin	115
4.8.7. Optimierung der Elutionsbedingungen: Elution mit Peptid	116
4.8.8. Vorbereitung co-immunpräzipitierter Proben für die massenspektrometrische Analyse	121
<b>4.9. Die SUMOylierung von Nup60 wird in Anwesenheit der E3-Ligase Nfi1 begünstigt</b>	<b>134</b>
<b>5. Diskussion</b>	<b>137</b>
<b>5.1. Nup2 als stressspezifisches SUMOylierungssubstrat</b>	<b>137</b>
<b>5.2. Die SUMOylierung von Nup2 hat keinen Einfluss auf die Genaktivität von <i>INO1</i> und <i>GAL1</i></b>	<b>142</b>
<b>5.3. Nup2 als SUMOylierungs-Substat unter Berücksichtigung seines Interaktionspartners Nup60</b>	<b>144</b>

<b>5.4.</b>	<b>Einfluss der SUMOylierung von Nup2 auf seine eigene Lokalisation und den cNLS-Import.....</b>	<b>146</b>
<b>5.5.</b>	<b>SUMOylierungsstellen und weitere PTMs von Nup2 .....</b>	<b>147</b>
<b>5.6.</b>	<b>Nup2 als Ubiquitinierungssubstrat.....</b>	<b>150</b>
<b>5.7.</b>	<b>Potentielle (SUMO-spezifische) Interaktionspartner von Nup2 .....</b>	<b>152</b>
5.7.1.	Ribosomenbiogenese und Export.....	154
5.7.2.	NPC .....	155
5.7.3.	Interpretation der massenspektrometrischen Ergebnisse .....	156
<b>5.8.</b>	<b>Perspektiven .....</b>	<b>162</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>164</b>
<b>7.</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>182</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>183</b>

## Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent	mg	Milligramm
% (w/v)	Gewichtsprozent	min	Minute
°C	Grad Celsius	ml	Milliliter
µg	Mikrogramm	mM	millimolar
µl	Mikroliter	mM	millimolar
µM	mikromolar	mm	Millimeter
µm	Mikrometer	MOPS	3-Morpholinopropan-1-sulfonsäure
ADP	Adenosindiphosphat	MW	Molekulargewicht
AK	Antikörper	NDSM	<i>negatively charged amino acid-dependent SUMOylation motif</i>
AMPS	Ammoniumpersulfat	NEM	<i>N-Ethylmaleinimid</i>
AS	Aminosäure	ng	Nanogramm
ATP	Adenosintriphosphat	nM	nanomolar
bp	Basenpaar	nm	Nanometer
BSA	Rinderserumalbumin	OD	optische Dichte
CBP	Calmodulin bindendes Peptid	ORF	offener Leserahmen
CiP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Co-IP	Co-Immunpräzipitation	PCR	Polymerasekettenreaktion
DDM	n-Dodecyl β-D-Maltosid	PDSM	<i>phosphorylation-dependent SUMOylation motif</i>
DMP	Dimethylpimelimidat	PEG	Polyethylenglykol
dest	destilliert	PLAC	Protease-Inhibitor-Mix
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	POD	Peroxidase
DTT	Dithiothreitol	PTM	posttranslationale Modifikation
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PVDF	Polyvinylidendifluorid
ECL	Enhanced chemilumineszenz	qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	RNA	Ribonukleinsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure	RT	Raumtemperatur
ER	endoplasmatisches Retikulum	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>et al</i>	<i>et altera</i>	SD	synthetisch definiert
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer	SDM	<i>site directed mutagenesis</i>
g	Gramm	SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>g</i>	Erdbeschleunigung	Sek	Sekunde
GFP	grün fluoreszierendes Protein	SGD	<i>Saccharomyces genome database</i>
GSH	Glutathion	SIM	SUMO interagierendes Motiv
GST	Glutathion-S-Transferase	SSR	<i>SUMO-stress-response</i>
GTP	Guanosintriphosphat	STUbLs	SUMO-targeted-Ubiquitin-ligases
h	Stunde	SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
HIV-1	humanes Immundefizienz-Virus 1	TAP	Tandemaffinitätsreinigung
HOG	<i>high osmolarity glycerol</i>	TB	<i>terrific broth</i>
IgG	Immunglobulin G	TCA	Trichloressigsäure
kb	Kilobase	TEMED	Tetramethylethylendiamin
kDa	Kilodalton	TEV	<i>tobacco etch virus</i>
l	Liter	TRP	<i>transient receptor potential</i>
M	Mol	ÜN	Über Nacht

UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VLP	<i>virus-like-particle</i>
WT	Wildtyp
YPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung des Kernporenkomplexes (NPC).....	4
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung des cNLS-Transports in <i>S. cerevisiae</i> . ....	6
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung von Nup2. ....	7
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung der beiden Hog1-Aktivierungspfade Sln1 und Sho1. .....	10
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Darstellung des Hefezell-Zyklus.....	12
<b>Abbildung 6:</b> Sexuelle Vermehrung von Hefen. ....	13
<b>Abbildung 7:</b> Der SUMO-Zyklus in <i>S. cerevisiae</i> . ....	18
<b>Abbildung 8:</b> Modifikationen der Komponenten der nukleären Korbstruktur. ....	20
<b>Abbildung 9:</b> Schematische Darstellung einer Transferkassette zur Übertragung von Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran.....	53
<b>Abbildung 10:</b> Schematische Darstellung sowie Aminosäuresequenz des TAP-tags. ....	65
<b>Abbildung 11:</b> Schematische Darstellung der Tandemaffinitätsreinigung. ....	66
<b>Abbildung 12:</b> Vereinfachte schematische Darstellung der Herstellung von Zellen zur Untersuchung chromosomaler Loci. ....	72
<b>Abbildung 13:</b> <i>In vivo</i> -SUMOylierung von Nup2 unter verschiedenen Stressbedingungen..	76
<b>Abbildung 14:</b> <i>In vivo</i> -SUMOylierung von Nup2-WT und Nup2-2xKR nach Osmosestress mittels KCl sowie <i>in vivo</i> -SUMOylierung der Einzel- und Doppelmutanten in $\Delta ulp2$ .....	77
<b>Abbildung 15:</b> <i>In vivo</i> -SUMOylierung von Nup2 in <i>srp1-54 ts</i> , einem Stamm mit Importdefekt, und $\Delta nup60$ . ....	80
<b>Abbildung 16:</b> <i>In vivo</i> -SUMOylierung von Nup2 in den DeSUMOylierungsmutanten $\Delta ulp2$ und <i>ulp1-133 ts</i> . ....	82
<b>Abbildung 17:</b> <i>In vivo</i> -SUMOylierung von Nup2 in Abwesenheit der MAP-Kinase Hog1. ....	84
<b>Abbildung 18:</b> Vergleich der SUMOylierungseffizienz in verschiedenen Stämmen. ....	86
<b>Abbildung 19:</b> <i>In vivo</i> -SUMOylierung von Nup2 in Abwesenheit von Nup60 sowie in Anwesenheit von Nup60-KR-Mutanten.....	88
<b>Abbildung 20:</b> <i>In vivo</i> -SUMOylierung von Nup2 in verschiedenen E3-Mutanten. ....	89
<b>Abbildung 21:</b> Die Lokalisation von Nup2-GFP nach Osmosestress.....	90
<b>Abbildung 22:</b> Schematische Darstellung zur Herstellung des Nup2-Smt3-Konstrukts. ....	91
<b>Abbildung 23:</b> Lokalisation verschiedener Nup2-GFP Fusionsproteine und Analyse des NLS- Imports in Anwesenheit von Nup2-Fusionsproteinen. ....	92
<b>Abbildung 24:</b> Lokalisation von Nup2-GFP in den Mutanten des Y-Komplexes $\Delta nup84$ und $\Delta nup133$ .....	94
<b>Abbildung 25:</b> Nup2-abhängige Aktivitätsbestimmung der chromosomalen Loci <i>INO1</i> und <i>GAL1</i> mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	96

<b>Abbildung 26:</b> <i>In vivo</i> -Ubiquitinierung von Nup2. ....	97
<b>Abbildung 27:</b> Nachweis der <i>in vivo</i> -Ubiquitinierung in verschiedenen Stämmen unter Einfluss von osmotischem Stress. ....	98
<b>Abbildung 28:</b> <i>In vivo</i> -Ubiquitinierung von Nup2 und nicht mehr SUMOylierbarem Nup2 nach osmotischem Schock.....	100
<b>Abbildung 29:</b> Nachweis der <i>in vivo</i> -Ubiquitinierung von verschiedenen Nup2-Mutanten..	101
<b>Abbildung 30:</b> Zellwachstum der Nup2-Mutanten unter osmotischem Stress.....	103
<b>Abbildung 31:</b> Zellwachstum der Nup2 und Nup60-Mutanten unter osmotischem Stress. ....	105
<b>Abbildung 32:</b> Zellwachstum in Flüssigkultur unter andauerndem osmotischem Stress....	106
<b>Abbildung 33:</b> TAP-Reinigung von Nup2-TAP unter verschiedenen Salzkonzentrationen sowie Test verschiedener Lysepuffer. ....	108
<b>Abbildung 34:</b> Immunpräzipitation von Nup2 und seinen Interaktionspartnern unter Verwendung von 0,01 M Chaps (0,65 %) im Vergleich zu 1 % Triton X-100 sowie unter Verwendung von IP-Puffer mit niedrigerer Salzkonzentration bei der Bindung. ....	111
<b>Abbildung 35:</b> Immunpräzipitation von Nup2 und seinen Interaktionspartnern in Abhängigkeit der Bindungsdauer. ....	112
<b>Abbildung 36:</b> Elution immunpräzipitierter Proteinkomplexe durch verschiedene Salzkonzentrationen.....	114
<b>Abbildung 37:</b> IP nach Quervernetzung des Antikörpers sowie Vergleich der Elutionsbedingungen.....	116
<b>Abbildung 38:</b> Detektion der genauen Bindestelle des Nup2-N-Antikörpers mittels Peptidspots sowie schematische Darstellung des synthetisch hergestellten Peptids.....	117
<b>Abbildung 39:</b> Elution gebundener Proteinkomplexe von über Protein affinitätsgereinigtem Antikörper durch Sättigung mit Nup2-Peptid.....	119
<b>Abbildung 40:</b> Elution gebundener Proteinkomplexe von über Peptid affinitätsgereinigtem Antikörper durch Sättigung mit Nup2-Peptid.....	120
<b>Abbildung 41:</b> Immunpräzipitation von Nup2 und seinen Interaktionspartnern sowie Analyse der Elutionseffizienz zur weiteren Bearbeitung mittels massenspektrometrischer Analyse. ....	121
<b>Abbildung 42:</b> Immunpräzipitation von Nup2 bzw. Nup2-2xKR und seinen Interaktionspartnern. ....	123
<b>Abbildung 43:</b> Immunpräzipitation von Nup2 bzw. Nup2-2xKR und seinen Interaktionspartnern nach Ultrazentrifugation. ....	126
<b>Abbildung 44:</b> Immunpräzipitation von Nup2 bzw. Nup2-2xKR und seinen Interaktionspartnern mit und ohne osmotischen Stress durch KCl. ....	127
<b>Abbildung 45:</b> <i>In vitro</i> -SUMOylierung von GST-Nup60 unter verschiedenen Bedingungen. ....	134

<b>Abbildung 46:</b> Kinetik der <i>in vitro</i> -SUMOylierung von GST-Nup60 unter Zugabe von Nfi1 bzw. mit pH-Änderung. ....	135
<b>Abbildung 47:</b> Schematische Darstellung von Nup2 und seinem Funktionshomolog Nup50 sowie Markierung des invertierten Konsensusmotivs.....	148
<b>Abbildung 48:</b> Proteinsequenz und schematische Darstellung von Nup2 und bekannten Modifikationsstellen. ....	150
<b>Abbildung 49:</b> Schematische Darstellung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse. ....	162

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verwendete primäre Antikörper.....	<b>25</b>
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete sekundäre Antikörper .....	<b>26</b>
<b>Tabelle 3:</b> Komponenten zur Herstellung der Aminosäuremischungen .....	<b>28</b>
<b>Tabelle 4:</b> Komponenten zur Herstellung der Aminosäurelösungen.....	<b>29</b>
<b>Tabelle 5:</b> Verwendete Plasmide .....	<b>29</b>
<b>Tabelle 6:</b> In dieser Arbeit hergestellte Plasmide .....	<b>30</b>
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.....	<b>31</b>
<b>Tabelle 8:</b> Verwendete <i>S. cerevisiae</i> -Stämme .....	<b>31</b>
<b>Tabelle 9:</b> Verwendete Oligonukleotide .....	<b>33</b>
<b>Tabelle 10:</b> Pipettierschema zur analytischen und präparativen enzymatischen Spaltung von DNA .....	<b>39</b>
<b>Tabelle 11:</b> Pipettierschema für einen Ligationsansatz .....	<b>40</b>
<b>Tabelle 12:</b> Ansatz für die Sequenzierung .....	<b>40</b>
<b>Tabelle 13:</b> Pipettierschema für PCR-Ansätze mit <i>Taq</i> - bzw. <i>Phusion</i> -Polymerase .....	<b>41</b>
<b>Tabelle 14:</b> Bedingungen zur Amplifikation mit dem Thermocycler unter Verwendung der <i>Taq</i> - bzw. <i>Phusion</i> -Polymerase .....	<b>42</b>
<b>Tabelle 15:</b> Pipettierschema für ortsspezifische Mutagenese.....	<b>43</b>
<b>Tabelle 16:</b> PCR-Bedingungen für ortsspezifische Mutagenese .....	<b>43</b>
<b>Tabelle 17:</b> Pipettierschema für Sammel- und Trenngel .....	<b>49</b>
<b>Tabelle 18:</b> MS1: Die in der Co-IP gereinigten und massenspektrometrisch identifizierten Interaktionspartner von Nup2 .....	<b>122</b>
<b>Tabelle 19:</b> MS2: Die in der Co-IP gereinigten und massenspektrometrisch identifizierten Interaktionspartner von Nup2 .....	<b>124</b>
<b>Tabelle 20:</b> MS3: Die in der Co-IP gereinigten und massenspektrometrisch identifizierten Interaktionspartner von Nup2 .....	<b>126</b>
<b>Tabelle 21:</b> MS4: Die in der Co-IP gereinigten und massenspektrometrisch identifizierten Interaktionspartner von Nup2 .....	<b>128</b>
<b>Tabelle 22:</b> Rohdaten der MS-Analysen (nukleäre Proteine grau hinterlegt).....	<b>129</b>
<b>Tabelle 23:</b> In der Co-immunopräzipitation spezifisch gereinigte mit dem Nukleus assoziierte Proteine.....	<b>132</b>
<b>Tabelle 24:</b> Nup2-abhängige und Nup2-Smt3-abhängige Funktionen.....	<b>163</b>

## 1. Zusammenfassung

Nup2 ist ein Nukleoporin der Hefe, welches sich zusammen mit Nup60 und Nup1 an der Kernseite des Kernporenkomplexes befindet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde vorwiegend die Rolle der SUMOylierung von Nup2 untersucht. Zuvor wurden die Lysinreste an Position 153 und 170 *in vitro* als SUMOylierungsstellen identifiziert. In dieser Arbeit wurden weiter gehende SUMOylierungsstudien mit Nup2 durchgeführt. Weiterhin wurden Effekte der nicht SUMOylierbaren Mutante (Nup2 K153R/K170R) *in vivo* analysiert.

Es zeigte sich, dass die SUMOylierung keinen Einfluss auf die Lokalisierung von Nup2 selbst sowie auf die Stabilität des Bindepartners Nup60 hat und dass auch der klassische Kernimport von NLS-Proteinen nicht beeinträchtigt ist. Unter Verwendung des LacI/LacO-Systems wurde nachgewiesen, dass die SUMOylierung von Nup2 keinen gravierenden Einfluss auf die Genaktivierung und Genlokalisierung (der Gene *INO1* und *GAL1*) hat, auch wenn ein Mitwirken von Nup2 diesen Mechanismus betreffend zuvor beschrieben wurde.

Nup2 ist *in vivo* normalerweise nur schwach SUMOyliert, aber bei osmotischem Stress steigt die SUMOylierung dramatisch an. Das trifft ebenfalls auf Nup60 zu. Beide Nukleoporine spielen offenbar eine Rolle beim Osmostress (nicht aber bei Alkoholstress). Es wurde weiterhin eine Ubiquitinierung von Nup2 detektiert und der Einfluss der SUMOylierung auf die Ubiquitinierung analysiert. Nach osmotischem Stress zeigt sich in der Nup2-SUMO-Mutante eine klar verringerte Ubiquitinierung. Somit gibt es offenbar ein Zusammenspiel der Modifikationen durch SUMO und Ubiquitin bei der Stressantwort. Es wurde außerdem gefunden, dass von den drei relevanten SUMO E3-Ligasen hauptsächlich Siz1 und Nfi1 zusammen und nicht nur eine spezielle E3 allein für die SUMOylierung notwendig ist.

Die weitere funktionelle Analyse der SUMOylierung von Nup2 bestand in der Untersuchung der Osmoadaption. Ein Einfluss der SUMOylierung von Nup2 auf das Zellwachstum wurde nicht gefunden. Die Lokalisation von Nup2 am NPC ist nach osmotischem Stress unverändert. Die SUMO-spezifische Reaktion auf Stress in Form von osmotischem Schock, welche in einer verstärkten SUMOylierung von Nup2 resultiert, wurde sowohl in  $\Delta hog1$ ,  $\Delta ulp2$  sowie *nup60-SUMO-KR* Zellen im Vergleich zum Wildtyp verstärkt detektiert, während  $\Delta nup60$  und *ulp1-133* Mutanten bereits eine stärkere GrundSUMOylierung zeigen. Die SUMO-Dekonjugasen Ulp1 und Ulp2 unterscheiden sich in ihrer deSUMOylierenden Funktion. Während Ulp1 konstant deSUMOyliert, wird Ulp2 infolge der SUMO-spezifischen Stressantwort verstärkt aktiv. Dadurch ergeben sich Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen zur Funktion der SUMOylierung von Nup2.

Um weitere, potentiell SUMO-abhängige Interaktionspartner von Nup2 zu identifizieren, wurden Co-Immunpräzipitationen durchgeführt und die Eluate massenspektrometrisch analysiert. Es wurden einige bereits bekannte Interaktionspartner bestätigt und mit der E3-Ubiquitinligase Bre1 ein neuer potentiell SUMO-abhängiger Interaktionspartner identifiziert. Andere Interaktionspartner deuten auf weitere Funktionen von Nup2 hin. Das betrifft das Targeting von Transposons, bei dem neben Nup2 und Nup60 auch SUMOylierung eine Rolle spielt. Schließlich existiert ein potentieller Einfluss der SUMOylierung von Nup2 auf die Meiose diploider Zellen, da die für die Meiose relevante Sequenz von Nup2 beide SUMOylierungsstellen beinhaltet.

**Abstract**

Nup2 is a yeast nucleoporin which is localized along with Nup60 and Nup1 on the nuclear side of the nuclear pore complex. This work focused on the investigation of the role of Nup2 SUMOylation. Previously, the lysine residues at position 153 and 170 were identified as SUMOylation sites *in vitro*. In this work, further SUMOylation studies with Nup2 were performed. Furthermore, effects of the non-SUMOylatable mutant (Nup2 K153R / K170R) were analyzed *in vivo*.

It was shown that SUMOylation does not affect the localization of Nup2 itself and the stability of the binding partner Nup60. Also the classical nuclear import of NLS proteins is not compromised. Using the LacI/LacO system, it was demonstrated that the Nup2 SUMOylation has no significant effect on gene activation and gene localization (of the *INO1* and *GAL1* genes), although the involvement of Nup2 in this mechanism was described previously.

Under normal conditions, the SUMOylation of Nup2 is weak *in vivo*, but it increases dramatically after osmotic stress, which also applies to Nup60. Thus, both nucleoporins appear to play a role in osmostress (but not in alcohol stress). Furthermore, it was found that Nup2 is also ubiquitylated and the influence of SUMOylation on ubiquitylation was analyzed. After osmotic stress, the Nup2-SUMO mutant shows a clearly reduced ubiquitylation. Thus, there seems to be an interaction of the modifications by SUMO and ubiquitin in the stress response. It was also found that among the three relevant SUMO E3 ligases, mainly Siz1 and Nfi1 together, but not just one specific E3 alone, are needed for SUMOylation.

Further functional analysis of the SUMOylation of Nup2 focused on osmoadaptation. No effect of Nup2 SUMOylation on cell growth was found. The localization of Nup2 at the NPC is unchanged upon osmotic stress. The SUMO-specific stress response after osmotic shock resulting in an increased SUMOylation of Nup2 is strongly increased in  $\Delta hog1$ ,  $\Delta ulp2$ , and *nup60-SUMO-KR* cells compared to the wild-type. On the other hand,  $\Delta nup60$  and *ulp1-133* mutants already show a stronger basic SUMOylation. The SUMO deconjugases Ulp1 and Ulp2 differ in their deSUMOylation function. While deSUMOylation by Ulp1 is a constant process, the activity of Ulp2 increases as a result of the SUMO-specific stress response. This provides new options for further studies on the function of Nup2 SUMOylation.

To identify novel potentially SUMO-dependent Nup2 interaction partners, co-immunoprecipitations were performed, and the eluates were analyzed by mass spectrometry. Several already known interaction partners were confirmed and a new potentially SUMO-dependent interaction partner, the E3 ubiquitin ligase Bre1, was identified. Other interaction partners point to additional functions of Nup2, for example the targeting of transposons, in which besides Nup2 and Nup60 also SUMOylation plays a role. Finally, there is a potential effect of Nup2 SUMOylation on the meiosis of diploid cells, since the meiosis-relevant sequence of Nup2 contains both SUMOylation sites.

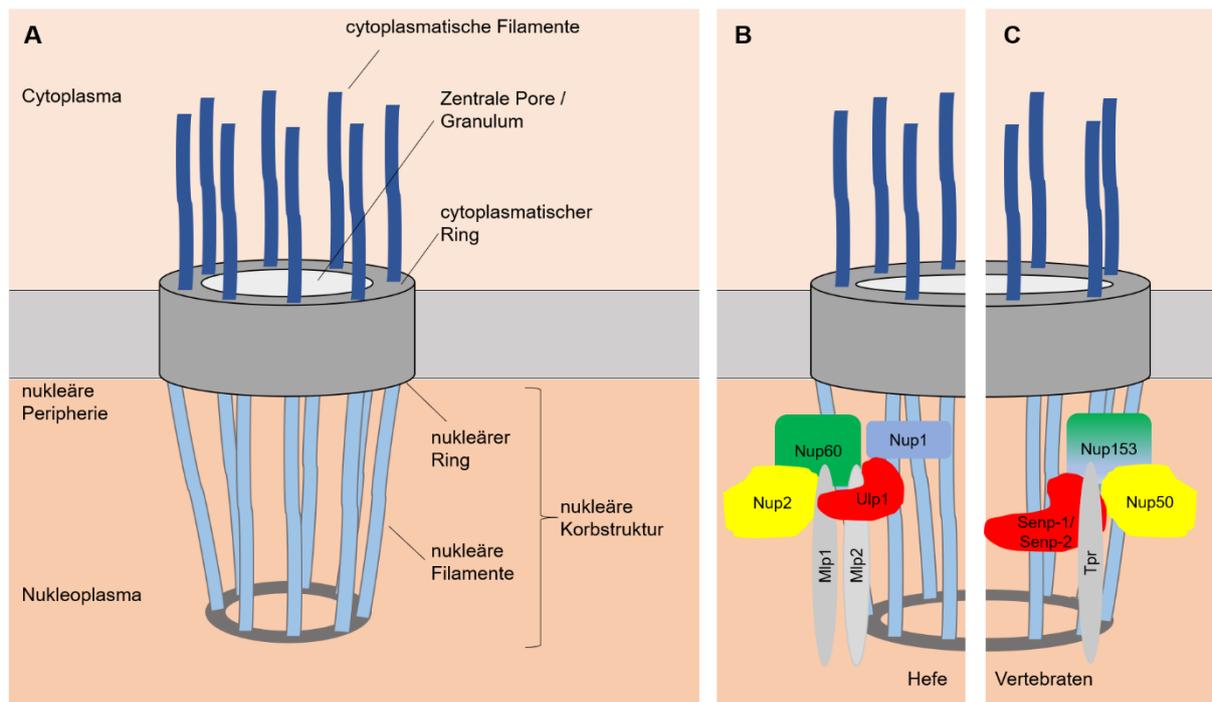
## 2. Einleitung

Der kleinste Baustein eines jeden Organismus ist die Zelle, welche an sich ein bereits in sich funktionierendes System ist, was sich an Einzellern zeigt. Diese funktionierende Einheit unterscheidet sich bei Prokaryoten (Bakterien und Archaeen) und Eukaryoten hauptsächlich in ihrer Größe sowie im Vorhandensein eines echten membranumhüllten Zellkerns. In einer im Vergleich zur prokaryotischen wesentlich größeren eukaryotischen Zelle müssen zelluläre Abläufe besser strukturiert sein, was sich anhand einer Aufteilung in mehrere Zellorganellen zeigt, der sogenannten „Kompartimentierung“. Eines dieser Zellkompartimente ist der für Eukaryoten typische Zellkern, welcher das Erbgut enthält. Das Nukleoplasma ist über eine Doppelmembran vom Cytoplasma getrennt, dennoch müssen zelluläre Abläufe und Interaktionen zwischen dem Zellkern und den anderen Kompartimenten gewährleistet werden, um alle Funktionen der Zelle aufrecht zu erhalten. So muss beispielsweise mRNA zur Translation aus dem Zellkern ins Cytoplasma überführt werden und andererseits Proteine, welche im Zellkern benötigt werden, in den Zellkern hinein transportiert werden (Allen *et al.*, 2000; Görlich, 1998). Aus genau diesem Grund sind in die Doppelmembran die sogenannten Kernporenkomplexe (nuclear pore complex, NPC) eingebaut, welche einen Molekülaustausch zwischen dem Zellkern und seiner Umgebung ermöglichen.

### 2.1. Kernporenkomplex: Aufbau und Funktion

Der Aufbau dieser Komplexe weist egal ob Hefe oder Säuger eine achtfache Rotationssymmetrie auf, unterscheidet sich aber stark in seiner Größe und seiner Zusammensetzung, wobei die Funktion Organismus übergreifend gleichbleibt (Yang *et al.*, 1998; Vasu und Forbes, 2001). In der Hefe *S. cerevisiae* beispielsweise sind die NPCs kompakter und entsprechen einer Größe von etwa 55-66 MDa, während in Vertebraten eine molekulare Masse von 125 MDa ermittelt wurde (Reichert *et al.*, 1990; Rout und Blobel, 1993; Yang *et al.*, 1998). Sie setzen sich aus etwa 30 verschiedenen Proteinen, den Nukleoporinen, zusammen, wobei diese in mehrfacher Kopie vorliegen und meist symmetrisch verteilt sind (Rout *et al.*, 2000; Cronshaw *et al.*, 2002). Etwa 1/3 der Masse dieser Nukleoporine besitzt *FG-Repeats*, eine sich wiederholende Sequenz mit Phenylalanin- und Glycinresten (Rout *et al.*, 2000), andere Nukleoporine haben Transmembrandomänen und binden Nukleoporine mit  $\beta$ -Propeller- und  $\alpha$ -Solenoid-Motiven (Devos *et al.*, 2006). Aus all diesen Proteinen setzt sich der NPC zusammen, wobei vom inneren Ring aus, welcher sich direkt in der Doppelmembran befindet, Filamente von 50 nm in das Cytoplasma sowie Filamente von 50-100 nm ins Nukleoplasma ragen (Abbildung 1A). Die Filamente auf nukleärer Seite sind über einen Ring verbunden, woraus sich eine Korbstruktur, der *nuclear basket*, ergibt (Izaurralde *et al.*, 1999; Stoffler *et al.*, 1999, Suntharalingam und Went, 2003). Ins Innere des Kernporenkomplexes

ragen ebenfalls Filamente in Speichenform und in der Mitte befindet sich das Zentralgranulum. Durch dieses dreidimensionale Filamentnetz können Ionen und kleine wasserlösliche Moleküle bis circa 40 kDa frei diffundieren, wobei auch hier bereits größenabhängig die Zeit der Durchquerung zunimmt, während größere Moleküle wie RNAs, Ribosomen oder die meisten Proteine aktiv über Karyopherine durch die Pore transportiert werden müssen (Feldherr und Akin, 1997; Mattaj und Engelmeier, 1998; Keminer und Peters, 1999).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Kernporenkomplexes (NPC).**

**A:** Der NPC ist in die Doppelmembran des Zellkerns eingebettet. Auf der cytoplasmatischen Seite liegt der cytoplasmatische Ring, aus welchem Filamente ins Cytoplasma ragen. In der Mitte des eingebetteten Rings, durch welchen der Transport erfolgt, liegt das Zentralgranulum. Auf der nukleären Seite ragen ebenfalls Filamente aus dem nukleären Ring ins Nukleoplasma, welche über einen Ring zu einer Korbstruktur verbunden sind. **B-C:** schematischer NPC mit Komponenten der nukleären Korbstruktur **B:** in Hefe. **C:** Homologe bzw. funktionell redundante Proteine in Vertebraten.

## 2.2. Kernimport und Kernexport

Der aktive Transport größerer Moleküle durch die Kernporen erfolgt über Importine und Exportine, welche das zu transportierende Substrat über eine spezifische Sequenz erkennen und einen Transportkomplex bilden (Bednenko *et al.*, 2003). Diese Erkennungssequenzen variieren, je nachdem ob ein Molekül in den Zellkern transportiert oder aus ihm exportiert werden soll. Die Transportfaktoren der Importin  $\beta$ -Familie beispielsweise erkennen das nukleäre Lokalisierungssignal (NLS), während die Exportine das nukleäre Exportsignal (NES) erkennen und das Substrat binden. In der Hefe *S. cerevisiae* gibt es 10 verschiedene dieser Importine und 4 Exportine (Fried und Kutay, 2003; Pemberton und Paschal, 2005). Durch kurzzeitige Interaktion mit den FG-Repeats der Nukleoporine in Form von Binden und Lösen im Wechsel wird der Transportfaktor-Substrat-Komplex durch die Pore bewegt (Rexach und

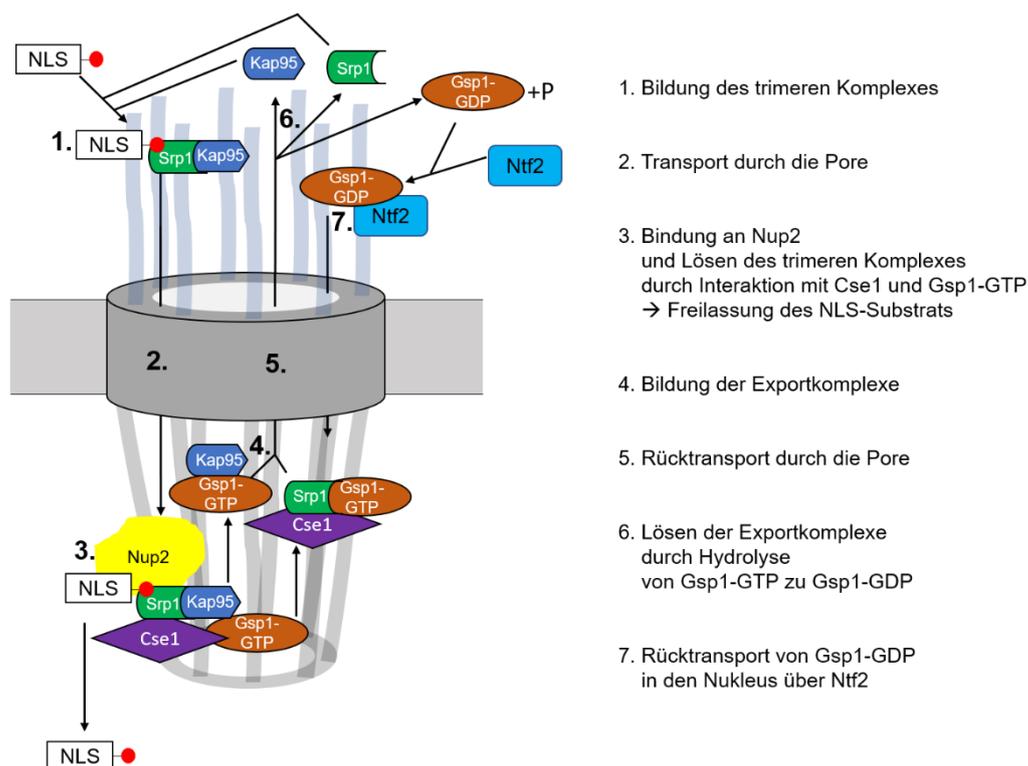
Blobel, 1995). Für den genauen Transport durch die Kernpore wurden jedoch verschiedene Modelle diskutiert, das „virtuelle Tor“ Modell, das „Spaghetti Öl“ Modell, das „selektive Phase“ Modell, sowie das Modell der Reduktion der Dimensionalität (Macara, 2001; Ribbeck und Görlich, 2001; Ribbeck und Görlich, 2002; Rout *et al.*, 2003; Peters, 2005; D'Angelo und Hetzer, 2008). Nachdem der Importkomplex die Pore passiert hat, wird er gelöst, indem Ran-GTP (Hefe Gsp1-GTP) an das Importin bindet, welches daraufhin das Substrat freigibt und zusammen mit Ran-GTP wieder exportiert wird. Dieser Komplex wiederum wird im Cytoplasma gelöst, indem Ran-GTP über Abspaltung eines Phosphats durch das GTPase-Aktivierungsprotein Ran-GAP (Hefe Rna1) zu Ran-GDP wird. Hierbei handelt es sich um einen gerichteten Transport, da Ran-GDP meist im Cytosol vorliegt und im Nukleus über den Guanidin-Austauschfaktor Ran-GEF (Hefe Prp20) Ran-GDP zu Ran-GTP umgewandelt wird (Bischoff *et al.*, 1994; Klebe *et al.*, 1995; Rexach und Blobel, 1995; Görlich *et al.*, 1996; Rout *et al.*, 2000).

### **2.3. Der klassische NLS-Import**

Es gibt zwei Typen von Kernlokalisierungssignalen, die klassische NLS (cNLS) und die atypische NLS. Besonders gut erforscht ist der klassische Kerntransport über die einfache Kernlokalisierungssequenz (PKKKRK), welche zuerst im großen SV40 T-Antigen des SV-Virus entdeckt wurde und seitdem zur Untersuchung des NLS-Imports als Modell verwendet wird (Kalderon *et al.*, 1984; Dingwall und Laskey, 1991). Neben dieser einfachen cNLS gibt es noch eine zweigeteilte (bipartite) cNLS, welche aus zwei durch 10 Aminosäuren (Linker) getrennten basischen Regionen besteht (Robbins *et al.*, 1991; Lange *et al.*, 2007). Im Laufe der Jahre zeigten neuere Studien, dass es Linker von bis zu 29 Aminosäuren gibt (Lange *et al.*, 2010). Der klassische Kerntransport erfolgt über Importin  $\beta$  (Hefe Kap95), welches im Gegensatz zu den anderen Importinen der  $\beta$ -Familie die Kernlokalisierungssequenz nicht selbst erkennen kann (Nagoshi *et al.*, 1999). Eine Ausnahme hierfür wurde jedoch für den Import des humanen Transkriptionsfaktors SREBP-2 beschrieben, welcher direkt von Importin  $\beta$  in Abwesenheit von Importin  $\alpha$  gebunden wird.

Das Adapterprotein Importin  $\alpha$  (Hefe Kap60 bzw. Srp1) hingegen erkennt die cNLS des zu transportierenden Substrats und interagiert zudem, da es nicht allein durch die Pore wandern kann, mit Importin  $\beta$ , was zur Bildung eines trimeren Komplexes führt (Enenkel *et al.*, 1995; Görlich *et al.*, 1996). Um zu verhindern, dass Importin  $\beta$  ein substratfreies Importin  $\alpha$  durch die Pore transportiert, bindet die cNLS-Bindetasche, welche normalerweise an das Substrat bindet, an die IBB-Domäne, welche zum Transport mit Importin  $\beta$  interagiert, und hemmt sich selbst (Kobe, 1999; Harreman *et al.*, 2003). Zudem verstärkt die Bindung an Importin  $\beta$  auch die Bindung zum cNLS-Substrat (Rexach und Blobel, 1995; Hahn *et al.*, 2008).

Kommt es in *S. cerevisiae* zu einer Bindung von Srp1 (Importin  $\alpha$ ) mit einem Substrat an Kap95 (Importin  $\beta$ ), so erfolgt der Transport durch die Kernpore bis hin zum an der nukleären Korbstruktur befindlichen Nup2 (Görlich *et al.*, 1996; Solsbacher *et al.*, 2000; Hahn *et al.*, 2008). Das Lösen des trimeren Komplexes wird einerseits begünstigt durch das Binden an die FxFG-Region von Nup2, wodurch die NLS Bindung schwächer wird, sowie das Binden von Srp1 an sein Exportin Cse1 mit Gsp1-GTP und die Bindung von Kap95 an Gsp1-GTP, was zum Lösen des Karyopherinheterodimers und zum Export der Importine führt (Rexach und Blobel, 1995; Künzler und Hurt, 1998; Hood und Silver, 1998; Gilchrist *et al.*, 2002; Matsuura *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005). Dieser Transport wiederum wird beendet durch die energieverbrauchende Umwandlung von Gsp1-GTP zu Gsp1-GDP, was dazu führt, dass die Importine wieder zum Transport weiterer Substrate zur Verfügung stehen (Hieda *et al.*, 1999). Zudem wird zur Aufrechterhaltung der Menge an Gsp1-GTP im Nukleus und Gsp1-GDP im Cytoplasma, das Gsp1-GDP über den Gsp1-GTP-spezifischen Importfaktor Ntf2 zurück in den Nukleus transportiert (Abbildung 2)(Ribbeck *et al.*, 1998; Bayliss *et al.*, 2002b).

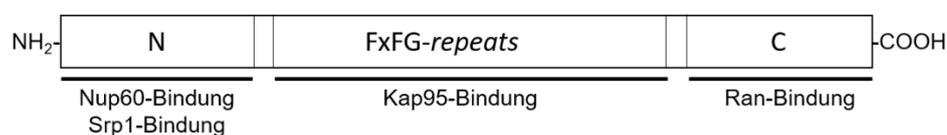


**Abbildung 2: Schematische Darstellung des cNLS-Transports in *S. cerevisiae*.**

Das NLS-Substrat wird von Srp1 erkannt und bindet mit Kap95 einen trimeren Komplex, welcher durch die Pore transportiert wird. Auf der nukleären Seite interagiert der Komplex mit Nup2. Diese Interaktion führt zusammen mit dem Binden von Cse1 und Gsp1-GTP zur Freilassung des NLS-Substrats und zum Lösen des Importkomplexes. Die Exportkomplexe Srp1-Cse1-Gsp1-GTP sowie Kap95-Gsp1-GTP werden aus dem Kern exportiert und auf der cytoplasmatischen Seite durch Hydrolyse von Gsp1-GTP zu Gsp1-GDP dissoziiert. Das Gleichgewicht von Gsp1-GTP im Zellkern und Gsp1-GDP im Cytoplasma wird aufrechterhalten, indem Gsp1-GDP über Ntf2 zurück in den Zellkern transportiert wird. Srp1 und Kap95 hingegen stehen für den nächsten Import zur Verfügung.

## 2.4. Eigenschaften und Lokalisation von Nup2

Wie bereits beschrieben, ist Nup2 eine Komponente des Kernporenkomplexes in *S. cerevisiae*, welche am klassischen Kernporentransport beteiligt ist (Solsbacher *et al.*, 2000). Was den Kernimport und die Lokalisation betrifft, entspricht Nup2 dem humanen Nukleoporin Nup50, unterscheidet sich jedoch stark in seiner Sequenz, da nur circa 17 % übereinstimmen und es somit kein Homolog darstellt (Guan *et al.*, 2000; Matsuura und Stewart, 2005; Ogawa *et al.*, 2010). Nup2 ist ein nicht essentielles Nukleoporin der nukleären Korbstruktur und über seinen Interaktionspartner Nup60 an die Kernpore gebunden (Abbildung 1B) (Loeb *et al.*, 1993; Dilworth *et al.*, 2001). Während Nup2 kein direktes Homolog im Menschen besitzt, stellt Nup60 zusammen mit Nup1, einem weiteren Nukleoporin, ein Homolog zum humanen Nukleoporin Nup153 dar (Abbildung 1B und C) (Fernandez-Martinez und Rout, 2009). Im Vergleich zu vielen anderen Nukleoporinen ist Nup2 asymmetrisch nur auf der nukleären Seite der Kernpore lokalisiert und weist als mobiles Nukleoporin eine zusätzliche Besonderheit auf (Solsbacher *et al.*, 2000; Dilworth *et al.*, 2001). Nup2 setzt sich aus 720 Aminosäureresten zusammen und besitzt ein Molekulargewicht von 78 kDa, bei Detektion nach Westernblot hingegen zeigt sich ein Signal bei einem Molekulargewicht von circa 110 kDa (Loeb *et al.*, 1993). Es besitzt im N-terminalen Bereich neben einer Nup60-Bindestelle auch eine Srp1-Bindestelle, welche sich jedoch in zwei verschiedenen Positionen befinden und somit nicht beeinflussen (Hood *et al.*, 2000; Solsbacher *et al.*, 2000; Denning *et al.*, 2001; Latta, 2011). Im mittleren Teil des Proteins befindet sich das für Nukleoporine typische Strukturmotiv bestehend aus 16 FxFG-*Repeats* und somit auch das Bindemotiv für Kap95 (Bayliss *et al.*, 2000; Bayliss *et al.*, 2002a; Denning *et al.*, 2002). Die im C-Terminus befindliche Gsp1-GTP Bindestelle begünstigt nach dem cNLS-Import das Lösen des Importkomplexes und ermöglicht das Bilden der Exportkomplexe (Abbildung 3) (Dingwall *et al.*, 1995; Schlenstedt *et al.*, 1995; Booth *et al.*, 1999).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung von Nup2.**

Nup2 besitzt verschiedene Bindestellen, welche sowohl für seine Lokalisation als auch für den cNLS-Transport wichtig sind. Im N-terminalen Bereich binden Srp1 und Nup60. Die Region mit den FxFG-*repeats* interagiert mit Kap95 und der C-terminale Bereich stellt die Bindestelle für Gsp1-GTP dar. (Modifiziert nach Latta, 2011).

## 2.5. Funktionen von Nup2

### 2.5.1. Nup2 und der cNLS-Transport

Nup2 enthält Bindestellen für die Kernimportfaktoren Srp1 und Kap95 sowie eine Bindestelle für das zum Export benötigte Gsp1-GTP und ist somit am bidirektionalen Transport von Srp1 und dem cNLS-Import beteiligt (Solsbacher *et al.*, 2000). Werden  $\Delta nup2$ -Zellen mit *SRP1-GFP* transformiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht, so zeigt sich, dass Srp1 in diesen Zellen im Zellkern akkumuliert und nicht wie im Wildtyp gleichmäßig verteilt in Cytosol und Nukleoplasma vorliegt. Zudem zeigt sich eine klare NPC-Assoziation in Form eines Ringsignals an der Kernhülle (Booth *et al.*, 1999). Ähnliche Effekte für Srp1-GFP wurden auch in der *cse1-1* Mutante beobachtet (Solsbacher *et al.*, 1998). Untersuchungen mit *CSE1-GFP* zeigen ebenfalls eine Akkumulation im Zellkern sowie einen Verlust der NPC-Assoziation, was auf Exportdefekte hindeutet (Hood *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Exportdefekte liegt im Cytoplasma nicht mehr genug Srp1 vor, weshalb man in  $\Delta nup2$ -Zellen, welche mit einem *NLS-GST-GFP* Plasmid transformiert wurden, eine Akkumulation des cNLS-Substrats im Cytoplasma detektieren kann, was auf Importdefekte hinweist (Solsbacher *et al.*, 2000). Gleiche Effekte wurden in Stade *et al.* (2002) auch für die SUMOylierungsmutanten *uba2-1* und *ulp1-133* beschrieben, weshalb, wie in Folz *et al.* (2019) beschrieben, auch die nicht mehr SUMOylierbare Form von Nup2 auf die gleichen Defekte getestet wurde, jedoch keine Import- bzw. Exportdefekte detektiert werden konnten. Auch die posttranslationale Modifikation von Nup60, dem Interaktionspartner von Nup2, durch SUMOylierung und Ubiquitinierung zeigte keinen Effekt bezüglich des cNLS-Transports (Nino *et al.*, 2016).

### 2.5.2. Nup2 und sein Interaktionspartner Nup60

Zellen, welche weder *NUP2* noch *NUP60* besitzen, sind letal, während Einzelmutanten lebensfähig sind (Loeb *et al.* 1993). Nup2 wird über Nup60 an die Kernpore gebunden, was sich in  $\Delta nup60$ -Zellen mit *NUP2-GFP* zeigt, welches im Nukleoplasma und nicht mehr an der Kernhülle lokalisiert ist (Denning *et al.*, 2001). Wird *NUP2* deletiert und *NUP60-GFP* analysiert, so zeigt sich, dass Nup2 einen Einfluss auf die Stabilität von Nup60 hat und die Menge an Nup60 in diesen Zellen verringert ist (Latta, 2011).

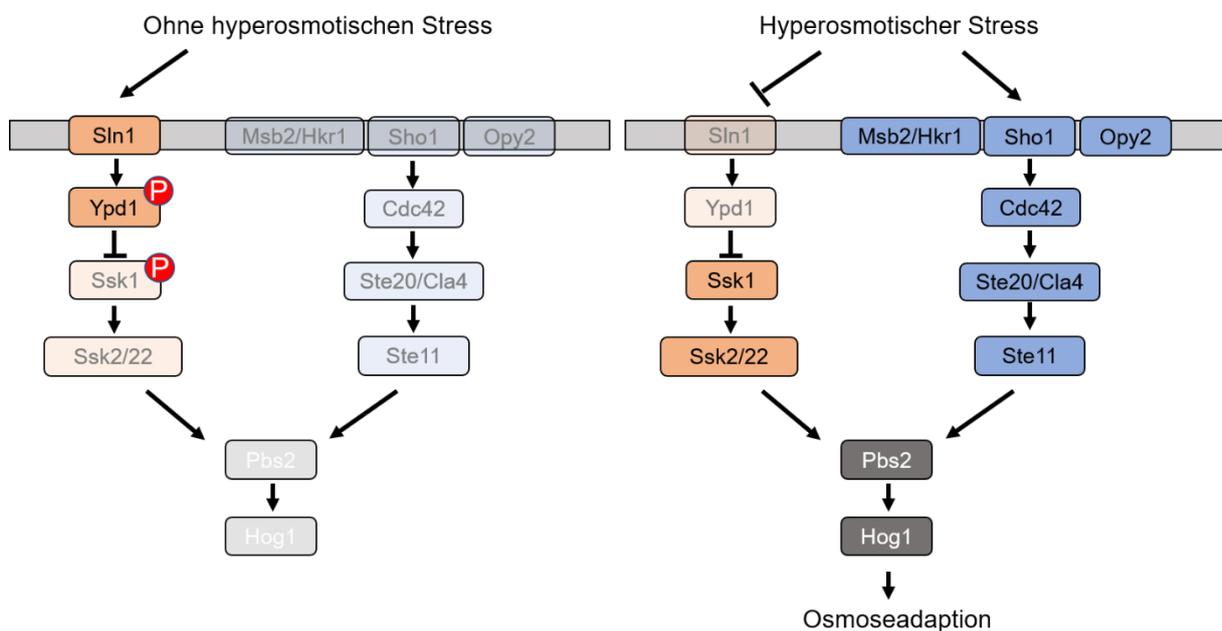
Zudem wurde auch beschrieben, dass Gsp1-GTP die Bindung von Nup2 und Nup60 verstärkt (Denning *et al.*, 2001). In Nino *et al.* (2016) wurden die SUMOylierungs- sowie Ubiquitinierungsstellen für Nup60 beschrieben, wobei besonders für die Ubiquitinierung von Nup60 eine drastische Änderung bezüglich der NPC-Assoziations- und Dissoziationsrate für Nup60 und seinen Interaktionspartner Nup2 beschrieben wurde, ohne jedoch die Gesamtdynamik des Kernporenkomplexes zu beeinflussen.

Neben Nup2 wird auch die Dekonjugase Ulp1, welche für die DeSUMOylierung verantwortlich ist, über Nup60 an den Kernporenkomplex gebunden und stabilisiert (Panse *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004). Ulp1 ist bezüglich seiner Dynamik im Gegensatz zu Nup2 aber nicht durch die SUMOylierung bzw. Ubiquitinierung von Nup60 beeinflusst (Nino *et al.*, 2016).

### 2.5.3. Nup2 und Osmosestress

Zellen müssen veränderte äußere Einflüsse wahrnehmen und zügig darauf reagieren können. Besonders wichtig ist dies auch für die Hefe *S. cerevisiae*, welche als einzelliger Eukaryot schnell mit Änderungen in ihrer Umgebung wie Kälte, Hitze, Mangel an Nährstoffen, oxidativem oder Ethanolstress sowie osmotischem Schock umgehen muss. Wichtig hierfür ist unter anderem ein intakter Kernporenkomplex, da die Stressoren an den Zellkern weitergeleitet werden müssen und im Zellkern die Expression von Genen eingeleitet wird, welche der Stressantwort dienen (Regot *et al.*, 2013). Die mRNA muss schließlich wieder durch die Kernporen exportiert werden. Ein Umwelteinfluss, der in Hefen eine große Rolle spielt, ist die Erhöhung des osmotischen Wertes der Umgebung, welche sich zu einem osmotischen Schock entwickeln kann. Dieser kann allein schon daraus resultieren, dass *S. cerevisiae* natürlicherweise auf sich zersetzenden Früchten gedeiht, welche jedoch beim Trocknen an Wasser verlieren, was eine erhöhte Zuckerkonzentration zur Folge hat. Die Reaktion auf diesen Stress erfolgt über den *high osmolarity glycerol* (HOG) Signalweg (Saito und Posas; 2012). Teil dieses Signalwegs ist die Hog1 MAP-Kinase-Kaskade. Der HOG-Signalweg kann über zwei verschiedene, funktionell redundante, aber mechanisch unterschiedliche Wege eingeleitet werden (Abbildung 4). Einer der Pfade startet bei dem transmembranen Osmosensor Sho1, welcher bei hyperosmotischem Schock die Ste11 MAPKKK aktiviert, was eine Aktivierung von Pbs2 zur Folge hat (Maeda *et al.*, 1995; Posas und Saito 1997). Der zweite Pfad über den transmembranen Histidin-Phospho-Transfer-Kinase/Osmosensor Sln1 wird als Zwei-Komponenten-System bezeichnet, ist negativ über osmotischen Stress reguliert und wird bei hyperosmotischem Stress inaktiviert (Maeda *et al.*, 1994). In aktiver Form sorgt sie für die Phosphorylierung von Ypd1 und Ssk1, was dazu führt, dass der HOG-Signalweg ausgeschaltet bleibt, da die phosphorylierte Ssk1 inaktiv ist. Bei hyperosmotischem Stress sinkt die Menge an phosphorylierter Ssk1. Ssk2 sowie Ssk22 werden aktiviert, welche dann wiederum Pbs2 aktivieren (Maeda *et al.*, 1995). An dieser Stelle laufen beide Pfade über Sho1 und Sln1 zusammen und in beiden Fällen wird die Hog1 MAPK aktiviert (Brewster *et al.* 1993). Nach Aktivierung wird ein Großteil von Hog1 in den Zellkern transportiert, wo es die Transkription sowie den Zellzyklus reguliert. Zudem hat Hog1 auch Zielproteine im Cytoplasma. Nachdem das osmotische Gleichgewicht wiederhergestellt ist, geht die Hog1-Aktivität zurück und es erfolgt der Export ins Cytoplasma. Die MAP-Kinase Hog1 ist somit essentiell für die Osmotoleranz von *S. cerevisiae* und  $\Delta hog1$ -Zellen sind nicht

in der Lage, in einer Umgebung mit hoher Osmolarität zu wachsen (Albertyn *et al.* 1994; Westfall und Thorner, 2006).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der beiden Hog1-Aktivierungspfade Sln1 und Sho1.**

Ohne hyperosmotischen Schock, ist Sln1 aktiv und phosphoryliert Ypd1 und Ssk1. Die phosphorylierte Form von Ssk1 ist inaktiv, weshalb keine Hog1 Aktivierung stattfindet. Bei hyperosmotischem Stress hingegen sind Sln1 und Ypd1 nicht aktiv, Ssk1 wird nicht phosphoryliert und aktiviert Ssk2 und Ssk22, welche wiederum Pbs2 und somit Hog1 aktivieren. Der Sho1-Pfad wird nur bei osmotischem Stress aktiv, was zu einer Aktivierung der MAPKKK Ste11 führt, welche ebenfalls Pbs1 und somit Hog1 aktiviert, was zu einer Osmoadaption infolge des Stresses führt (Modifiziert nach Saito und Posas; 2012).

Hog1 kann die Genexpression auf mehreren Ebenen regulieren, so phosphoryliert es einerseits Transkriptionsfaktoren oder bildet physikalische Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren in Promotornähe aus (Alepez *et al.*, 2001; Proft *et al.*, 2001; Nadal *et al.*, 2003; Nadal und Posas, 2010; Ruiz-Roig *et al.*, 2012). Zudem ist Hog1 mit Chromatin assoziiert, interagiert mit der RNA-Polymerase II und ist für die Stabilität von mRNA sowie die Translation von Stressantwort-Genen verantwortlich (Alepez *et al.*, 2003; Romero-Santacreu *et al.*, 2009; Nadal-Ribelles *et al.*, 2012). In Regot *et al.* (2013) wurde gezeigt, dass ein intakter Kernporenkomplex für das Zellwachstum und die Genexpression bei Stress notwendig ist. Zudem wurde beschrieben, dass Hog1 mit dem Kernporenkomplex assoziiert ist und Nup1, Nup2 und Nup60 direkt phosphoryliert. Für Nup60 konnte keine Hog1-spezifische Phosphorylierungsstelle detektiert werden, während Nup2 an Threonin 361 und Nup1 an Serin 11 und 160 sowie an Threonin 159 spezifisch phosphoryliert werden. Die Nukleoporine sowie die Phosphorylierung von Nup2 sind beteiligt an mRNA-Transkription und mRNA-Export stressspezifischer Gene, beispielsweise *STL1*, jedoch erfolgt die Interaktion der Nukleoporine mit den Loci für die Stressantwort nur bei Stress und in Anwesenheit von Hog1 (Regot *et al.*, 2013).

Erhöhter Stress führt in den Zellen der meisten eukaryotischen Organismen zu einer erhöhten globalen SUMOylierung (Kurepa *et al.*, 2003; Catala *et al.*, 2007; Conti *et al.*, 2008; Sydorsky *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2004). Ebenso verhält es sich auch für osmotischen Stress in Hefen. In Abu Irqeba *et al.* (2014) wurde beschrieben, dass das Fehlen der Hog1-Kinase einen noch höheren Anstieg der PolySUMOylierung bedingt, und geschlussfolgert, dass die Adaption an hyperosmotischen Stress unter anderem auch über die Hog1-vermittelte Regulierung der globalen SUMOylierung erfolgt. Zudem wurde auch ein Einfluss der E3-Ligase Siz1 sowie der Dekonjugase Ulp2 beschrieben (Abu Irqeba *et al.*, 2014). Die *SUMO stress response* (SSR) wurde auch in Lewicki *et al.* (2015) nach verschiedenen Stressbedingungen analysiert. Hier wurde bestätigt, dass Siz1 und Ulp2 an der Regulierung der Stressantwort beteiligt sind. Anhand massenspektrometrischer Analysen von mit 1 M KCl oder 1 M Sorbitol behandelten Zellen wurde ebenfalls gezeigt, dass dieser osmotische Schock zu einem Anstieg SUMOylierter Proteine führt, welche an der Transkriptionskontrolle beteiligt sind. Zudem wurde auch ein SUMOylierungsanstieg der am nukleären Korb lokalisierten Nukleoporene Nup1, Nup2 und Nup60 detektiert (Lewicki *et al.*, 2015).

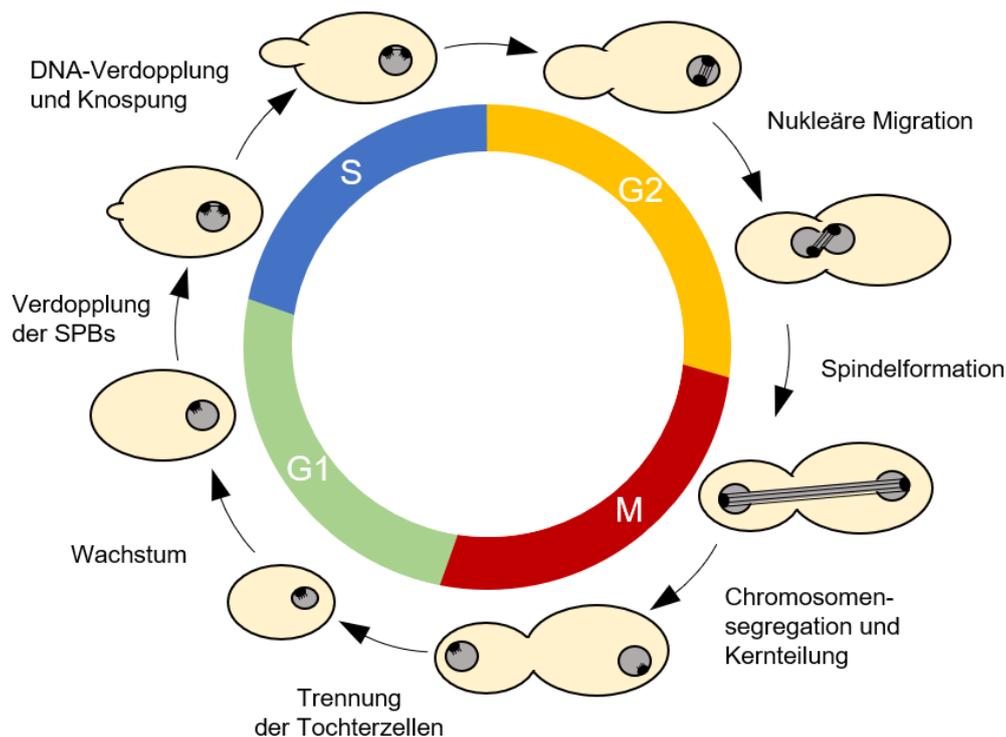
#### 2.5.4. Nup2 und sein Einfluss auf die Genaktivität

Die nukleäre Peripherie wurde lange für eine reprimierende Zone gehalten, da dort viele *silencing*-Faktoren sowie Heterochromatin lokalisiert sind (Andrulis *et al.*, 1998; Galy *et al.*, 2000; Brown und Silver, 2007). Zudem sind in der Hefe *S. cerevisiae* Interaktionen mit der nukleären Peripherie für das korrekte *silencing* von Telomeren sowie den Paarungstyploci HML und HMR notwendig, wobei hieran unter anderem Nup60 beteiligt ist (Brown und Silver, 2007). Mittlerweile wurde gezeigt, dass der NPC nicht nur einen reprimierenden Einfluss auf die Genaktivität hat, da gerade auch induzierbare Gene wie *INO1*, *GAL1* oder *HXK1* in aktiviertem Zustand an der nukleären Peripherie lokalisiert sind und zum Teil die mRNA-Produktion dadurch steigt, wenngleich die Lokalisation nicht essentiell ist (Casolari *et al.*, 2004; Dieppois und Stutz, 2010). Die periphere Lokalisation wird unter anderem durch basale Nukleoporene wie Nup2 beeinflusst (Brickner *et al.*, 2007). Für Nup2 wurde auch schon früher eine *chromatin boundary activity* (BA) beschrieben, da seine gerichtete Zugabe zu Reportergenen deren Assoziation mit der Kernpore begünstigt, das Öffnen von Heterochromatin verhindert und somit isolierend auf benachbarte Genregionen wirkt (Ishii *et al.*, 2002; Dilworth *et al.*, 2005). Durch diese isolierende Wirkung der BAs können Proteine, wie beispielsweise Nup2, sowohl reprimierend als auch aktivierend wirken, weshalb von Brown und Silver (2007) diskutiert wurde, ob die NPCs die Kernperipherie in aktive und inaktive Bereiche trennen (Ishii *et al.*, 2002; Brown und Silver, 2007).

Nup2 ist mit an der Rekrutierung von *INO1* und *GAL1* an die nukleäre Peripherie beteiligt. Während sich die periphere Lokalisation infolge äußerer Faktoren schnell einstellt und

mehrere Generationen bestehen bleibt, erfolgt die Transkriptionsaktivierung und somit der mRNA-Anstieg langsam. Nach der Hemmung bleiben *INO1* und *GAL1* durch den spezifischen Einbau der Histonvariante H2A.Z in den reprimierten Promotor an der Peripherie lokalisiert, woraus eine schnelle Reaktivierung erfolgt (Brickner *et al.*, 2007).

### 2.5.5. Nup2 und Meiose



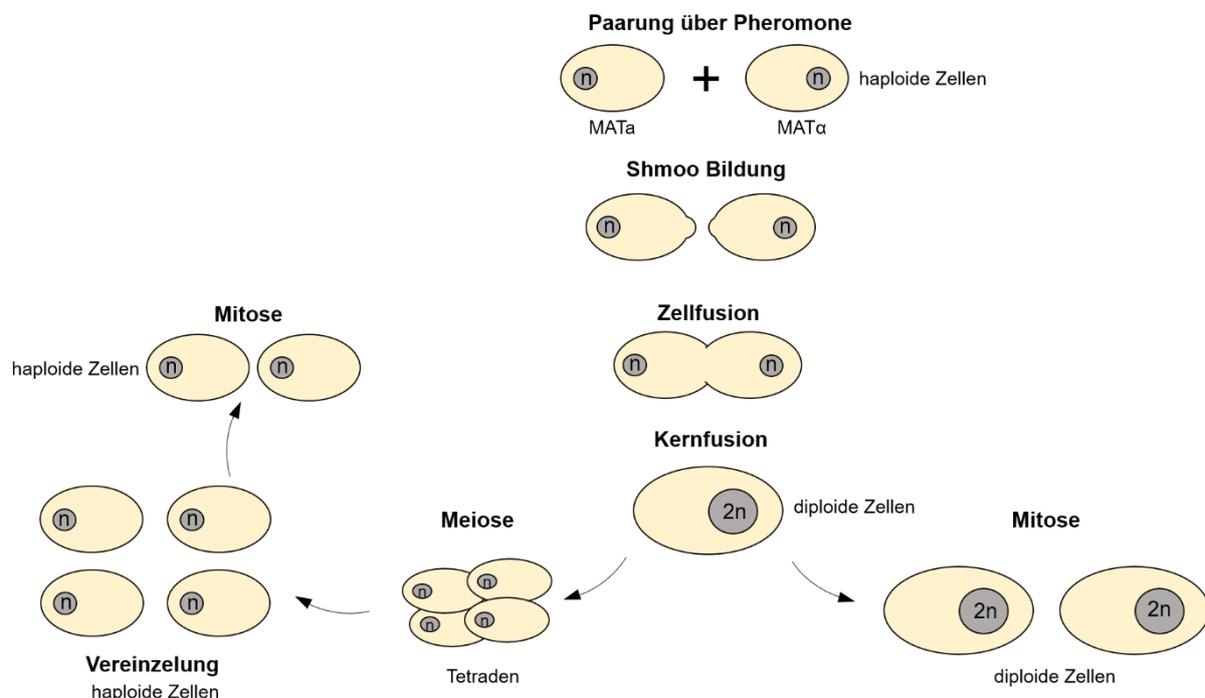
**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Hefezell-Zyklus.**

Der Zellzyklus startet in der G1-Phase mit einer Zelle, welche nach der Verdopplung der Spindelkörper (spindle pole bodies SPB) in die Synthese-Phase übergeht, in welcher die DNA verdoppelt wird und die Knospung einsetzt. In der G2-Phase erfolgt die nukleäre Migration und die Spindelformation, bevor in der Mitose-Phase erst die Zellkerne und anschließend die Zellen getrennt werden. Die Tochterzellen wachsen in der G1-Phase heran und durchlaufen dann auch den Zellzyklus. (Modifiziert nach Hartwell, 1974).

Der Zellzyklus einer jeden Zelle besteht aus den verschiedenen Phasen: G1-Phase, Synthesephase (S), G2-Phase und Mitosephase (M), so auch in der Hefe (Abbildung 5) (Murray, 1987). Der Startpunkt des Kreislaufs liegt in der G1-Phase, in welcher Zellbestandteile ergänzt werden und die Mutterzelle wächst. Während der S-Phase in *S. cerevisiae* wird die DNA verdoppelt und die Knospung beginnt. In der G2-Phase erfolgt die nukleäre Migration, bevor im ersten Teil der M-Phase die Spindelformation stattfindet. Der zweite Teil der M-Phase beinhaltet die Chromosomen-Segregation sowie die Teilung des Zellkerns und endet mit der Trennung beider Tochterzellen, welche wiederum in die G1-Phase eintreten, heranwachsen und ebenfalls den Zellzyklus durchlaufen (Hartwell, 1974). Diesen Kreislauf können sowohl haploide als auch diploide Zellen passieren, wobei es sich bei der Mitose um die asexuelle Vermehrungsform von Hefen, auch Knospung genannt, handelt.

Hefen können sich jedoch aufgrund ihrer unterschiedlichen Paarungstypen (*mating type*) MAT $\alpha$  und MAT $\alpha$  auch sexuell fortpflanzen. Werden zwei Hefestämme mit unterschiedlichen Paarungstypen verpaart, entstehen diploide Zellen, welche sich entweder mitotisch teilen oder bei Nährstoffmangel sporulieren und die Meiose durchlaufen, was zum Ausbilden einer Tetrade, bestehend aus 4 haploiden Zellen, führt (Abbildung 6).

Ndj1 ist ein Protein, welches an der Meiose beteiligt ist und für die homologe Paarung und Rekombination mitverantwortlich ist. Es lokalisiert sowohl an den Telomeren als auch an den *spindle pole bodies* (SPB) und wird in *S. cerevisiae* benötigt, um Telomere physikalisch an Proteine der Kernhülle zu binden. In einer Tandemaffinitätsreinigung von Ndj1-TAP in meiotischen Zellen wurde das Nukleoporin Nup2 mitgereinigt (Chu *et al.*, 2017). Zwischen beiden Proteinen wurde keine direkte Interaktion beschrieben und auch funktional sind beide nicht abhängig voneinander, sondern sind Teil verschiedener Pfade mit zum Teil sich überschneidenden Funktionen, wie in Doppelmutanten gezeigt wurde, welche weniger sporulieren. Der für die Meiose wichtige Teil, die MAR (*meiotic autonomous region*), befindet sich im N-terminalen Bereich von Nup2 an Position 50-174 und beeinflusst ebenso wie die Deletion von *NUP2* den Fortschritt der Meiose sowie die Sporenvitalität und führt zu erhöhten Leveln an Rekombinationsintermediaten (Chu *et al.*, 2017).



**Abbildung 6: Sexuelle Vermehrung von Hefen.**

Zwei haploide Hefezellen mit verschiedenen Paarungstypen können verpaart werden. Die Pheromone führen zur Shmoo Bildung, welche in einer Zell- und letztendlich Kernfusion endet. Es entsteht eine größere diploide Zelle, welche unter normalen Bedingungen den normalen mitotischen Zellzyklus durchläuft, woraus dann zwei diploide Zellen entstehen. Unter besonderen Umständen wie Mangel an Nährstoffen kann die diploide Zelle Tetraden bilden, welche aus 4 haploiden Zellen mit verschiedenen Erbgutinformationen bestehen. Diese können vereinzelt werden und als haploide Zellen den mitotischen Zellzyklus durchlaufen.

## 2.6. Posttranslationale Modifikationen (PTM)

Die funktionale Vielfalt und Diversität des Proteoms eukaryotischer Zellen wird zum einen auf Transkriptionsebene durch alternatives Spleißen gewährleistet, aber auch über diverse posttranslationale Modifikationen enorm erweitert (Black, 2003). Somit werden die Proteine nicht nur einfach synthetisiert und liegen in einer einzigen Version vor, sondern können auch infolge von Veränderungen im Zellinneren oder der äußeren Umgebung modifiziert werden, was zu einer schnellen Reaktion der Zellen führt. Je nachdem um welche Modifikation es sich handelt, können beispielsweise Peptide wie Signalpeptide über proteolytische Spaltung im C- oder N-terminalen Bereich des Proteins entfernt oder es können kleine Moleküle auf ein Protein übertragen werden, wie es beispielsweise bei der Methylierung, Phosphorylierung oder Glykosylierung der Fall ist, oder aber auch kleine Proteine wie zum Beispiel Ubiquitin oder SUMO an ein Zielprotein gebunden werden. Während proteolytische Modifikationen endgültig sind, können die enzymatisch katalysierten Modifikationen sowohl dauerhaft als auch reversibel sein. Anhand von *in silico* Analysen lassen sich viele dieser Modifikationen für die untersuchten Zielproteine vorhersagen (Wilkins *et al.*, 1999; Holmes und Giddings, 2004; Xue *et al.*, 2006).

### 2.6.1. Ubiquitinierung

Das wohl bekannteste und am besten erforschte regulatorische Protein, welches an Zielproteine gebunden wird und diese somit posttranslational modifiziert, ist Ubiquitin. Es ist ein in Eukaryoten stark konserviertes, 74 Aminosäuren langes Protein, welches ein Molekulargewicht von 8,5 kDa besitzt und zum ersten Mal bei der Isolation des Polypeptidhormons Thymopoetin aus dem Rinderthymus gefunden wurde (Goldstein *et al.*, 1975). Übertragen wird Ubiquitin über einen dreistufigen Prozess (Hershko und Ciechanover, 1992), wobei das ubiquitär vorkommende Vorläuferprotein über ein Deubiquitinierungsenzym prozessiert und das reife Protein danach in einem ersten Schritt unter Verwendung von ATP durch Ausbildung einer Thioesterbindung mit dem E1-Enzym aktiviert wird. Anschließend wird in einem zweiten Schritt das Ubiquitin auf eines der E2-Enzyme (in Hefe über 11 verschiedene) übertragen. Abgeschlossen wird die Ubiquitinierung durch Übertragung des Ubiquitins auf das Zielprotein unter Ausbildung einer Isopeptid-Bindung mit Hilfe einer spezifischen E3-Ligase, hier gibt es über 60 verschiedene in Hefe (Hershko *et al.*, 1983; Finley *et al.*, 2012; Buetow und Huang, 2016). Der Mechanismus ist reversibel und die Modifikation kann somit in Hefe über eines von 20 Deubiquitinierungsenzymen rückgängig gemacht werden (Reyes-Turcu *et al.*, 2009; Finley *et al.*, 2012).

Die wohl bekannteste Funktion dieser enzymatischen Modifikation ist die Markierung von fehlerhaften Proteinen, welche über das 26S Proteasom degradiert werden sollen. In diesem

Fall werden die Proteine polyubiquitiniert, indem mehrere Ubiquitine am Lysinrest K48 miteinander verknüpft werden (Hershko und Ciechanover, 1992). Andere Arten der Polyubiquitinierung über das Lysin K63 sowie Multi-, Oligo- und Monoubiquitinierung hingegen haben andere Funktionen, wie beispielsweise Signalweiterleitung, Endozytose, Histonmodifikation, DNA-Reparatur oder auch einen Einfluss in der Immunantwort (Polo *et al.*, 2002; Mukhopadhyay und Riezman, 2007; Hochstrasser, 2009; Tokunaga *et al.*, 2009).

Neben Ubiquitin wurden im Laufe der Zeit noch weitere kleine Ubiquitin-ähnliche regulatorische Proteine gefunden, welche entweder Homologien zu Ubiquitin aufweisen oder über einen ähnlichen enzymatischen Mechanismus auf das Zielprotein übertragen werden, wie beispielsweise Rub1 (Nedd8 in Vertebraten), Urm1, Atg12 oder Smt3 (Sumo1-3 in Vertebraten) (Hochstrasser, 2009). Modifikationen über diese Ubiquitin-ähnlichen Proteine sind wichtig bei vielen zellulären Prozessen wie Transkription, DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle, aber auch Signaltransduktion oder Autophagie (Müller *et al.*, 2001; Kerscher *et al.*, 2006).

### 2.6.2. SUMOylierung

Die posttranslationale Modifikation durch SUMO (*small ubiquitin-like modifier*), welche, wie der Name bereits sagt, der Ubiquitinierung sehr ähnlich ist, ist ein meist essentieller und in allen Eukaryoten konservierter Mechanismus. Während Invertebraten nur ein einziges für SUMO kodierendes Gen besitzen, haben Vertebraten und Pflanzen verschiedene SUMO-Gene. Im Menschen sind hauptsächlich drei Gene für SUMO beschrieben (*SUMO-1*, -2 und -3) (Saitoh und Hinchey, 2000). Zum Teil wird auch noch *SUMO-4* erwähnt, welches in Nierenzellen entdeckt und mittlerweile auch in Immun- und Pankreaszellen sowie der Plazenta nachgewiesen wurde, sowie das gewebs- und primatenspezifische *SUMO-5* (Bohren *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2016; Baczyk *et al.*, 2017). Die synthetisierten Proteine SUMO-2 und -3 sind zu 95 % homolog (Saitoh und Hinchey, 2000; Melchior, 2000; Johnson, 2004; Kerscher *et al.*, 2006). Zudem weist SUMO-1 eine Sequenzhomologie von 50 % sowohl zu SUMO-2 als auch zu SUMO-3 sowie dem SUMO-Protein Smt3 aus *S. cerevisiae* auf (Saitoh und Hinchey, 2000; Müller *et al.*, 2001). Die Sequenzhomologie von Smt3 sowie SUMO-1, -2 und -3 zu Ubiquitin liegt nur bei 18 %, jedoch bilden sie eine dem Ubiquitin ähnliche dreidimensionale Struktur aus (Bayer *et al.*, 1998; Hochstrasser, 2009). Des Weiteren verläuft die kovalente Bindung von SUMO an ein Zielprotein wie auch die Ubiquitinierung in drei Schritten über ein Aktivierungsenzym E1, eine Konjugase E2 und eine Ligase E3 (Gong *et al.*, 1997; Schwarz *et al.*, 1998). Übertragen wird SUMO auf einen Lysinrest, welcher meist Teil eines Konsensusmotivs ( $\Psi$ KxE/D) ist, bestehend aus einer großen, aliphatischen Aminosäure ( $\Psi$  =Leucin, Isoleucin oder Valin), dem Lysin (K), einer beliebigen Aminosäure (x)

und einer sauren Aminosäure (Glutaminsäure (E) oder Asparaginsäure (D)), und von der E2-Konjugase erkannt wird (Rodriguez *et al.*, 2001).

Neben diesem einfachen Konsensusmotiv gibt es auch noch erweiterte Versionen dieses Motivs wie das PDSM (*phosphorylation-dependent SUMOylation motif*), welches zusätzlich noch ein Serin und Prolin ( $\Psi K x E x x S P$ ) enthält und als phosphorylierungsabhängige SUMOylierungsstelle fungiert, oder aber das NDSM (*negatively charged amino acid-dependent SUMOylation motif*), welches zusätzlich negativ geladene Aminosäurereste enthält ( $\Psi K x E x x E E E E$ ) (Hietakangas *et al.*, 2006; Ankar und Sistonen, 2007; Geiss-Friedlander und Melchior, 2007). Zu diesen Konsensusmotiven gesellen sich auch noch weitere Motive und es sind auch viele SUMO-Substrate ohne Konsensusmotiv bekannt. Dennoch begünstigen Konsensusmotive sowie das Vorhandensein einer NLS die SUMOylierung des Substrats (Rodriguez *et al.*, 2001; Geiss-Friedlander und Melchior, 2007).

Wie auch bei der Ubiquitinierung kann ein einziges SUMO kovalent an ein Substrat gebunden werden (MonoSUMOylierung) oder aber auch mehrere SUMO-Proteine. Werden die SUMO-Proteine an verschiedene Lysinreste gebunden, handelt es sich um MultiSUMOylierung, während die Bindung mehrerer SUMO-Proteine an einen Lysinrest als PolySUMOylierung bezeichnet wird, welche aber im Gegensatz zur Polyubiquitinierung nicht den proteasomalen Abbau begünstigt (Ulrich, 2008; Creton und Jentsch, 2010).

SUMOylierung ist ein Mechanismus mit verschiedenen regulatorischen Eigenschaften, so kann eine Interaktionsstelle durch SUMO beispielsweise blockiert oder erst durch die Bindung an SUMO generiert werden. Zudem kann auch durch eine Konformationsänderung eine neue Interaktion begünstigt werden und es können durch die SUMOylierung andere PTMs ermöglicht werden, wie beispielsweise mit STUbLs (*SUMO-targeted ubiquitin ligases*), welche unter anderem die Stabilität des Proteins beeinflussen, indem sie es für den proteasomalen Abbau markieren. Die Stabilität kann aber auch dahingehend beeinflusst werden, dass Lysine, welche eigentlich ubiquitiniert werden, über SUMOylierung modifiziert und somit nicht mehr erkannt werden können (Muller *et al.*, 2001; Geiss-Friedlander und Melchior, 2007; Creton und Jentsch, 2010; Henley *et al.*, 2014).

Eine besondere Form neuer durch SUMOylierung gewonnener Interaktionsfähigkeiten ergibt sich durch sogenannte SUMO-interagierende Motive (SIMs). SUMO kann nicht nur kovalent in Form von SUMOylierung an sein Zielprotein gebunden werden, sondern auch über ein SUMO-interagierendes Motiv. SIMs setzen sich aus einer kurzen Sequenz von hydrophoben Aminosäuren, gefolgt von einer sauren Aminosäure und/oder einem phosphorylierten Serin zusammen (Hecker *et al.*, 2006). Die Interaktion ist nicht kovalent und kommt zustande, indem das SIM-Peptid eine  $\beta$ -Faltblattstruktur ausbildet, welche parallel oder antiparallel zwischen der  $\alpha$ -Helix und dem  $\beta$ -Strang von SUMO eingebettet wird (Kerscher, 2007). Das SIM erkennt

jedoch nicht nur freies SUMO, sondern auch SUMOylierte Substrate, was wiederum neue Interaktionen und zelluläre Prozesse ermöglicht (Minty *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2004).

### 2.6.3. SUMOylierung in *S. cerevisiae*

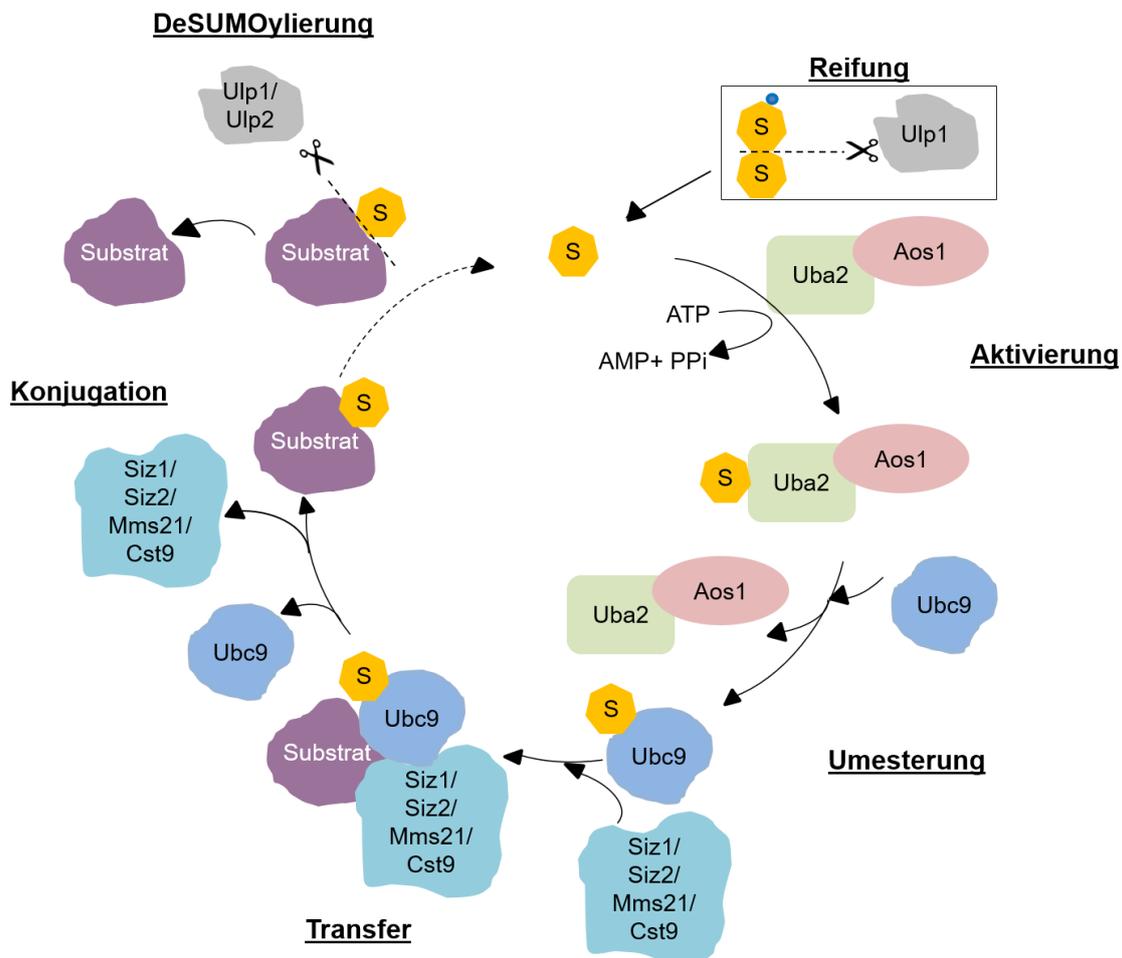
In *S. cerevisiae* gibt es ein einziges SUMO-Protein, Smt3 (*Suppressor of mif2*), welches eine Molekularmasse von etwa 11 kDa aufweist. Substrate, welche mit einem Smt3 modifiziert sind, zeigen in einer SDS-PAGE jedoch eine um etwa 20 kDa erhöhte Molekularmasse (Johnson, 2004).

Die SUMOylierung erfolgt in Hefe ebenso wie in anderen Organismen über einen dreistufigen Prozess, welcher als SUMO-Zyklus in

Abbildung 7 dargestellt ist. Das unreife als Vorläuferprotein synthetisierte Smt3 wird durch die Protease Ulp1 in seine aktive Form überführt, indem ein Peptid abgespalten wird und das G-G-Motiv bestehen bleibt. Anschließend wird Smt3 durch Ausbildung einer Thioesterbindung mit dem heterodimeren E1 (Aos1/Uba2)-Komplex energieabhängig unter Verbrauch von ATP aktiviert (Johnson *et al.*, 1997). Das aktivierte Smt3 interagiert über seine Konsensussequenz mit der E2-Konjugase (Ubc9) und wird auf diese übertragen (Johnson und Blobel, 1997). Der letzte Schritt erfolgt meist in Anwesenheit einer spezifischen E3-Ligase, wobei diese nicht zwingend erforderlich ist (Johnson und Gupta, 2001). In *S. cerevisiae* gibt es vier bekannte E3-Ligasen, Siz1, Nfi1 (Siz2), Mms21 und Cst9 (Zip3), welche zur Gruppe der SP (Siz/PIAS)-RING-Ligasen gehören und aufgrund ihrer RING-Domäne sowohl das Zielprotein als auch Ubc9 gleichzeitig binden und somit den Smt3-Transfer vereinfachen (Hochstrasser, 2001; Johnson und Gupta, 2001, Takahashi *et al.*, 2001; Zhao und Blobel, 2005; Cheng *et al.*, 2006). In der Hefe gibt es ebenfalls neben Einfach- und Multi- auch PolySUMOylierung, welche durch kovalente Verknüpfung mehrerer Smt3-Proteine über die Lysinreste K11, K15 oder K19 zustandekommt (Bylebyl *et al.*, 2003). Da es sich bei der SUMOylierung um einen reversiblen Prozess handelt, können SUMOylierte Proteine über die Dekonjugasen Ulp1 und Ulp2 wieder deSUMOyliert werden, wobei Ulp2 besonders am Abbau von PolySUMO-Ketten beteiligt ist (Li und Hochstrasser, 1999; Li und Hochstrasser, 2000; Bylebyl *et al.*, 2003). Die SUMO-spezifische Protease Ulp1, welche für die Prozessierung des unreifen Smt3 sowie die DeSUMOylierung verantwortlich ist, ist mit dem Kernporenkomplex assoziiert, während die Dekonjugase Ulp2 lediglich an der DeSUMOylierung beteiligt und im Kern lokalisiert ist (Panse *et al.*, 2003; Johnson, 2004).

Die Wichtigkeit der SUMOylierung bei verschiedenen zellulären Prozessen zeigt sich auch darin, dass viele Faktoren des SUMO-Zyklus essentiell sind. So sind Hefen ohne die Dekonjugase Ulp1, welche für die Reifung von Smt3 notwendig ist, ebenso wie Zellen ohne Smt3 selbst nicht lebensfähig (Johnson *et al.*, 1997; Li und Hochstrasser, 2003). Auch die Gene, welche für die E1-Proteine Aos1 und Uba2 sowie die E2-Konjugase Ubc9 kodieren,

sind wichtig für die Viabilität (Johnson *et al.*, 1997; Johnson und Blobel 1997). Das Fehlen der E3-Ligase Mms21 ist zwar nicht letal, zeigt aber dennoch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber DNA-schädigenden Substanzen, Defekte in der nukleolären Struktur, der Clusterbildung sowie Inaktivierung und Längenregulierung von Telomeren, was auf Defekte in der SUMOylierung bestimmter Proteine hinweist (Zhao und Blobel, 2005).



**Abbildung 7: Der SUMO-Zyklus in *S. cerevisiae*.**

Unreifes Smt3 wird über die Protease Ulp1 prozessiert. Diese reife Smt3-Form wird ATP-abhängig über eine Thioester-Bindung an den E1-Enzymkomplex (Aos1-Uba2) aktiviert (Aktivierung) und anschließend über eine weitere Thioester-Bindung auf das E2-Enzym (Ubc9) übertragen (Umesterung). Mit Hilfe einer der E3-Ligasen (Siz1, Nfi1, Mms21 oder Cst9) (Transfer) wird Smt3 meist proteinspezifisch auf das zu SUMOylierende Substrat übertragen (Konjugation). Dieser Prozess ist reversibel, da die Proteasen Ulp1 und Ulp2 das Smt3-Protein wieder vom Substrat entfernen (Dekonjugation) und der Kreislauf von vorne beginnen kann.

SUMOylierung ist eine Modifikation, welche viele verschiedene Proteine betrifft und durch ihre unterschiedlichen regulatorischen Eigenschaften die verschiedensten Konsequenzen für die Zelle haben kann (Panse *et al.*, 2004; Hannich *et al.*, 2005). Aufgrund der zellulären Lokalisation von Smt3 und der (De)SUMOylierungsenzyme im Nukleus beeinflusst die SUMOylierung vor allem nukleäre Prozesse wie Chromatinorganisation, Transkription, DNA-Reparatur, RNA-Metabolismus oder den nukleocytoplasmatischen Transport. Aber auch außerhalb des Zellkerns spielt die SUMOylierung von Proteinen eine Rolle, so beispielsweise

im Cytoplasma, endoplasmatischen Retikulum oder den Mitochondrien, wo SUMO-Substrate die Enzymaktivität, Exozytose, Kanalaktivität, Rezeptoraktivität oder Mitochondriendynamik beeinflussen (Geiss-Friedlander und Melchior, 2007; Wasik und Filipek, 2014).

Einflüsse auf beispielsweise den Kerntransport resultieren nicht nur daraus, dass SUMOKomponenten fehlen, sondern können auch schon entstehen, wenn ein einziges Lysin in einem Protein mutiert wird und das Protein deshalb nicht mehr SUMOyliert werden kann. So wurde es auch für das Importin Kap114 in *S. cerevisiae* gezeigt, welches am Lysinrest an Position K909 SUMOyliert wird. Nach Mutation dieser Position wurden Importdefekte detektiert, da nicht SUMOylierbares Kap114 sein zu transportierendes Substrat nicht freilässt und in gebundener Form im Zellkern akkumuliert (Rothenbusch *et al.*, 2012). Ähnliche Effekte wurden für den cNLS-Transport in den SUMOylierungsmutanten *uba2-1* und *ulp1-133* gezeigt, in welchen das Importin Srp1 im Zellkern akkumuliert, das NLS-Substrat jedoch Importdefekte aufweist und zum größten Teil im Cytoplasma verbleibt (Stade *et al.*, 2002).

SUMOylierungsspezifische Effekte müssen nicht unbedingt daraus resultieren, dass SUMOKomponenten fehlen oder SUMOylierungsstellen modifiziert sind, sondern es kann auch infolge äußerer Faktoren zu einer veränderten SUMOylierung kommen. So scheint die SUMOylierung auch einen Einfluss bei der Stressadaptation zu haben, da beispielsweise infolge von hyperosmotischem Stress, aber auch von Ethanol und oxidativem Stress eine gesteigerte SUMOylierung vieler Proteine detektiert wurde, welche sich hauptsächlich in Form von PolySUMOylierung zeigte. Zu den SUMOylierten Proteinen zählen unter anderem auch viele Proteine der Transkriptionsmaschinerie (Zhou *et al.*, 2004; Abu Irqeba *et al.*, 2014; Lewicki *et al.*, 2015).

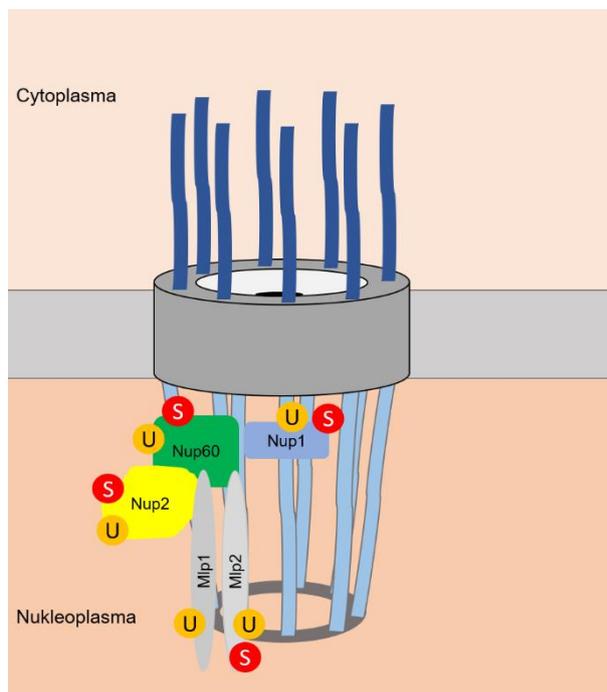
#### **2.6.4. PTMs der Komponenten der nukleären Korbstruktur**

Für die Komponenten der nukleären Korbstruktur Nup1, Nup2, Nup60 sowie Mlp1 und Mlp2 sind bereits mehrere posttranslationale Modifikationen bekannt. So wurden anhand verschiedener umfassender proteomischer Studien bereits 52 Phosphorylierungsstellen in Nup1, 56 in Nup2 und 54 in Nup60 sowie 18 in Mlp1 und 8 in Mlp2 entdeckt (Smolka *et al.*, 2007; Chi *et al.*, 2007; Albuquerque *et al.*, 2008; Gnad *et al.*, 2009; Holt *et al.*, 2009; Huber *et al.*, 2009; Bodenmiller *et al.* 2010). In Nup2 wurde zusätzlich noch eine weitere Hog1-spezifische Phosphorylierungsstelle identifiziert, welche nicht in den vorherigen 56 Phosphorylierungsstellen mit einbegriffen ist (Regot *et al.*, 2013). Zudem wurden für Nup2 und Nup60 je eine bekannte Ubiquitinierungsstelle sowie 18 Stellen für Mlp2 belegt (Mayor *et al.*, 2005; Swaney *et al.*, 2013). Für Nup2, Nup60, Mlp1 und Mlp2 wurde auch gezeigt, dass sie SUMOyliert und möglicherweise an weiteren Stellen ubiquitiniert werden (Albuquerque *et al.*, 2008; Kolawa *et al.*, 2013; Swaney *et al.*, 2013). In Nino *et al.* (2016) wurden diese Modifikationen für Nup60 mittels *in vivo*-SUMOylierung/Ubiquitinierung näher untersucht und

die SUMOylierungsstellen K440, K442 und K505 bestätigt. Die Ubiquitinierungsstelle für Nup60 wurde auf die Lysine im Abschnitt K105 bis K175 eingegrenzt, wobei die Mutation einer einzigen Stelle nicht ausreichend ist, um die Ubiquitinierung zu verhindern, obwohl es sich lediglich um eine Monoubiquitinierung handelt (Nino *et al.*, 2016).

In Folz *et al.* (2019) wurde die Ubiquitinierung von Nup2, Nup1, Nup60, Mlp1 und Mlp2 sowie die SUMOylierung von Nup1, Nup2, Nup60 und Mlp2 auch über spezifische *in vivo*-Analysen nachgewiesen (

Abbildung 8). Zudem wurden die SUMOylierungsstellen von Nup2 *in vitro* bestätigt (Folz *et al.*, 2019).



**Abbildung 8: Modifikationen der Komponenten der nukleären Korbstruktur.**

Darstellung der unter normalen Bedingungen in Folz *et al.*, (2019) bestätigten posttranslationalen Modifikationen der Komponenten der nukleären Korbstruktur. Nup1, Nup2, Nup60 und Mlp2 werden ubiquitiniert und SUMOyliert. Mlp1 wird ubiquitiniert. (Modifiziert nach Folz *et al.*, 2019).

### 2.6.5. Nup2 und posttranslationale Modifikationen

Für Nup2 sind bereits einige Modifikationen bekannt, so wurden bisher 57 Phosphorylierungsstellen beschrieben, welche sich über das gesamte Protein erstrecken (Smolka *et al.*, 2007; Albuquerque *et al.*, 2008; Holt *et al.*, 2009; Bodenmiller *et al.*, 2010). Zudem wurde auch beschrieben, dass Nup2 an Lysinrest 569 ubiquitiniert wird (Swaney *et al.*, 2013). *In silico* Analysen zeigen Nup2 als potenzielles SUMOylierungssubstrat, was über *in vitro*-SUMOylierung verifiziert wurde. In Folz *et al.* (2019) wurden verschiedene rekombinant hergestellte Nup2-Fragmente analysiert und eine SUMOylierung in Nup2-N<sup>85-174</sup> belegt. Genauere Untersuchungen in *in vitro*-Versuchen in dieser Arbeit ergaben die Lysinreste an

Position 153 und 170 als SUMOylierungsstellen. Anhand massenspektrometrischer Untersuchungen ungestresster und durch osmotischen Schock gestresster Zellen wurde Nup2 ebenso wie auch Nup60 und Nup1 als SUMOyliertes Protein beschrieben (Lewicki *et al.*, 2015). Nup2 wurde auch schon zuvor als SUMOyliertes Protein beschrieben, wobei dies ebenfalls auf massenspektrometrischen Ergebnissen beruhte (Wohlschlegel *et al.*, 2004; Hannich *et al.*, 2005; Albuquerque *et al.*, 2013).

## 2.7. Zielsetzung

Vorherige Arbeiten zeigten bereits, dass das Nukleoporin Nup2 *in vitro* SUMOyliert wird (Latta, 2011; Folz, 2014; Folz *et al.*, 2019). Zudem wurden *in vitro* die Lysinreste an Position 153 und 170 als SUMOylierungsstellen beschrieben und gezeigt, dass Mutationen an diesen Stellen keinen Einfluss auf den NLS-Import sowie die Lokalisation von Nup2 haben (Latta, 2011; Folz, 2014; Folz *et al.*, 2019).

Ein Teil dieser Arbeit bestand darin, *in vivo* die bereits bekannten *in vitro*-Ergebnisse zu verifizieren und Stämme und Bedingungen zu finden, in oder unter denen die SUMOylierung von Nup2 gesteigert ist. Zudem sollte überprüft werden, welche phänotypischen Effekte die SUMOylierung/ nicht vorhandene SUMOylierung von Nup2 auf die Funktionen von Nup2 hat. Unter diesem Aspekt sollten auch die Reaktion auf Osmosestress sowie die Effekte bezüglich der Chromatinbindung analysiert werden.

Neben der SUMOylierung von Nup2 sollte auch eine mögliche Ubiquitinierung analysiert und auch hier der Einfluss der SUMOylierung mit einbezogen werden.

Zudem sollten Methoden zur Analyse von Nup2-Interaktionspartnern optimiert und die Ergebnisse analysiert werden. Auch hier sollte der Einfluss der SUMOylierung auf die Interaktion mit anderen Proteinen einbezogen werden.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Geräte

Autoklav V-150, V-2540EL (Systec, Wettenberg)  
Behälter für Flüssigstickstoff, Isotherm KGW (Pequannuch, USA)  
Brutschränke (Mettler, Schwabach)  
DNA-Imager, Image Master (PharmaciaBiotech Amersham, München)  
Eisbad (Neolab, Heidelberg)  
Eismaschine (Ziegra, Hannover)  
Feinwaage BP61 und Extend (Sartorius, Göttingen)  
Gel-Gießschlitten und Elektrophoresekammern für Agarose-Gele (PEQLAB, Erlangen)  
Gilson-Pipetten (Abimed, Düsseldorf)  
Hamilton MICROLITER Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz)  
Heizblock Thermomixer Compact, Thermomixer 5436, Thermomixer 5320 (Eppendorf, Hamburg)  
Kühlschrank Liebherr Comfort (Liebherr, Ochsenhausen)  
Kühlzentrifuge Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg)  
Kühlzentrifuge GS-6KR Centrifuge und J2-M Centrifuge (Beckman Coulter, Fullerton, USA)  
Leuchttisch Prolite Basic (KAISER, Buchen)  
Lumi Fusion SL Advance Multi-Imagingsystem (PEQLAB, Karlsruhe)  
Magnetrührer MR3002 und MR 3000 (Heidolph, Schwabach)  
Mikrowellenherd Panasonic (Panasonic, Kadoma, Japan)  
Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Plus 185 (Merck Millipore, Hessen)  
Mikroskop Observer Z1 (Carl Zeiss, Göttingen)  
Mikroskop Zeiss Axio Scope (Carl Zeiss, Göttingen)  
Mikrowellenherd Panasonic (Panasonic, Kadoma, Japan)  
Mini-PROTEAN tetra Electrophoresis Cell (Gießapparatur für SDS-Polyacrylamidgele, Glasplatten, Spacer, Kämmen, Apparatur zum Lauf von SDS-Gelen) (Biorad, München)  
Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Apparatur zum Blotting von SDS-Gelen) (Biorad, München)  
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (PEQLAB, Karlsruhe)  
PCR-System PEQLAB Primus 96 (PEQLAB Karlsruhe)  
pH-Meter Microprocessor pH-Meter pH 537 (WTW, Weilheim)  
Photometer Ultrospec 3000 (Amersham Bioscience, München)

Planeten-Monomühle PULVERISETTE 6 classic line, Mahlbecher mit Dichtung (FRITSCH, Idar-Oberstein)  
Precellys24 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)  
Rotoren für Kühlzentrifuge JA10 (Beckman Coulter, Fullerton, USA)  
Scanner Image Scanner III (GE Healthcare, Freiburg)  
Spannungsgerät Power Pac 200 und Power Pac 300 (Biorad, München)  
Sterilbank (Fröbel Laborgeräte, Lindau)  
Thermocycler Primus 96 (PEQLAB, Karlsruhe)  
Tiefkühlschrank Comfort (Liebherr, Ochsenhausen)  
Tiefkühltruhe HeraFreeze (Heraeus, Hanau)  
Tischzentrifuge Eppendorf 5415C (Eppendorf, Hamburg)  
Typhoon Trio (GE Healthcare, Freiburg)  
UV-Tisch (PEQLAB, Karlsruhe)  
Vortex-Mixer Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, USA)  
Wasseraufbereitungsanlage Milli-QPlus 185 (Merck Millipore, Hessen)  
Wasserbad Julabo V (Julabo, Seelbach)  
Wipptisch Shaker Drs-12 (Elmi, Riga, Lettland)

### **3.1.2. Verbrauchsmaterialien**

Deckgläser Menzel Gläser (Gerhard Menzel, Braunschweig)  
Einmalspitzen (Sarstedt, Nümbrecht)  
Glaskügelchen (425-600 µm) (Sigma-Aldrich, München)  
Glaswaren (Schott AG, Mainz)  
Küvetten 10 mM (Sarstedt, Nümbrecht)  
Mikroschraubröhren SafeSeal microtube 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht)  
Mikrotiter-Platten 96-well (Sarstedt, Nümbrecht)  
Objektträger Menzel Gläser (Gerhard Menzel, Braunschweig)  
PCR-Reaktionsgefäße (Greiner Bio-One, Frickenhausen)  
Petrischalen (Greiner Bio-One, Frickenhausen)  
Polyprep Chromatographie-Säule 10 ml (BioRad, München)  
Reaktionsgefäße: 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht) und 2 ml (Eppendorf, Hamburg)  
Schraubröhrchen 15 ml und 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht)  
Spritzenfilter 0,22 µm Rotilabo (Carl Roth, Karlsruhe)  
Sterilfilter Nalgene Rapid-Flow (Thermo Scientific, Waltham, USA)  
Transfermembran 0,45 µM Roti-PVDF (Carl Roth, Karlsruhe)  
Whatman 3MM-Papier (Whatman, Kent, UK)  
(Ultra-) Zentrifugenbecher aus Polycarbonat oder Polypropylen (Beckman, München)

ZEBA Entsalzungssäulen (Pierce, Rockford, USA)

### 3.1.3. Enzyme

Alkalische Phosphatase (Roche, Mannheim)

*Klenow*-Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, USA)

*Phusion* High-Fidelity DNA-Polymerase (NEB, Frankfurt)

Restriktionsenzyme (Thermo Scientific, Waltham, USA bzw. NEB, Frankfurt)

RNase A (Roche, Mannheim)

T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific, Waltham, USA)

*Taq*-DNA-Polymerase (NEB, Frankfurt)

### 3.1.4. Software

Axiovision 4.8.2 SP1, Mikroskopsoftware (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena)

GraphPad Prism 5

ImageQuant 5.1, Quantifizierung (GE Healthcare, Freiburg)

Lumi Fusion, Analyse- und Steuerungssoftware (PEQLAB, Karlsruhe)

Microsoft Office

Scaffold 4, MS Datenanalyse (Oregon, USA)

### 3.1.5. Biochemikalien und Chemikalien

Biotoool, München: Protein A/G-Sepharose

Carl Zeiss, Göttingen: Immersionsöl "Immersol" 518 F fluorescence free

Eurofins MWG Operon, Ebersberg: Oligonukleotide

Fluka, Taufkirchen: Agar, L-Cystein, N-Ethylmaleinimid,

GeneON, Ludwigshafen: GelRED Fluoreszenzfarbstoff

GE Healthcare, Freiburg: Adenosintriphosphat, GSH-Sepharose, IgG-Sepharose, Calmodulin-Sepharose

Merck, Darmstadt: Ammoniumacetat, Ammoniumsulfat, Di-Natriumhydrogenphosphat, Ethylendiamintetraessigsäure, Ethylenglycol-bisaminoethylether-tetraessigsäure, Glycerin, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Calciumchlorid, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Trichloressigsäure, Tris,  $\beta$ -Mercaptoethanol, S-Protein-Agarose

New England Biolabs, Frankfurt: dNTP-Mix (2,5 mM bzw. 10 mM von jedem Nukleotid)

Peptide Institute Inc., Osaka, Japan: Pepstatin A, Antipain, Chymostatin, Leupeptin

Qiagen, Hilden: Nickel-NTA-Agarose

Remel, Lenexa, USA: Bacto-Trypton, Hefe-Extrakt, Bacto-Agar, Yeast Nitrogen Base

Roche, Mannheim: dNTP-Mix (je 10 mM), NP40, Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (EDTA-frei)

Serva Electrophoresis, Heidelberg: Ammoniumpersulfat, Harnstoff, Saccharose, Natriumdodecylsulfat, Triton X-100

Sigma-Aldrich, München: Ampicillin, Kanamycin,  $\beta$ -Mercaptoethanol, Bis-Tris, Dextrose, Dimethylsulfoxid, Geneticin, Glutathion, Polyethylenglycol 3300, Lachssperma-DNA, Lithiumacetat, 1,4-Phenylendiamin, Raffinose, Tween 20, Uracil, alle Aminosäuren außer L-Cystein

Sunrise Science, San Diego, USA: Inositolfreies Yeast Nitrogen Base

Thermo Scientific, Waltham, USA: Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid, Page Ruler Prestained Protein Ladder, Page Ruler Unstained Protein Ladder, 1 kb DNA-Leiter, Klenow

VWR International, Darmstadt: Aceton, Glycin, Methanol, Sorbitol

Die hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Roth aus Karlsruhe bezogen.

### 3.1.6. Kits

SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

QIAquick PCR Purification Kit (250); QIAquick Gel Extraction Kit (250) (Qiagen, Hilden)

QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, Waldbronn)

Rapid DNA Ligation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

Sure Clean DNA purification kit (Bioline, Luckenwalde)

### 3.1.7. Antikörper

Tabelle 1: Verwendete primäre Antikörper

Antigen	Verdünnung für Westernblot	Organismus	Typ	Herkunft	Anmerkung
GFP	1:1000	Kaninchen	polyklonal	Laborkollektion	Affinitäts-gereinigt über Protein
Gsp1	1:1000	Kaninchen	polyklonal	Laborkollektion	Affinitäts-gereinigt über Protein
HA	1:1000	Maus	mono-klonal	Covance (Hersteller) Hiss (Vertriebsfirma)	

Antigen	Verdünnung für Westernblot	Organismus	Typ	Herkunft	Anmerkung
Kap95	1:500	Kaninchen	polyklonal	Laborkollektion	Affinitäts-gereinigt über Protein
Nup2-N	1:1000	Kaninchen	polyklonal	Laborkollektion	Affinitäts-gereinigt über Protein
					Affinitäts-gereinigt über Peptid
Nup1-N	1:1000	Kaninchen	polyklonal	Laborkollektion	Affinitäts-gereinigt über Protein
Nup60	1:1000	Kaninchen	polyklonal	Laborkollektion	Affinitäts-gereinigt über Protein
Smt3	1:3000	Kaninchen	polyklonal	Laborkollektion	Affinitäts-gereinigt über Protein
Srp1	1:1000	Kaninchen	polyklonal	Laborkollektion	Affinitäts-gereinigt über Protein
Ubc9	1:1000	Ziege	polyklonal	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, USA	
Ubi	1:1000		polyklonal	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, USA	

Tabelle 2: Verwendete sekundäre Antikörper

Antigen	Verdünnung für Westernblot	Organismus	Herkunft
Kaninchen IgG (POD)	1:10000	Ziege	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, USA
Kaninchen IgG (POD)	1:30000	Ziege	Jackson ImmunoResearch lab, West Grove, USA
Maus IgG (POD)	1:1000	Ziege	Sigma Aldrich, München
Ziege IgG (POD)	1:1000	Esel	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, USA
Kaninchen IgG (Cy5)	1:5000	Ziege	GE Healthcare, Freiburg

### 3.1.8. Medien

#### Medien und Antibiotika zur Kultivierung und Selektion von *E. coli*

**LB-Medium** 25 g/l LB-Medium

In  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  unter Rühren lösen, autoklavieren.

**TB-Medium** 50 g TB-Medium

4 ml Glycerin

In 1 l  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  unter Rühren lösen, autoklavieren.

**2YT-Medium** 31 g/l 2YT

In  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  unter Rühren lösen, autoklavieren.

#### Antibiotika:

Ampicillin 100 mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  (-20°C)

Kanamycin 25 mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  (-20°C)

Chloramphenicol 34 mg/ml in  $\text{EtOH}_{\text{abs.}}$  (-20°C)

1:1000 Verdünnung in Medium.

**Agar** 15 g/l Bacto-Agar

Zum Medium geben, autoklavieren und in Petrischalen gießen.

#### Medien zur Kultivierung und Selektion von *S. cerevisiae*

20 % Galaktose-Lösung 200 g Galaktose

In 1 l  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  lösen, autoklavieren.

**20 % Glukose-Lösung** 200 g Glukose

In 1 l  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  lösen, autoklavieren.

**20 % Raffinose-Lösung** 200 g Raffinose

In 1 l  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  lösen, autoklavieren.

**YPD<sub>ade</sub>-Medium** 20 g Pepton

10 g Hefeextrakt

20 g Glukose

In 1 l  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  lösen, 5,5 ml 30 mM Adenin zusetzen und autoklavieren.

**YPD<sub>ade</sub>-Platten**

20 g Pepton  
 10 g Hefeextrakt  
 20 g Glukose  
 20 g Bacto-Agar

In 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, 5,5 ml 30 mM Adenin zusetzen, autoklavieren und in Petrischalen gießen. Zur Selektion über Kanamycin wird G418 (Geneticin) zugegeben (Endkonzentration 200 µg/ml).

**Synthetisch definierte (SD)-Selektionsplatten**

6,7 g Yeast Nitrogen Base mit Ammoniumsulfat  
 2 g -2AS-Mix (-Leu, -Ura)  
 Oder 2 g -4AS-Mix (-Leu, -Ura, -His, -Trp)  
 20 g Agar

10 ml benötigter AS hinzuzufügen, in 150 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen. Den Agar mit 750 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auffüllen, getrennt autoklavieren. Nach dem Autoklavieren beide Lösungen vereinigen, 100 ml 20 % Glukose zugeben und in Petrischalen gießen.

**Synthetisch definiertes (SD)-Medium**

6,7 g Yeast Nitrogen Base mit Ammoniumsulfat  
 2 g -2AS-Mix (-Leu, -Ura)  
 Oder 2 g -4AS-Mix (-Leu, -Ura, -His, -Trp)

10 ml benötigte Aminosäurestammlösung (s.u.) hinzufügen, in 900 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen und autoklavieren. Vor Benutzung Kohlenstoffquelle in Form von 100 ml 20 % Glukose zugeben. Bei galaktoseinduzierten Zellen dienen Raffinose und Galaktose als Kohlenstoffquelle.

Tabelle 3: Komponenten zur Herstellung der Aminosäuremischungen

Aminosäure	Menge	Aminosäure	Menge	Aminosäure	Menge
Adeninsulfat	5 g	Glycin	10 g	Serin	10 g
Alanin	10 g	Histidin	10 g	Threonin	10 g
Arginin	10 g	Isoleucin	10 g	Tryptophan	10 g
Asparagin	10 g	Leucin	5 g	Tyrosin	10 g
Asparaginsäure	10 g	Lysin	10 g	Valin	10 g
Cystein	10 g	Methionin	10 g	<i>myo</i> -Inositol	10 g
Glutamin	10 g	Phenylalanin	10 g	<i>para</i> -	1 g
Glutaminsäure	10 g	Prolin	10 g	Uracil	10 g

Aminosäuremischung -2 enthält weder Leucin noch Uracil.

Aminosäuremischung -4 enthält kein Leucin, Uracil, Histidin sowie Tryptophan.

## Aminosäurelösungen

Tabelle 4: Komponenten zur Herstellung der Aminosäurelösungen

Aminosäure/Nukleinbase	Konzentration [g/200ml]	Konzentration [mM]
Adenin	1,1	30
Histidin	4,2	100
Leucin	2,63	100
Tryptophan	1,64	40
Uracil	0,45	20

**Antibiotikumlösung:** 50 mM Kanamycin bzw. Analogon Geneticin (G418)

### Lösung zum Lagern der Hefezellen

Glycerin-Stammlösung 50 %

288 ml 87 % Glycerin

212 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

autoklavieren.

### 3.1.9. Plasmide

Tabelle 5: Verwendete Plasmide

pGSNr.	Bezeichnung	Selektionsmarker für <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	Herkunft
42	pRS315 ( <i>CEN</i> -Plasmid)	<i>AMP<sup>R</sup> LEU2</i>	Stratagene
43	pRS316 ( <i>CEN</i> -Plasmid)	<i>AMP<sup>R</sup> URA3</i>	Stratagene
422	YCpGAL-NLS-GST-SGFP	<i>AMP<sup>R</sup> LEU2</i>	Laborkollektion
583	pRS316-NUP2-GFP	<i>AMP<sup>R</sup> URA3</i>	Laborkollektion
2010	pRS426-NUP2-3xHA	<i>AMP<sup>R</sup> URA3</i>	Laborkollektion
2036	YEP181-CUP-7xHIS-SMT3	<i>AMP<sup>R</sup> LEU2</i>	Laborkollektion
2086	pRS426-NUP2-3HA K170R	<i>AMP<sup>R</sup> URA3</i>	Laborkollektion
2116	pRS426-NUP2-3HA K153R	<i>AMP<sup>R</sup> URA3</i>	Laborkollektion
2117	pRS426-NUP2-3HA K153R K170R	<i>AMP<sup>R</sup> URA3</i>	Laborkollektion
2169	pRS423-UBC9 (gDNA)	<i>AMP<sup>R</sup> HIS3</i>	Laborkollektion
2170	pRS424-UBC9 (gDNA)	<i>AMP<sup>R</sup> TRP1</i>	Laborkollektion
2246	pRS315-NUP2	<i>AMP<sup>R</sup> LEU2</i>	Laborkollektion
2247	pRS315-NUP2 K153R K170R	<i>AMP<sup>R</sup> LEU2</i>	Laborkollektion
2276	pFA6-TAP-KANMX6	<i>AMP<sup>R</sup> KAN<sup>R</sup></i>	V. Panse, Zürich, Schweiz
2307	pCUP1-6HIS-UBI	<i>AMP<sup>R</sup> LEU2</i>	B. Palancade, Paris, Frankreich
2308	pCUP1-6HIS-UBI	<i>AMP<sup>R</sup> URA3</i>	B. Palancade, Paris, Frankreich

pGSNr.	Bezeichnung	Selektionsmarker für <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	Herkunft
2309	pCUP1-6HIS-SMT3	AMP <sup>R</sup> TRP1	B. Palancade, Paris, Frankreich
2310	pCUP1-6HIS-SMT3	AMP <sup>R</sup> URA3	B. Palancade, Paris, Frankreich
2311	pCUP1-6HIS-SMT3	AMP <sup>R</sup> LEU2	B. Palancade, Paris, Frankreich
2324	pRS306-NUP2	AMP <sup>R</sup> URA3	Laborkollektion
2356	pEX-K4-nuSMT3	KAN <sup>R</sup>	euofins
2381	pEX-K4-nuCCE1 CBM3-Domäne von <i>Clostridium cellulolyticum</i>	KAN <sup>R</sup>	euofins
2406	pRS423-CUP-6HIS-SMT3	AMP <sup>R</sup> HIS3	Laborkollektion
2419	pGPD-mCherry-ER04	AMP <sup>R</sup> TRP1	J. Brickner, Northwestern University, Evanston

Tabelle 6: In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

pGS Nr.	Bezeichnung	Selektionsmarker für <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	Vektor	Insert
2365	pRS316- NUP2	AMP <sup>R</sup> URA3	pGS43 BamHI/XhoI/Cip	PCR von genomischer DNA (GSY170) Oligo 903+1118 BamHI/XhoI
2376	pEX-K4- nuSMT3 G→A	KAN <sup>R</sup>	pGS2356 Quik Change Mutagenese Oligo 1120+1121 GGG→AAA	
2379	pRS316- NUP2-SMT3- GFP G→A	AMP <sup>R</sup> URA3	pGS583 SexAI/Agel/Cip	pGS2376 SexAI/Agel
2380	pRS316- NUP2-SMT3	AMP <sup>R</sup> URA3	pGS2365 SexAI/Agel/Cip	pGS2376 SexAI/Agel
2384	pRS316- NUP2-CCE1	AMP <sup>R</sup> URA3	pGS2365 SexAI/Agel/Cip	pGS2381 SexAI/Agel
2385	pRS316- NUP2-CCE1- SGFP	AMP <sup>R</sup> URA3	pGS583 SexAI/Agel/Cip	pGS2381 SexAI/Agel
2408	pRS306 NUP2 K569R	AMP <sup>R</sup> URA3	pGS2324 Quik Change Mutagenese Oligos 1128/1129	

### 3.1.10. Organismen

### 3.1.11. Bakterienstämme

Tabelle 7: Verwendete *E. coli*-Stämme

Name	Genotyp	Herkunft
JM101	supE thi-Δ (lac-proAB) [F <sup>+</sup> traD36 proAB laq <sup>q</sup> lacZΔM15]	Stratagene, Waldbronn
BL21 (DE3)	pLysS F- <i>dcm ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> -m <sub>B</sub> -) <i>gal</i> λ(DE3) [pLysS (Cam <sup>R</sup> )]	NEB, Frankfurt
BL21 (DE3) AOS1 UBA2	pLysS F- <i>dcm ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> -m <sub>B</sub> -) <i>gal</i> λ(DE3) [pET28a-AOS1 (Kan <sup>R</sup> )] [pET11a-UBA2 (Amp <sup>R</sup> )]	E. Johnson, T. Jefferson Philadelphia, USA
Rosetta star	F- <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> -m <sub>B</sub> -) <i>gal dcm</i> pRARE (Cam <sup>R</sup> )	D. Görlich, Göttingen
M15	<i>Nal<sup>S</sup>, Str<sup>S</sup>, Rif<sup>S</sup>, Lac<sup>-</sup>, Ara<sup>-</sup>, Gal<sup>-</sup>, Mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, RecA<sup>+</sup>, Uvr<sup>+</sup>, Lon<sup>+</sup></i> [pREP4 Kan <sup>R</sup> ]	Qiagen, Hilden
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F <sup>+</sup> <i>proAB laq<sup>q</sup> lacZΔM15 Tn 10</i> ] (Tet <sup>R</sup> )	Stratagene, Waldbronn

### 3.1.12. Hefestämme

Tabelle 8: Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

GSY Nr.	Alternativer Name	Genotyp	Herkunft
170	WT	MATα <i>ura3-1 leu2-3,112 trp1-1, ade2-1 his3-11,15 kan1-100</i> (W303)	Laborkollektion
432	Δ <i>nup2</i>	MATα <i>leu2-3,11, trp1-1 ade2-1 Δnup2::ura3-1::HIS3</i> (JLY506)	(Loeb et al., 1993)
468	<i>ts rsl1-1</i>	MATα <i>ma1-1 ade2 ade3 leu2 ura3, his3 TRP<sup>+</sup> ts rsl1-1</i>	(Koepp et al., 1996)
664	<i>ts srp1-54</i>	<i>ts srp1-54</i> (NOY672) MATα <i>ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ63 ade2-1 can1-100 srp1-45</i>	M. Nomura, Univ. of California, Irvine
1255	Δ <i>ulp2</i>	MATα <i>trp1Δ63 his3Δ200 leu2-3,112 lys2-810 ura3-52 ulp2-1</i> [IS18-M2]	(Schwienhorst et al., 2000)
1257	<i>ts ulp1-133</i>	MATα <i>ulp1::HIS3 LEU2::ulp1-133 ura3-52 lys2-801 trp1-1 his3Δ200</i>	(Li & Hochstrasser, 1999)
1366	<i>ts mms21-11</i>	MATα <i>mms21-11::LEU2 met15 Δ RAD5 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 kan1-100</i>	(Zhao & Blobel, 2005)

<b>GSY Nr.</b>	<b>Alternativer Name</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Herkunft</b>
1386	<i>Δnup60</i>	MATa <i>NUP60::TRP1</i> (GSY170 + PCR von pGS1532 mit Oligos 359 und 1048)	Laborkollektion
1426	WT BY4741	MATa WT BY4741 <i>TRP<sup>+</sup> leu2 ura3 his3</i>	V. Panse, ETH Zürich
1427	<i>Δsiz1</i>	MATa <i>Δsiz1::KAN TRP<sup>+</sup> leu2 ura3 his3</i>	V. Panse, ETH Zürich
1428	<i>Δnfi1</i>	MATa <i>Δnfi1::KAN TRP<sup>+</sup> leu2 ura3 his3</i>	V. Panse, ETH Zürich
1429	<i>Δcst1</i>	MATa <i>Δcst1::KAN TRP<sup>+</sup> leu2 ura3 his3</i>	V. Panse, ETH Zürich
1487	<i>NUP2-WT</i>	MATα <i>NUP2::URA3</i> (GSY432 + pGS2324)	Laborkollektion
1488	<i>NUP2-2xKR</i>	MATα <i>NUP2 K153R K170R::URA3</i> (GSY432 + pGS2323)	Laborkollektion
1493	<i>Δhog1</i>	Ausgangsstamm: BY4741 (GSY1426) MATa <i>his3 leu2 ura3 TRP<sup>+</sup> HOG1::KANMX6</i>	V. Panse, ETH Zürich
1495	<i>NUP2-K170R</i>	MATα <i>NUP2 K170R::URA3</i> (GSY432 + pGS2370)	diese Arbeit
1496	<i>NUP2-K153R</i>	MATα <i>NUP2 K153R::URA3</i> (GSY432 + pGS2369)	diese Arbeit
1518	<i>NUP2-K569R</i>	MATα <i>NUP2 K569R::URA3</i> (GSY432 + pGS2408)	diese Arbeit
1523	<i>NUP2-TAP</i>	MATα <i>NUP2-TAP::KANMX6</i> (GSY1487 + pGS2408)	diese Arbeit
1524	<i>NUP2-2xKR-TAP</i>	MATα <i>NUP2-2xKR-TAP::KANMX6</i> (GSY1488 + pGS2408)	diese Arbeit
1528	<i>INO1LacO@INO1 + pGPDmCherry-ER04</i>	<i>ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ADE2 LacIGFP:HIS3 pGPDmCherry-ER04:TRP1 INO1LacO:URA3</i>	J. Brickner, Northwestern University, Evanston
1529	<i>LacO control + pGPDmCherry-ER04</i>	<i>ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ADE2 LacIGFP:HIS3 pGPDmCherry-ER04:TRP1 LacO:URA3</i>	J. Brickner, Northwestern University, Evanston
1532	<i>GAL1LacO@GAL1 + pGPDmCherry-ER04</i>	<i>ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ADE LacIGFP:HIS3 pGPDmCherry-ER04:TRP1 GAL1LacO:URA3</i>	J. Brickner, Northwestern University, Evanston
1534	<i>Δnup2 GAL1LacO@GAL1</i>	<i>Δnup2::Kan<sup>r</sup> ade2-1 can 1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 LacIGFP:HIS3 GAL1LacO:URA3</i>	J. Brickner, Northwestern University, Evanston

GSY Nr.	Alternativer Name	Genotyp	Herkunft
1535	<i>Δnup2</i> <i>INO1LacO@INO1</i>	<i>Δnup2::Kan<sup>r</sup> ade2-1 can 1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i> <i>LacIGFP:HIS3 INO1LacO:URA3</i>	J. Brickner, Northwestern University, Evanston
1536	<i>Δnup2</i> <i>INO1LacO@INO1</i> <i>+pGPDmCherry-ER04</i>	<i>Δnup2::Kan<sup>r</sup> ade2-1 can 1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i> <i>LacIGFP:HIS3 GAL1LacO:URA3</i> <i>pGPDmCherry-ER04:TRP1</i>	diese Arbeit
1538	<i>Δnup2</i> <i>GAL1LacO@GAL1</i> <i>+pGPDmCherry-ER04</i>	<i>Δnup2::Kan<sup>r</sup> ade2-1 can 1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i> <i>LacIGFP:HIS3 INO1LacO:URA3</i> <i>pGPDmCherry-ER04:TRP1</i>	diese Arbeit
1539	<i>NUP2-GFP</i>	<i>MATα NUP2-GFP::KANMX6</i> (GSY1487 + PCR von pGS1534 mit Oligos 883 und 884)	diese Arbeit

### 3.1.13. Oligonukleotide

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide

Nr.	Name	Sequenz (5' → 3')
140	URA3+	GGGAAGGGATGCTAAGGTAGAGGG
534	protA Integration Test-	CCGGAATTCGCTTATTTAGAAGTGGCGCGC
883	NUP2+	CTCATTTACGAAAGCTATTGAAGATGCTAAAAAAGAAATG AAACGGATCCCCGGGTTAATTAA
884	NUP2-	CTTTATTTGCTCAACTATAACCTTGAGCTACAAAATATGAG GGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
885	NUP2-360	CGGTGAGGAAGACGAAGTGGC
903	NUP2 5' Xho+	GAGGATTCCTATATCCTCGAG
1097	URA3 5' -250+	GTGGCTGTGGTTTCAGGGTCC
1105	pRS306 Integration an PstI Test-	CTCCTTACGCATCTGTGCGG
1118	NUP2 3' BAM-	GCGCGGATCCTTGCAGGAAAGAAAGGAG
1120	NUP2-SMT3 Junction delta GGG mutation+	GCTCACAGAGAACAGATTGCTGCTGCACCCAAGTTCACA ATAGATGC
1121	NUP2-SMT3 Junction delta GGG mutation-	GCATCTATTGTGAACCTGGGTGCAGCAGCAATCTGTTCTC TGTGAGC
1128	NUP2 K569R+	CAACTACAAATGATAGCAgGGAAGAATCAACAACAG
1129	NUP2 K569R-	CTGTTGTTGATTCTTCCcTGCTATCATTGTAGTTG

## 3.2. Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1. Kultivierung von *E. coli*

Bakterien haben sich im Laufe der letzten Jahre zu einem unverzichtbaren Werkzeug in der Molekularbiologie entwickelt. Sie dienen einerseits zur Herstellung von Proteinen, welche beispielsweise für *in vitro*-Experimente oder zur Affinitätsreinigung von Antikörpern verwendet werden. Andererseits lassen sich mittels Bakterien Plasmide vervielfältigen oder aber auch modifizierte Plasmide herstellen.

Die Kultivierung von Bakterien erfolgt meist bei 37°C in LB-Medium. Es wird jedoch auch TB-Medium verwendet, welches ermöglicht, die Zellen zu einer höheren Dichte wachsen zu lassen und somit eine höhere Plasmidausbeute zu gewinnen. LB-Medium wird standardmäßig auch zur Regeneration der Zellen nach der Transformation mittels Hitzeschock sowie zur Anzucht transformierter Zellen verwendet. Transformierte Zellen werden sowohl zur Plasmidpräparation als auch zur Synthese rekombinanter Proteine verwendet.

Zur Synthese rekombinanter Proteine wird neben LB-Medium auch 2YT-Medium verwendet. In beiden Fällen wird dem Medium eine 1:1000 verdünnte Antibiotika-Stammlösung beigelegt, um erfolgreich transformierte Bakterien zu selektieren.

### 3.2.2. Kultivierung von *S. cerevisiae*

Hefen stellen auf molekularbiologischer Ebene den idealen Modellorganismus dar, da sie schnell genetisch modifiziert werden können und diese Modifikationen problemlos dauerhaft beibehalten. Die Transformation kompetenter Hefezellen erfolgt über Hitzeschock. Die optimale Wachstumstemperatur der Bäckerhefe liegt bei 30°C. Temperatursensitive Stämme hingegen werden nach einer Wachstumsphase bei 25°C für 1-2 h bei 37°C kultiviert, da sie meist eine genomische Modifikation in einem essentiellen Gen besitzen, welche erst bei höherer Temperatur induziert wird. Zur Anzucht wildtypischer sowie genomisch veränderter Hefen kann das komplexe Vollmedium YPD<sub>ade</sub> oder ein synthetisches Vollmedium, SD-Medium genannt, verwendet werden. Hefen hingegen, welche lediglich auf Plasmidebene modifiziert werden, müssen in Minimalmedium kultiviert werden. Während genomische Veränderungen dauerhaft beibehalten werden, können Plasmide bei fehlendem Selektionsdruck von den Hefezellen verloren werden. Minimalmedium enthält ebenso wie YPD<sub>ade</sub> und SD-Medium Glukose als Kohlenstoffquelle. Als Stickstoffquelle dient im SD-Medium das aminosäurefreie Hefe-Stickstoff-Basismedium. Prinzipiell entspricht das Minimalmedium dem SD-Medium, wobei einige Aminosäuren bzw. Nukleotidbasen fehlen. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Plasmidvektoren verwendet, welche neben der gewünschten Eigenschaft auch für die Synthese der daran gekoppelten Selektionsmarker Histidin, Leucin, Tryptophan oder Uracil kodieren oder eine Geneticinresistenz entwickeln

können. Ebenso wie bei Bakterien kann die Selektion transformierter Zellen auch über ein Resistenzgen erfolgen. So können Plasmide neben der gewünschten Fähigkeit ein daran gekoppeltes Resistenzgen enthalten, wobei es sich in dieser Arbeit um eine Kanamycinresistenz handelt. Bei diesem Resistenzgen gibt es jedoch einen Unterschied zwischen Bakterien und Hefen. Während Bakterien zu den Prokaryoten gehören und eine Kanamycinresistenz entwickeln, entwickeln die eukaryontischen Hefen eine Geneticinresistenz, weshalb den Hefemedien Geneticin (G418) und nicht Kanamycin zugefügt wird.

Erfolgreich transformierte Hefen können auf Selektivplatten ausgestrichen und kultiviert werden und anschließend mit einem Holzstäbchen in 50 % Glycerin überführt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden, ohne dass sie ihre durch Transformation gewonnenen Fähigkeiten verlieren. Werden sie dann zu einem späteren Zeitpunkt benötigt, müssen sie lediglich auf Selektivplatten ausgestrichen werden und stehen, nachdem sie angewachsen sind, für weitere Experimente zur Verfügung.

### 3.2.3. Photometrische Dichtebestimmung von Bakterien- und Hefekulturen

Das Wachstum von Bakterien und Hefen in Flüssigmedium wurde mit einem Photometer gemessen. Mit diesem Verfahren wird die Trübung der Lösung über die Streuung des Lichts bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Als Referenz wird das zur Anzucht verwendete Medium verwendet. Ein Problem bei dieser Methode liegt darin, dass das Wachstum nicht genau ermittelt werden kann, da auch abgestorbene Zellen zu einer Trübung führen und somit die Messung verfälschen. Um also genauere Aussagen über das Wachstum der Zellen treffen zu können, müsste eine organismusspezifische Wachstumskurve erstellt oder eine andere Methode zur Wachstumsbestimmung verwendet werden. Ein weiterer ungünstiger Faktor ist, dass zu dicht gewachsene Zellen erst verdünnt werden müssen, bevor sie gemessen werden, da ab einer  $\text{OD}_{600}$  von etwa 0,5 die Streuung des Lichts keine genauen Aussagen mehr über die Zelldichte geben kann.

In dieser Arbeit war die photometrische Dichtemessung ausreichend, da lediglich überprüft werden musste, ob sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Hierzu sollten die Zellen eine  $\text{OD}_{600}$  von etwa 0,5-1 haben, wobei eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,1 einer Zellzahl von etwa  $1\text{-}2 \times 10^6$  Hefezellen pro ml entspricht (Xiao, 2006).

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

#### EDTA

0,5 M EDTA

In  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  lösen, pH 7,5 einstellen mit NaOH, autoklavieren oder sterilfiltrieren.

**GTE-Puffer** 50 mM Glukose  
25 mM Tris pH 8,0  
10 mM EDTA

In H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, sterilfiltrieren.

**TE/ pH8,0** 10 mM Tris pH 8,0  
1 mM EDTA

In H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, autoklavieren.

**RNase A 10 mg/ml** 986,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>  
10 mg RNase A  
10 mM Tris pH 7,5  
15 mM NaCl

Für 15 min bei 100°C erhitzen im Wasserbad.

**TE/RNase pH 8,0** 5 µl RNase A Lösung (10 mg/ml)  
95 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>  
2 ml TE-Puffer zugeben

**Natriumacetat 3 M** 49,22 g C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>  
In 200 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, pH 5,2 einstellen, autoklavieren.

**Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol** Roti-Phenol Mix

Nachdem transformierte *E. coli* Zellen auf LB<sub>Amp</sub>-Platten selektiert wurden, wurden Einzelkolonien in 1,5 ml TB-Medium, welches ebenfalls Ampicillin enthielt, überführt und für mindestens 8 h bei 37°C rollend inkubiert. Die dicht bewachsene Kultur wurde anschließend in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Durch einen 15-sekündigen Zentrifugationsschritt bei 15800 x g wurden die Zellen pelletiert und das Medium wurde verworfen.

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte durch alkalische Lyse. Nach Zugabe von 100 µl GTE-Puffer wurde das Pellet durch starkes Mischen resuspendiert. Anschließend wurde die Zellwand destabilisiert, indem 200 µl neu angesetzte 1 % SDS/ 0,2 M NaOH-Lösung zugegeben und das Zellgemisch dreimal über Kopf geschwenkt wurde. Das Neutralisieren erfolgte durch Zugabe von 150 µl 3 M NaOAc.

Um nun die Zellbestandteile wie denaturierte Proteine, die Bakterienzellwand oder auch genomische DNA von der Plasmid-DNA zu trennen, wurde eine Fällung mit einem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mix durchgeführt. Hierbei lagern sich die Verunreinigungen in der

Inter- und Unterphase ab, während die Plasmid-DNA in der wässrigen Phase bleibt. Nach einem 2-minütigen Zentrifugationsschritt bei 15800 x g wurde diese wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA wurde durch 1 ml 100 % Ethanol unlöslich gemacht und somit gefällt. Das Zellpellet wurde anschließend noch mit 70 % Ethanol gewaschen. Durch Entfernen des Überstands wurden die restlichen organischen Lösungsmittelreste entfernt und das DNA-Pellet wurde bei 37°C getrocknet und anschließend je nach Menge in 30-50 µl TE/RNase-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert. Für eine langfristige Lagerung wurde die Plasmid-DNA bei -20°C aufbewahrt.

### 3.2.5. Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Cracking-Buffer	2 % (v/v) Triton X-100
	1 % (w/v) SDS
	100 mM NaCl
	10 mM Tris pH 8,0
	1 mM EDTA

In H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen und sterilfiltrieren.

Ammoniumacetat:	7,5 M C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> NH <sub>4</sub>
-----------------	--

In H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, dann sterilfiltrieren.

Zur Isolierung genomischer DNA aus Hefe wurden 2 ml YPD<sub>ade</sub>-Medium mit dem gewünschten Hefestamm angeimpft und über Nacht bei 30°C zu einer dichten Kultur wachsen gelassen. 1,5 ml dieser Kultur wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellen durch einen 15 Sekunden langen Zentrifugationsschritt bei 15800 x g sedimentiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 200 µl Cracking-Puffer aufgenommen. Um die Zellwand der Hefezellen aufzubrechen, wurden neben dem Phenol-Chloroform-Mix noch 0,2 g Glaskügelchen zugegeben. Durch 5-minütiges Vortexen wurden die Zellen aufgebrochen, da durch die Scherkräfte der sich bewegenden Glaskügelchen eine hohe Kraft entsteht. Um anschließend die Zellbestandteile von der DNA zu trennen, wurde das Gemisch für 2 min bei 15800 x g zentrifugiert. 200 µl der wässrigen Phase mit der sich nun darin befindenden DNA wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 50 µl 7,5 M NH<sub>4</sub>OAc sowie 500 µl EtOH<sub>absolut</sub> gefällt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen und anschließend wieder zentrifugiert. Das bei 37°C getrocknete DNA-Pellet wurde dann in 40 µl TE-Puffer aufgenommen und für 5 Minuten bei 55°C inkubiert. Um die schwer lösliche DNA vollständig zu lösen, war eine weitere Inkubation für 30 Minuten bei 37°C erforderlich. Zur Analyse über PCR wurde 1 µl DNA verwendet und der Rest bei 4°C gelagert.

### 3.2.6. Insertion von DNA-Fragmenten in Plasmide

Bei der Klonierung werden bestimmte DNA-Fragmente, wie beispielsweise PCR-Produkte oder gereinigte DNA-Abschnitte aus anderen Plasmidvektoren, in die gewünschten Plasmidvektoren eingebracht. Die Plasmidvektoren sind organismusspezifisch und können die eingebrachte Sequenz entweder überexprimieren (*high-copy*), in geringen Mengen vermehren (*low-copy*) oder ins Genom integrieren, von wo die Sequenz in endogenen Mengen exprimiert wird.

Die verwendeten Vektoren enthalten die üblichen plasmidtypischen Elemente. Zu dieser Minimalausstattung gehören der Replikationsursprung (*origin of replication*), der Polylinker, auch Mehrfachklonierungsstelle (*multiple cloning site*) genannt, sowie ein Selektionsmarker. Neben diesen Elementen können auch Sequenzen im Vektor enthalten sein, welche für spezifische *tags* kodieren, sowie Promotoren, welche für eine gerichtete Induktion benötigt werden.

Der Polylinker enthält eine Sequenz, in der viele Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen enthalten sind. Ursprünglich werden diese Restriktionsendonukleasen von Bakterien verwendet, um sich gegen das Eindringen von Fremd-DNA zu schützen, indem diese durch die Enzyme abgebaut wird. Heutzutage macht sich die Wissenschaft genau diesen Mechanismus zu Nutze, um DNA-Fragmente in Vektoren einzubringen. Hierzu wird sowohl das DNA-Fragment als auch der Vektor mit einem oder zwei verschiedenen Enzymen geschnitten, wobei es sich meist um Typ II Restriktionsendonukleasen handelt, welche eine 4-8 bp lange Sequenz erkennen und in unmittelbarer Nähe oder direkt in dieser Sequenz schneiden. Im Gegensatz zu anderen Restriktionsendonukleasen benötigen Typ II Enzyme kein ATP und besitzen keine Methyltransferase-Aktivität. Je nachdem, welche Endonukleasen verwendet werden, entstehen glatte Enden (*blunt ends*) oder Enden mit 5'- bzw. 3'-Überhängen (*sticky ends*). Endstücke mit Überhängen vereinfachen die gerichtete Integration, bedingt durch die Phosphatreste an den Überhängen. Wird nur ein Enzym zum Schneiden verwendet oder entstehen glatte Enden, muss neben der erfolgreichen Einbringung des Fragments in den Vektor zusätzlich noch die Orientierung überprüft werden.

### 3.2.7. Spaltung der Plasmid-DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Sowohl für den Plasmidvektor als auch zur Vorbereitung des einzufügenden DNA-Fragments wurde ein präparativer Ansatz angefertigt (Tabelle 10). Neben diesem präparativen Ansatz wurden, falls zwei verschiedene Enzyme verwendet wurden, noch zwei analytische Ansätze vorbereitet, um die Enzymaktivität beider Restriktionsendonukleasen einzeln zu kontrollieren. Je nach verwendeten Enzymen wurden die Puffer sowie die Inkubationsbedingungen nach Herstellerangaben ausgewählt, wobei die Inkubation in den meisten Fällen bei 37°C erfolgte.

Die analytischen Ansätze wurden nach einer einstündigen Inkubation mit 6x Probenpuffer versetzt und nach gelelektrophoretischer Auftrennung analysiert. Welcher Probenpuffer verwendet wurde, war abhängig von der Größe der erwarteten Fragmente, da sowohl Xylencyanol als auch Bromphenolblau ein unterschiedliches Laufverhalten im Gel zeigen und somit das DNA-Signal überlagern können. In einem einprozentigen Agarosegel läuft Xylencyanol bei etwa 3000-4000 bp und ist für kleinere Fragmente geeignet, während Bromphenolblau aufgrund seines Laufverhaltens bei etwa 200-300 bp gut geeignet ist, wenn große Fragmente erwartet werden. Nachdem die Aktivität beider Enzyme verifiziert wurde, erfolgte die Auftrennung der präparativen Ansätze. Die gewünschten Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mit dem Gel-Extraktions-Kit gereinigt.

Tabelle 10: Pipettierschema zur analytischen und präparativen enzymatischen Spaltung von DNA

Komponente	analytischer Ansatz	präparativer Ansatz
DNA	1 µl	4-10 µl (~4 µg)
Enzym, je	0,4 µl	1,5 µl
Puffer 10x (mit oder ohne BSA)	1 µl	4 µl
BSA 10x (optional)	1 µl	4 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	auf 10 µl	auf 40 µl

### 3.2.8. Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase

Die durch den Restriktionsverdau entstandenen endständigen Phosphatgruppen erhöhen das Risiko einer Religation des Vektors, weshalb entweder direkt nach dem Restriktionsverdau oder aber nach der Reinigung aus dem Gel 0,5 µl CIP (*calf intestinal alkaline phosphatase*) zum Vektor zugegeben wurden und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert wurde. Das Insert hingegen blieb unbehandelt, um den Einbau in den Vektor zu vereinfachen.

### 3.2.9. Behandlung mit Klenow-Polymerase

Das Klenow-Fragment ist das große Fragment der DNA-Polymerase und stammt aus *E. coli*. Eine Behandlung mit dem Klenow-Enzym ist nur erforderlich, wenn sowohl Vektor als auch Insert nicht mit zwei gleichen Enzymen geschnitten wurden und die Enden nicht kompatibel sind. In diesem Fall wird zu der geschnittenen DNA Klenow-Enzym (1 U/µl) sowie dNTPs (Endkonzentration 1 µM/dNTP) und der je nach Herstellerangaben kompatible Puffer zugegeben und der Ansatz für 10 min bei 37°C inkubiert, bevor die Reaktion bei 75°C für 10 min gestoppt wird. Durch diesen Prozess werden die 5'-Überhänge zu doppelsträngiger DNA aufgefüllt, indem die 3'-Enden der geschnittenen DNA mit komplementären dNTPs aufgefüllt werden, wodurch glatte Enden für die Ligation entstehen.

### 3.2.10. DNA-Ligation

Die Ligation erfolgte mit dem *Rapid Ligation* Kit von Fermentas für 1 h bei Raumtemperatur. Eine Komponente dieses Kits ist die T4-Ligase, welche für die Ausbildung von Estergruppen zwischen den komplementären 3'-5'-Enden verantwortlich ist. Es handelt sich hierbei um eine ATP-abhängige Reaktion, weshalb der im Kit enthaltene Puffer unter anderem ATP als Cofaktor für die T4-Ligase enthält. Das Verhältnis von Vektor zu Insert lag bei 1:3 (Tabelle 11), da sich gezeigt hat, dass die Wahrscheinlichkeit einer Religation beziehungsweise der Einbau mehrerer Inserts in einen Vektor unter diesen Bedingungen am geringsten ist. In Fällen, in denen auf diese Weise keine Transformanten generiert werden konnten, wurde das Verhältnis von Insert zu Vektor jedoch variiert.

Tabelle 11: Pipettierschema für einen Ligationsansatz

Komponente	Menge pro Ligationsansatz
Vektor	1 x
Insert	3 x
Ligationspuffer	2 µl
Ligase	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 10 µl

### 3.2.11. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung ermöglicht es, die Richtigkeit eines Plasmidvektors zu kontrollieren. Dies ist vor allem erforderlich, wenn ein PCR-Produkt in einen Vektor eingebracht wurde oder wenn einzelne Basen mittels PCR mutiert wurden. Die zu sequenzierende DNA wurde mit dem *Sure clean DNA Purification Kit* gereinigt und anschließend mittels Nanodrop ND 1000 quantifiziert. Die gemessene Konzentration des Plasmids diente zur Berechnung der einzusetzenden Menge für die Sequenzierung. Pro Sequenzierungsansatz (Tabelle 12) wurden 1 µg DNA sowie 0,4 µl Oligonukleotid verwendet. Pro Plasmid wurden meist zwei Sequenzierungen durchgeführt, eine in 5'-und eine in 3'-Richtung, weshalb zwei Ansätze mit zwei unterschiedlichen Oligonukleotiden angefertigt wurden. Der Sequenzierungsansatz wurde anschließend von LGC Genomics (Berlin) sequenziert.

Tabelle 12: Ansatz für die Sequenzierung

Komponente	Menge pro Sequenzierungsansatz
Gereinigte DNA	1 µg
Oligonukleotid (50 µM)	0,4 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	auf 14 µl auffüllen

### 3.2.12. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht, bekannte DNA-Sequenzabschnitte zu amplifizieren. Auf diese Weise lassen sich u.a. Mutationskassetten herstellen, welche zur Integration oder Deletion verwendet werden können. Außerdem lassen sich mit Hilfe von PCR und speziellen Kits zielgerichtete Mutationen wie beispielsweise ein Basenaustausch in einen Plasmidvektor einbauen, der zum Austausch einer Aminosäure führt. PCR kann aber auch dazu dienen, den Erfolg genomischer Integrationen oder Deletionen zu überprüfen.

Je nachdem, ob eine Mutationskassette über die PCR hergestellt werden, ein Fragment zur Herstellung eines neuen Plasmids amplifiziert oder eine genomische Veränderung verifiziert werden sollte, variierte die Größe des PCR-Ansatzes, wobei die jeweiligen Komponenten identisch waren. Der Kontrollansatz wurde möglichst klein gehalten und hatte ein Volumen von 25 µl, während der Ansatz zur Herstellung einer Mutationskassette oder eines DNA-Fragments ein Volumen von 100 µl hatte (Tabelle 13). Als DNA-Vorlage (*template*) dienen entweder Plasmid-DNA, welche vor Benutzung 1:20 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> verdünnt wurde, oder genomische DNA, welche unverdünnt verwendet wurde. In den PCR-Ansätzen waren neben der DNA-Vorlage eine thermostabile DNA-Polymerase sowie Oligonukleotidprimer, Nukleotide und Puffer enthalten. DNA-Polymerasen stammen aus verschiedenen Organismen, wobei in dieser Arbeit hauptsächlich die extrem hitzebeständige *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* sowie die *Phusion*-Polymerase verwendet wurden. Bei der *Phusion*-Polymerase handelt es sich um eine Chimäre, welche eine der *Pyrococcus furiosus*-Polymerase ähnliche Polymerasesequenz mit *proofreading*-Enzym sowie eine dsDNA-bindende Proteindomäne enthält, was zu einer hohen Genauigkeit sowie einer schnellen Amplifikation führt.

Tabelle 13: Pipettierschema für PCR-Ansätze mit *Taq*- bzw. *Phusion*-Polymerase

Komponente	Menge pro PCR-Ansatz bei Integrations-/Deletionskontrolle	Menge pro PCR-Ansatz für Mutagenesekassetten oder zur Herstellung eines DNA-Fragments
Reaktionspuffer	2,5 µl (10x)	20 µl (5x)
dsDNA ( <i>template</i> )	1 µl (genomische DNA)	1 µl (1:20 verdünnt)
Primer (50 µM)	0,5 µl	2 µl
dNTP Mix	0,5 µl	2 µl
Polymerase	0,5 µl <i>Taq</i> -Polymerase	2 µl <i>Phusion</i> -Polymerase
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	auf 25 µl auffüllen	auf 100 µl auffüllen

Tabelle 14: Bedingungen zur Amplifikation mit dem Thermocycler unter Verwendung der *Taq*- bzw. *Phusion*-Polymerase

Reaktionsschema	<i>Taq</i> -Polymerase		<i>Phusion</i> -Polymerase		Zyklen
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit	
Erster Denaturierungsschritt	95°C	30°sec	98°C	30°sec	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	30°sec	98°C	10°sec	30-35 Zyklen
Anlagerung	52°C	30°sec	52°C	30°sec	
Elongation	68°C	1 min/kb	72°C	30°sec/kb	
Anschließende Elongation	68°C	5 min	72°C	7 min	1 Zyklus
Lagerung	8°C	∞	8°C	∞	1 Zyklus

Das PCR-Programm besteht aus drei verschiedenen, sich wiederholenden Phasen, der Denaturierung, der Hybridisierung und der Elongation, und wird in einem Thermocycler durchgeführt (Tabelle 14). Nachdem alle Komponenten für die PCR in einem PCR-Reaktionsgefäß vereint wurden, wurde die Reaktion auf 95°C erhitzt. Anschließend erfolgt die Denaturierungsphase, bei der die DNA bei 95°C zu einzelsträngiger DNA (ssDNA) denaturiert wurde. In der Hybridisierungsphase, welche in der Temperatur variieren kann, meist jedoch bei 52°C erfolgte, lagern sich die Nukleotidprimer an die ssDNA an und werden anschließend während der Elongationsphase bei 68°C mit Hilfe der DNA-Polymerase in 5'-zu 3'-Richtung verlängert, was dazu führt, dass wieder doppelsträngige DNA vorliegt. Mit jedem Zyklus steigt die Menge an DNA exponentiell an, wobei eine PCR meist aus 30-35 Zyklen besteht. Die Elongationszeit der PCR variiert je nach Größe des erwarteten Fragments und je nach verwendeter Polymerase, wobei in etwa 0,5-1 min pro 1 kb Länge gerechnet werden (Mühlhardt, 2005). Die kurzfristige Lagerung des PCR-Produkts erfolgt bei 4°C. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurde das PCR-Produkt bei -20°C gelagert.

PCR-Produkte, welche dazu dienen, um Deletionen oder Integrationen zu überprüfen, wurden auf einem Agarosegel analysiert, während Fragmente zur Herstellung neuer Plasmide nach der Analyse über Restriktionsenzyme gespalten und aus dem Agarosegel gereinigt wurden. Über PCR hergestellte Mutationskassetten hingegen wurden nach der Analyse direkt zur Transformation von Hefen verwendet.

### 3.2.13. Ortsspezifische Mutagenese

Mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese können über gerichteten Basenaustausch einzelne oder mehrere Aminosäuren in bis zu 8000 bp langen DNA-Plasmiden ausgetauscht werden. Hierzu müssen beide verwendeten Primer die gewünschte Mutation enthalten und sich an der gleichen Sequenz, jedoch an den gegenläufigen Strängen anlagern. Zudem sollten die Primer neben den Mutationen jeweils zwischen 25 und 45 Basen lang sein und eine



<b>DNA-Längenstandard</b>	45 µl DNA
	485 µl TE-Puffer pH 8,0
	170 µl 6x-DNA-Probenpuffer
<b>TAE-Puffer 50x</b>	0,5 M Tris
	55 % (v/v) Essigsäure
	50 mM EDTA

In H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen.

DNA-Fragmente lassen sich mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese ihrer Größe nach auftrennen. DNA ist aufgrund des Phosphatrückgrats negativ geladen und lässt sich somit über ein elektrisches Feld auftrennen. Hierbei wandert die negativ geladene DNA von der Kathode zur Anode. Kleinere DNA-Fragmente wandern schneller durch die Poren der Matrix als größere, wodurch eine größenabhängige Auftrennung zustande kommt. Neben der Größe hat auch die Struktur einen Einfluss auf das Laufverhalten im Gel. Lineare Fragmente wandern schneller als offene oder geschlossene, ringförmige Strukturen.

Für die Elektrophorese wurden 1 %ige Agarosegele verwendet, bestehend aus 1 g Agarose, 100 ml TAE-Puffer und 2,5 µl GelRED Farbstoff. Die Agarose wurde hierzu im TAE-Puffer in einer Mikrowelle bis zum Kochen erhitzt. Nachdem die Agarose gelöst war, wurde nach kurzem Abkühlen der Farbstoff zugefügt und alles in einen Gelschlitten gegeben. Die Taschen zum Laden der Proben wurden mit Hilfe eines Gelkamms hergestellt. Je nachdem ob es sich um ein analytisches oder präparatives Gel handelte, wurde aus verschiedenen Taschengrößen ausgewählt. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde es mit dem Gelschlitten in die Gelapparatur gegeben und mit TAE-Puffer überschichtet. Beladen wurde das Gel entweder mit 12 µl (10 µl Probe + 2 µl 6x-Probenpuffer mit oder ohne Xylencyanol oder Bromphenolblau) zu analysierender Probe oder mit 48 µl (40 µl Probe + 8 µl 6x-Probenpuffer mit oder ohne Xylencyanol oder Bromphenolblau) einer präparativen Probe. Welcher Probenpuffer verwendet wurde, war abhängig von der erwarteten Fragmentgröße, da Xylencyanol Signale bei 3000 kb überlagert, während Bromphenolblau die Detektion 500 kb großer Fragmente behindert.

Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer Spannung von 120 V über eine Stunde. Anschließend wurden die aufgetrennten Fragmente an einem UV-Tisch sichtbar gemacht. Dies ist möglich, da der verwendete Farbstoff GelRED in die DNA interkaliert und sein Absorptionsspektrum, welches bei einer Wellenlänge von etwa 300 nm liegt, verändert wird. Während analytische Proben nur dokumentiert wurden, wurden präparative Proben an einem UV-Tisch aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mit dem *QiaQuick Gel Extraction*

(250) Kit aus dem Gel gereinigt. Der gereinigte, enzymatisch geschnittene Vektor sowie das gereinigte und geschnittene Insert wurden zu einem neuen Plasmid ligiert.

### 3.2.15. Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

<b>Puffer 1</b>	30 mM KOAc
	100 mM CaCl <sub>2</sub>
	50 mM MnCl <sub>2</sub>
	15 % (v/v) Glycerin

in 800 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> lösen, mit Essigsäure pH 5,8 einstellen, sterilfiltrieren.

<b>Puffer 2</b>	10 mM MOPS
	75 mM CaCl <sub>2</sub>
	10 mM RbCl <sub>2</sub>
	15 % (v/v) Glycerin

in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> lösen, mit verdünnter KOH pH 6,5 einstellen, sterilfiltrieren.

Bakterien können durch verschiedene Behandlungen kompetent gemacht und somit verwendet werden, um fremde Plasmid-DNA aufzunehmen und zu vervielfältigen oder aber auch um über diese Plasmid-kodierte Proteine zu synthetisieren.

Das Protokoll, mit welchem die Zellen in dieser Arbeit kompetent gemacht wurden, ist eine modifizierte Version nach Hanahan (Hanahan, 1983). Hierbei wurde eine *E. coli*-Kolonie des Stamms JM101 von einer LB-Agarplatte in 10 ml LB-Medium überführt und bei 37°C über Nacht rollend wachsen gelassen. 2 ml dieser Kultur wurden am Folgetag in 200 ml LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,7 bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Die Kultur wurde in einen vorgekühlten Zentrifugenbecher überführt und für 5 min auf Eis inkubiert, bevor die Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 6370 x g auf 4°C gekühlt geerntet wurden. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 80 ml kaltem Puffer 1 resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 8 ml Puffer 2 aufgenommen, resuspendiert und anschließend in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen bei -80°C aufbewahrt und bei Bedarf aufgetaut.

Für die Transformation wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 100 µl dieser Zellen wurden dann mit 5 µl Ligationsansatz oder 1 µl Plasmid für 45 min auf Eis inkubiert, wodurch sich die DNA an die Zellwand anlagern konnte. Mit Hilfe eines 90-sekündigen Hitzeschocks bei 42°C wurde die Permeabilität der Zellwand erhöht, was eine bessere Aufnahme der DNA zur Folge hatte. Abgestoppt wurde der Hitzeschock durch eine kurze Inkubation auf Eis. Zur Regeneration wurden die Zellen mit 500 µl LB-Medium versetzt

und für 45 min rollend bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Gewachsene Kolonien wurden dann wie in 3.2.4 erklärt zur Gewinnung der Plasmid-DNA behandelt.

### 3.2.16. Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA

#### 40 % PEG/LiOAc

80 g PEG (Polyethylenglycol 3300)

0,1 M LiOAc

10 mM Tris pH 7,5

1 mM EDTA pH 7,5

In 200 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, sterilfiltrieren.

#### 0,1 M LiOAc; TE pH 7,5

0,1 M LiOAc

10 mM Tris pH 7,5

1 mM EDTA pH 7,5

In 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, sterilfiltrieren.

Zur Transformation von Hefezellen wurde die LiOAc/Einzelstrang-Träger-DNA/PEG-Methode verwendet. Bei dieser Methode wird die Effizienz der Transformation gesteigert, indem neben dem Plasmid oder einem DNA-Abschnitt auch einzelsträngige DNA zugegeben wird, welche als Träger die Aufnahme des Plasmids vereinfacht (Xiao, 2006).

### 3.2.17. Herstellen kompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde der zu transformierende Stamm auf YPD<sub>ade</sub> oder Selektivplatten ausgestrichen und über Nacht je nach Stamm bei 25°C oder 30°C kultiviert. Anschließend wurde entsprechendes Medium mit den Zellen angeimpft und ebenfalls über Nacht bei 25°C oder 30°C schüttelnd kultiviert. Zum Ernten der Zellen sollte die OD<sub>600</sub> bei etwa 0,5-1 liegen. Zu dicht gewachsene Kulturen wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3-0,4 verdünnt und für weitere 2 h wachsen gelassen, sodass sich die Zellen verdoppeln konnten. Pro Transformationsansatz wurden 5 ml der Zellkultur benötigt. Je nach Anzahl der Transformationsansätze wurde ein bestimmtes Volumen der Kultur in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (1535 x g/ 5 min/ 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in der Hälfte des Ursprungsvolumens an 0,1 M LiOAc/ TE pH 7,5 aufgenommen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt, bevor das Pellet in 1/100 Volumen der geernteten Kultur an 0,1 M LiOAc/ TE pH 7,5 aufgenommen und entweder direkt verwendet oder für bis zu einer Woche bei 4°C gelagert wurde.

### 3.2.18. Transformation

#### Lachssperma DNA 10 µg/µl

300 mg Lachssperma DNA

30 ml TE-Puffer pH 8,0

Die Lachssperma DNA wurde in 30 ml TE-Puffer pH 8,0 über Nacht bei 4°C unter Rühren gelöst. Mittels Ultraschall wurde die gelöste DNA für 50 sec bei einer Amplitude von 50 % fragmentiert. Anschließend wurde sie aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Zur Transformation wurden zunächst 2,5 µl Lachssperma-DNA, welche als Träger diente, bei 95°C in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß denaturiert. Die einzelsträngige DNA wurde sofort für 1 min auf Eis inkubiert, um zu verhindern, dass die Einzelstränge sich wieder aneinander anlagern. Anschließend wurden 1 µl Plasmid oder 10 µl PCR-Produkt zugegeben, welche sich an die Träger-DNA anlagerten. Nachdem auch 50 µl kompetente Zellen sowie 350 µl 40 % PEG3300/ 0,1 M LiOAc/ TE pH 7,5 zugegeben und gut gemischt wurde, folgte eine Inkubation für 30 min bei 30°C auf dem Roller. Vor dem 15-minütigen Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C wurden 35 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben und gut gemischt. Bei hitze-sensitiven Stämmen wurde der Hitzeschock auf 5 min verkürzt. Durch einen Zentrifugationsschritt (3385 x g/ 3 min/ RT) wurden die Zellen sedimentiert, bevor sie zur Regeneration in 500 µl YPD<sub>ade</sub> aufgenommen und für 45-60 min bei 30°C rollend inkubiert wurden. Um das Medium bestmöglich zu entfernen, erfolgte ein Waschschrift mit 500 µl TE-Puffer pH 7,5, bevor das Zellpellet in 50 µl TE-Puffer pH 7,5 aufgenommen und auf den jeweiligen Selektionsplatten ausplattiert wurde. Nach Inkubation für etwa 48 h bei 30°C waren einzelne Kolonien sichtbar, welche anschließend auf neuen Selektivplatten ausgestrichen und auf erfolgreiche Transformation getestet wurden.

### 3.2.19. Hefegenomische Methoden

#### 3.2.20. Integration genomischer Modifikationen in *S. cerevisiae*

Als Modellorganismus bietet *S. cerevisiae* viele Vorteile. So ist es möglich, schnell und einfach genomische Modifikationen in Hefen einzubringen und auf diese Weise bestimmte Phänotypen leichter zu analysieren. Außerdem lassen sich auf diese Weise modifizierte Gene in genomisch üblichen Mengen exprimieren, während mit Plasmiden nur zwischen einer hohen oder niedrigen Expressionsrate gewählt werden kann.

Genetische Modifikationen wurden in das Hefegenom über Genkassetten eingebracht. Auf diese Weise können Gene deletiert oder aber auch integriert werden, sowie Fusionsproteine durch Einbringen eines N- oder C-terminalen tags gebildet oder einzelne oder mehrfache Aminosäuremutationen eingefügt werden.

Eingebracht wurden die genomischen Modifikationen nach dem Protokoll von Longtine *et al.* (1998) über homologe Rekombination komplementärer Sequenzen der genomischen DNA und des zu integrierenden Fragments. Verwendet wurden hierzu modulare Plasmide, welche neben der gewünschten Modifikation noch einen Selektionsmarker enthalten, welcher sich nicht selbst mit dem Hefegenom rekombinieren kann.

Nachdem ein geeignetes Plasmid ausgewählt wurde, wurde eine PCR durchgeführt, um die Integrationskassette zu amplifizieren. Verwendet wurden hierzu zwei Oligonukleotide, welche einerseits komplementär zur Plasmid-DNA sind und somit die Amplifikation des Fragments ermöglichen und andererseits komplementär zum 5'-Ende des ORFs sind und somit die homologe Rekombination des PCR-Produkts und der genomischen DNA ermöglichen.

Ein kleines Volumen des amplifizierten Fragments wurde anschließend auf einem Agarosegel sichtbar gemacht und auf die richtige Größe überprüft, bevor das gesamte PCR-Produkt gereinigt wurde. Anschließend wurden 10 µl des gereinigten PCR-Produkts verwendet, um kompetente Hefezellen zu transformieren.

Eine weitere Möglichkeit, Hefen genomisch zu modifizieren, ist die Einbringung eines Gens mit Hilfe eines Integrationsvektors. Der Integrationsvektor, welcher das zu integrierende Gen enthält, in dieser Arbeit *NUP2-UB-KR*, wurde unter Verwendung des Restriktionsenzym *Pst*I vor dem *URA3*-Marker linearisiert und in Hefezellen transformiert, da es an der *Pst*I-Schnittstelle integriert werden sollte. Bei den verwendeten Hefezellen handelte es sich um einen  $\Delta nup2$ -Stamm (GSY432), bei welchem bei der Deletion von *NUP2* neben dem Selektionsmarker *HIS3* auch eine Mutation (*ura3-1*) eingebaut wurde. Diese Mutation wurde durch Integration des Plasmids über homologe Rekombination an der *Pst*I-Schnittstelle beseitigt, weshalb über *URA3* selektiert werden konnte. Zur Transformation wurden auch in diesem Fall 10 µl des Integrationsplasmids verwendet.

Zum Überprüfen einer erfolgreichen Integration oder Deletion wurde genomische DNA hergestellt, welche als Vorlage bei der PCR-Analyse diente. Außerdem wurden TCA-Proben hergestellt, um auch auf Proteinebene mittels SDS-Gelelektrophorese und Westernblot die erfolgreiche Deletion oder Integration sowie Synthese zu überprüfen.

In dieser Arbeit wurde in einen  $\Delta nup2$ -Stamm eine *NUP2*-Version mit Punktmutation eingebracht und es wurden Stämme generiert, welche Nup2 bzw. Nup2-2xKR mit TAP-tag synthetisieren.

### **3.3. Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.3.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

**AMPS (Ammoniumpersulfat)**

10 % AMPS

In H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen.

**SDS-Laufpuffer 5x**

125 mM Tris  
 960 mM Glycin  
 17 mM SDS

In H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen.

**SDS-Probenpuffer 2x**

125 mM Tris pH 6,8  
 140 mM SDS  
 40 mM Bromphenolblau  
 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol

In H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen.

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Hierbei passieren die Proteine erst ein neutrales Sammelgel, bevor sie in einem basischen, höher konzentrierten Gel ihrer Größe bzw. ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt werden. Während das Sammelgel für alle Gele einheitlich hergestellt wurde, wurde die Porengröße des Trenngels je nach Konzentration der Komponenten Wasser und Acrylamid variiert (Tabelle 17). Die Polymerisation wurde durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (AMPS) aktiviert und durch Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert. Beide Komponenten kamen erst ganz am Schluss dazu, kurz bevor die Lösung in die Gießapparatur gegossen wurde. Um ein Austrocknen während der Polymerisation zu verhindern und um ein gerades Gel zu erhalten, wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das restliche Isopropanol abgenommen und das Sammelgel auf das Trenngel gegeben. Je nach Anzahl der Proben, welche auf dem Gel aufgetrennt werden sollten, wurde entweder ein 10er oder 15er Kamm benutzt, um Taschen im Sammelgel zu erzeugen. Das fertige Gel wurde dann wie vom Hersteller angegeben in die Kammer gespannt, welche mit Laufpuffer aufgefüllt wurde.

Tabelle 17: Pipettierschema für Sammel- und Trenngel

Komponenten	Trenngel				Sammelgel
	8 %	11 %	15 %	17,5 %	
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	2,33 ml	1,82 ml	1,15 ml	1,56 ml	1,52 ml
Rotiphorese Gel 30	1,32 ml	1,83 ml	2,5 ml	5,78 ml	0,325 ml
1,5 M Tris pH 8,8	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	-
0,5 M Tris pH 6,8	-	-	-	-	0,625 ml
10 % SDS (w/v)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	25 µl
10 % AMPS (w/v)	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	12,5 µl
TEMED	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	5 µl

Proben, welche anschließend mittels Massenspektrometrie analysiert werden sollten, wurden in bereits vorgefertigte Gele der Firma Biorad einlaufen gelassen, um eine Kontamination beim Gießen zu vermeiden. Bei den verwendeten Gelen handelte es sich um 10-prozentige *Mini-PROTEAN TGX Precast Gels* mit einem 10er Kamm.

Die Proteinproben wurden für die Elektrophorese vorbereitet, indem sie in SDS-haltigem Probenpuffer bei 65°C oder 95°C für etwa 5-15 min inkubiert und somit denaturiert wurden, was zum Lösen der Proteinstruktur führte. Zudem lagern sich SDS-Ionen an die Proteine an, was zu einer negativen Ladung führt. An größere Proteine lagern sich mehr SDS-Ionen an, weshalb Ladung und Proteingröße sich proportional zueinander verhalten. Die entstandene negative Ladung macht man sich für die Elektrophorese zu Nutze, da eine elektrische Spannung angelegt wird, welche dazu führt, dass die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe zur Anode wandern.

Neben SDS enthielt der Probenpuffer meist auch Thiole wie Dithiothreitol (DTT) oder  $\beta$ -Mercaptoethanol, welche Wechselwirkungen wie Disulfidbrücken zwischen den Proteinen unterbinden und somit die Auftrennung im Gel erleichtern. Aufgetragen wurden die Proben in die vorgefertigten Taschen mit einer Glasspritze. Zudem wurde ein Proteinstandard mit Proteinen bekannter Masse aufgetragen, welcher dazu diente, die zu analysierenden Proteinproben größenmäßig abschätzen zu können. Nachdem alle Proben aufgetragen waren, wurde für mindestens 55 min eine Spannung von 200 Volt angelegt, sodass die untere Front des Probenpuffers aus dem Gel auslaufen konnte. Proben, die besser aufgetrennt werden sollten, wurden bis zu 80 min aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend aus der Apparatur genommen und die aufgetrennten Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau visualisiert (3.3.3) oder aber auch auf eine Membran transferiert und anschließend mit einem spezifischen Antikörper detektiert. (3.3.5 und 3.3.6).

### 3.3.2. Visuelle Darstellung von Proteinen im Polyacrylamid-Gel

#### 3.3.3. Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau

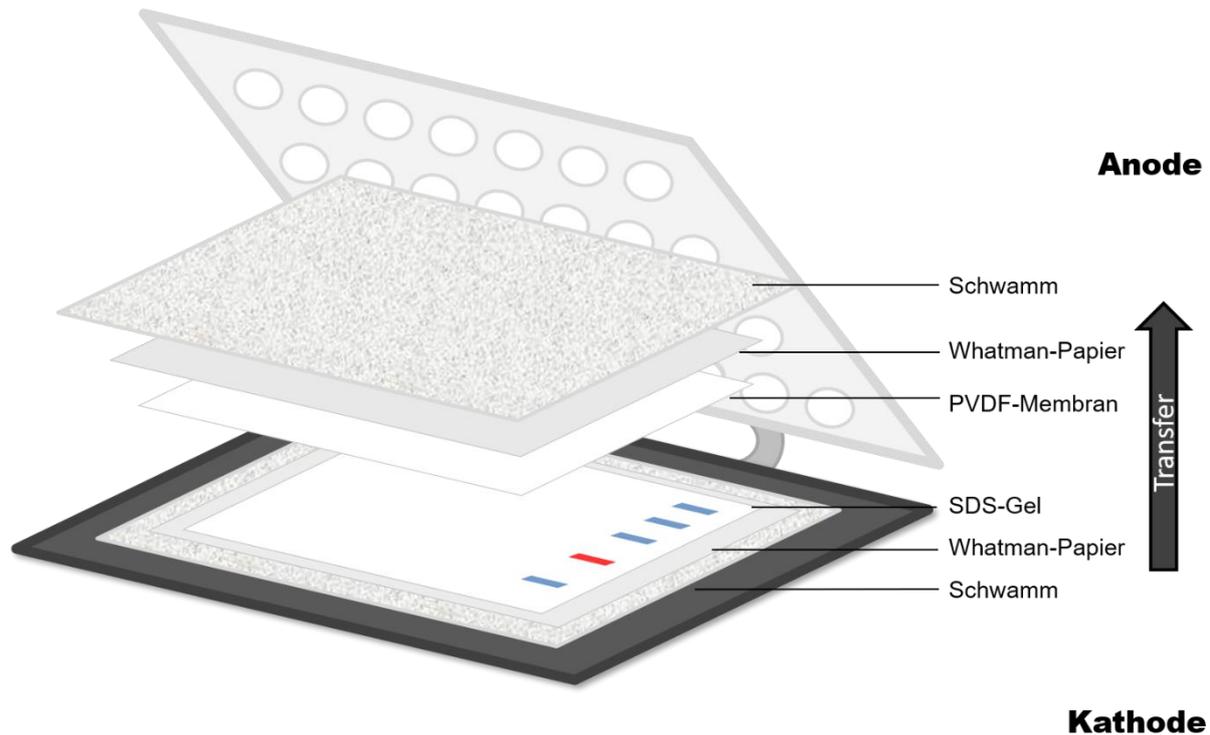
<b>Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung</b>	0,2 % Coomassie R-250
	0,005 % Coomassie G-250
	50 % Methanol
	10 % Eisessig

Das Coomassie mit dem Methanol für 30 min rühren, anschließend den Eisessig sowie  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  dazugeben, rühren und filtrieren.





verwendet und der Transfer erfolgte bei 40 mA über Nacht, wobei die Apparatur in einem Eisbad gekühlt wurde.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung einer Transferekassette zur Übertragung von Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran.**

Die Transferekassette wurde so bepackt, dass zuerst ein Schwamm und dann ein Whatman-Papier luftblasenfrei geschichtet wurden, gefolgt von dem SDS-Gel und der mit Methanol aktivierten und mit Transferpuffer äquilibrierten PVDF-Membran. Darauf folgten eine weitere Schicht Whatman-Papier und ein Transferschwamm, welche ebenfalls von Luftblasen befreit wurden. Sowohl die Schwämme als auch die Whatman-Papiere wurden zuvor mit Transferpuffer äquilibriert. Die Kassette wurde so in die Apparatur gelegt, dass die Proteine von der Kathode in Richtung der Anode aus dem Gel auf die Membran transferiert wurden.

### 3.3.6. Immunologische Detektion und Analyse der Proteine

<b>PBS</b>	155 mM NaCl
	2,5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

In H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, pH 7,3 einstellen, sterilfiltrieren.

<b>PBST</b>	155 mM NaCl
	2,5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,25 % (v/v) Tween20

In H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, pH 7,3 einstellen, sterilfiltrieren.

<b>Blockierlösung für POD</b>	5 % (w/v) Milchpulver
-------------------------------	-----------------------

In PBS lösen.

**Blockierlösung für Cy5**

3 % (w/v) Bovines Serumalbumin (BSA)

In PBS lösen.

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese in eine Plastikschaale gelegt und für 1 h mit Blockierlösung inkubiert, welche unspezifische Bindestellen absättigt. Anschließend wurde die Membran mit dem in Blockierlösung verdünnten, primären Antikörper inkubiert. Das Milchpulver sättigt hierbei auch den Antikörper ab, sodass die Bindung des Antikörpers möglichst spezifisch an das zu detektierende Protein erfolgt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte bei 4°C über Nacht auf einer Wippe. Nach dem Entfernen des Antikörpers erfolgte zum Beseitigen des überschüssigen Antikörpers ein Waschschriff mit PBS für 2 min, danach wurde zweimal für 5 min mit PBST gewaschen und zuletzt wieder mit PBS für 2 min. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, welcher die Epitope des primären Antikörpers erkennt, erfolgte bei Raumtemperatur für mindestens 1 h. Überschüssiger Antikörper wurde auch hier nach der gleichen Prozedur gewaschen, bevor die Membran entweder zur Detektion des Cy5-gekoppelten Antikörpers im Dunkeln getrocknet oder zur Detektion des POD-gekoppelten Antikörpers für 1 min mit ECL benetzt und anschließend die Chemilumineszenz mit Hilfe des Fusion SL Imagingsystems detektiert wurde. Die Chemilumineszenz kommt hierbei durch eine chemische Reaktion zustande, welche durch das an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzym Meerrettichperoxidase mit dem ECL erfolgt. Die Detektion des mit dem Farbstoff Cy5-gekoppelten Antikörpers erfolgte mittels fluorometrischer Messung am Typhoon.

**3.3.7. Proteinfällung mit Trichloressigsäure****Methode 1:****NaOH/  $\beta$ -Mercaptoethanol**

0,25 mM NaOH

1 % (v/v)  $\beta$ -MercaptoethanolIn 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> lösen, sterilfiltrieren.**SDS-Probenpuffer (1x)**

62,5 mM Tris pH 6,8

70 mM SDS

20 mM Bromphenolblau

5 % (v/v)  $\beta$ -MercaptoethanolIn H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> lösen, aliquotieren.

Mit Hilfe der TCA-Fällung lassen sich Proteine konzentrieren. Auf diese Weise kann beispielsweise die Synthese eines Proteins überprüft werden. Bei der Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) handelt es sich um eine denaturierende Proteinfällung. Der zu

untersuchende Hefestamm wurde in YPD<sub>ade</sub> oder entsprechendem SD-Medium über Nacht anwachsen gelassen und bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1 wurden 4 OD-Einheiten in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation (1535 x g/ 5 min/ 4°C) geerntet. Das Zellpellet wurde in 0,5 ml 0,25 M NaOH/ 1 % β-Mercaptoethanol resuspendiert, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 80 µl 50 % TCA folgte eine weitere Inkubation für 10 min auf Eis. Die TCA entzieht den Zellen das Wasser, wodurch die Löslichkeit der Proteine herabgesetzt wird. Die ausgefallenen Proteine wurden nun durch Zentrifugation (11885 x g/ 10 min/ 4°C) pelletiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet anschließend mit 0,5 ml eiskaltem Aceton gewaschen. Nachdem das Pellet auf dem Heizblock bei 37°C getrocknet war, wurde es in 95 µl 1x Probenpuffer sowie 5 µl Tris-Base aufgenommen und bei 95°C für 5 min denaturiert. Zur Analyse wurden je 10 µl der TCA-Probe auf ein SDS-Gel aufgetragen.

### **Methode 2: modifizierte Fällung für *in vivo*-SUMO-Bindeversuche**

<b>HU-Puffer</b>	8 M Harnstoff
	200 mM Tris pH 6,8
	1 mM EDTA
	5 % SDS
	0,1 % Bromphenolblau
	97 mM DTT

In H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> lösen, pH 6,8 einstellen, bei -20°C lagern.

<b>NaOH/β-Mercaptoethanol</b>	2 M NaOH
	5,7 mM β-Mercaptoethanol

In 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> mischen.

Für TCA-Proben, welche bei den *in vivo*-SUMOylierungsversuchen benötigt wurden, wurden 2 OD-Einheiten der Zellen bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1 geerntet (1535 x g/ 5 min/ 4°C). Diese wurden in 500 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und es wurden 75 µl 2 M NaOH/ 1 % β-Mercaptoethanol zugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden 75 µl 55 % TCA zugegeben und ein weiteres Mal für 10 min auf Eis inkubiert. Die Proteine wurden durch Zentrifugation (11885 x g/ 10 min/ 4°C) pelletiert, in 30 µl HU-Probenpuffer aufgenommen und bei 60°C für 15 min erhitzt. Je nach Bedarf wurde Tris-Base zugesetzt, um die Proben zu neutralisieren, da Reste der TCA den Indikator im Probenpuffer von Blau nach Gelb umschlagen ließen und der saure pH die SDS-Gelelektrophorese stört.



in 2 ml Kopplungspuffer gelöst (Endkonzentration 50 mM) und die Säulenmatrix für 15 min unter Schütteln damit inkubiert. Nachdem sich das Säulenmaterial abgesetzt hatte, wurde viermal mit 4 ml Waschpuffer gewaschen und eine Fritte auf die Matrix gesetzt. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 10 ml 0,1 M Glycin pH 2,2 sowie 20 ml PBS. Während die Säule gewaschen wurde, wurde das Serum bereits vorbereitet. Hierzu wurde das Serum aufgetaut und 5 mM EDTA dazugegeben, bevor es für 30 min bei 1300 x g zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in ein 50 ml-Reaktionsröhrchen überführt. Die Bindung des Antikörpers erfolgte über Nacht mit Hilfe einer Pumpe, welche das Serum mit einer Flussrate von 5-10 ml/h immer wieder über die Säule laufen ließ. Hierzu wurde ein Ende eines Schlauchs, welcher an die Pumpe angeschlossen war, in das 50 ml-Reaktionsgefäß mit Serum getaucht und das andere Ende wurde in die Säule gegeben. Das 50 ml-Reaktionsgefäß wiederum wurde unter der Säule platziert, sodass ein geschlossenes System entstand. Am Folgetag wurde der Schlauch aus dem Serum genommen und mit 2 ml PBS nachgespült, um den Kreislauf zu unterbrechen. Das Serum im Durchfluss wurde aufbewahrt und die Matrix mit dem gekoppelten Antikörper gewaschen. Ein erster Waschschrift erfolgte mit 10 ml PBS, anschließend wurde in 5 ml Schritten so lange 50 mM Tris, 500 mM NaCl pH 7,5 auf die Säule gegeben, bis der Durchfluss eine Proteinkonzentration von unter 0,01 mg/ml hatte. Danach wurde nochmals mit 10 ml PBS gewaschen. Die Elution des gebundenen Antikörpers erfolgte über den sauren pH-Wert des 0,1 M Glycins pH 2,2. Wichtig war hierbei, dass vor Zugabe des Glycins auf die Säule zum Neutralisieren 365 µl 1,5 M Tris pH 8,8 in das Auffanggefäß vorgelegt wurden. Der Antikörper wurde durch das leicht basische Tris sofort neutralisiert, da der saure pH-Wert ihn schädigen würde. Unter Rühren wurde in 5 ml Schritten so lange Glycin auf die Säule gegeben, bis die Proteinkonzentration unter 0,03 mg/ml lag. Der gewonnene Antikörper wurde anschließend über eine *Zeba*-Säule von Tris/Glycin in PBS umgepuffert und aliquotiert bei -20°C gelagert. Zuvor wurde jedoch die Effizienz der Reinigung getestet, indem sowohl das Nup2-Protein in Hefe als auch das in *E. coli* synthetisierte Protein mit dem Serum, dem Durchlauf und dem affinitätsgereinigten Antikörper als primären Antikörper nach SDS-PAGE und Westernblot immunologisch detektiert wurden.

### **3.3.9. Reinigung von rekombinanten Fusionsproteinen aus *E. coli***

Proteine aus anderen Organismen können in *E. coli* als Fusionsproteine rekombinant synthetisiert und anschließend gereinigt werden. In dieser Arbeit wurden Proteine aus *S. cerevisiae* rekombinant hergestellt. Hierzu muss die DNA des zu untersuchenden Plasmids in einen Expressionsvektor für *E. coli* integriert werden. Nicht jedes Protein wird in jedem *E. coli* Stamm gleich effizient synthetisiert, weshalb je nach Protein zum Teil unterschiedliche Stämme verwendet wurden. Kontrolliert wird die Synthese über Proben, welche vor und nach der Induktion sowie nach der Reinigung gezogen und über Coomassie-Brilliant-Blau Färbung

analysiert werden. Die rekombinant hergestellten Proteine wurden auch für die *in vitro*-SUMOylierung verwendet.

### Rekombinante Proteinsynthese in *E. coli*

Zur Proteinsynthese wurden *E. coli*-Zellen mit dem jeweiligen Plasmid transformiert und unter den für den ausgewählten Stamm bzw. das jeweilige Protein optimalen Synthesebedingungen kultiviert. Im Folgenden ist eine Standardprozedur beschrieben, wobei *E. coli*-Stamm, Temperatur und Induktionszeit je nach Protein variieren können.

*E. coli*-Zellen des Stammes BL21 wurden, wie in 3.2.15 beschrieben, transformiert und in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37°C kultiviert, bevor sie am Folgetag in einer Hauptkultur mit dem gleichen Antibiotikum in LB- oder 2YT-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 verdünnt wurden. Die Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 inkubiert. Bevor die Induktion über Zugabe von 0,3 mM Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) erfolgte, welches die Repression des lac-Promotors im Plasmid aufhebt und zur Proteinsynthese führt, wurde eine Probe entnommen, um die erfolgreiche Induktion anhand dieser Vorinduktionsprobe zu belegen. Nach der 3-stündigen Induktion bei 15°C wurde eine weitere Probe entnommen, um die induzierte Synthese nachzuweisen, und die Zellen im Anschluss durch Zentrifugation (8983 x g/ 10 min/ 4°C) geerntet. Je nachdem ob es sich um 6His- oder GST- Fusionsproteine handelte, wurde zwischen zwei Reinigungsbedingungen gewählt .

### Lyse und Reinigung von 6His-Fusionsproteinen aus *E. coli*-Lysat

**DTT (1 M)** 3,08 g DTT

in 20 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> lösen, sterilfiltrieren, aliquotieren, bei -20°C lagern.

**PLAC**

- 12 mg Pepstatin
- 12 mg Leupeptin
- 12 mg Antipain
- 12 mg Chymostatin

einzelne Komponenten in je 1 ml DMSO lösen, vereinigen und aliquotieren, bei -20°C lagern.

**6His-Lysepuffer**

- 50 mM Tris
- 200 mM NaCl
- 10 mM Imidazol
- 1 mM β-Mercaptoethanol

in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, pH 8,0 einstellen, sterilfiltrieren.

<b>6His-Waschpuffer</b>	50 mM Tris
	300 mM NaCl
	20 mM Imidazol
	1 mM $\beta$ -Mercaptoethanol

in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  lösen, pH 8,0 einstellen, sterilfiltrieren.

<b>6His-Elutionspuffer</b>	50 mM Tris
	300 mM NaCl
	250 mM Imidazol
	1 mM $\beta$ -Mercaptoethanol

in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  lösen, pH 8,0 einstellen, sterilfiltrieren.

Das Zellpellet wurde in 20 ml 6His-Lysepuffer aufgenommen und 10  $\mu\text{l}$  1 DTT sowie 20  $\mu\text{l}$  PLAC hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen für mindestens 10 min in flüssigem Stickstoff gelagert, schnell aufgetaut und dann für weitere 10 min auf Eis inkubiert, bevor durch einen Zentrifugationsschritt (18396 x g/ 30 min/ 4°C) die unlöslichen Zellbestandteile abzentrifugiert wurden. Die Bindung von 6His-Fusionsproteinen erfolgte an Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Agarose, welche zuvor durch dreimaliges Waschen mit 6His-Lysepuffer äquilibriert wurde. Das Gesamtzelllysat nach der Lyse wurde mit der Ni-NTA-Agarose für 1 h bei 4°C rollend inkubiert, bevor es in eine Chromatographie-Säule gegeben wurde. Der Durchlauf wurde aufgefangen und die Ni-NTA-Agarose mit dem gebundenen Protein mit Hilfe einer Fritte luftblasenfrei verschlossen. Nichtgebundene Proteine wurden durch Zugabe von Waschpuffer entfernt, wobei der Proteingehalt der Waschfraktionen mit dem Nanodrop gemessen wurde. Nachdem die Absorption  $A_{280}$  des Durchflusses unter 0,1 lag, konnte davon ausgegangen werden, dass nur noch spezifisch gebundene Proteine vorliegen und es erfolgten 8-10 Elutionsschritte mit je 1 ml Elutionspuffer. Die einzelnen Fraktionen wurden separat aufgefangen und einzeln mit dem Nanodrop gemessen. Die Fraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen wurden vereinigt und über Gelfiltration in TEF-Puffer umgepuffert, um die Proteine für *in vitro*-SUMOylierungsversuche zu verwenden.

### **Lyse und Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus *E. coli*-Lysat**

<b>GSH-Elutionspuffer</b>	50 mM Tris-HCl pH 8
	10 mM Glutathion

in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  lösen

<b>PBSKMT</b>	155 mM NaCl
	3 mM KCl
	1 mM MgCl <sub>2</sub>
	2,5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,1 % (v/v) Tween 20

in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, pH 7,3 einstellen, sterilfiltrieren.

Die Lyse der *E. coli*-Zellen erfolgte nach dem gleichen Verfahren wie auch bei den 6His-Proteinen, wobei das Zellpellet nach dem Ernten in 20 ml PBSKMT resuspendiert, mit 20 µl 1 M DTT und 20 µl PLAC versetzt und die Zellen über schnelles Einfrieren und Auftauen lysiert wurden. Die Bindung von GST-Fusionsproteinen erfolgte an 2 ml GSH-Sepharose, welche zuvor dreimal mit PBSKMT gewaschen wurde. Die Inkubation des Gesamtzelllysats nach der Lyse mit der GSH-Sepharose erfolgte für 1 h bei 4°C. Das Lysat-Sepharose-Gemisch wurde auf eine Chromatographie-Säule gegeben, der Durchlauf aufgefangen und das Säulenmaterial mit einer Fritte abgedichtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Gewaschen wurde die Säule mit PBSKMT und die Waschfraktionen wurden aufgefangen, um den Proteingehalt zu bestimmen. Bei einer Absorption A<sub>280</sub> unter 0,1 erfolgte die Elution mit je 1 ml GSH-Elutionspuffer. Die 8-10 einzelnen Fraktionen wurden aufgefangen, gemessen und die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration vereint, bevor sie umgepuffert wurden.

### **Umpuffern gereinigter Proteine mittels Gelfiltration**

Die *in vitro*-SUMOylierung erfolgt in TEFP-Puffer, weshalb auch die SUMOylierungskomponenten in TEFP-Puffer umgepuffert wurden. Das Umpuffern der Proteine erfolgte über ZEBU-Gelfiltrationssäulen, welche zuerst durch Zentrifugation (1000 x g/ 2 min/ 4°C) vom Alkohol befreit und durch Waschen mit TEFP-Puffer äquilibriert wurden. Anschließend wurden die Proteine in der Säule unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert, wobei Proteine mit ihrer größeren Molekülgröße schneller durch die Gelmatrix wandern als die Ionen und Salze des Puffers, welche in der Matrix verbleiben. Somit können die Proteine von dem alten Puffer getrennt und in dem gewünschten Puffer aufgenommen werden. Die Konzentration wurde am Nanodrop gemessen, bevor die Proteine aliquotiert und bei -80°C gelagert wurden.

### 3.4. Analyse posttranslationaler Proteinmodifikationen sowie von Protein-Protein-Interaktionen

#### 3.4.1. *In vitro*-SUMOylierung

<b>5x TEFP-Puffer</b>	500 mM NaCl
	250 mM Bis-Tris pH 6,5
	50 mM MgCl <sub>2</sub>

In H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, auf pH 6,5 einstellen, sterilfiltrieren.

<b>ATP-Stammlösung</b>	50 mM ATP
------------------------	-----------

In TEFP-Puffer lösen, pH 6,5 einstellen, lagern (-20°C).

<b>3x SDS-Probenpuffer</b>	188 mM Tris
	210 mM SDS
	60 mM Bromphenolblau
	30 % (v/v) Glycerin

In H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen.

Anhand der *in vitro*-SUMOylierung lässt sich unter optimierten Bedingungen überprüfen, ob Proteine SUMOyliert werden können. Hierzu werden in einem geschlossenen System alle für die SUMOylierung benötigten Komponenten in ausreichender Menge bereitgestellt. Anhand der *in vitro*-Analysen lassen sich aber lediglich Aussagen darüber treffen, ob ein Protein potentiell SUMOyliert werden kann. In einem lebenden Organismus können aufgrund ungünstigerer Bedingungen Proteine, welche zwar *in vitro* SUMOyliert werden, *in vivo* nicht SUMOyliert werden. Dennoch stellt die *in vitro*-SUMOylierung eine effektive Methode zum Nachweis potentieller SUMOylierung sowie zur Detektion putativer SUMOylierungsstellen dar. Der Standardansatz bei einer *in vitro*-SUMOylierung enthielt neben dem zu SUMOylierenden Substrat (100 ng/μl) das SUMO-Protein Smt3 (250 ng/μl) sowie die zum Ablauf der SUMOylierung notwendigen Enzyme E1 (SUMO-Aktivierungsenzym) Aos1-Uba2 (66 ng/μl), das E2-Enzym (SUMO-Konjugase) Ubc9 (25 ng/μl) und gegebenenfalls das E3-Enzym (SUMO-Ligase) Nfi1 bzw. Siz1 (100 ng/μl). Da es sich um eine Reaktion handelt, welche Energie in Form von ATP benötigt, wurden auch 5 mM ATP hinzugegeben. Die Reaktion erfolgte in TEFP-Puffer, welcher 1 mM DTT als Reduktionsmittel enthält. Zur Optimierung der Reaktion konnte auch Tris pH 8,8 zugegeben werden, sodass der pH-Wert auf 8 erhöht wurde, oder aber auch Kombinationen verschiedener Bedingungen mit E3 und pH-Erhöhung etc. durchgeführt werden. Die Inkubation der Ansätze erfolgte standardmäßig für 90 min bei 30°C, wurde jedoch für eine Kinetik verkürzt, um zu analysieren, wie schnell die Reaktion erfolgt.

Durch Zugabe von 3x SDS-Probenpuffer und 0,1 M DTT wurde die Reaktion abgestoppt. Nach 20-minütigem Erhitzen bei 60°C wurden die Proben über SDS-PAGE aufgetrennt (Rothenbusch *et al.*, 2012).

### 3.4.2. Reinigung und Analyse SUMOylierter Proteine *in vivo*

Mit Hilfe des denaturierenden Ni-NTA-Bindeversuchs lässt sich die *in vivo*-SUMOylierung einzelner Zielproteine analysieren. Um SUMOylierte Proteine über Ni-NTA reinigen zu können, wurde der zu untersuchende Hefestamm mit einem über *CUP1*-Promotor kupferinduzierbaren *6HIS-SMT3*- oder *7HIS-SMT3*-Überexpressionsplasmid transformiert. Als Negativkontrolle wurden der nicht transformierte Ausgangsstamm sowie der nur mit *UBC9* transformierte Ausgangsstamm mitgeführt. Zudem wurde der Ausgangsstamm noch mit *6HIS-SMT3*- oder *7HIS-SMT3*- bzw. *6HIS-SMT3*- und *UBC9*-Plasmiden gleichzeitig transformiert, da in Anwesenheit der E2-Ligase die SUMOylierung in manchen Stämmen effizienter war.

### 3.4.3. Kultivieren und Ernten der Zellen

Zur Herstellung der Zellpellets wurden 25 ml Kulturen mit den jeweiligen transformierten Stämmen angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln wachsen gelassen. Verwendet wurde hier das jeweilige Selektivmedium und es wurden 100 µM CuSO<sub>4</sub> zur Induktion der Synthese von *7HIS-SMT3* bzw. *6HIS-SMT3* dazugegeben. Die Kultur wurde am Folgetag in ein größeres Volumen (200-400 ml) des jeweiligen Selektivmediums mit CuSO<sub>4</sub> auf eine OD<sub>600</sub> von 0,4 verdünnt und anschließend weiter kultiviert. In der logarithmischen Wachstumsphase bei OD<sub>600</sub> 0,8-1 wurden pro Pellet 50 OD-Einheiten sowie ein TCA-Pellet von 2 OD-Einheiten zur Überprüfung der Synthese geerntet. Die 50 OD-Einheiten wurden in 400 ml Zentrifugenbecher (4226 x g/ 15 min/ 4°C) zentrifugiert, das Pellet anschließend mit kaltem H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gewaschen und in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (1300 x g/ 5 min/ 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefrostet, bevor es bei -80°C gelagert wurde. Das TCA-Pellet wurde bei -20°C eingefroren. Während der gesamten Ernteprozedur war es wichtig, die Zellen kalt zu halten, um die Aktivität der DeSUMOylierungsenzyme so weit wie möglich zu verlangsamen.

### 3.4.4. Zellyse

<b>Lysepuffer</b>	8 M Harnstoff
	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	10 mM Tris

In 50 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, pH 8 einstellen und sterilfiltrieren.

**Vor Verwendung:**

- + 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol
- + *N*-Ethylmaleinimid (Endkonz. 2,5  $\mu$ g/ml)
- + Protease-Inhibitoren (PLAC, 200  $\mu$ g/ml)

Um die Zellyse unter denaturierenden Bedingungen durchzuführen, wurde das Pellet in 1 ml kaltem Lysepuffer aufgetaut und in ein 2 ml-Schraubdeckelreaktionsgefäß überführt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mechanisch über Scherkräfte, weshalb noch 250  $\mu$ l Glaskügelchen hinzugegeben wurden. Der Zellaufschluss wurde im Precellys24 bei 6500 Upm für 30 Sekunden durchgeführt, wobei dieser Vorgang zehnmal wiederholt wurde. Zwischen jedem Lyseschritt wurden die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert, um den Abbau von Proteinen zu verhindern. Die solubilisierten Proteine, welche für den weiteren Versuch benötigt wurden, wurden von den restlichen Zellbestandteilen getrennt, indem das Lysat ohne die Glaskügelchen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert wurde (19314 x g/ 20 min/ 4°C). Um die Lyseeffizienz besser beurteilen zu können, wurden 25  $\mu$ l vom Überstand entnommen und mit 25  $\mu$ l HU-Probenpuffer versetzt. Das Pellet wurde in 1 ml Lysepuffer gelöst, es wurde ebenfalls eine Probe von 25  $\mu$ l entnommen und nach Zugabe von 25  $\mu$ l HU-Probenpuffer für 15 min bei 60°C erhitzt, was zum Denaturieren der Proben führte.

### 3.4.5. Reinigung modifizierter Proteine über Ni-NTA-Agarose

**Waschpuffer**

- 8 M Harnstoff
- 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 10 mM Tris

In 50 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, pH 6,4 einstellen und sterilfiltrieren.

**Vor Verwendung:**

- + 3,5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol
- + 0,1 % Triton X-100

**HU-Puffer:**

- 8 M Harnstoff
- 200 mM Tris-HCl
- 1 mM EDTA
- 5 % SDS
- 0,1 % Bromphenolblau
- 97 mM DTT

In H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, pH 6,8 einstellen und aliquotieren.

Pro Zellysat wurden 30  $\mu$ l der Ni-NTA-Agarose-Suspension mit Lysepuffer äquilibriert, bevor der Überstand zugefügt wurde. Die Bindung der SUMOylierten Proteine an die Nickelmatrix

erfolgte bei 4°C über Nacht auf einem Rotator. Die Bindungseffizienz wurde getestet, indem am Folgetag 25 µl des Überstands (DF) nach der Bindung entnommen, in HU-Probenpuffer aufgenommen und denaturiert wurden. Der restliche Überstand wurde verworfen und die Nickel-Agarose dreimal mit 1 ml kaltem Waschpuffer gewaschen, bevor die gebundenen Proteine durch 15-minütige Inkubation bei 60°C mit 30 µl HU-Probenpuffer eluiert und denaturiert wurden. Es wurden je 15 µl der Eluatproben und je 10 µl der Lysekontrollen auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend per Westernblot analysiert.

### 3.4.6. Tandemaffinitätsreinigung (TAP)

<b>TAP-Puffer</b>	50 mM Tris pH 7,5
	50-150 mM NaCl
	1,5 mM mgCl <sub>2</sub>
	1,5 % (v/v) NP40
	1 % (w/v) DDM

In H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, sterilfiltrieren, bei 4°C lagern.

<b>Elutionspuffer</b>	50 mM Tris pH 7,5
	50 mM NaCl
	5 mM EGTA

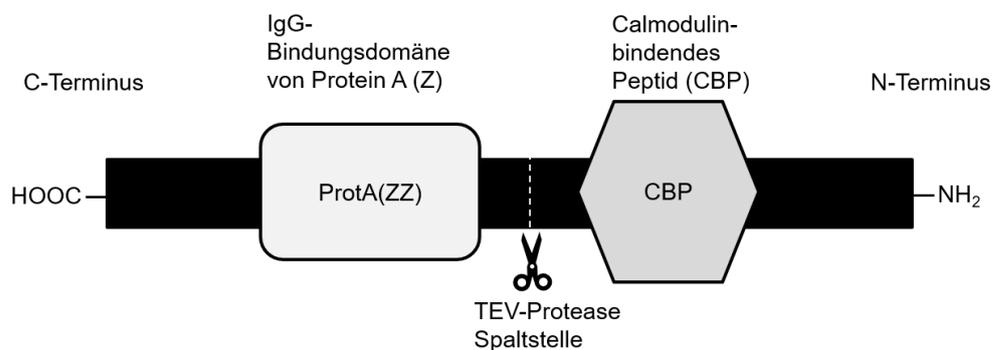
In H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, sterilfiltrieren.

<b>PMSF</b>	200 mM PMSF
-------------	-------------

In EtOH<sub>absolut</sub> lösen, bei 4°C lagern.

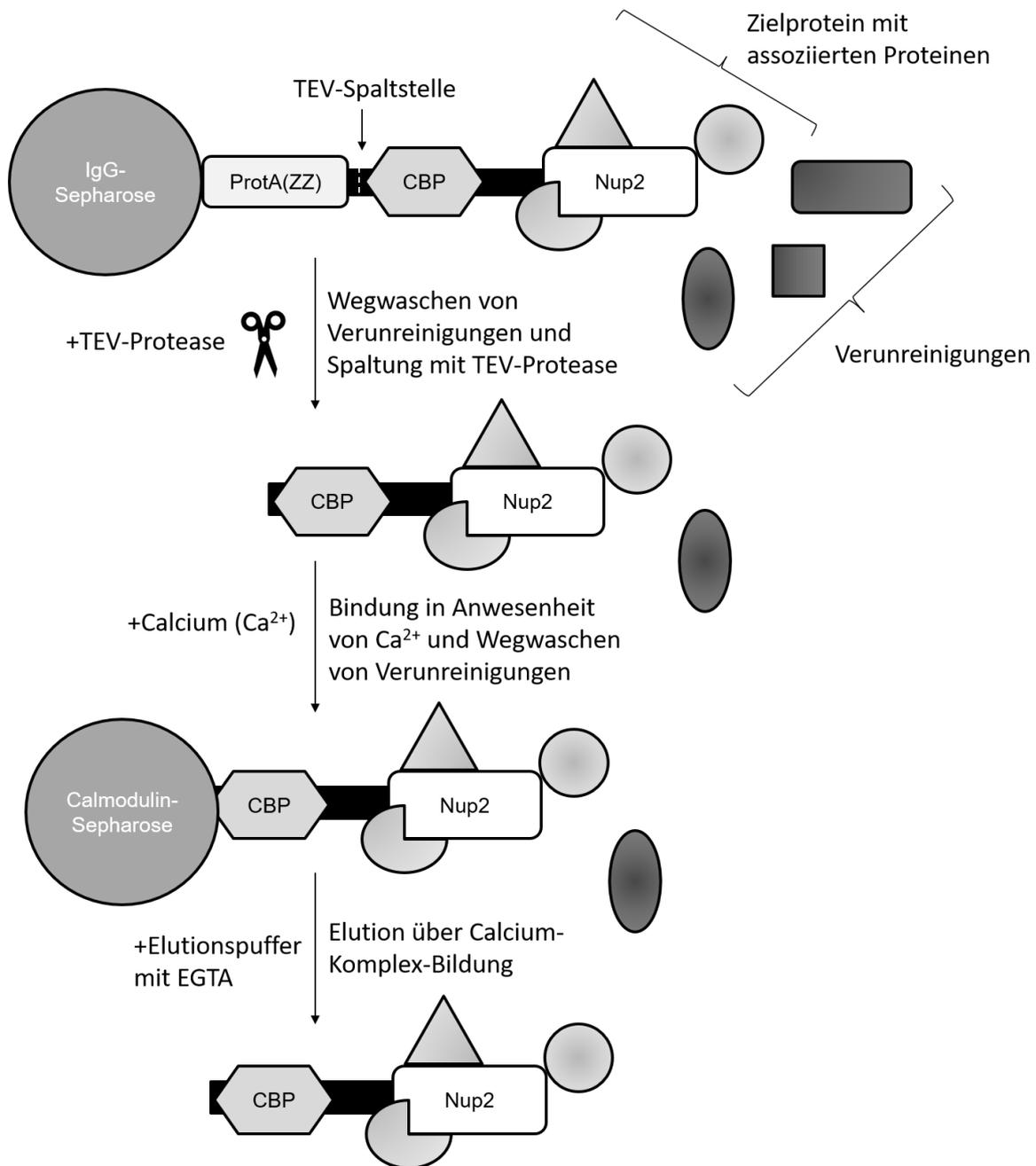
Bei der Tandemaffinitätsreinigung handelt es sich um eine Methode, bei der unter nativen Bedingungen Proteine und Proteinkomplexe aus einem Zelllysate gereinigt werden können (Rigaut *et al.*, 1999). Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die für den TAP-tag kodierende Sequenz über homologe Rekombination N- oder C-terminal an die Sequenz des Zielproteins in das Genom integriert wird. Somit wird das Zielprotein auf seinem natürlichen Syntheseelevel gehalten und die Bildung nicht-physiologischer Proteinkomplexe unterbunden. Die Reinigung des mit dem TAP-tag fusionierten Zielproteins und seiner Interaktionspartner erfolgt über zwei aufeinanderfolgende Affinitätsreinigungsschritte, weshalb diese Methode sehr spezifisch ist, jedoch auch einige Proteine aufgrund der vielen verschiedenen Schritte verloren gehen können. Der hier eingesetzte TAP-tag (Abbildung 10) verfügt über zwei aus dem Protein A von *Staphylococcus aureus* stammende IgG-Bindedomänen (ZZ), welche die erste Affinitätsreinigung über IgG-Sepharose ermöglichen. Diese beiden Bindedomänen sind über eine TEV-Spaltstelle von der Calmodulinbindestelle (*calmodulin binding peptide*=CBP),

welche die zweite Affinitätsreinigung über Calmodulin-Sepharose ermöglicht, getrennt. Nach der ersten Affinitätsreinigung kann mit Hilfe der aus dem *tobacco etch virus* stammenden TEV-Protease die IgG-Bindedomäne abgeschnitten werden. Somit ermöglicht die TEV-Spaltstelle eine native Elution, welche schonender als eine denaturierende Elution unter sauren Bedingungen ist, welche die Proteinkomplexe zerstören würde. Die eluierten Proteine werden dann in einer zweiten Reinigung durch Calcium-abhängige Bindung an die Calmodulin-Bindedomänen und anschließende Elution mit EGTA-haltigem Puffer noch spezifischer gereinigt, da hierdurch unspezifische Interaktionen an die IgG-Bindedomänen entfernt werden (Abbildung 11).



**Abbildung 10: Schematische Darstellung sowie Aminosäuresequenz des TAP-tags.**

Der dargestellte TAP-*tag* enthält im C-terminalen Bereich die beiden (Z)-Interaktionsdomänen von Protein A gefolgt von der TEV-Protease Spaltstelle und im N-terminalen Bereich die CBP-Domäne. Aufgrund der Anordnung der Bindebereiche ist dieser TAP-*tag* geeignet für C-terminale Fusionen.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung der Tandemaffinitätsreinigung.**

Das TAP-Nup2-Fusionsprotein bindet über die beiden IgG-Bindungsdomänen von Protein A an IgG-Sepharose. Nichtgebundene Proteine und Verunreinigungen werden durch Waschschrte mit Puffer weggewaschen, bevor die Spaltung über die TEV-Protease erfolgt. Durch Zugabe von Calcium-haltigem Puffer erfolgt die Bindung des Calmodulin-bindenden Peptids (CBP) an die Calmodulin-Sepharose. Übrige Verunreinigungen und die TEV-Protease werden weggewaschen, bevor die Elution unter Verwendung von EGTA-haltigem Puffer erfolgt. EGTA bildet mit  $\text{Ca}^{2+}$  Komplexe, was zum Lösen der Calcium-induzierten Bindung der CBP-Domäne an die Calmodulin-Sepharose führt (Modifiziert nach Gartmann, 2017).

### 3.4.7. Zellkultivierung und Herstellung der Zellpellets

Es wurden 300 ml Kulturen der zu untersuchenden TAP-Integrationsstämme sowie deren Ausgangsstämme vor Integration als Negativkontrolle in  $\text{YPD}_{\text{ade}}$  angeimpft. Über Nacht wurden die Kulturen bei  $30^\circ\text{C}$  unter Schütteln inkubiert und am Folgetag in 2 l vorgewärmtem

YPD<sub>ade</sub>-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3-0,4 verdünnt. Die Zellkulturen wurden anschließend bis zu einer OD<sub>600</sub> von 3-3,5 bei 30°C inkubiert und durch Zentrifugation (4226 x g/ 15 min/ 4°C) in sechs 400 ml Zentrifugenbechern geerntet. Die auf die verschiedenen Gefäße verteilte Kultur wurde nach Verwerfen des Überstands in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen, in einem 50 ml-Reaktionsgefäß vereint und zentrifugiert (1300 x g/ 15 min/ 4°C). Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### **3.4.8. Mechanische Lyse der Zellen**

Die eingefrorenen Zellpellets wurden in einem Wasserbad auf Raumtemperatur schnell aufgetaut und mit TAP-Puffer auf 25 ml aufgefüllt. Zudem wurden 1/2 Tablette Proteaseinhibitor sowie 200 µl PMSF und 25 µl 1 M DTT zugegeben und alles zusammen mit 25 ml Glaskügelchen in den *Pulverisette*-Mahlbecher gegeben. Um möglichst wenig an Zellen zu verlieren, wurde das Gefäß nochmals mit 5 ml TAP-Puffer ausgespült. Anschließend wurden die Mahlbecher verschlossen und in die Planetenmühle eingesetzt. Der Zellaufschluss erfolgte durch mechanische Lyse der Zellen durch die Glaskügelchen (500 Upm/ 20 min/ 4°C). Nach der Lyse wurde eine 50 ml Spritze ohne Kolben an einem Stativ befestigt und mit einem Trichter versehen. Unter die Spritze wurde ein 50 ml-Reaktionsgefäß gestellt, um das Lysat aufzufangen, welches durch Filtration durch die Spritze von den Glaskügelchen getrennt wurde. Das filtrierte Lysat wurde durch Zentrifugation (4226 x g/ 20 min/ 4°C) von größeren Zelltrümmern befreit. Danach wurde der Überstand zwei weitere Male in je neue vorgekühlte Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (39554 x g/ 20 min/ 4°C) um auch kleinere Zelltrümmer zu entfernen. In einem 50 ml Reaktionsröhrchen wurden 150 µl IgG-Sepharose mit TAP-Puffer äquilibriert und anschließend der Überstand des Lysats nach der letzten Zentrifugation zugegeben.

#### **3.4.9. Affinitätsreinigung über IgG-Sepharose**

Die Affinitätsreinigung über IgG-Sepharose erfolgte rollend bei 4°C für 1 1/2 h. Zur Elution mittels TEV-Protease wurde die IgG-Sepharose inklusive des Lysats auf eine Chromatographiesäule gegeben und der Durchlauf verworfen. Um möglichst wenig IgG-Sepharose sowie gebundenes Protein zu verlieren, wurde das 50 ml -Reaktionsgefäß zweimal mit 5 ml TAP-Puffer mit 0,5 mM DTT ausgespült und alles auf die Säule gegeben. Die Säule wurde unten verschlossen und es wurden neben 5 ml TAP-Puffer 30 µl gereinigte TEV-Protease zugegeben. Die Säule wurde dicht verschlossen und über Nacht rollend bei 4°C inkubiert. Während dieser Inkubation konnte die TEV-Protease die an die IgG-Sepharose gebundenen Proteine an der TEV-Schnittstelle abspalten und so von der Sepharose eluieren.

### 3.4.10. Affinitätsreinigung über Calmodulin-Sepharose

Das Eluat der TEV-Spaltung wurde auf eine neue 10 ml-Chromatographiesäule gegeben und die erste Säule wurde viermal mit je 1 ml TAP-Puffer ausgespült. Der Durchlauf wurde in der neuen Säule gesammelt und nach Zugabe von 20 µl CaCl<sub>2</sub> (1 M), 10 µl DTT (1 M) sowie 150 µl mit TAP-Puffer äquilibrierter Calmodulin-Sepharose rollend bei 4°C für 1 1/2 h inkubiert. Während der Inkubation konnten die Proteinkomplexe, welche das vorher TAP-fusionierte Protein beinhalteten, an die Calmodulin-Sepharose binden. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen und die Sepharose zweimal mit je 5 ml TAP-Puffer mit 1 mM DTT gewaschen. Das Eluieren der Proteinkomplexe erfolgte durch Zugabe von 300 µl Elutionspuffer und eine 10-minütige Inkubation bei 35°C. Die Elution wurde insgesamt viermal durchgeführt und nach jedem Elutionsschritt wurde das Eluat in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesammelt vereinigt und mittels TCA gefällt.

### 3.4.11. TCA-Fällung der eluierten Proteine

Die im Eluat befindlichen Proteinkomplexe wurden durch Zugabe von 130 µl 100 %-iger TCA gefällt. Hierzu erfolgte nach Zugabe der TCA und kräftigem Mischen ein 15-minütiger Inkubationsschritt auf Eis. Die ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugation (11885 x g/ 10 min/ 4°C) pelletiert und anschließend in 30 µl 1x-Probenpuffer bei 60°C für 15 min denaturiert. Pro SDS-Gel wurde 1/3 der Eluatprobe aufgetragen und entweder mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt oder mittels Westernblot immunologisch detektiert.

### 3.4.12. Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

<b>IP-Puffer</b>	100 mM HEPES pH 7,4 400 mM NaCl 1 mM CaCl <sub>2</sub> 1 % (v/v) Triton X-100
<b>IP-Puffer (ohne NaCl)</b>	100 mM HEPES pH 7,4 1 mM CaCl <sub>2</sub> 1 % (v/v) Triton X-100
<b>Vor Verwendung pro 10 ml</b>	+ 100 µl PMSF (200 mM Stocklösung) + 66 µl PLAC + ½ Tablette Protease Inhibitor Cocktail

Die Co-Immunpräzipitation ermöglicht die Reinigung von Proteinen und ihren Interaktionspartnern. Hierzu wurden magnetische, mit Protein A/G gekoppelte Kügelchen zunächst in IP-Puffer äquilibriert und anschließend für 90 min mit 3 µg Antikörper gegen das zu reinigende Protein sowie 300 µl IP-Puffer inkubiert. Protein A sowie Protein G erkennen die Fc-Region der Immunglobuline (IgG) und interagieren auf diese Weise mit den schweren Antikörperketten. Überschüssiger, nicht gebundener Antikörper wurde durch Waschen mit IP-Puffer entfernt. Die so vorbereitete Protein A/G-Sepharose wurde über Nacht mit dem Zelllysate inkubiert, welches, wie 3.4.4 beschrieben, unter Verwendung des IP-Puffers statt des *in vivo*-Puffers hergestellt wurde. Es wurden 25 µl Proben sowohl vor als auch nach der Bindung entnommen, um die Effizienz der Bindung an den Antikörper zu dokumentieren. Der restliche Überstand wurde entfernt und die magnetischen Kügelchen wurden dreimal mit IP-Puffer (125 mM NaCl) gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch Zugabe von 30 µl 1x-Probenpuffer und Denaturieren bei 70°C für 15 min.

Die Immunpräzipitation wurde anhand dieses Standardprotokolls durchgeführt, wobei Modifikationen des Protokolls getestet wurden, um die IP von Nup2 zu optimieren, wie in (Ergebnis 4.8) beschrieben. Eine dieser Modifikationen war die Quervernetzung des Antikörpers an die magnetische Protein A/G-Sepharose:

#### **Quervernetzung des Antikörpers:**

<b>Lösung A</b>	100 mM Tris/HCl pH 8,0
<b>Lösung B</b>	200 mM B(OH) <sub>3</sub> /NaOH pH 9,0
<b>Lösung C</b>	200 mM Ethanolamin/HCl pH 8,0
<b>Lösung D</b>	100 mM Glycin pH 2,8

Um Antikörper dauerhaft mit der Protein A/G-Sepharose zu verbinden und eine Elution des Antikörpers weitestgehend zu verhindern, kann dieser unter Verwendung eines *Crosslinkers* quervernetzt werden. Hierzu wurden 100 µl der Protein A/G-Sepharose-Kügelchen zweimal mit 1 ml der Lösung A äquilibriert. Die magnetischen Kügelchen wurden mit einem Magneten fixiert und der Überstand abgenommen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit Antikörper (12 µg) bei 4°C. Die Sepharose wurde zweimal mit 1 ml Lösung B gewaschen, anschließend wieder in 1 ml Lösung B aufgenommen und der Quervernetzer Dimethylpimelimidat zu einer Endkonzentration von 20 mM hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung B inklusive des nicht verbrauchten Quervernetzers abgenommen und verworfen. Es folgte ein Waschschriff mit 1 ml Lösung C für 1-2 min bei

Raumtemperatur. Anschließend wurden die magnetischen Kügelchen mit 1 ml Lösung C für 2 h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Nach einer Inkubation für 10-15 min mit Lösung D bei Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen und die Kügelchen für 1-2 min mit Lösung A bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde wieder verworfen. Die mit Antikörper quervernetzte Sepharose konnte nach Zugabe von 1 ml Lösung A mit 0,01 % Thimerosal bei -20°C aufbewahrt oder direkt für eine Co-Immunpräzipitation verwendet werden.

### **3.5. Zellbiologische Methoden**

#### **3.5.1. *In vivo*-Fluoreszenzmikroskopie**

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie lässt sich die Lokalisation fluoreszenzmarkierter Proteine analysieren. Hierzu wird an das zu untersuchende Protein ein *tag* fusioniert, wobei in dieser Arbeit ausschließlich GFP-fusionierte Proteine analysiert wurden. Bei GFP handelt es sich um das grün fluoreszierende Protein, welches bei einer Wellenlänge von 475 nm angeregt wird, weshalb man seine Fluoreszenz unter Verwendung des FITC-Kanals (Fluoresceinisothiocyanat-Kanals) mikroskopisch detektieren kann. Es handelt sich hierbei um ein aus der Qualle *Aequorea victoria* stammendes Fluorochrom.

Selektivmedium wurde mit dem zu analysierenden Hefestamm angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 wachsen gelassen. 500 µl dieser Kultur wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen pelletiert (2943 x g/ 3 min/ RT). Durch Abnahme von circa 400 µl des Überstands wurden die Zellen eingengt und in dem verbliebenen Medium resuspendiert. Anschließend wurden 5 µl der Zellen auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas eingedeckt. Die Zellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie angeschaut und mit einer Kameraaufnahme dokumentiert.

Zum Teil wurden Zellen mit Galaktose-induzierbaren Plasmiden untersucht, diese wurden in 2 ml Selektivmedium mit Glukose über Nacht kultiviert und am Folgetag in Selektivmedium mit Raffinose auf eine OD<sub>600</sub> von 0,02-0,05 verdünnt. Über Nacht verdichtete sich die Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von ~0,3. Durch Zugabe von Galaktose für eine Inkubationszeit von 2-3 h wurde die Synthese der Fusionsproteine induziert und diese wurden dann mit dem Fluoreszenzmikroskop detektiert.

#### **3.5.2. Wachstum von *S. cerevisiae* unter Stressbedingungen**

#### **3.5.3. Untersuchung der Stressantwort auf Agar-Platten**

Der Stresstest wurde verwendet, um zu untersuchen, ob die SUMOylierung von Nup2 einen Einfluss auf die Stressantwort hat bzw. ob SUMOylierungsmutanten einen phänotypischen Unterschied im Wachstum bei Stress zeigen. Die hierzu verwendeten Stämme wurden über

Nacht in YPD<sub>ade</sub> kultiviert und in 10 ml YPD<sub>ade</sub> auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 verdünnt. Bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,8 wurden 200 µl der verschiedenen Stämme in eine Mikrotiterplatte gegeben. Wichtig hierbei war, dass die zu vergleichenden Stämme eine vergleichbare Zellzahl aufwiesen. In die folgenden Vertiefungen wurden je 180 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> vorgelegt und eine Verdünnungsreihe hergestellt (1:10; 1:100; 1:1.000; 1:10.000; ... oder 1:5; 1:25; 1:125; 1:625; ...). Zum gleichmäßigen Auftragen der Proben auf die Platten wurde ein Replikationsstempel benutzt, welcher vor Benutzung durch Abflammen sterilisiert wurde.

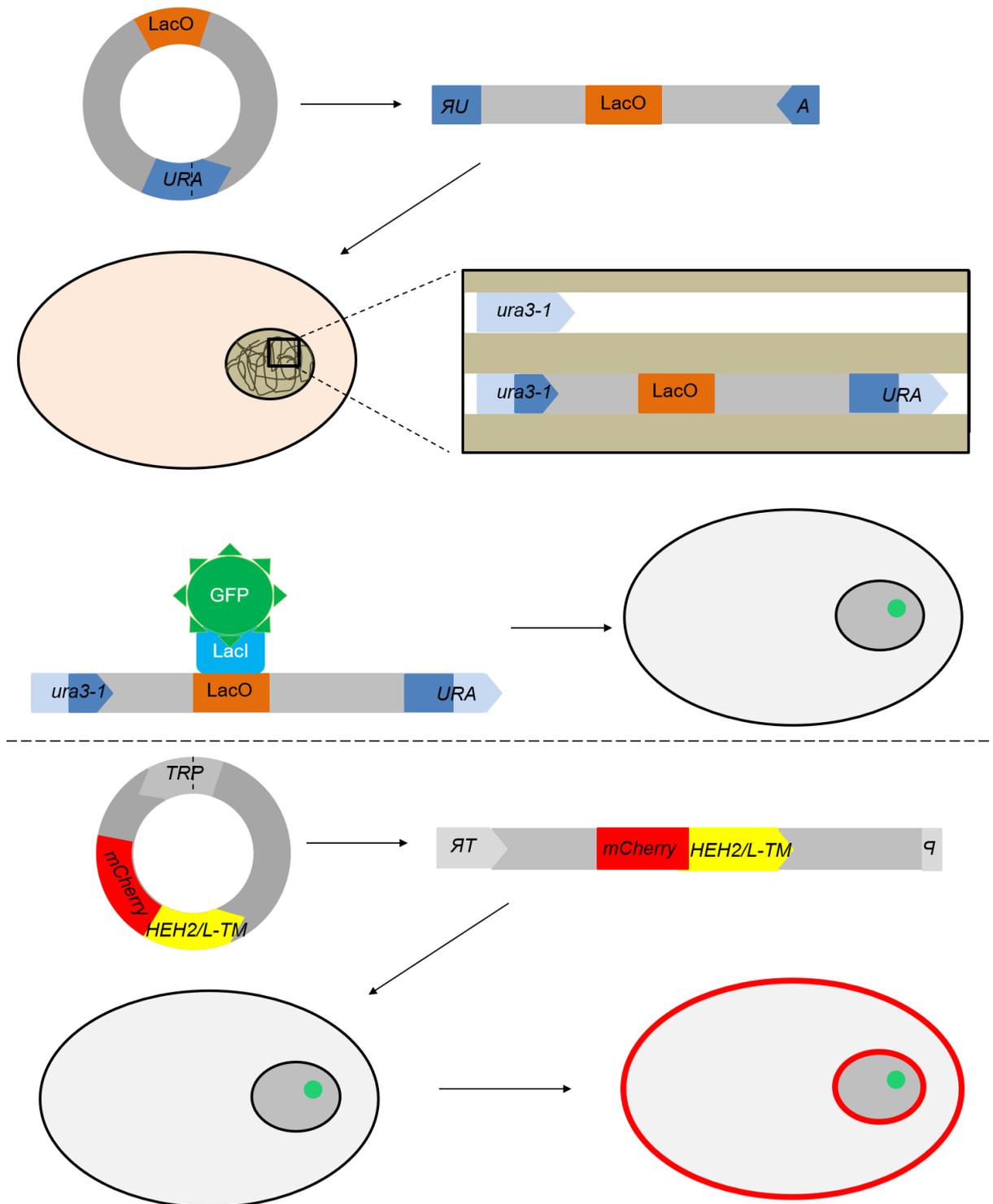
Aufgestempelt wurden die Proben auf YPD<sub>ade</sub>-Platten, welche unterschiedliche Zusätze (KCl, Sorbitol) enthielten auf Platten ohne Zusätze als Positivkontrollen, um das gleichmäßige Wachstum ohne Stress analysieren zu können. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert und nach ein, zwei bzw. drei Tagen wurde das Zellwachstum mit Scanneraufnahmen dokumentiert.

#### **3.5.4. Untersuchung des Zellwachstums in KCl-haltigem Flüssigmedium**

Die zu untersuchenden Hefestämme, wurden über Nacht in YPD<sub>ade</sub> kultiviert und am Folgetag in 100 ml YPD<sub>ade</sub> sowie YPD<sub>ade</sub> mit 1 M KCl auf eine OD<sub>600</sub> von etwa 0,1 verdünnt. Um zeitabhängig das Zellwachstum zu vergleichen, wurde über 12,5 h zu bestimmten Zeitpunkten die OD<sub>600</sub> der Zellkulturen bestimmt und zur visuellen Darstellung in einem Punktdiagramm aufgeführt.

#### **3.5.5. Lokalisierung chromosomaler Loci mittels Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung des LacI/LacO Systems**

Induzierbare Gene, wie beispielsweise *INO1*, *GAL1* oder *HXK1*, sind in aktiviertem Zustand mit der nukleären Peripherie assoziiert, wobei an dieser Lokalisation auch Nukleoporine wie Nup2 beteiligt sind (Casolari *et al.*, 2004; Dieppois und Stutz, 2010). In dieser Arbeit wurde die Aktivität von *INO1* und *GAL1* über ihre Lokalisation untersucht. Zur Untersuchung der Lokalisation chromosomaler Loci wurden Hefezellen verwendet, welche ein mCherry-markiertes ER-Protein synthetisieren, um die Kernhülle detektieren zu können. Zudem wurde am zu untersuchenden Locus ein Lac-Operator (LacO-Array) integriert, welcher mit einem GFP-markierten Lac-Repressor (GFP-LacI) interagiert und das zu untersuchende Gen mithilfe des fluoreszierenden Proteins sichtbar macht. Die verwendeten Stämme enthielten bereits dieses LacI/LacO-System und wurden vom Brickner-Labor zur Verfügung gestellt (Egecioglu *et al.*, 2014).



**Abbildung 12: Vereinfachte schematische Darstellung der Herstellung von Zellen zur Untersuchung chromosomaler Loci.**

*URA3* dient in diesem Fall als Beispiel für einen zu untersuchenden chromosomalen Locus, wobei in dieser Arbeit *INO1* und *GAL1* analysiert wurden. Das Plasmid mit der Sequenz des zu analysierenden Gens und dem Lac-Operator wurde in der Sequenz des Locus geschnitten und über homologe Rekombination in Zellen eingebracht, welche in dem zu analysierenden Gen eine Mutation tragen. Durch den Einbau des Plasmids entsteht neben der mutierten Version des Gens eine funktionale Version, welche sich in direkter Nähe des Lac-Operators befindet. In diese Zellen wurde ein weiteres Plasmid integriert, welches den Lac-Repressor sowie die Sequenz für GFP enthält. Das Lac-Repressor-GFP-Konstrukt bindet an den Lac-Operator, weshalb über das GFP das zu untersuchende Gen in Form eines grün fluoreszierenden Punkts lokalisiert werden kann. Die Kernhülle sowie die Zellmembran werden über die mCherry-markierte L-TM-Domäne des Heh2-Proteins lokalisiert, welches ebenfalls über homologe Rekombination in die Zellen integriert wurde.

Abbildung 12 zeigt eine vereinfachte schematische Darstellung des LacI/LacO-Systems. Hierzu wurde ein Plasmid, welches neben dem zu untersuchenden Gen noch einen Lac-Operator enthält, über Restriktionsenzyme im Gen gespalten und anschließend in Hefezellen transformiert, welche eine Mutation im zu untersuchenden Gen haben. Über homologe Rekombination wurde es an der Stelle des mutierten Gens integriert, wodurch zusätzlich zu dem mutierten Gen die normale Version des Gens zusammen mit dem Lac-Operator gebildet wurde. In diese Zellen wurde zusätzlich ein GFP-markierter Lac-Repressor eingebaut, welcher nun das LacO-markierte Gen erkennt und daran bindet, weshalb über das GFP-Protein das zu untersuchende Gen lokalisiert werden kann. Die Darstellung der Kernhülle erfolgte durch Integration eines Plasmids mit mCherry-markierter Heh2/L-TM-Domäne, welches mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI geschnitten und im *TRP1*-Gen in Hefezellen integriert wurde.

Bei den untersuchten Stämmen handelte es sich um *Δnup2*-Zellen, welche noch mit dem ebenfalls von Brickner zur Verfügung gestellten mCherry-Plasmid sowie mit Plasmiden, welche für *NUP2* beziehungsweise *NUP2-2xKR* kodieren, transformiert wurden. Da eine zu hohe Zelldichte zu einem schlecht auswertbaren Signal führt, wurden die Zellen über Nacht in entsprechendem Selektivmedium so stark verdünnt angeimpft, dass am Folgetag die  $OD_{600}$  von 0,3 nicht überschritten wurde, oder nochmals auf 0,1 verdünnt und weiter kultiviert. Für den Versuch wurden die Zellen pelletiert (1535 x g/ 5 min/ RT), in Wasser gewaschen und auf zwei Röhrchen aufgeteilt, wobei eines das zuvor verwendete Selektivmedium enthielt und das andere je nach Versuch Medium ohne Inositol bzw. mit Galaktose statt Glukose beinhaltete. Die nicht induzierten Zellen wurden direkt fluoreszenzmikroskopisch analysiert, während die anderen Zellen für 1-2 Stunden induziert und anschließend untersucht wurden. Um einen Überblick über den gesamten Zellkern zu bekommen, wurde ein *z-stack* von 10-15 Bildern gemacht, wobei alle 0,3  $\mu\text{m}$  eine neue Aufnahme gemacht wurde. Es wurden Aufnahmen gemacht, um das über GFP sichtbar gemachte Gen zu lokalisieren, sowie um das mCherry-markierte ER-Protein zu detektieren, welches die Kernhülle sichtbar macht. Beide Aufnahmen einer jeden Ebene wurden zusammengefügt und anschließend ausgewertet, indem die räumliche Nähe des mit GFP-sichtbar gemachten Gens und der über mCherry dargestellten nukleären Peripherie analysiert wurde. Befindet sich das Gen in der Peripherie, so werden die Zellen als aktiv gewertet. Ist das GFP-Signal im Nukleoplasma, wird das Gen als inaktiv gewertet.

## 4. Ergebnisse

Nup2 wurde bereits anhand früherer Untersuchungen als potentiell SUMOylierbares Protein identifiziert. Es wurden *in silico*-Analysen zur Vorhersage möglicher SUMOylierungsstellen sowie *in vitro*-Versuche zur Verifizierung der vorhergesagten Stellen durchgeführt. Anhand von *in vitro*-SUMOylierungsversuchen wurden SUMOylierungsstellen ausfindig gemacht, welche *in vivo* bestätigt und charakterisiert werden sollten. Erste *in vivo*-Experimente wurden bereits durchgeführt, führten jedoch nicht zu eindeutigen Ergebnissen beziehungsweise wurden missinterpretiert (Folz, 2014). In der vorliegenden Arbeit sollten die *in vivo*-Ergebnisse nochmals genauer analysiert und verifiziert sowie mögliche phänotypische Veränderungen analysiert und charakterisiert werden.

### 4.1. *In vivo*-SUMOylierung von Nup2

Zum Nachweis einer potenziellen SUMOylierung von Nup2 wurden Ni-NTA-Agarose-Bindeversuche unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Die denaturierenden Bedingungen waren erforderlich, um eine mögliche DeSUMOylierung über Proteasen weitestgehend zu verhindern.

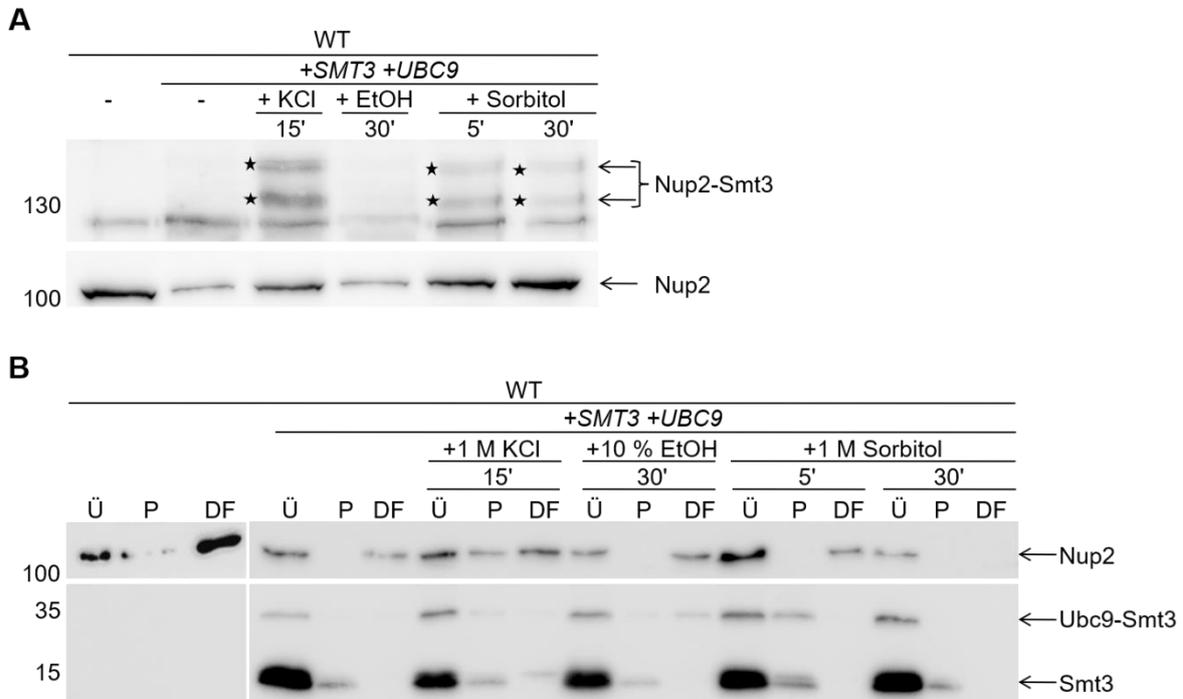
SUMOylierte Proteine liegen in Zellen unter normalen Bedingungen meist nur in geringen Mengen vor, weshalb die Detektion dieser Proteine erst durch ihre Reinigung und folglich Anreicherung möglich wird. Zum Reinigen der SUMOylierten Proteine wurde in den zu untersuchenden Stamm ein Plasmid transformiert, welches ein über Kupfer induzierbares, mit einem 6His- oder 7His-tag markiertes *SMT3* enthält. Zudem ist die Anwesenheit einer höheren Menge an Ubc9 ebenfalls von Vorteil, um die SUMOylierung zu steigern, weshalb zum Teil neben dem Plasmid für *SMT3* noch ein Plasmid, welches für *UBC9* kodiert, mit in den zu untersuchenden Stamm transformiert wurde.

#### 4.1.1. Nup2 wird *in vivo* nach Osmosestress SUMOyliert

In Lewicki *et al.* (2015) wurde der Einfluss verschiedener Stressoren wie Ethanol, Sorbitol und KCl auf die GesamtSUMOylierung verschiedener Proteine untersucht. Anhand massenspektrometrischer Analysen wurde gezeigt, dass osmotischer Stress zu einer erhöhten SUMOylierung führt, unter anderem auch von Nup2 (Lewicki *et al.*, 2015). Aus diesem Grund wurde der osmotische Schock sowie auch Alkoholstress als eine Bedingung gesehen, unter der die SUMOylierung von Nup2 möglicherweise gut nachweisbar ist. In einem ersten Versuch wurden die im oberen Abschnitt erwähnten Plasmide für *6HIS-SMT3* und *UBC9* in den Wildtypstamm transformiert. Die Zellen wurden, wie in 3.4.3 beschrieben, kultiviert. Kurz vor der Ernte wurden die verschiedenen Stressoren zu den Zellen gegeben, um eine mögliche Zunahme des SUMOylierten Nup2 zu detektieren. Als Stressor wurde zum einen KCl mit einer

Endkonzentration von 1 M verwendet, welches 15 min vor Ernte zugegeben wurde. Des Weiteren wurde eine Kultur für 30 min mit Ethanol mit einer Endkonzentration von 10 % behandelt. Sowohl 5 min als auch 30 min vor der Ernte wurde Sorbitol mit einer Endkonzentration von 1 M zu je einem Teil der Kultur hinzugegeben. Neben diesen vier behandelten Proben wurde eine unbehandelte Probe sowohl mit wie auch ohne Plasmide mitgeführt, um einerseits die stressabhängige Änderung der SUMOylierung und andererseits die SUMOylierung an sich detektieren zu können. Um die Effizienz des Versuchs zu überprüfen, wurde nach der Zellyse und dem Entfernen der Zellbestandteile jeweils eine Probe des Überstands und der durch Zentrifugation entfernten Zellbestandteile, welche sich im Pellet befinden, entnommen. Wie in Abbildung 13B zu sehen, war die Lyse von Nup2 erfolgreich und der Großteil des Proteins konnte in den Überstandsproben detektiert werden, während in den Pellets nur wenig bis kein Nup2 vorhanden war. Ebenfalls in dieser Abbildung zu sehen ist die Synthese von Smt3 sowie die Reinigungseffizienz SUMOylierter Proteine. Smt3 war hauptsächlich in den Überstandsproben detektierbar, während in den Durchflussproben, welche nach der Bindung an die Ni-NTA-Agarose entnommen wurden, kein SUMO mehr vorhanden war. Die Zellen, welche kein *SMT3*-Plasmid enthielten, zeigen kein Signal für Smt3. Die in Abbildung 13A gezeigten Eluat- und Überstandsproben lassen auf die Menge an SUMOyliertem Nup2 schließen. In der Probe ohne zusätzliches *SMT3*-Plasmid ist im Eluat keine SUMOylierung für Nup2 erkennbar, obwohl die Menge an Nup2-Gesamtprotein in der Überstandsprobe hoch war. Auch in der Probe, welche sowohl *SMT3* als auch *UBC9* enthält, ist keine SUMOylierung detektierbar, ebenso in der mit 10 % EtOH behandelten Probe. Die Proben, welche mit dem Salz Kaliumchlorid bzw. dem Zuckeralkohol Sorbitol behandelt wurden, zeigen hingegen zwei klare Banden bei etwa 140 und 150 kDa, welche anhand der Kontrolle ohne zusätzliches *SMT3* klar für SUMOylierung sprechen. Es ist jedoch zu beobachten, dass die Menge des SUMOylierten Nup2 in den verschiedenen Proben variiert. Die Probe, welche mit KCl behandelt wurde, zeigt ein wesentlich stärkeres Signal als die mit Sorbitol behandelten Zellen, obwohl die Gesamtmenge von Nup2 in dieser Probe geringer ist, wie anhand der Überstandsproben zu erkennen ist. Zudem lässt sich beobachten, dass die Menge an SUMOyliertem Nup2 bei einem längeren osmotischen Schock mit Sorbitol geringer wird. Aufgrund der stärkeren SUMOylierung von Nup2 nach Behandlung mit 1 M KCl im Vergleich zur unbehandelten beziehungsweise mit EtOH oder Sorbitol behandelten Probe wurde dieser Stressor für weitere Versuche beibehalten. Prinzipiell bleibt noch zu erwähnen, dass Smt3 ein kleines Protein von nur etwa 15 kDa ist. Der Größenunterschied zwischen Nup2 und Nup2-Smt3 hingegen entspricht jedoch eher 30-40 kDa, was die Vermutung zulässt, dass es sich um eine zweifache beziehungsweise bei der zweiten Bande um eine mehrfache SUMOylierung handelt. Ob es sich hierbei um eine Doppel- bzw. MehrfachSUMOylierung an einem Lysinrest oder um EinfachSUMOylierungen an verschiedenen Lysinresten handelt,

lässt sich an dieser Stelle nicht sagen. Andererseits hat sich in Versuchen mit anderen Proteinen gezeigt, dass die SUMO-Produkte meist höher laufen als es ihrem Molekulargewicht entspricht, weshalb die untere Bande auch einer EinfachSUMOylierung entsprechen könnte. Nup2 zeigt eine verstärkte SUMOylierung infolge von Osmosestress, nicht jedoch nach Ethanolstress.



**Abbildung 13: In vivo-SUMOylierung von Nup2 unter verschiedenen Stressbedingungen.**

Der Wildtypstamm (GSY170) wurde mit den für *6HIS-SMT3* (pGS2311) sowie *UBC9* (pGS2169) kodierenden 2 $\mu$ -Plasmiden transformiert und in kupferhaltigem (100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>) SD-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 kultiviert. Zur Kontrolle wurde der Stamm auch ohne Plasmide mitgeführt. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1 M KCl für 15 min, durch Zugabe von 10 % EtOH für 30 min oder durch Inkubation mit 1 M Sorbitol für 5 bzw. 30 min gestresst, bevor 50 OD-Einheiten geerntet wurden. Es wurden zudem auch 50 OD-Einheiten der Kultur vor der Stressbehandlung geerntet. Die Zellen wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgeschlossen und das Lysat durch Zentrifugation von Zellfragmenten befreit, bevor über Nacht die Bindung SUMOylierter Proteine an die Ni-NTA-Agarose erfolgte. Zur Kontrolle der Lyseeffizienz wurden nach der Zentrifugation Proben von Überstand (Ü) und Pellet (P) entnommen. Die Bindungseffizienz an die Ni-NTA-Agarose wurde durch eine Durchflussprobe (DF) verifiziert. Die Ni-NTA-Agarose wurde mit Puffer gewaschen und anschließend wurden die gebundenen Proteine durch 15-minütiges Erhitzen auf 60°C nach Zugabe von HU-Probenpuffer eluiert. Die Eluate (A) wurden in einem 8 %-igen und die Lysekontrollen (B) in einem Stufengel (8 %-15 %) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Eluatproben wurden durch Inkubation mit Nup2-N-Primärantikörper sowie dem entsprechenden POD-gekoppelten (anti-Kaninchen) Sekundärantikörper analysiert. Die Analyse der Lyseproben erfolgte unter Verwendung der gleichen Antikörper, wobei noch ein zweiter Primärantikörper gegen Smt3 verwendet wurde, welcher mit dem gleichen Sekundärantikörper detektiert wurde. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **A:** Eluatproben mit SUMOyliertem Nup2 (\*) unter verschiedenen Stressbedingungen sowie Überstandsproben zur Analyse des gesamten Nup2-Gehalts in den verschiedenen Proben. **B:** Synthese-, Lyse- und Bindungskontrolle von Nup2 und Smt3.

4.1.2. Nup2-2xKR wird nicht SUMOyliert

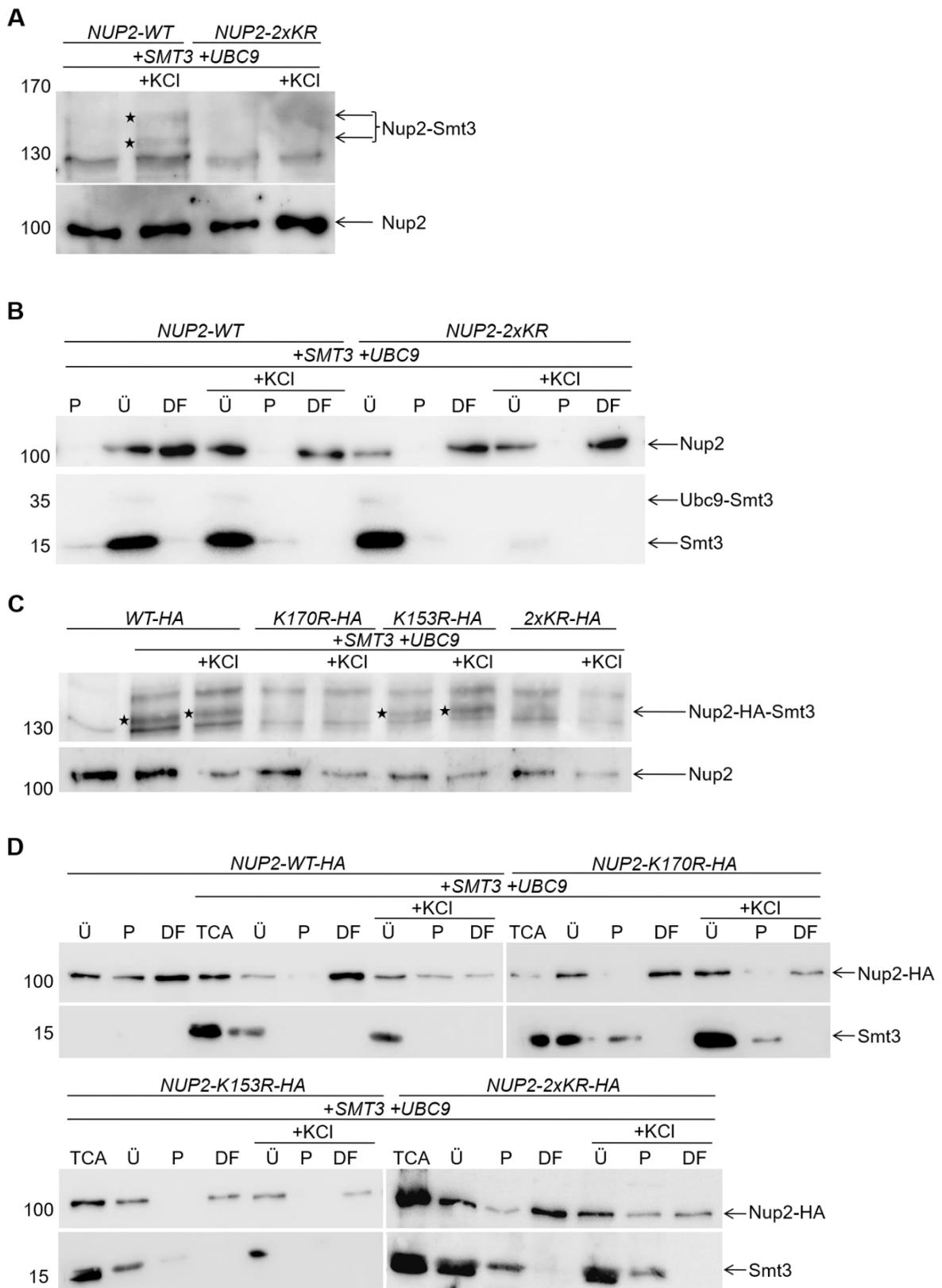


Abbildung 14: *In vivo*-SUMOylierung von Nup2-WT und Nup2-2xKR nach Osmosestress mittels KCl sowie *in vivo*-SUMOylierung der Einzel- und Doppelmutanten in  $\Delta$ ulp2.

A und B zeigen die Ergebnisse der NUP2-2xKR-Mutante (GSY1488), sowie des dazugehörigen integrierten Wildtyps (GSY1487), welche mit 6HIS-SMT3 (pGS2311) sowie UBC9 (pGS2170) transformiert wurden. C und D zeigen die Eluat- und Lyseproben des mit 7HIS-SMT3 (pGS2036) sowie UBC9 (pGS2170) transformierte  $\Delta$ ulp2-

Stammes (GSY1255), welcher neben dem genomischen *NUP2* zusätzlich ein 2 $\mu$ -Plasmid enthält, welches für *NUP2-3xHA* (pGS2010), *NUP2-K170R-3xHA* (2086), *NUP2-K153R-3xHA* (pGS2116) oder *NUP2-2xKR-3xHA* (pGS2117) kodiert. Die zu untersuchenden Zellen wurden in kupferhaltigem (100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>) SD-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 wachsen gelassen. Zur Kontrolle wurden für B die jeweiligen Stämme auch ohne zusätzliche Plasmide für *SMT3* und *UBC9* mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1 M KCl für 15 min einem osmotischen Schock unterzogen, bevor 50 OD-Einheiten geerntet wurden. Die Lyse, Bindung, Elution und Detektion wurden nach dem Standardprotokoll wie in Abbildung 13 beschrieben durchgeführt. Die Eluatproben wurden durch Inkubation mit Nup2-N-Primärantikörper sowie dem entsprechenden POD-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) bzw. mit Primärantikörper gegen HA und POD-gekoppeltem Sekundärantikörper (anti-Maus) analysiert. Die Analyse der Lyseproben erfolgte unter Verwendung der gleichen Antikörper, wobei noch ein weiterer Primärantikörper gegen Smt3 verwendet wurde, welcher ebenfalls mit POD-gekoppeltem Sekundärantikörper gegen Kaninchen detektiert wurde. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **A und C:** Eluatproben mit SUMOyliertem Nup2 (\*) sowie Überstandsproben zur Analyse des gesamten Nup2-Gehalts in den verschiedenen Proben. **B und D:** Synthese-, Lyse- und Bindungskontrolle von Nup2 und Smt3. TCA entspricht dem Gesamtzelllysat. Das Lysat wurde durch Zentrifugation getrennt in Überstand vor der Bindung (Ü) und Pellet (P) und der Durchfluss ist der Überstand nach der Bindung (DF).

Die bereits in *in vitro*-Versuchen bestätigten SUMOylierungsstellen von Nup2 an den Lysinresten an Position 153 und 170 sollten auch *in vivo* verifiziert werden. Hierzu wurden die *NUP2-WT* bzw. *NUP2-2xKR* Integrationsstämme sowohl mit *SMT3* als auch mit dem für *UBC9* kodierenden Plasmid transformiert und Proben sowohl ohne als auch mit osmotischem Schock über 1 M KCl hergestellt. Die in Abbildung 14B gezeigte Lysekontrolle belegt, dass die Lyse erfolgreich war und Nup2 nur im Überstand, aber nicht im Pellet vorliegt. Zudem ist zu erkennen, dass die Synthese von Smt3 gleichmäßig ist und SUMOylierte Proteine erfolgreich gereinigt wurden. In der mit KCl behandelten Probe der *2xKR*-Mutante ist bei der Lysekontrolle kein Signal für Smt3 erkennbar, was ein Detektionsproblem zu sein scheint, da sowohl in der Überstand- als auch der Durchflussprobe das solubilisierete Nup2 nachweisbar ist und diese Probe aus der gleichen Kultur wie die Zellen ohne Stressbehandlung entnommen wurde. Daher ist auch auszuschließen, dass es sich um eine verringerte Syntheserate von Smt3 handelt. Die in Abbildung 14A gezeigten Eluat- und Überstandsproben zeigen eine einheitliche Gesamtmenge von Nup2, jedoch sind nur in der mit KCl gestressten Wildtypprobe zwei Signale, welche Nup2-Smt3 darstellen, zu erkennen. Die Menge an SUMOyliertem Nup2 ist insgesamt aber sehr gering. Anhand dieses konnte Versuchs gezeigt werden, dass es sich bei der *NUP2-2xKR*-Mutante um die nicht mehr SUMOylierbare Form von Nup2 handelt.

#### 4.1.3. Der Lysinrest an Position 170 ist die essentielle SUMOylierungsstelle

Die SUMOylierung von Nup2 war in dem *NUP2-WT*-Integrationsstamm nur sehr schwach detektierbar, weshalb zur Klärung der essentiellen SUMOylierungsstelle nicht weiterhin Integrationsstämme, sondern mit für *NUP2-WT-HA*, *NUP2-2xKR-HA* oder für die Einzelmutanten *NUP2-K153R-HA* bzw. *NUP2-K170R-HA* kodierenden 2 $\mu$ -Plasmiden transformierte Stämme verwendet wurden. Das 2 $\mu$ -Plasmid sorgt durch eine Überexpression für einen höheren Gehalt an Nup2-HA beziehungsweise den mutierten Nup2-HA-Versionen. Um die SUMOylierung von Nup2 längere Zeit aufrecht zu erhalten, wurde kein Wildtypstamm, sondern ein  $\Delta$ *Ulp2*-Stamm verwendet, in welchem das DeSUMOylierungsenzym Ulp2 fehlt und

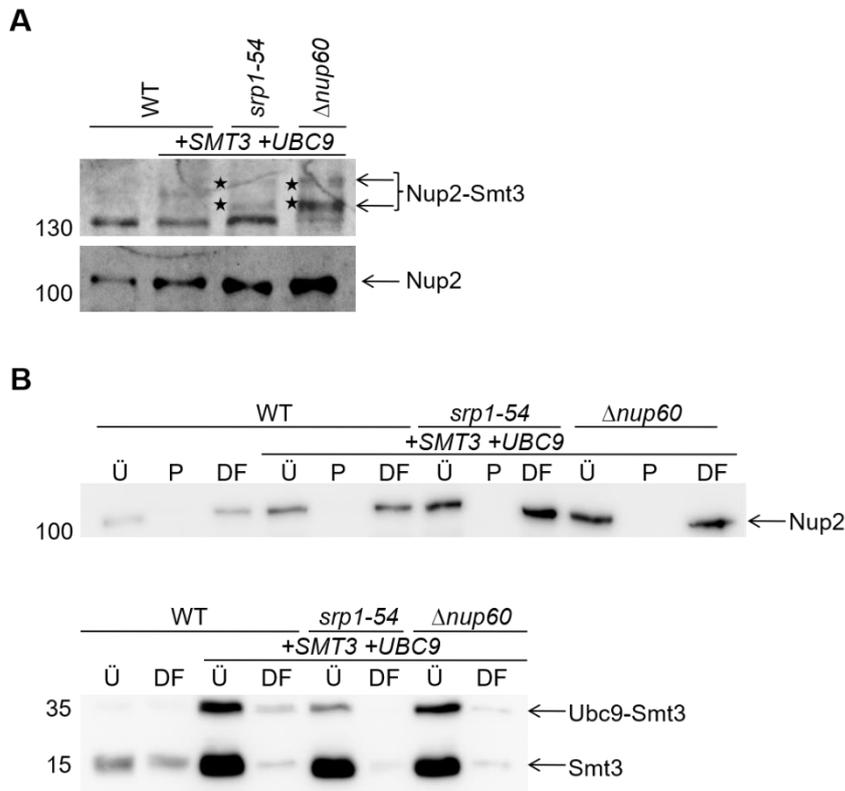
die SUMOylierung deshalb weniger effizient abgebaut wird (Li und Hochstrasser, 2000; Bylebyl *et al.*, 2003).

Da neben den transformierten 2 $\mu$ -Plasmiden von Nup2 auch noch das genomisch synthetisierte Nup2 in den Zellen enthalten war, wurde ein HA-Primärantikörper verwendet, um das über das Plasmid synthetisierte Nup2 zu detektieren. Die Lyse sowie die Effizienz der Reinigung SUMOylierter Proteine konnte anhand der in Abbildung 14D gezeigten Lysekontrolle nachgewiesen werden. Anhand der in Abbildung 14C dargestellten Eluat- sowie Überstandsproben konnten Unterschiede in der SUMOylierungseffizienz der verschiedenen Nup2-Versionen gezeigt werden. Sowohl die *NUP2-WT-HA*-Version sowie die *NUP2-K153R-HA*-Version zeigten eindeutige zusätzliche Banden, welche auf eine SUMOylierung hinweisen, da sie nur in den Proben zu sehen sind, in welchen *SMT3* enthalten ist. Die Bandensignale sehen in den Eluaten von *NUP2-WT-HA* und *NUP2-K153R-HA* sowohl mit als auch ohne osmotischen Stress in etwa gleich stark aus. Betrachtet man jedoch den Gesamtgehalt von Nup2 in den Überstandsproben und vergleicht ihn mit der Menge an SUMOyliertem Protein, gelangt man zu dem Schluss, dass die SUMOylierungseffizienz nach Behandlung mit 1 M KCl höher ist als ohne. Anhand dieses Versuchs wurde auch *in vivo* gezeigt, dass es sich bei dem Lysinrest an Position 170 um die HauptSUMOylierungsstelle und bei dem Lysinrest an Position 153 um eine weitere, aber schwächere SUMOylierungsstelle handelt.

#### **4.1.4. Die NLS-Importmutante *srp1-54* sowie $\Delta$ *nup60* zeigen eine stärkere SUMOylierung von Nup2**

Nup2 ist sowohl am NLS-Import über Srp1 beteiligt als auch für die Stabilität von Nup60 verantwortlich (Solsbacher *et al.*, 2000; Latta, 2011). Zudem ist Nup2 über Nup60 an der Kernhülle lokalisiert (Denning *et al.*, 2001). Aufgrund dessen sollte in der mit *SMT3* transformierten Importin  $\alpha$ -Mutante *srp1-54* sowie in der *nup60 knockout*-Mutante die SUMOylierung von Nup2 analysiert werden. Neben den beiden zu testenden Stämmen wurde als Kontrolle der Wildtyp sowohl mit als auch ohne zusätzliches *SMT3* mitgeführt. In beiden Stämmen war keine SUMOylierung von Nup2 detektierbar, während in der Importin  $\alpha$ -Mutante bereits zwei schwache und in der  $\Delta$ *nup60*-Mutante zwei wesentlich stärkere SUMOylierungsbanden zu erkennen waren, welche für SUMOyliertes Nup2 sprechen (Abbildung 15A). Sowohl Lyse als auch Synthese und Bindung waren vergleichbar (Abbildung 15B). Auch in der Importin  $\beta$ -Mutante *rs1-1* mit zusätzlichem *SMT3* wurde eine verstärkte SUMOylierung von Nup2 hauptsächlich nach osmotischem Schock detektiert (Daten nicht gezeigt).

Somit wird die SUMOylierung von Nup2 in Abwesenheit seiner Interaktionspartner Nup60 und Srp1 begünstigt.



**Abbildung 15: *In vivo*-SUMOylierung von Nup2 in *srp1-54 ts*, einem Stamm mit Importdefekt, und  $\Delta nup60$ .** Der Wildtyp (GSY170), der *srp1-54 ts* Stamm (GSY664) sowie der  $\Delta nup60$ -Stamm (GSY1386) wurden mit den für 6HIS-SMT3 (pGS2311) sowie UBC9 (pGS2169) kodierenden 2 $\mu$ -Plasmiden transformiert und in kupferhaltigem (100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>) SD-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 wachsen gelassen. Zur Kontrolle wurde der Wildtyp auch ohne zusätzliche Plasmide mitgeführt. Die Lyse der Zellen sowie die Reinigung und Detektion erfolgte nach dem in Abbildung 13 beschriebenen Standardprotokoll. Die Eluatproben wurden durch Inkubation mit Nup2-N-Primärantikörper sowie dem entsprechenden POD-gekoppelten (anti-Kaninchen) Sekundärantikörper analysiert. Die Analyse der Lyseproben erfolgte unter Verwendung der gleichen Antikörper, wobei noch ein weiterer Primärantikörper gegen Smt3 verwendet wurde, welcher ebenfalls mit POD-gekoppeltem Sekundärantikörper gegen Kaninchen detektiert wurde. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **A:** Eluatproben mit SUMOyliertem Nup2 (\*) sowie Überstandsproben zur Analyse des gesamten Nup2-Gehalts in den verschiedenen Proben. **B:** Synthese-, Lyse- und Bindungskontrolle von Nup2 und Smt3. Das Lysat wurde durch Zentrifugation getrennt in Überstand vor der Bindung (Ü) und Pellet (P) und der Durchfluss ist der Überstand nach der Bindung (DF).

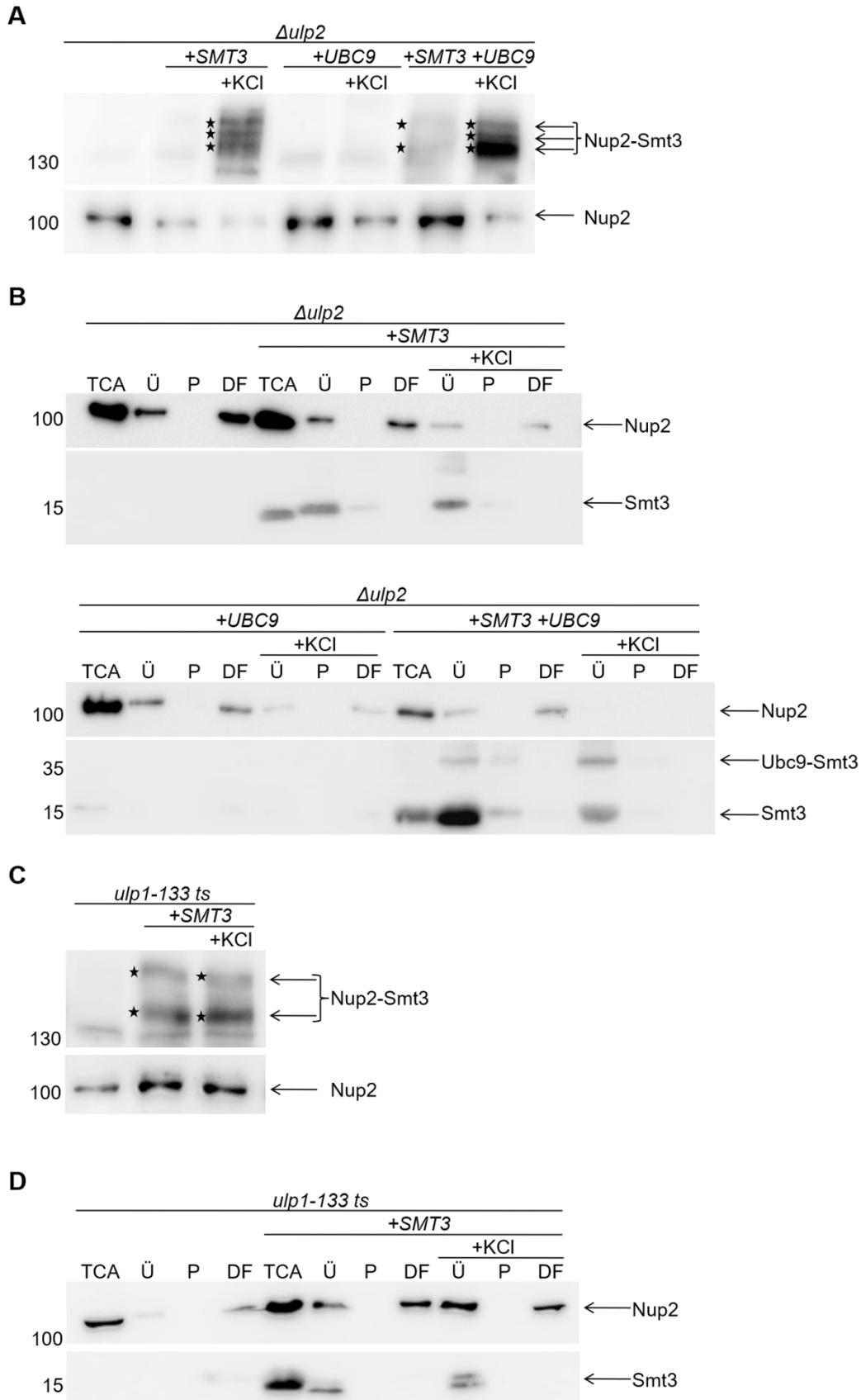
#### 4.1.5. Das Fehlen von Ulp2 führt zur PolySUMOylierung von Nup2

Ulp2 ist eine der beiden Smt3-Dekonjugasen (Li und Hochstrasser, 2000), weshalb getestet wurde, wie sich das Fehlen dieses Enzyms auf den SUMOylierungsstatus von Nup2 auswirkt. In Abbildung 16B ist die Lysekontrolle von Nup2 sowie die Synthese- und Bindungseffizienz von Smt3 in  $\Delta ulp2$ -Zellen dargestellt. Das Pellet enthält wie erwartet kein Nup2, während die Überstandsproben Signale für das solubilisierete Nup2 zeigen. Auch der Smt3-Gehalt ist in den Überstandsproben gut erkennbar, während im Durchfluss kein Signal mehr detektierbar ist. Die Eluatproben, welche in Abbildung 16A gezeigt sind, weisen eine starke PolySUMOylierung nach KCl-Stress auf, wenn SMT3 enthalten ist, und ein viel stärkeres SUMOylierungssignal, wenn neben SMT3 noch UBC9 enthalten ist. Neben den sonst üblichen SUMOylierungssignalen bei 140 kDa und 150 kDa ist noch eine dritte Bande detektierbar. Die

mit KCl behandelte Probe, welche *SMT3* allein enthält, weist drei gleich starke Banden auf. In Anwesenheit von *SMT3* und *UBC9* verstärkt sich vor allem die untere Bande, die obere Bande bleibt fast unverändert und die mittlere zeigt ein etwas stärkeres Signal. Somit steigt nicht nur die Menge an SUMOyliertem Nup2 in  $\Delta ulp2$ , sondern es ändert sich auch die Art des SUMOylierungsmusters, was auf eine verstärkte PolySUMOylierung von Nup2 hindeutet.

#### **4.1.6. Ulp1 und Ulp2 sind in ihrer DeSUMOylierungsfunktion bezüglich Nup2 nicht redundant**

Nachdem die SUMOylierung von Nup2 in dem  $\Delta ulp2$ -Stamm getestet wurde, wurde auch die SUMOylierung in der temperatursensitiven DeSUMOylierungsmutante *ulp1-133* bei der nicht-permissiven Temperatur von 37°C getestet. Sowohl die in Abbildung 16D gezeigte Lyseeffizienz als auch die Synthese- und Bindungseffizienz von Nup2 waren effizient. In Abbildung 16C sind die entsprechenden Eluat- und Überstandsproben gezeigt. Zwischen den Proben, welche durch Zugabe von KCl gestresst wurden, und den ungestressten Zellen gab es keinen Unterschied bezüglich des SUMOylierungsmusters und der SUMOylierungseffizienz, was darauf hindeutet, dass die SUMOylierung in dieser Mutante nicht stressabhängig ist. Das SUMOylierungsmuster unterscheidet sich jedoch stark von dem in  $\Delta ulp2$ -Zellen. Während im  $\Delta ulp2$ -Stamm eine zusätzliche Bande auftrat, sind im *ulp1-133 ts*-Stamm wie auch schon im Wildtyp (Abbildung 13A) nur zwei Banden detektierbar, was auf eine geringere PolySUMOylierung hinweist. Zudem weisen die Ergebnisse für *ulp1-133 ts* auf eine erhöhte GrundSUMOylierung von Nup2 hin, welche nicht über Osmosestress induziert ist.



**Abbildung 16: In vivo-SUMOylierung von Nup2 in den DeSUMOylierungsmutanten *Δulp2* und *ulp1-133 ts*.** Der *Δulp2* Stamm (GSY1255) wurde mit den für 7HIS-SMT3 (pGS2036) sowie UBC9 (pGS2169) kodierenden 2 $\mu$ -Plasmiden und der *ulp1-133 ts* Stamm (GSY1257) mit dem für 6HIS-SMT3 (pGS2310) kodierenden Plasmid transformiert. Die Kultivierung erfolgte in kupferhaltigem (100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>) SD-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8.

Zur Kontrolle wurde der jeweilige Stamm ohne zusätzliche Plasmide sowie für  $\Delta ulp2$  mit je nur einem der beiden Plasmide mitgeführt. Anschließend wurde ein Teil der Zellen durch Zugabe von 1 M KCl 15 min lang einem Osmosestress unterzogen, während der andere Teil unbehandelt blieb. Die weitere Behandlung der Zellen sowie die Reinigung und Detektion erfolgte nach dem Standardprotokoll (Abbildung 13). Die Eluatproben wurden durch Inkubation mit Nup2-N-Primärantikörper sowie dem entsprechenden POD-gekoppelten (anti-Kaninchen) Sekundärantikörper analysiert. Die Analyse der Lyseproben erfolgte unter Verwendung der gleichen Antikörper, wobei noch ein weiterer Primärantikörper gegen Smt3 verwendet wurde, welcher ebenfalls mit POD-gekoppeltem Sekundärantikörper gegen Kaninchen detektiert wurde. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **A und C:** Eluatproben mit SUMOyliertem Nup2 (\*) sowie Überstandsproben zur Analyse des gesamten Nup2-Gehalts in den verschiedenen Proben. **B und D:** Synthese-, Lyse- und Bindungskontrolle von Nup2 und Smt3. Das Lysat wurde durch Zentrifugation getrennt in Überstand vor der Bindung (Ü) und Pellet (P) und der Durchfluss ist der Überstand nach der Bindung (DF). (Daten veröffentlicht in Folz *et al.*, 2019 (doi: 10.1242/jcs.224279.), Inhalt durch „Copyright Clearance Center, Inc.“ geschützt, <https://www.copyright.com>).

#### 4.1.7. Das Fehlen der MAP-Kinase Hog1 hat einen verstärkenden Einfluss auf die SUMOylierung von Nup2

Die über Mitogene aktivierte (MAP) Kinase Hog1 ist dafür bekannt, bei Osmosestress aktiv zu werden (Brewster *et al.*, 1993). Zudem ist bereits bekannt, dass das Fehlen von Hog1 einen Einfluss auf die Menge SUMOylierter Proteine in der Zelle hat (Abu Irqeba *et al.*, 2014). Der genaue Einfluss auf die SUMOylierung von Nup2 wurde wie auch für die anderen bereits getesteten Stämme über *in vivo*-SUMOylierungsversuche analysiert. In Abbildung 17B ist die Effizienz von Lyse und Bindung für diesen Versuch gezeigt. Die zugehörigen Eluate und Überstandsproben sind in Abbildung 17A zu sehen. Sowohl in den mit KCl gestressten Zellen mit *SMT3* allein als auch in Zellen mit *SMT3* und *UBC9* ist ein starkes SUMOylierungssignal, bestehend aus zwei Banden, für Nup2-Smt3 erkennbar. Die zusätzliche Anwesenheit von *UBC9* neben dem *SMT3*-Plasmid sorgt für ein stärkeres Signal an der unteren Bande, während die obere Bande sich nicht intensiviert, was dafürspricht, dass die Einfach- bzw. ZweifachSUMOylierung zunimmt, nicht aber die PolySUMOylierung. Ohne den durch Zugabe von KCl durchgeführten osmotischen Schock ist keine SUMOylierung von Nup2 erkennbar, ebenso wie auch in den Negativkontrollen ohne Plasmide.

Gleiches wurde ebenfalls in einem zweiten Experiment (Abbildung 17C und D) gezeigt, in welchem über eine Kinetik der zeitabhängige sowie stressabhängige Verlauf der SUMOylierung analysiert wurde. Hierzu wurden der mit *SMT3* und *UBC9* transformierte Stamm kultiviert. Es wurden Proben nach 5, 30 und 60 min KCl-Stress sowie eine unbehandelte Probe entnommen. Die zugehörigen Lyse-, Synthese- und Bindungskontrollen sind in Abbildung 17D dargestellt. Auch in diesem Versuch wurde ohne Zugabe von KCl keine SUMOylierung für Nup2 detektiert, während diese nach 5-minütiger Inkubation mit KCl anstieg. Während von 5 auf 30 min eine deutliche Zunahme der SUMOylierung erkennbar war, blieb das Level von 30 auf 90 min gleich, was darauf hindeutet, dass das Maximum an SUMOylierung nach maximal 30 min erreicht ist Abbildung 17C. Im Vergleich zum Wildtyp zeigen  $\Delta hog1$ -Zellen eine verstärkte, länger andauernde SUMOylierung von Nup2.

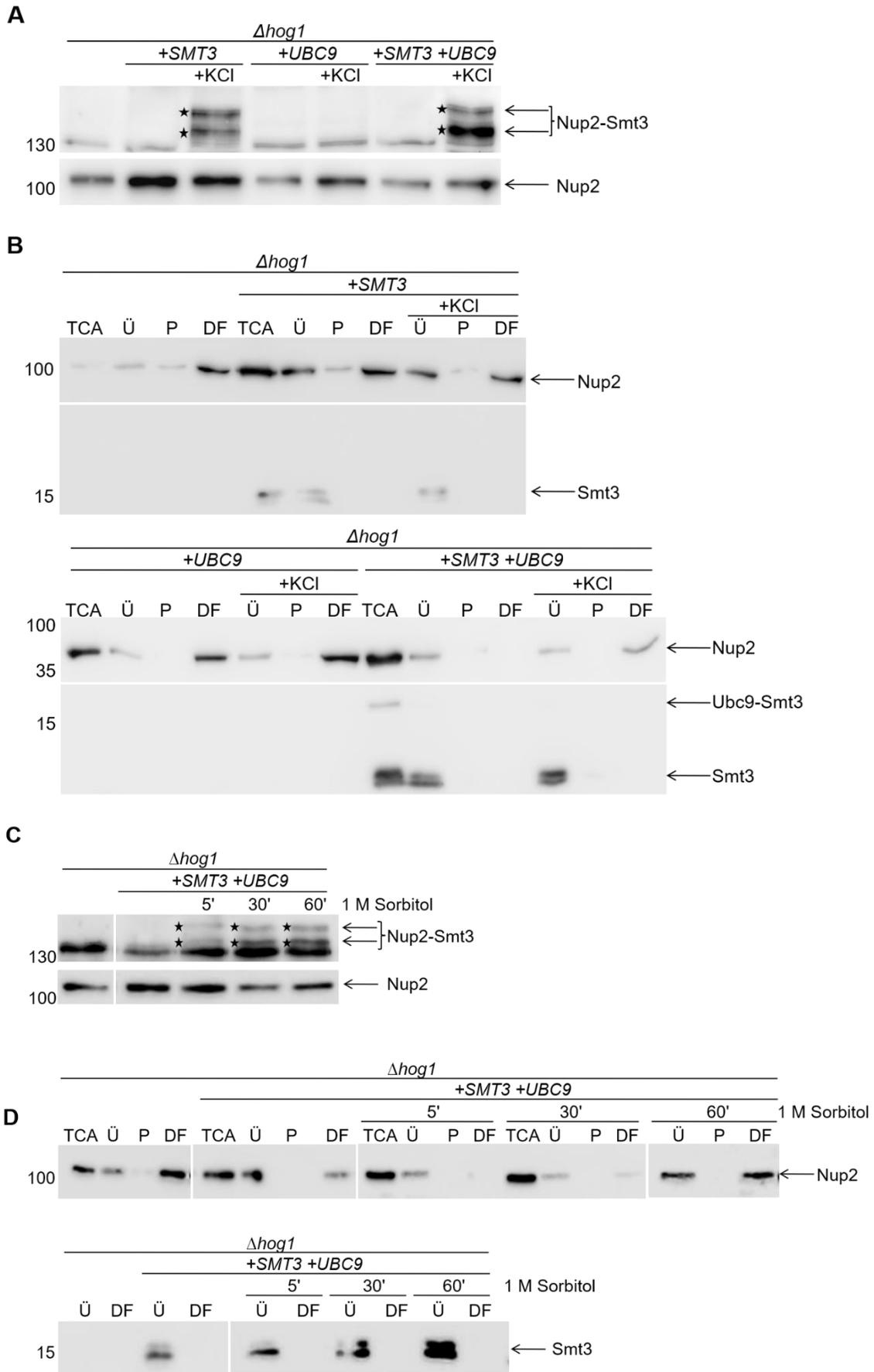
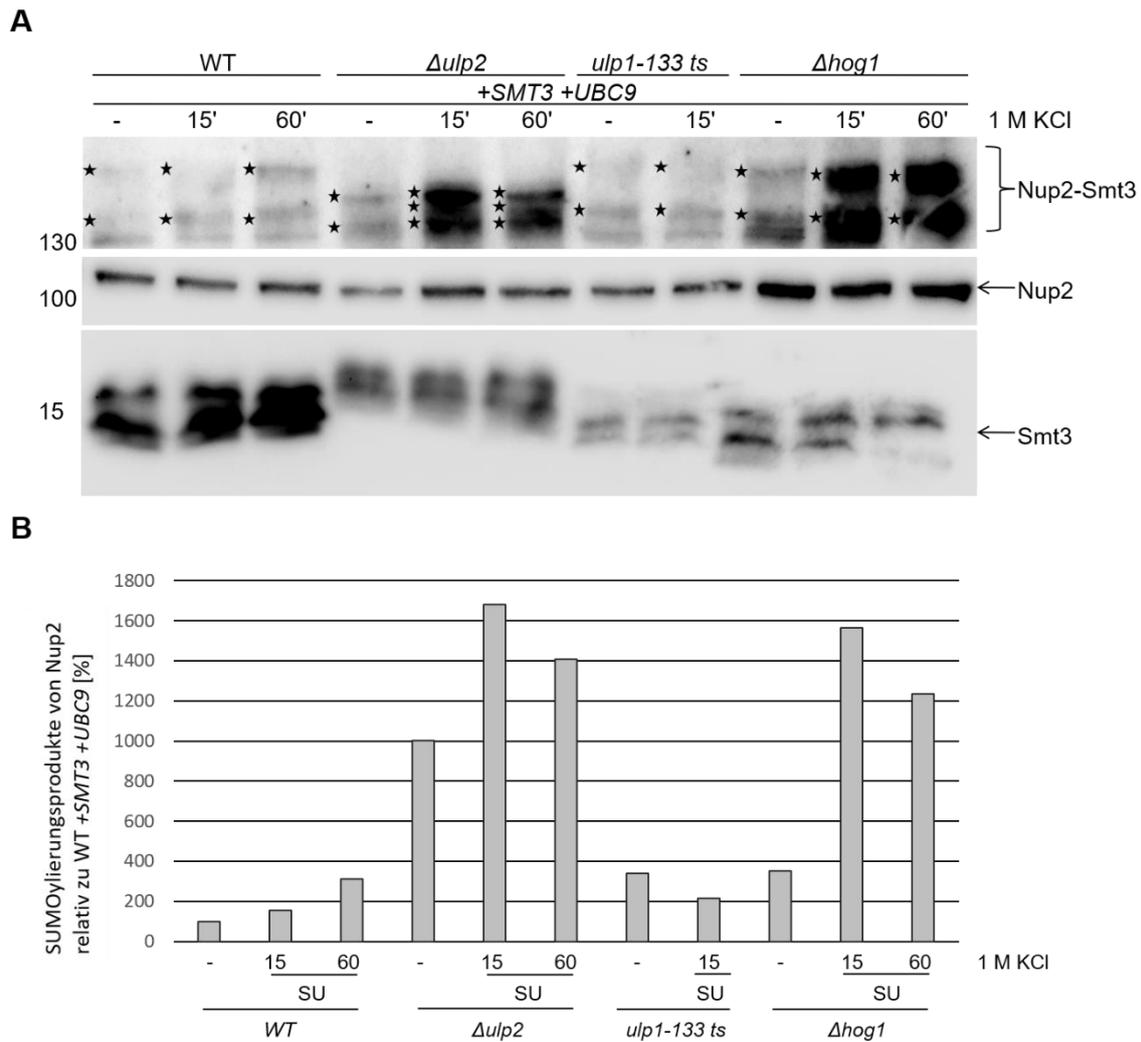


Abbildung 17: *In vivo*-SUMOylierung von Nup2 in Abwesenheit der MAP-Kinase Hog1.

Der  $\Delta hog1$ -Stamm (GSY1493) wurde mit den für *6HIS-SMT3* (pGS2310) sowie *UBC9* (pGS2169) kodierenden 2 $\mu$ -Plasmiden transformiert und in kupferhaltigem (100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>) SD-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 wachsen gelassen. Zur Kontrolle wurde der jeweilige Stammohne zusätzliche Plasmide sowie mit je nur einem der beiden Plasmide mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1 M KCl 15 min lang einem Osmosestress unterzogen (bei der Kinetik für 5, 30 und 60 min), bevor 50 OD-Einheiten der Zellen geerntet wurden. Die weitere Prozedur erfolgte wie in Abbildung 13 beschrieben. Die Eluatproben wurden durch Inkubation mit Nup2-N-Primärantikörper sowie dem entsprechenden POD-gekoppelten (anti-Kaninchen) Sekundärantikörper analysiert. Die Analyse der Lyseproben erfolgte unter Verwendung der gleichen Antikörper, wobei noch ein weiterer Primärantikörper gegen Smt3 verwendet wurde, welcher ebenfalls mit POD-gekoppeltem Sekundärantikörper gegen Kaninchen detektiert wurde. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **A und C:** Eluatproben mit SUMOyliertem Nup2 (\*) unter verschiedenen Stressbedingungen sowie Überstandsproben zur Analyse des gesamten Nup2-Gehalts in den verschiedenen Proben. **B und D:** Synthese-, Lyse- und Bindungskontrolle von Nup2 und Smt3. TCA entspricht dem Gesamtzelllysat. Das Lysat wurde durch Zentrifugation getrennt in Überstand vor der Bindung (Ü) und Pellet (P) und der Durchfluss ist der Überstand nach der Bindung (DF).

#### 4.1.8. Die SUMOylierung von Nup2 unterscheidet sich in den DeSUMOylierungs-mutanten sowie der $\Delta hog1$ -Mutante und dem Wildtyp in Muster und Intensität

Nachdem die verschiedenen Stämme einzeln betrachtet wurden, sollten sie in einem weiteren Versuch direkt miteinander verglichen werden. Hierzu wurden der Wildtyp sowie die Stämme *ulp1-133*,  *$\Delta ulp2$*  und  $\Delta hog1$  sowohl unbehandelt als auch nach 15- und 60-minütigem osmotischen Schock mit KCl untersucht. Für *ulp1-133* wurde keine Probe mit 60-minütigem Schock hergestellt, da sich in vorherigen Versuchen bereits gezeigt hat, dass die SUMOylierung auch nach länger anhaltendem Stress in diesem Stamm unverändert bleibt (nicht gezeigt). Der unbehandelte Wildtyp zeigt ein sehr schwaches SUMOylierungssignal, welches in der Auswertung (Abbildung 18B) auf 100 % gesetzt wurde. Nach 15 min stieg die detektierbare Menge an SUMOyliertem Nup2 und verdoppelte sich nochmals nach 60-minütigem osmotischem Schock. Die SUMOylierung von Nup2 in  *$\Delta ulp2$*  war in der unbehandelten Probe bereits gut sichtbar und nahm infolge des Stresses nochmals zu, jedoch verringerte sie sich von 15 auf 60 min osmotischem Schock leicht. Das SUMOylierungsmuster für Nup2 unterschied sich in diesem Stamm, wie in Abbildung 18A zu sehen, klar von dem der anderen Stämme, was anhand vorheriger Versuche auch schon ersichtlich war. Das SUMOylierungsniveau von Nup2 in der *ulp1-133 ts*-Mutante lag sowohl mit als auch ohne Stress in etwa gleich wie bei den für 60 min gestressten Wildtypzellen. Die  $\Delta hog1$ -Mutante zeigte ohne KCl eine SUMOylierungseffizienz, welche vergleichbar mit der des für 60 min gestressten Wildtyps war. Nach Zugabe von KCl nahm diese aber um etwa das fünffache zu und blieb auch nach 60 min osmotischem Schock auf einem vergleichbaren Niveau. Sowohl die GrundSUMOylierung als auch die stressinduzierte SUMOylierung von Nup2 ist in  $\Delta hog1$ - und  *$\Delta ulp2$* -Zellen um ein Vielfaches erhöht, wobei  $\Delta hog1$ -Zellen für die SUMOylierung von Nup2 eine höhere Stressabhängigkeit zeigen.



**Abbildung 18: Vergleich der SUMOylierungseffizienz in verschiedenen Stämmen.**

Der WT-Stamm (GSY170), die DeSUMOylierungsmutanten *ulp1-133 ts* (GSY1257) und  $\Delta$ ulp2 (GSY1255) sowie der  $\Delta$ hog1-Stamm (GSY1493) wurden mit den jeweiligen für 6HIS-SMT3 bzw. 7HIS-SMT3 (pGS2310, 2036, 2311) sowie UBC9 (pGS2169) kodierenden 2 $\mu$ -Plasmiden transformiert und in kupferhaltigem (100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>) SD-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 wachsen gelassen. Anschließend wurde ein Teil der Zellen durch Zugabe von 1 M KCl bis 15 min und 60 min lang einem osmotischen Schock unterzogen, bevor 50 OD-Einheiten der Zellen geerntet wurden. Die Zellen wurden wie in Abbildung 13 weiterbehandelt und analysiert. Die Eluat- und Überstandproben wurden durch Inkubation mit Nup2-N-Primärantikörper sowie dem entsprechenden POD-gekoppelten (anti-Kaninchen) Sekundärantikörper analysiert. Die Überstände wurden zudem mit Primärantikörper gegen Smt3 inkubiert, welcher ebenfalls mit POD-gekoppeltem Sekundärantikörper gegen Kaninchen detektiert wurde. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **A:** Eluatproben mit SUMOyliertem Nup2 (\*) sowie Überstandsproben zur Analyse des gesamten Nup2-Gehalts in den verschiedenen Proben sowie der Smt3-Synthese. **B:** Quantifizierung der SUMO-Produkte von Nup2 basierend auf dem Ausgangswert von 100 % im Wildtypstamm ohne Stressbedingung. Die Nup2-Gesamtmenge wurde einberechnet.

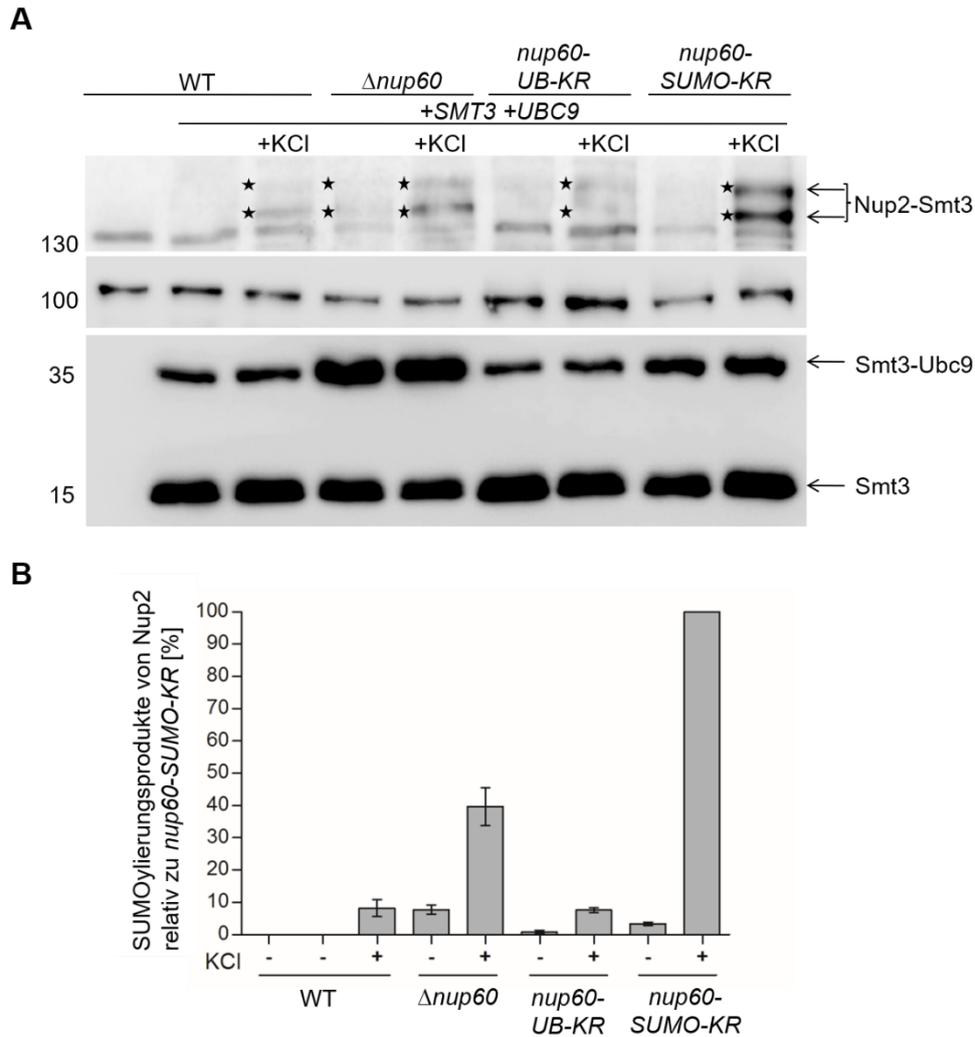
**4.1.9. Die SUMOylierung von Nup2 wird nicht nur durch die Abwesenheit von Nup60 beeinflusst, sondern zeigt noch stärkere Effekte in der NUP60-SUMO-KR-Mutante**

Für Nup60 wurde bereits in Nino *et al.* (2016) gezeigt, dass es sowohl SUMOyliert als auch ubiquitiniert wird. Da Nup60 das Nukleoporin ist, welches maßgeblich an der Lokalisation von Nup2 beteiligt ist (Denning *et al.*, 2001), stellt sich die Frage, wie die Abwesenheit sowie

Veränderungen in der posttranslationalen Modifikation dieses Proteins einen Einfluss auf die SUMOylierung von Nup2 haben. Um dies zu testen, wurden neben dem *nup60 knockout* die in Nino *et al.* (2016) beschriebenen mutierten *NUP60*-Stämme mit *6HIS-SMT3*- und *UBC9*-Plasmiden transformiert, um die SUMOylierung von Nup2 zu untersuchen. Die Zellen wurden unbehandelt oder nach Inkubation mit 1 M KCl geerntet, mechanisch aufgeschlossen und nach Bindung an Ni-NTA-Agarose immunologisch analysiert. In Abbildung 19A sind die Eluate von  $\Delta nup60$ , dem Wildtyp sowie den KR-Mutanten abgebildet. Die  $\Delta nup60$ -Mutante ohne Stressbehandlung oder mit osmotischem Schock zeigt ein höheres SUMOylierungsniveau, welches im Vergleich zu den KR-Mutanten und dem Wildtyp weniger stressabhängig erscheint. Im Wildtyp sowie in dem Stamm mit der nicht ubiquitinierbaren Version von Nup60 ist das Level an SUMOyliertem Nup2 ebenso wie auch die stressabhängige Zunahme der SUMOylierung von Nup2 nach dem osmotischen Schock in etwa vergleichbar. Der Stamm mit der nicht mehr SUMOylierbaren Version von Nup60 zeigt ebenfalls ein stressabhängiges SUMOylierungsmuster, welches jedoch wesentlich auffälliger ist. Die Gesamtmenge an Nup2 sowie an Smt3 wurde anhand von Überstandsproben überprüft, wie in Abbildung 19A gezeigt ist. Zudem wurden mehrere Versuche quantifiziert und miteinander verglichen, um den in der *NUP60-SUMO-KR*-Mutante gesehenen Effekt eindeutig zu belegen.

Dieses Experiment zeigt, dass die SUMOylierung von Nup2 in den *NUP60-KR*-Mutanten nicht dem Muster des *knockouts* entspricht. Die nicht mehr ubiquitinierbare Nup60-Mutante verhält sich wie der Wildtyp und die SUMOylierung steigt stressabhängig. Die SUMOylierung von Nup2 in der nicht mehr SUMOylierbaren Nup60-Mutante entspricht zwar in ihrer Stressabhängigkeit der des Wildtyps und der *NUP60-UB-KR*-Mutante, zeigt jedoch einen etwa 10-mal höheren SUMOylierungsgrad nach dem osmotischen Schock (Abbildung 19B).

Die SUMOylierung von Nup2 wird durch die Abwesenheit seines Interaktionspartners Nup60 unabhängig von Osmosestress sowie durch dessen verhinderte SUMOylierung abhängig von Osmosestress begünstigt.



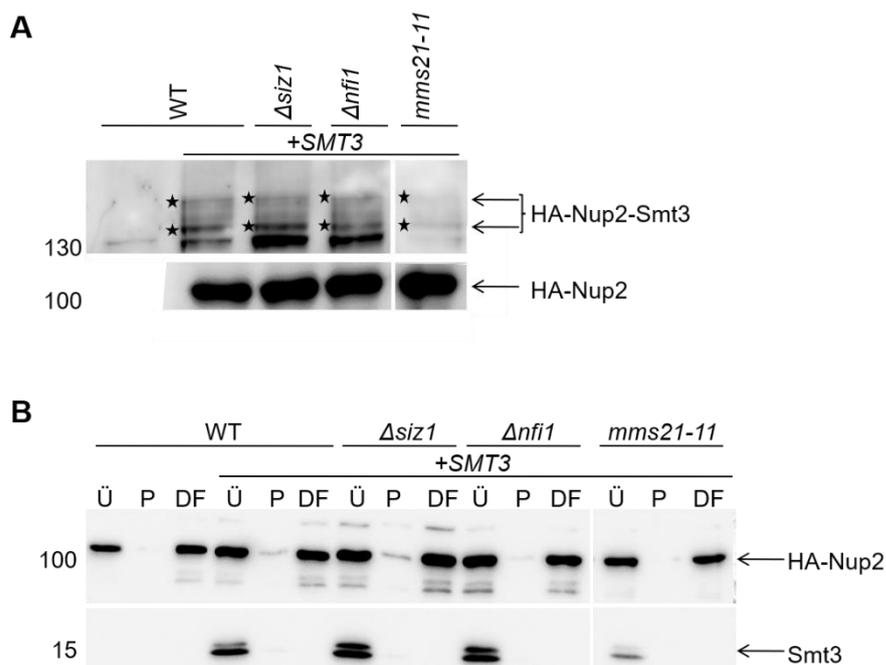
**Abbildung 19: *In vivo*-SUMOylierung von Nup2 in Abwesenheit von Nup60 sowie in Anwesenheit von Nup60-KR-Mutanten.**

Der Wildtypstamm (GSY170), der  $\Delta nup60$ -Stamm (GSY1386) sowie die *NUP60-UB-KR*-Mutante (GSY1499) und die *NUP60-SUMO-KR*-Mutante (GSY1500) wurden mit den für *6HIS-SMT3* (pGS2310) sowie *UBC9* (pGS2169) kodierenden 2 $\mu$ -Plasmiden transformiert und in kupferhaltigem (100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>) SD-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 wachsen gelassen. Zur Kontrolle wurde der Wildtypstamm ohne zusätzliche Plasmide mitgeführt. Anschließend wurde je ein Teil der Zellen durch Zugabe von 1 M KCl 15 min lang einem Osmosestress unterzogen, bevor 50 OD-Einheiten geerntet wurden. Der Nachweis der *in vivo*-SUMOylierung erfolgte nach den in Abbildung 13 beschriebenen Standardbedingungen. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **A:** Eluatproben mit SUMOyliertem Nup2 (\*) unter verschiedenen Stressbedingungen sowie Überstandsproben zur Analyse des gesamten Nup2- sowie Smt3-Gehalts in den verschiedenen Proben. **B:** Quantitative Auswertung von 4 Wiederholungen des Versuchs und Analyse relativ zum Nup2-Smt3-Gehalt in der *nup60-SUMO-KR*-Mutante nach Behandlung mit KCl (auf 100 % gesetzt) unter Einbezug der Gesamtmenge von Nup2 im Überstand (Daten veröffentlicht in Folz *et al.*, 2019 (doi: 10.1242/jcs.224279), Inhalt durch „Copyright Clearance Center, Inc.“ geschützt, <https://www.copyright.com>).

#### 4.1.10. Die SUMOylierung von Nup2 erfolgt nicht über eine einzelne E3-Ligase

Meist wird die SUMOylierung einzelner Proteine über bestimmte E3-Ligasen begünstigt, was anhand von *in vivo*-SUMO-Bindungsversuchen in verschiedenen E3-Mutanten gezeigt werden kann. Aus diesem Grund wurden die E3-Mutanten  $\Delta siz1$ ,  $\Delta siz2$  sowie die temperatursensitive Mutante *mms21-1* mit einem für *SMT3* kodierenden Plasmid transformiert. Zudem wurde aufgrund der geringen endogenen Nup2-Menge noch *NUP2-HA* in die Zellen eingebracht. Wie

in Abbildung 20B gezeigt, waren sowohl die Lyse als auch die Synthese und die Reinigung effizient. Die Smt3-Synthese im *mms21*-Stamm war etwas niedriger, aber dennoch gut detektierbar und über dem endogenen Niveau. Sowohl im Wildtyp als auch in den  $\Delta$ *siz1*- bzw.  $\Delta$ *siz2*-Zellen sind Banden, welche auf SUMOyliertes Nup2 hindeuten, erkennbar (Abbildung 20A). Die Bande bei etwa 140 kDa in der  $\Delta$ *siz1*-Mutante erscheint trotz gleicher Nup2-HA Menge in der Lyse etwas stärker als in Wildtyp und  $\Delta$ *siz2*. Im *mms21*-Stamm sind ebenfalls auf gleicher Höhe Banden zu erkennen, welche jedoch wesentlich schwächer erscheinen. Neben den weniger intensiven Banden des SUMOylierten Nup2 ist aber auch die unspezifische Bande bei etwa 130 kDa nicht zu sehen, was darauf hindeutet, dass die Probe im Ganzen etwas schwächer konzentriert ist. Dieser Versuch wurde auch unter Verwendung der  $\Delta$ *cst9*-Mutante durchgeführt (nicht gezeigt). Aber auch in dieser Mutante konnte eine klare SUMOylierung von Nup2 detektiert werden. Die in allen getesteten E3-Stämmen gut detektierbare SUMOylierung von Nup2 lässt darauf schließen, dass nicht nur eine E3-Ligase allein für die SUMO-Modifikation von Nup2 verantwortlich ist.

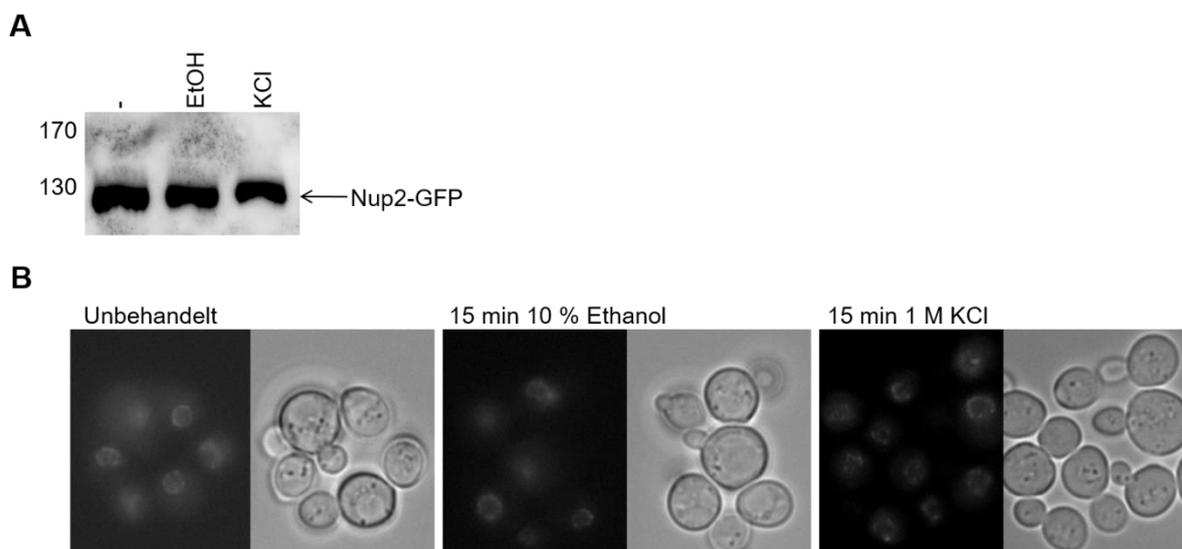


**Abbildung 20: In vivo-SUMOylierung von Nup2 in verschiedenen E3-Mutanten.**

Die verschiedenen E3-Mutanten  $\Delta$ *siz1* (GSY1427),  $\Delta$ *siz2* (GSY1428) und *mms21-11* *ts* (GSY1366) sowie der zugehörige Wildtypstamm (GSY1426) wurden mit dem für *7HIS-SMT3* (pGS2036) kodierenden 2 $\mu$ -Plasmid sowie einem für *NUP2-HA* (pGS2010) kodierenden Plasmid transformiert und in kupferhaltigem (100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>) SD-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 wachsen gelassen. Zur Kontrolle wurde der Wildtypstamm ohne *SMT3*-Plasmid, aber mit *NUP2-HA*-Plasmid mitgeführt. Anschließend wurden 50 OD-Einheiten der Zellen geerntet. Die weitere Behandlung erfolgte unter Standardbedingungen (Abbildung 13). Die Eluatproben wurden durch Inkubation mit HA-Primärantikörper sowie dem entsprechenden POD-gekoppelten (anti-Maus) Sekundärantikörper analysiert. Die Analyse der Lyseproben erfolgte unter Verwendung der gleichen Antikörper, wobei noch ein zweiter Primärantikörper gegen Smt3 verwendet wurde, welcher mit dem entsprechenden POD-gekoppelten (anti-Kaninchen) Sekundärantikörper detektiert wurde. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links angegeben. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **A:** Eluatproben mit SUMOyliertem Nup2 (\*) unter verschiedenen Stressbedingungen sowie Überstandsproben zur Analyse des gesamten Nup2-Gehalts in den verschiedenen Proben. **B:** Synthese-, Lyse- und Bindungskontrolle von Nup2 und Smt3. Das Lysat wurde durch Zentrifugation getrennt in Überstand vor der Bindung (Ü) und Pellet (P) und der Durchfluss ist der Überstand nach der Bindung (DF).

#### 4.2. Osmotischer Schock und Ethanolstress haben keinen Einfluss auf die Lokalisation von Nup2

Nachdem gezeigt wurde, dass die SUMOylierung von Nup2 nach osmotischem Stress verstärkt ist, sollte überprüft werden, ob sich infolgedessen die Lokalisation von Nup2 ändert. Hierzu wurde der *NUP2-GFP* Stamm in synthetischem Vollmedium kultiviert und für 15 min mit 10 % Ethanol oder 1 M KCl behandelt. Zudem wurde eine Kontrollprobe vor der Behandlung entnommen. GFP-markiertes Nup2 wurde fluoreszenzmikroskopisch detektiert und analysiert. Sowohl die unbehandelten als auch die gestressten Zellen zeigten, wie in Abbildung 21B zu sehen, ein einheitliches Fluoreszenzsignal an der Kernhülle. In Abbildung 21A ist der dazugehörige mit GFP-Antikörper dekorierte Westernblot abgebildet, welcher in allen drei Proben ein einheitliches Signal für Nup2-GFP zeigt. Aufgrund der unveränderten Lokalisation wurde darauf verzichtet, die SUMO-Mutante zu mikroskopieren, da hier kein Effekt zu erwarten war.



**Abbildung 21: Die Lokalisation von Nup2-GFP nach Osmosestress.**

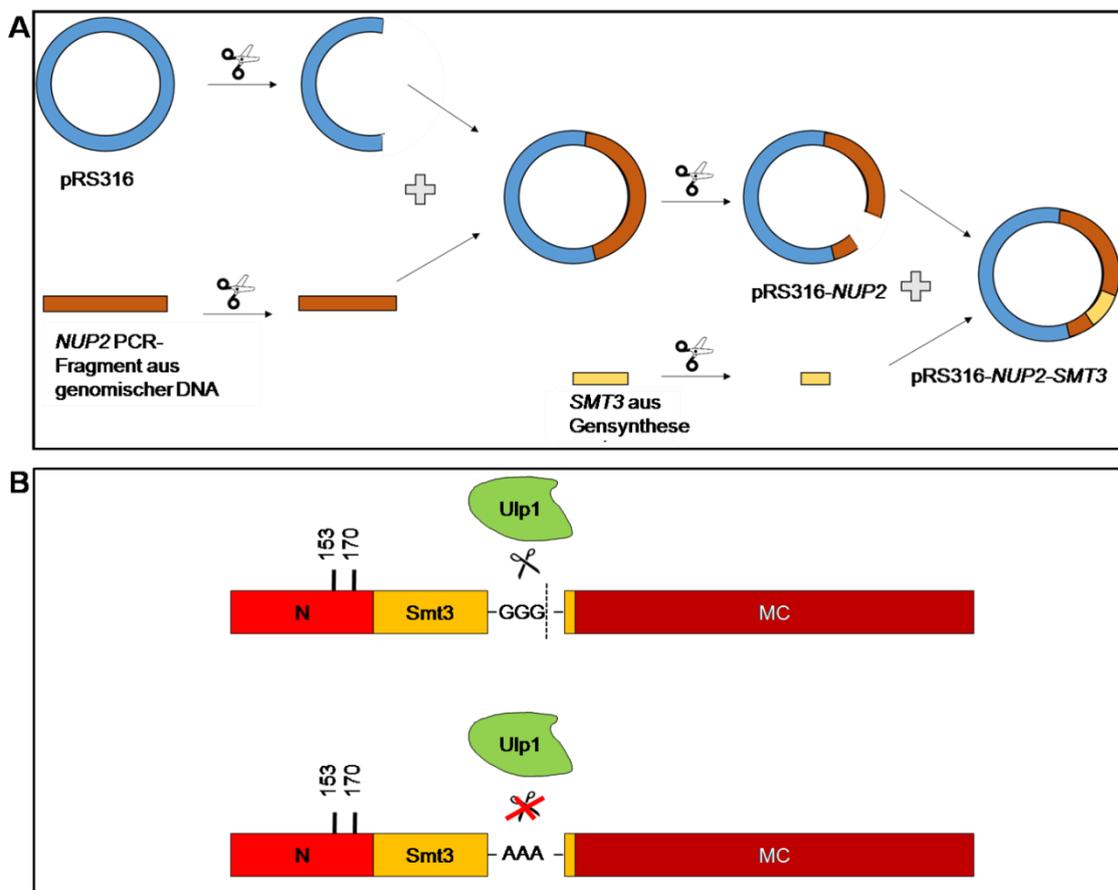
Der Nup2-GFP-Stamm (GSY1539) wurde in synthetischem Vollmedium kultiviert und anschließend durch Zugabe von 10 % Ethanol bzw. 1 M KCl 15 min gestresst, bevor die Lokalisation von Nup2-GFP analysiert wurde. **A:** Gesamtzelllysate der mikroskopierten Proben. Die Proteine wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Detektion wurde ein GFP-Primärantikörper verwendet sowie ein POD-gekoppelter Sekundärantikörper (anti-Kaninchen). Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **B:** Die Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch analysiert und zusätzlich mit Differentialinterferenzkontrast (DIC) dokumentiert.

#### 4.3. Die Fusion von Smt3 an den N-Terminus von Nup2 hat keinen Einfluss auf dessen Lokalisation sowie den NLS-Import

Nachdem keine Lokalisationsänderungen von Nup2 nach stressinduzierter SUMOylierung detektiert werden konnten, wurde ein Plasmid, welches für ein stabiles Nup2-Smt3 Fusionsprotein kodiert, hergestellt. Ziel war es, das Smt3-Protein so mit dem Nup2 zu

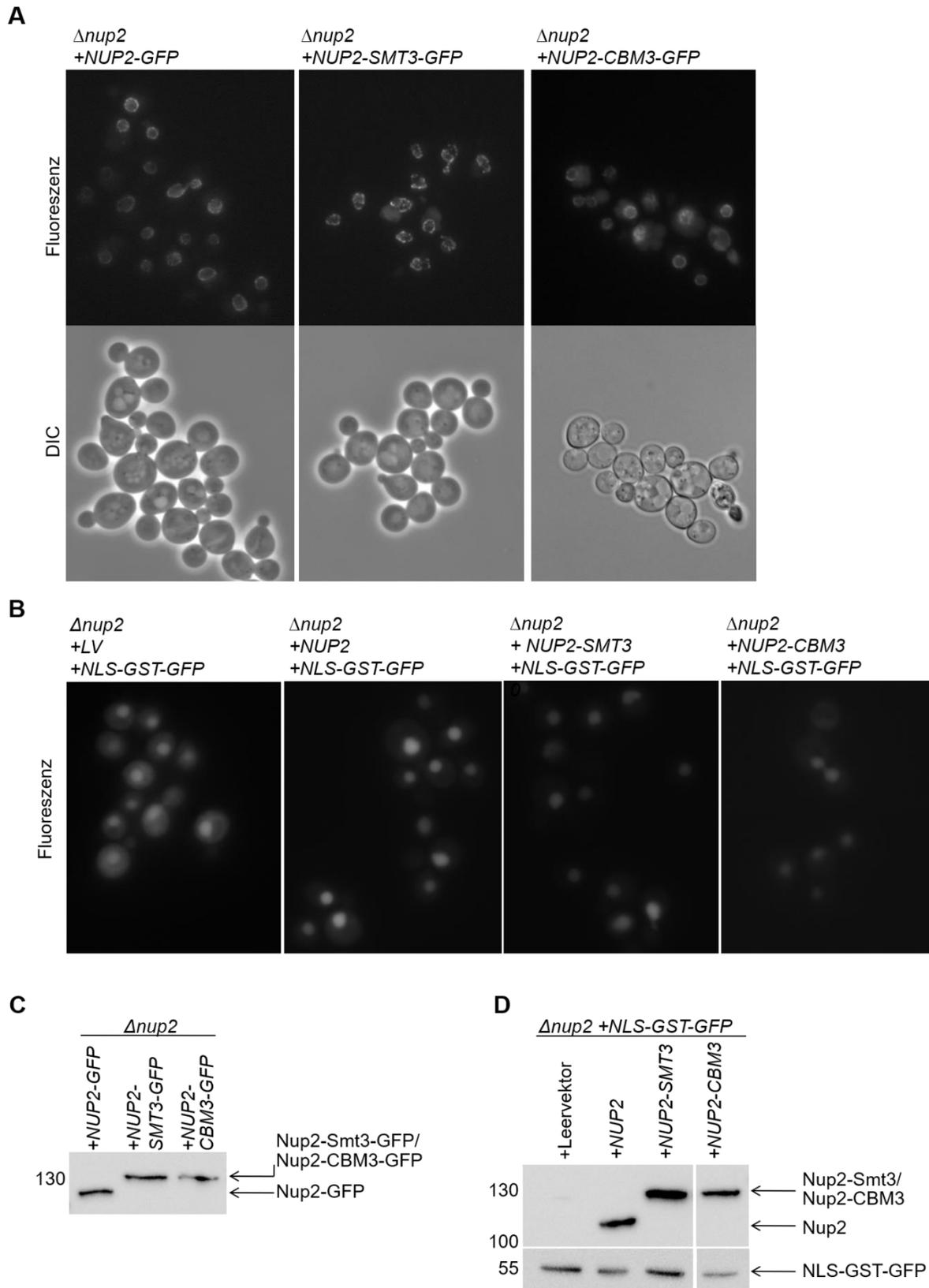
verbinden, dass es sich permanent ungefähr an der Position der SUMOylierungsstellen befindet.

Über Gensynthese wurde von der Firma *euofins* ein Plasmid für *SMT3* hergestellt, welches nach Behandlung mit Restriktionsenzymen in den ebenfalls mit diesen Enzymen vorbereiteten Vektor kloniert wurde. Über das hergestellte Plasmid wurde dann das Nup2-Smt3-Fusionsprotein synthetisiert. Zu beachten war hierbei, dass noch ein Basenaustausch, welcher zum Aminosäureaustausch führte, durchgeführt werden musste (Abbildung 22), da das inserierte *SMT3* noch die Glycin-Glycin-Spaltstelle enthielt, welche bei unreifem Smt3 als Schnittstelle für Ulp1 dient, wodurch aus unreifem Smt3 die reife Form prozessiert wird. In diesem Nup2-Smt3-Fusionsprotein führte dies dazu, dass es ohne die Aminosäureänderung in zwei Teile geschnitten wurde.



**Abbildung 22: Schematische Darstellung zur Herstellung des Nup2-Smt3-Konstrukts.**

**A:** Das pRS316-Plasmid (pGS43) wurde mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *BamHI* geschnitten, ebenso wie das gereinigte *NUP2*-Fragment, welches über PCR mit den Oligonukleotiden 903 und 1118 aus genomischer DNA amplifiziert wurde. Es folgte eine Ligation, welche zu dem *NUP2*-Plasmid (pGS2365) führte. Dieses Plasmid wurde ebenso wie auch das Gensyntheseprodukt für die *SMT3*-Integration (pGS2376) mit *SexAI* und *AgeI* geschnitten und miteinander ligiert, was zu dem *NUP2-SMT3*-Plasmid führte. Gleiches wurde auch für *NUP2-SMT3-GFP* durchgeführt, wobei hier nicht pRS316 (pGS43) als Ausgangsplasmid gewählt wurde, sondern das Plasmid pRS316-*NUP2-GFP* (pGS583), in welches *NUP2-GFP* schon inseriert war, weshalb nur noch das Gensyntheseprodukt (pGS2376) eingebaut werden musste. **B:** Vor der Herstellung des *NUP2-SMT3*-Plasmids wurde im Gensyntheseprodukt (pGS2356) über ortsspezifische Mutagenese mit den Oligonukleotiden 1120 und 1121 die Ulp1-Schnittstelle bestehend aus drei Glycinen zu Alaninen umgewandelt um zu vermeiden, dass das synthetisierte Nup2-Smt3 über Ulp1 in zwei Teile (N-Terminus mit Smt3 und MC-Terminus) separiert wird. Dieses daraus resultierende modifizierte Gensyntheseprodukt (pGS2376) wurde zur Herstellung des Plasmids verwendet.



**Abbildung 23: Lokalisation verschiedener Nup2-GFP Fusionsproteine und Analyse des NLS-Imports in Anwesenheit von Nup2-Fusionsproteinen.**

**A und C:** Der  $\Delta nup2$ -Stamm (GSY432) wurde entweder mit einem CEN-Plasmid transformiert, welches für *NUP2-GFP* (pGS583), *NUP2-SMT3-GFP* (pGS2379) oder *NUP2-CBM3-GFP* (pGS2385) kodiert. Die Zellen wurden in Selektivmedium kultiviert. **A:** Direkte Fluoreszenzmikroskopie intakter Zellen zur Analyse der Lokalisation von Nup2-GFP Fusionsproteinen sowie Nup2-GFP Fusionsproteinen mit Smt3 bzw. *CBM3* Integration hinter dem N-Terminus. Zur strukturellen Einteilung wurden die Zellen nochmals mit Differentialinterferenzkontrast (DIC)

dokumentiert. **C:** Gesamtzelllysat der analysierten Zellen. Nachdem die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert wurden, wurden sie mit einem Nup2-Primärantikörper sowie einem POD-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) analysiert.

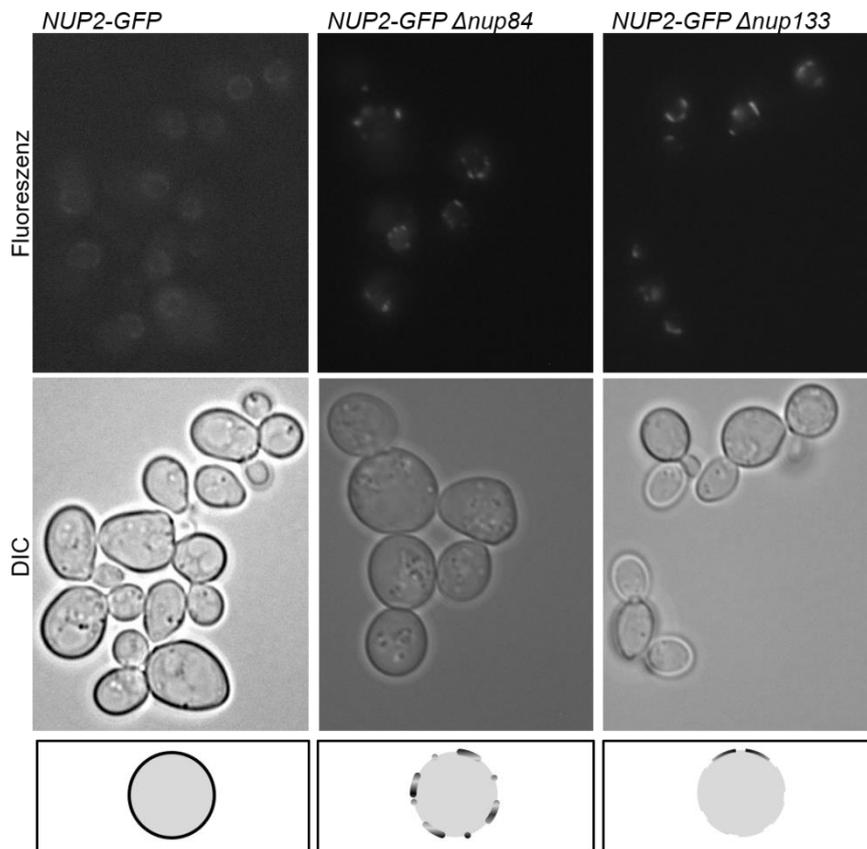
**B und D:** Der  $\Delta nup2$ -Stamm (GSY432) wurde entweder mit einem CEN-Plasmid transformiert, welches für *NUP2* (pGS2365), *NUP2-SMT3* (pGS2380) oder *NUP2-CBM3* (pGS2384) kodiert. Zudem wurde alle Stämme mit einem GAL-induzierbaren *NLS-GST-GFP*-Plasmid (pGS422) transformiert. Zur Kontrolle wurde der  $\Delta nup2$ -Stamm zudem mit dem zugehörigen Leervektor (pGS42) sowie dem *NLS-GST-GFP*-Plasmid transformiert. Die Zellen wurden in Selektivmedium kultiviert und vor der Analyse wurde das *NLS-GST-GFP*-Plasmid durch Zugabe von Galaktose induziert. **B:** Direkte Fluoreszenzmikroskopie intakter Zellen zur Analyse der Lokalisation von *NLS-GST-GFP* in Abwesenheit von Nup2 sowie in Anwesenheit von Nup2 oder Nup2-Fusionsproteinen. **D:** Gesamtzelllysat der analysierten Zellen. Nachdem die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert wurden, wurden sie mit einem Nup2-N- bzw. einem GFP-Primärantikörper sowie einem POD-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) inkubiert. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben.

Um zu zeigen, dass mögliche Effekte speziell auf der Smt3-Insertion und nicht auf einer Insertion an sich beruhen, wurde ein weiteres kleines Protein gesucht, welches in Größe und Charakteristik Smt3 ähnlich ist und aus einem anderen Organismus stammt. Bei dem ausgewählten Protein handelte es sich um die CBM3-Domäne des Cce1-Proteins aus *Clostridium cellulolyticum* (Ferdinand *et al.*, 2013), welches ebenso wie Smt3 in Nup2 inseriert wurde.

Wie in Abbildung 23A zu sehen, ändert sich die Lokalisation von Nup2 nicht, wenn es mit Smt3 fusioniert ist. Ebenso wie Nup2 allein sowie das mit der CBM-Domäne fusionierte Nup2 ist auch das Fusionsprotein Nup2-Smt3 an der Kernhülle bzw. genauer gesagt an der Kernpore lokalisiert, was dafürspricht, dass die Funktionalität des Proteins bezüglich seiner Lokalisation und somit seiner Interaktion mit Nup60 noch gegeben ist, was auch anhand von Bindungsversuchen belegt wurde (persönliche Mitteilung, Dr. Stefanie Caesar). Dies bedeutet jedoch auch, dass keine SUMO-spezifischen Effekte detektiert werden konnten. Die Synthese der GFP-markierten Fusionsproteine war, wie in Abbildung 23C zu sehen, auf gleichem Niveau wie Nup2-GFP, was eine mögliche Instabilität des Fusionsproteins ausschließt.

Um mögliche Änderungen im NLS-Import in Abhängigkeit von dem Nup2-Smt3-Fusionsprotein zu überprüfen, wurde der  $\Delta nup2$ -Stamm mit dem für *NUP2* bzw. für das jeweilige Nup2-Fusionsprotein kodierenden Plasmid sowie einem für *GFP-GST-NLS* kodierenden Plasmid transformiert und der Import des NLS-Reporters analysiert. Die in Abbildung 23D gezeigten Westernblots zeigen, dass die Synthese in den untersuchten Zellen vergleichbar war. Wie in Abbildung 23B dargestellt, zeigt die mitgeführte Negativkontrolle Defizite im NLS-Import, was sich in einer partiellen Misslokalisierung des NLS-Proteins zeigt. In den untersuchten Hefen, welche Nup2 in seiner wildtypischen oder in einer fusionierten Form enthalten, konnten keine Unterschiede festgestellt werden, woraus sich schließen lässt, dass das Fusionsprotein sowohl mit Smt3 als auch mit der CBM-Domäne weder einen negativen noch einen positiven Einfluss auf den NLS-Import hat. Somit hat die permanente SUMOylierung von Nup2, welche in diesem Versuch über Fusion eines Smt3-Proteins imitiert wurde, keinen Einfluss auf den cNLS-Import sowie die Lokalisation von Nup2.

#### 4.4. Die Lokalisation von Nup2 ändert sich nicht in Abwesenheit der Komponenten des Y-Komplexes Nup84 und Nup133



**Abbildung 24: Lokalisation von Nup2-GFP in den Mutanten des Y-Komplexes  $\Delta nup84$  und  $\Delta nup133$ .** Der  $\Delta nup84$ -Stamm (GSY1513) sowie der  $\Delta nup133$ -Stamm (GSY1514) und der dazugehörige Wildtyp (GSY1512) wurden mit einem für *NUP2-GFP* kodierenden Plasmid transformiert, in Selektivmedium kultiviert und anschließend die Lokalisation des Nup2-GFP-Konstrukts mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie in intakten Zellen analysiert. Zur strukturellen Einteilung wurden die Zellen nochmals mit Differentialinterferenzkontrast (DIC) dokumentiert. Zudem wurde eine schematische Darstellung zur genaueren Abbildung der Lokalisation von Nup2-GFP hinzugefügt.

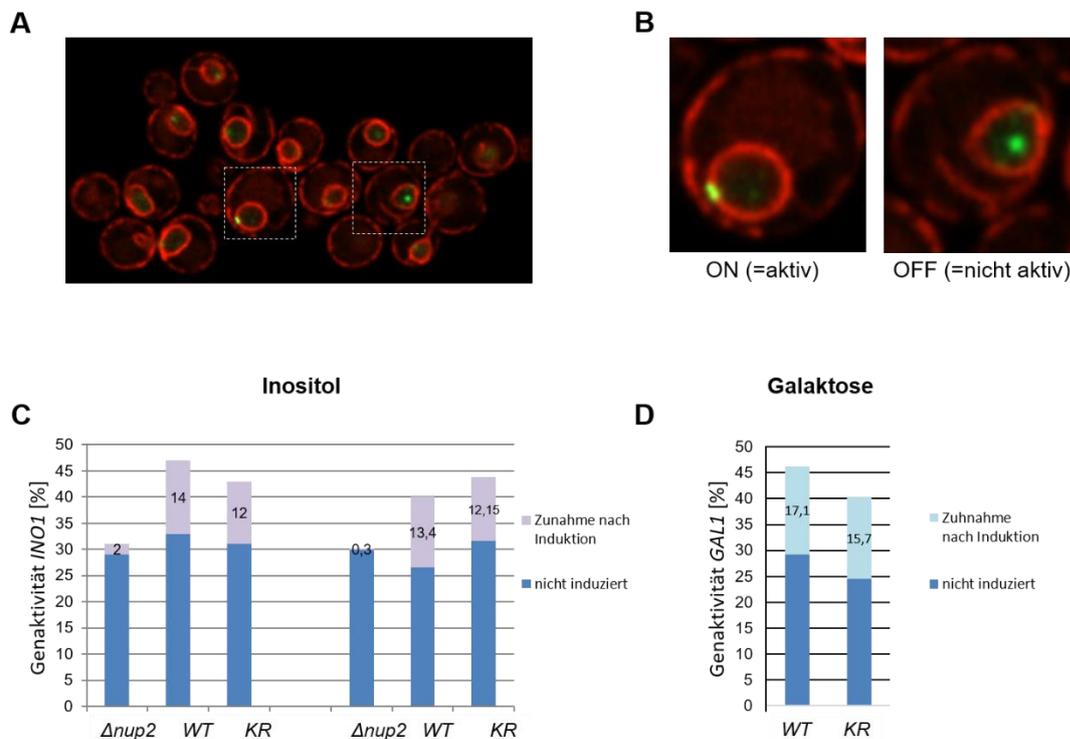
In Nino *et al.* (2016) wurde gezeigt, dass Nup60 in der  $\Delta nup84$ -Mutante teils misslokalisiert ist und sich nicht nur an der Kernpore, sondern auch im Nukleoplasma befindet. Zudem wurde eine begünstigte Interaktion von Nup84 und der ubiquitinierten Form von Nup60 gezeigt. Aufgrund der Interaktion und der gegenseitigen Stabilisierung und Lokalisation wurde diese Analyse auch für Nup2 durchgeführt (Abbildung 24). Als Kontrolle wurde die Lokalisation von Nup2-GFP im Wildtyp untersucht, welche sich in einer Ringstruktur an der Kernhülle zeigt (Loeb *et al.*, 1993; Hood *et al.*, 2000; Solsbacher *et al.*, 2000). Für die Mutanten des Y-Komplexes  $\Delta nup84$  und  $\Delta nup133$  wurde bereits beschrieben, dass es zu einer räumlichen Anhäufung, dem so genannten *clustering*, der Kernporenkomplexe kommt (Palancade *et al.*, 2007), weshalb auch das Signal von Nup2-GFP nicht mehr als eine Ringstruktur, sondern als gehäufte Punkte an der Kernhülle in diesen Stämmen zu erkennen ist. Im Gegensatz zu dem in Nino *et al.* (2016) beschriebenen Effekt in  $\Delta nup84$  ließ sich jedoch keine Misslokalisation

von Nup2 nachweisen, auch wenn Nup2 über Nup60 an die Kernhülle gebunden ist (Denning *et al.*, 2001).

#### **4.5. Die SUMOylierbarkeit von Nup2 hat keinen Einfluss auf die Aktivität der chromosomalen Loci *GAL1* und *INO1***

In Brickner *et al.* (2007) wurde gezeigt, dass Nup2 einen Einfluss bei der Aktivierung bzw. Rekrutierung der chromosomalen Loci *GAL1* und *INO1* hat, da es für deren Anbindung an die nukleäre Peripherie und die Inkorporation des Histons H2A.Z mit verantwortlich ist. Mit den vom Brickner Labor zur Verfügung gestellten Stämmen und Plasmiden sollte dieser Versuch unter Verwendung der nicht mehr SUMOylierbaren Version von Nup2 analysiert werden, um einen möglichen Einfluss der SUMOylierung zu überprüfen. Die vom Brickner Labor zur Verfügung gestellten  $\Delta nup2$ -Stämme mit integriertem LacI/LacO-System für *INO1* bzw. *GAL1* wurden mit einem für mCherry-*HEH2/L-TM* kodierenden Integrationsplasmid transformiert. Diese Ausgangsstämme ohne Nup2 dienten als Negativkontrolle, da  $\Delta nup2$ -Zellen eine deutlich verringerte periphere Lokalisation von *INO1* und *GAL1* zeigen. Transformiert mit einem für *NUP2* kodierenden Plasmid fungierten sie als Positivkontrolle und die mit *NUP2-2xKR* transformierten Zellen waren die zu vergleichenden Zellen. Die Zellen wurden in Selektivmedium verdünnt und über Nacht bei 30°C kultiviert. Eine Dichte von 0,5 sollte nicht überschritten werden, da die Signale der Zellen bei einer zu hohen optischen Dichte diffus wurden, auch wenn sie nochmals verdünnt wurden. Bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,1 wurden die Zellen sofort verwendet, bei einer höheren OD<sub>600</sub> hingegen wurden sie nochmals stark verdünnt und weiter kultiviert. Die Zellen wurden bei 1535 x g zentrifugiert, in H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend die eine Hälfte in dem zuvor verwendeten Selektivmedium aufgenommen. Ein Teil der *LacO::INO1*-Zellen wurde in inositolfreiem Medium aufgenommen, um sie durch den Inositolmangel zu aktivieren. Eine Änderung der Kohlenstoffquelle von Glukose zu Galaktose führt bei *LacO::GAL1*-Zellen zu einer Induktion von *GAL1*. Unbehandelte Zellen wurden sofort mikroskopisch analysiert, während die anderen noch für 1 bis 2 Stunden weiter bei 30°C inkubiert und erst danach mikroskopisch analysiert wurden Abbildung 25A. Um einen genauen Überblick über den Zellkern und den über GFP markierten Gen-Locus zu gewinnen, wurden Aufnahmen durch den gesamten Zellkern in einem Abstand von 0,3 µm gemacht. Hierzu wurden einerseits das über GFP markierte Gen sowie die über mCherry markierte *Heh2/L-TM*-Domäne analysiert, welche die äußere Hülle des Zellkerns sichtbar macht (Meinema *et al.*, 2011; Lokareddy *et al.*, 2015). Pro Stamm und Bedingung wurden jeweils mindestens 80 Zellen analysiert und ausgewertet, wobei wie in Abbildung 25B zu sehen zwischen aktiven und inaktiven Genen unterschieden wurde. Nicht eindeutig auswertbare Zellen wurden meist als inaktiv gewertet, was zu einer recht geringen Zahl an aktiven Zellen nach Induktion führte. Dennoch zeigte sich eine Erhöhung der Anzahl aktiver Zellen nach

Induktion, wenn Nup2-WT vorhanden war. Ohne Nup2 hingegen erhöhte sich der Wert aktiver Zellen nach Induktion nicht und blieb bei etwa 30 %. Dieser Grundwert an aktiv gewerteten Zellen entsteht durch zufällige räumliche Nähe des über GFP sichtbar gemachten Gens an der Peripherie und wurde auch bereits bei Brickner, unter anderem auch mit nichtinduzierbaren Genen wie *URA3*, beschrieben (Brickner *et al.*, 2007) (Auch in dieser Arbeit bestätigt, Daten nicht gezeigt für *URA3*). Die Zellen mit *NUP2-2xKR* verhalten sich wie die Zellen mit *NUP2-WT* und es werden nach Induktion ebenfalls in etwa 13 % mehr aktive Zellen gezählt. Diese Zunahme ist relativ gering, wurde jedoch anhand mehrerer Versuche für beide Gene bestätigt (Abbildung 25C und D). Somit wurde gezeigt, dass die SUMOylierung von Nup2 keinen Effekt auf die Aktivität chromosomaler Loci besitzt, da im Gegensatz zu  $\Delta nup2$ -Zellen die Lokalisation und somit die Genaktivität in der nicht mehr SUMOylierbaren Mutante vergleichbar mit dem Wildtyp ist.

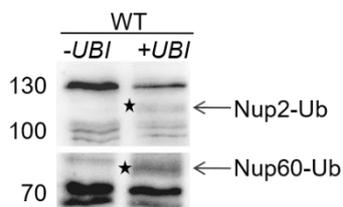


**Abbildung 25: Nup2-abhängige Aktivitätsbestimmung der chromosomalen Loci *INO1* und *GAL1* mittels Fluoreszenzmikroskopie.**

Die  $\Delta nup2$  Hefestämme mit LacO::*INO1* (GSY1536) bzw. LacO::*GAL1* (GSY1538), welche zudem LacI-GFP sowie mCherry-markiertes Heh2-L-TM enthalten, wurden mit Plasmiden transformiert, welche für *NUP2* bzw. *NUP2-2xKR* kodieren, und bis zu einer OD<sub>600</sub> von maximal 0,2 in entsprechendem Selektivmedium mit Glukose kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde unbehandelt untersucht. Der andere Teil der LacO::*INO1*-Zellen wurde für 2 h weiter in Inositol-freiem Medium kultiviert. Bei den LacO::*GAL1*-Zellen wurde die Kohlenstoffquelle Glukose durch Galaktose ausgetauscht. Zur Analyse der Zellen wurden in Abständen von 0,3  $\mu$ m fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen durch den gesamten Zellkern gemacht (z-stack), wobei in jeder Ebene eine Aufnahme des GFP-Signals sowie des mCherry-Signals gemacht wurde. Beide Aufnahmen einer jeden Ebene wurden übereinander gelagert und konnten so ausgewertet werden. **A:** Ausschnitt einer Zellpopulation mit Zellen, welche aktiv für das zu untersuchende Gen sind, sowie auch inaktive Zellen. **B:** Ausschnitte aus A mit Beispielzellen für die zwei Aktivitätsstadien. **C und D:** Auswertung der Aktivitätszunahmen der verschiedenen Stämme nach der Induktion und Darstellung im Balkendiagramm. Der prozentuale Anteil der Zellen, der bereits ohne Induktion als aktiv gewertet wurde, ist blau dargestellt. Das Grundlevel der peripheren Lokalisation liegt auch bei nicht induzierbaren Genen bei ~30 % (Daten nicht gezeigt).

#### 4.6. Nup2 wird ebenso wie auch sein Interaktionspartner Nup60 ubiquitiniert

Nachdem von Nino *et al.* (2016) gezeigt wurde, dass Nup60 sowohl SUMOyliert als auch ubiquitiniert wird, sollte diese zweite posttranslationale Modifikation auch für Nup2 überprüft werden. Der hierzu verwendete Versuchsaufbau entspricht dem, der auch zum Nachweis der *in vivo*-SUMOylierung verwendet wurde. Eine kleine Abwandlung erfolgte lediglich durch die Zugabe von MG132 zum Lysepuffer, um den Abbau ubiquitiniertes Proteine durch Proteasen zu verhindern. Zudem wurden die zu untersuchenden Stämme zuvor mit einem Plasmid transformiert, welches für *6HIS-UBI* kodiert, um ebenso wie auch in den SUMOylierungsexperimenten modifizierte Proteine über Ni-NTA-Agarose reinigen zu können. Als Positivkontrolle wurde neben Nup2 auch Nup60 detektiert. Als Negativkontrolle wurde der nicht transformierte Ausgangsstamm mitgeführt, um die Bande des ubiquitinierten Nup2 zuordnen zu können. Abbildung 26 zeigt ein Experiment zum Nachweis der Ubiquitinierung von Nup2 und Nup60. Während Nup2 in Westernblots meist bei etwa 110 kDa detektiert wird, findet sich nach dem Reinigen der ubiquitinierten Proteine nach Detektion mit Antikörper gegen Nup2 eine Bande bei etwa 118 kDa. Nup60 hingegen läuft etwa auf einer Höhe von 70 kDa und wird in der Ubiquitinierungsprobe bei etwa 78 kDa detektiert, was in beiden Fällen einer Größenänderung von 8 kDa und somit einem gebundenen Ubiquitin (8,5 kDa) entspricht. Somit wurde die Monoubiquitinierung beider Proteine *in vivo* bestätigt.



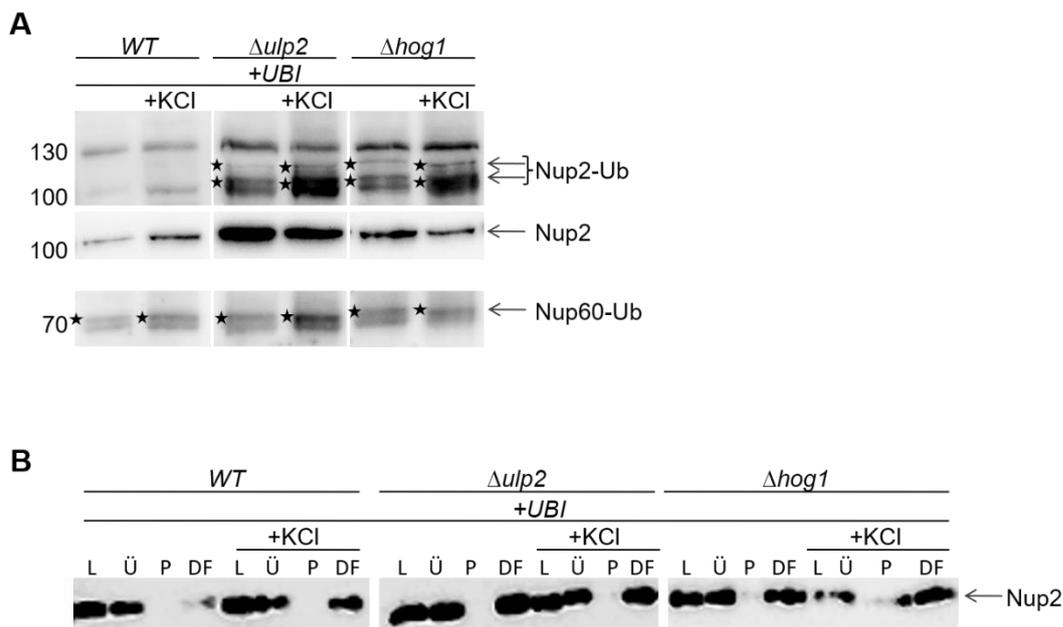
**Abbildung 26: *In vivo*-Ubiquitinierung von Nup2.**

Der Wildtyp-Stamm (GSY170), wurde mit dem für *6HIS-UBI* kodierenden 2 $\mu$ -Plasmid (pGS2308) transformiert und in kupferhaltigem (100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>) SD-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 wachsen gelassen. Zur Kontrolle wurde der Stamm ohne *UBI*-Plasmid mitgeführt. Anschließend wurden 50 OD-Einheiten der Zellen geerntet und wie bei der *in vivo*-SUMOylierung (Abbildung 13) weiter behandelt. Die Eluate wurden in einem 11 %-igen Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Eluatproben wurden durch Inkubation mit Nup2-N-Primärantikörper sowie dem entsprechenden POD-gekoppelten (anti-Kaninchen) Sekundärantikörper analysiert. Zur Kontrolle wurde der Blot auch mit Nup60-Antikörper inkubiert. Der Sekundärantikörper war in beiden Fällen der Gleiche. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben.

##### 4.6.1. Die Ubiquitinierung von Nup2 steigt infolge von osmotischem Stress an

Nachdem die Ubiquitinierung von Nup2 bestätigt wurde, wurden auch hier die Effekte in verschiedenen Stämmen und nach osmotischem Schock untersucht. Hierzu wurden die stresssensitiven Stämme  $\Delta$ *ulp2* und  $\Delta$ *hog1* sowie der Wildtyp mit *6HIS-UBI* transformiert. Das Ubiquitinierungsniveau von Nup2 ist ebenso wie auch bereits vorher für die SUMOylierung

gezeigt in  $\Delta ulp2$  und  $\Delta hog1$  im Vergleich zum Wildtyp stark erhöht. Zudem steigt auch die Ubiquitinierung nach dem osmotischen Stress leicht an. Die Ubiquitinierung von Nup2 im Wildtyp ist im Vergleich zu den beiden anderen Stämmen so schwach, dass sie wie in Abbildung 27A gezeigt nicht detektierbar war. Zudem ist anzumerken, dass in diesem Versuch nicht wie vorher nur eine einzige für Monoubiquitinierung sprechende Bande detektiert wurde, sondern eine Doppelbande. In Abbildung 27B sind die zugehörigen Lyseproben dargestellt. Die gleichen Eluate wurden auch mit Nup60-Antikörper analysiert, wobei in den verschiedenen Stämmen keine signifikanten Unterschiede im Ubiquitinierungslevel von Nup60 detektiert werden konnten. Auch war eine stressabhängige Ubiquitinierung für Nup60 nicht nachzuweisen, wie in Abbildung 27A dargestellt ist.

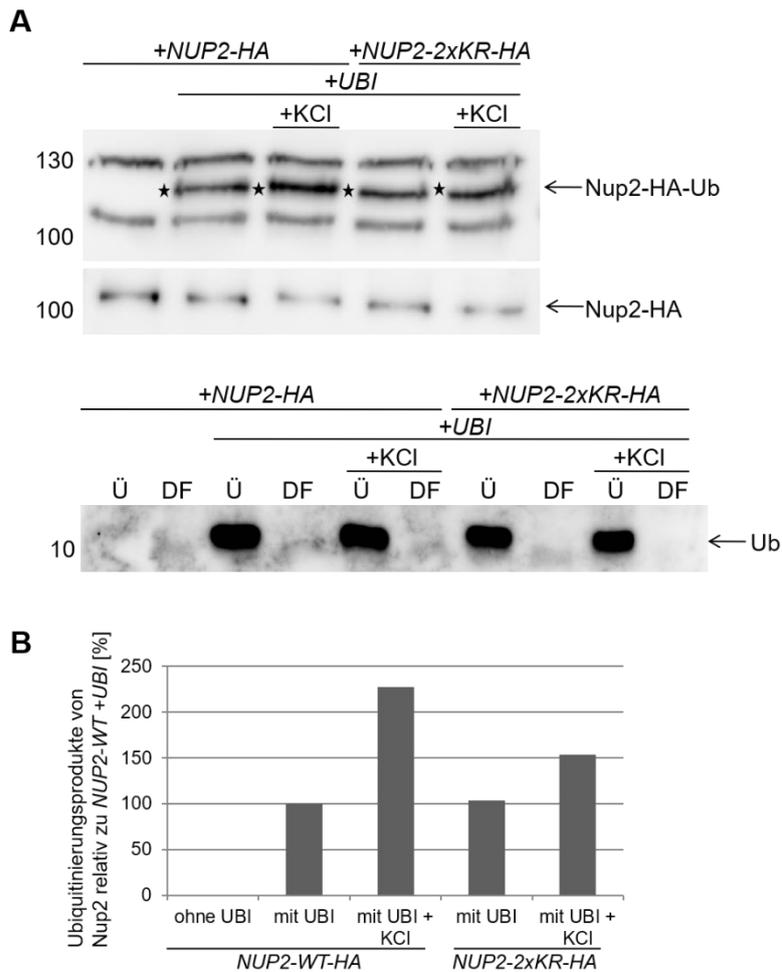


**Abbildung 27: Nachweis der *in vivo*-Ubiquitinierung in verschiedenen Stämmen unter Einfluss von osmotischem Stress.**

Der WT-Stamm (GSY170), die DeSUMOylierungsmutante  $\Delta ulp2$  (GSY1255) und der  $\Delta hog1$ -Stamm (GSY1493) wurden mit für *6HIS-UBI* (pGS2307; 2308) kodierenden 2 $\mu$ -Plasmiden transformiert und in kupferhaltigem (100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>) SD-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 wachsen gelassen. Ein Teil der Kultur wurde mit 1 M KCl 15 min lang einem osmotischen Schock ausgesetzt. Die Zellen wurden nach der in Abbildung 13 beschriebenen Prozedur weiterbehandelt. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **A:** Die Eluatproben sowie die Überstände wurden in einem 8 %-igen Gel aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran sowohl mit Antikörper gegen Nup2-N sowie die Eluate auch mit Antikörper gegen Nup60 inkubiert. POD-gekoppelte Sekundärantikörper aus Kaninchen wurde zur Detektion beider Primärantikörper verwendet. **B:** Lysekontrolle der Proben, welche ebenfalls mit Nup2-N-Antikörper und dem gleichen Sekundärantikörper analysiert wurde. Das Lysat (L) wurde durch Zentrifugation getrennt in Überstand vor der Bindung (Ü) und Pellet (P) und der Durchfluss ist der Überstand nach der Bindung (DF).

#### 4.6.2. Die SUMOylierungsstellen von Nup2 entsprechen unter normalen Wachstumsbedingungen nicht den Ubiquitinierungsstellen von Nup2

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der SUMOylierung und der Ubiquitinierung von Nup2 zu untersuchen, wurde die *NUP2-2xKR*-Mutante ebenfalls auf Ubiquitinierung überprüft. Aufgrund der Tatsache, dass die Ubiquitinierung von Nup2 im wildtypischen Stamm nur schwach zu detektieren war, wurde für den folgenden Versuch der Wildtyp mit einem Plasmid transformiert, welches zur Überexpression von *NUP2-HA* bzw. *NUP2-2x-SUMO-KR-HA* führt. Die Stämme wurden mit *6HIS-UBI* transformiert und anschließend die durch Bindung an Ni-NTA-Agarose gereinigten Proteine analysiert. Aufgrund der im vorherigen Versuch gefundenen Zunahme der Ubiquitinierung nach osmotischem Stress wurden diese beiden Hefestämme ebenfalls mit KCl inkubiert. Wie in Abbildung 28A zu sehen, zeigen beide Nup2-Varianten, egal ob Wildtyp oder Doppelmutante, das gleiche Signal für Nup2-Ub, was dafürspricht, dass die SUMOylierung keinen Einfluss auf die Ubiquitinierung hat und die Ubiquitinierungsstellen nicht den SUMOylierungsstellen entsprechen. Betrachtet man jedoch die gleichen Stämme nach osmotischem Stress, so sieht man bei der Doppelmutante verglichen mit dem Stamm mit Nup2-HA-WT eine wesentlich schwächere Ubiquitinierung für Nup2 (Abbildung 28A). Die Negativkontrolle ohne zusätzliches Ubiquitin zeigt, dass die Bande spezifisch für Nup2-Ub ist. Die Ergebnisse wurden quantifiziert und in einem Balkendiagramm dargestellt, wobei die Gesamtmenge an Nup2-HA in den Überstandsproben mit einberechnet und die Ubiquitinierung ohne Stressor im Wildtyp auf 100 % gesetzt wurde (Abbildung 28B). In Abbildung 28A sind zudem noch die Überstandsproben dargestellt, welche mit Antikörper gegen HA sowie Ubiquitin detektiert wurden. Die Ergebnisse für *NUP2-WT* und die *NUP2-2xKR*-Mutante wurden mehrfach überprüft. Die Änderung des Ubiquitinierungsgrads in Abhängigkeit von osmotischem Stress in beiden Stämmen hingegen müsste noch in weiteren Versuchen verifiziert werden, da es hier nur dieses eine Ergebnis gibt. Unter normalen Bedingungen entsprechen die SUMOylierungsstellen von Nup2 nicht den Ubiquitinierungsstellen und das Verhindern der SUMOylierung an diesen Positionen beeinflusst die Ubiquitinierung nicht. Unter osmotischem Stress lassen sich anhand dieser Daten nur Mutmaßungen anstellen, wobei dieses erste Ergebnis dafürspricht, dass die SUMOylierungsstellen unter diesen Bedingungen die Ubiquitinierung begünstigen. Nach osmotischem Stress erfolgt entweder auch eine Ubiquitinierung an den SUMOylierungsstellen oder aber die SUMOylierung dieser Stellen begünstigt die Ubiquitinierung anderer Lysinreste.



**Abbildung 28: *In vivo*-Ubiquitinierung von Nup2 und nicht mehr SUMOylierbarem Nup2 nach osmotischem Schock.**

Der Wildtyp (GSY170) wurde mit dem für *6HIS-UBI* kodierenden 2 $\mu$ -Plasmid (pGS2307) sowie mit *NUP2-3xHA* (pGS2010) oder *NUP2-2xKR-3xHA* (pGS2117) transformiert. Zur Kontrolle wurde ein Stamm mitgeführt, welcher nur *NUP2-3xHA*, aber kein zusätzliches Ubiquitin enthält. Die Kultivierung sowie die Prozedur zum Nachweis der *in vivo*-Ubiquitinierung erfolgte nach dem in Abbildung 13 beschriebenen Protokoll der *in vivo*-SUMOylierung. **A:** Die Eluate und Überstände wurden in einem 8 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Inkubation erfolgte mit HA-Primärantikörper sowie dem entsprechenden POD-gekoppelten (anti-Maus) Sekundärantikörper. Die Überstände vor (Ü) und nach der Bindung (DF) wurden zudem auf einem 17,5 %-igen Gel aufgetragen und nach Westernblot mit Antikörper gegen Ubiquitin und dem POD-gekoppelten Sekundärantikörper gegen Maus analysiert. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **B:** Die Eluate der verschiedenen Ansätze wurden quantifiziert und, nachdem sie auf die Überstände normiert wurden, in einem Balkendiagramm dargestellt. Die Ubiquitinierung von Nup2-WT-3xHA ohne osmotischen Stress wurde hierzu auf 100 % gesetzt.

4.6.3. Nup2 hat mehr als nur eine Ubiquitinierungsstelle

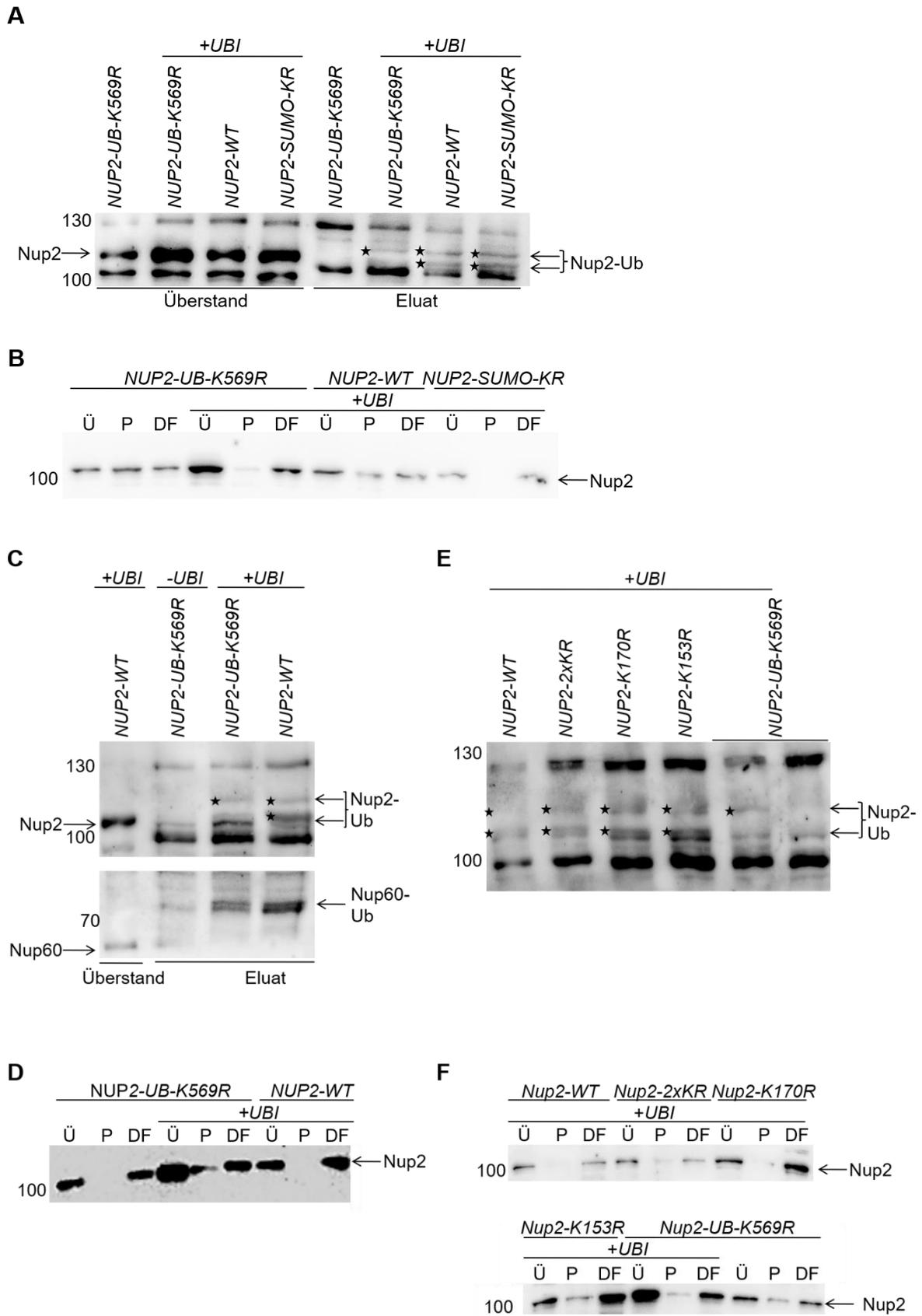


Abbildung 29: Nachweis der *in vivo*-Ubiquitinierung von verschiedenen Nup2-Mutanten.

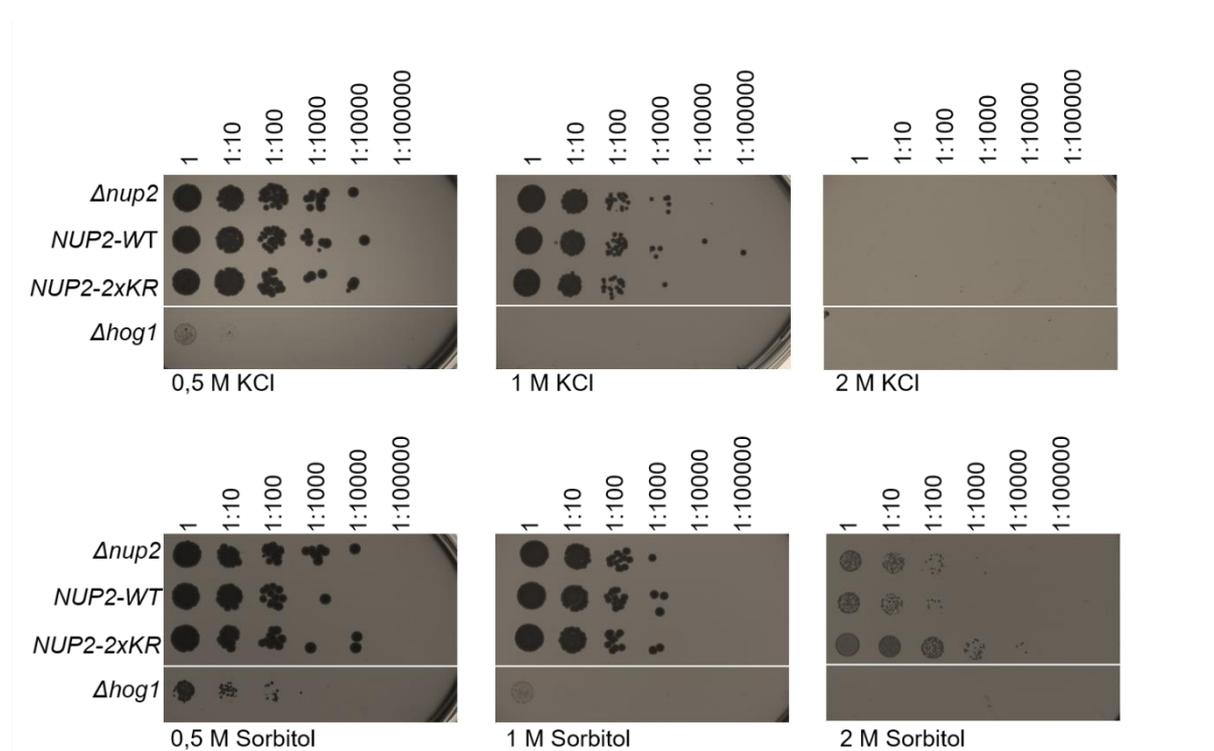
Die *NUP2-2xKR*-Mutante (GSY1488), die *NUP2-K153R*-Mutante (GSY1496), die *NUP2-K170R*-Mutante (GSY1495) sowie die *NUP2-K569R*-Mutante (GSY1518) und der dazugehörige integrierte Wildtyp (GSY1487) wurde mit dem für *6HIS-UBI* kodierenden 2 $\mu$ -Plasmid (pGS2307) transformiert und in kupferhaltigem Selektivmedium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 kultiviert. Zur Kontrolle wurde der integrierte Wildtyp sowie die *NUP2-K569R*-Mutante ohne zusätzliches Ubiquitin mitgeführt. Das Ernten sowie die weitere Behandlung der Zellen erfolgten wie bereits in Abbildung 13 beschrieben. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. A-F zeigen drei unabhängige Experimente. **A, C und E:** Eluatproben, welche in einem 8 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und nach dem Transfer mithilfe eines Antikörpers gegen Nup2-N und POD-gekoppeltem Sekundärantikörper gegen Kaninchen analysiert wurden. **B, D und F:** Überstand vor (Ü) und nach Bindung (DF) sowie Pellet (P) nach Lyse, aufgetrennt über ein 8 %-iges SDS-Gel und nach Transfer mit den gleichen Antikörpern wie die Eluate detektiert.

Nachdem gezeigt wurde, dass Nup2 ubiquitiniert wird, die SUMOylierungsstellen aber unter normalen Bedingungen keinen Einfluss auf diese Modifikation haben, sollte getestet werden, ob die bereits auf Datenbanken (SGD ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)); Biogrid (<https://thebiogrid.org>)) vorhergesagte Ubiquitinierungsstelle am Lysinrest 569 die Stelle ist, an der Nup2 über Ubiquitin modifiziert wird. Um dies zu testen, wurde ein Stamm generiert, in welchen *NUP2* integriert wurde, welches aufgrund eines Basenaustauschs einen Aminosäureaustausch von Lysin zu Arginin an Position 569 aufweist. Dieser Stamm wurde auf die gleiche Weise aus  $\Delta nup2$  hergestellt, wie auch der integrierte Wildtyp sowie die integrierten SUMO-Mutanten, weshalb diese als direkte Kontrolle gewählt wurden. Der Versuchsablauf erfolgte nach den Standardbedingungen. Die in Abbildung 29A, C und E gezeigten Eluate sowie die Lysekontrollen in B, D und F zeigen, dass sich die *NUP2-K569R*-Mutante in ihrem Ubiquitinierungsmuster von allen anderen *NUP2*-Integrationsstämmen unterscheidet. Vergleicht man die Negativkontrolle ohne *UBI* mit den Integrationsstämmen der SUMO-Mutanten bzw. dem Wildtyp mit zusätzlichem *UBI*, so ist zu erkennen, dass zwei Banden dazukommen, wobei in der *NUP2-K569R*-Mutante nur die obere Bande klar zu sehen ist, während die untere wesentlich schwächer oder auch gar nicht detektierbar ist. Anhand dieser Versuche lässt sich sagen, dass der Lysinrest an Position 569 wohl nicht die einzige Ubiquitinierungsstelle von Nup2 ist, aber dennoch einen Einfluss auf die Ubiquitinierungseffizienz hat.

#### **4.7. Nup2-Mutanten zeigen keine Änderungen im Wachstum unter osmotischem Stress**

Aufgrund der Tatsache, dass die SUMOylierung von Nup2 bei osmotischem Stress verstärkt wird, sollte getestet werden, ob auch das Wachstum der Hefezellen unter diesen Bedingungen beeinträchtigt oder möglicherweise sogar gehemmt wird. Hierzu wurden Hefezellen, welche *NUP2* in seiner wildtypischen Form enthalten, mit der *NUP2-2xKR*-Mutante verglichen. Zudem wurde als Kontrolle der  $\Delta hog1$ -Stamm mitgeführt, bei dem schon bekannt ist, dass das Wachstum nach osmotischem Stress sehr eingeschränkt ist (Babazadeh *et al.*, 2014). Außerdem wurde der  $\Delta nup2$ -Stamm mitgeführt, um zu testen, ob das Fehlen von Nup2 einen negativen Einfluss auf das Wachstum der Zellen hat.

Für diesen Versuch wurden Kulturen der jeweiligen Stämme über Nacht kultiviert und am Folgetag auf eine OD<sub>600</sub> von etwa 0,2 verdünnt, sodass die Zellen nach weiterer zweistündiger Inkubation bei 30°C in etwa die gleiche Zelldichte von 0,5 aufwiesen. Die Zellen wurden in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte in 10er Schritten mit Wasser verdünnt und anschließend auf die Platten mit KCl- bzw. Sorbitolkonzentrationen von 0,5 M, 1 M und 2 M gestempelt. Um mehrere Replikate zu haben, wurden von den Platten mit den verschiedenen KCl- und Sorbitolkonzentrationen jeweils mindestens drei gestempelt. Die Zellen wurden insgesamt für drei Tage wachsen gelassen, wobei das Wachstum täglich unter Verwendung eines Scanners dokumentiert wurde (Abbildung 30; nur Tag 3). Auf der Platte mit der geringsten KCl- bzw. Sorbitolkonzentration sieht man am ersten Tag noch ein verlangsamtes Wachstum des *Δhog1*-Stamms, welcher aber ab dem zweiten Tag noch anwächst (Daten nicht gezeigt). Bei der niedrigsten Konzentration sieht man schon einen leichten Effekt für den *Δhog1*-Stamm, welcher bei 1 M Sorbitol zu einem stark gehemmten Wachstum ab der ersten Verdünnungsstufe und bei 2 M Sorbitol zu keinem Wachstum führt. Die *NUP2*-Mutanten hingegen wachsen vollkommen vergleichbar mit dem Wildtyp und zeigen keine Beeinträchtigung durch den osmotischen Stress, abgesehen von einem verringerten Wachstum bei 2 M Sorbitol, welches aber auch in den *NUP2*-WT-Zellen zu sehen ist.



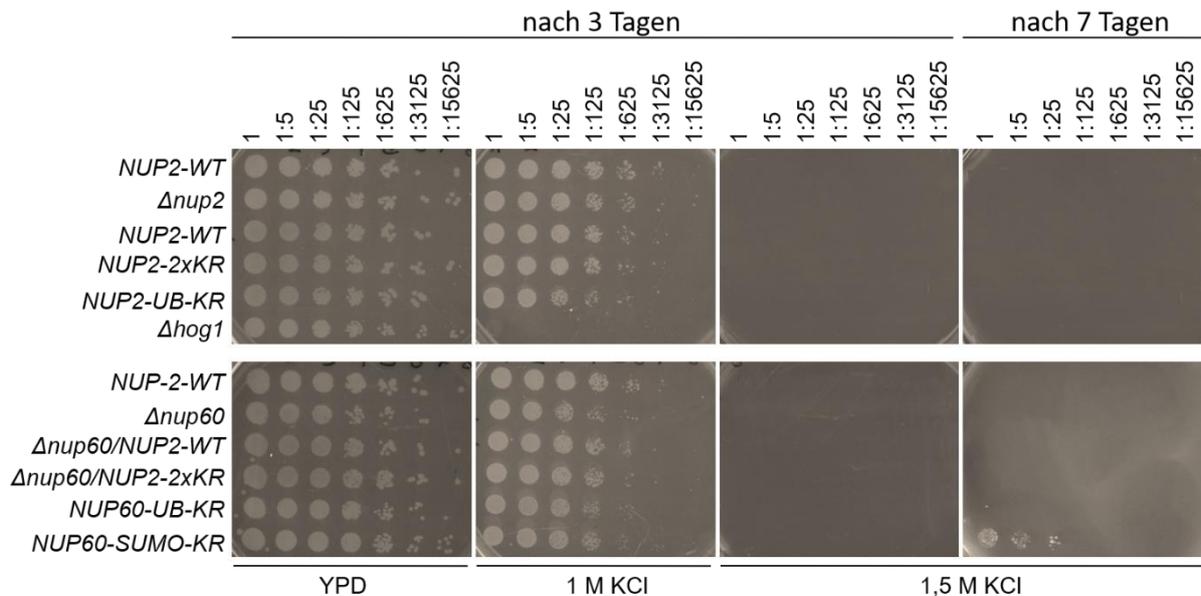
**Abbildung 30: Zellwachstum der Nup2-Mutanten unter osmotischem Stress.**

Der *Δnup2*-Stamm (GSY432), der *NUP2-2xKR*-Stamm (GSY1488) sowie der dazugehörige integrierte Wildtyp (GSY1487) und der *Δhog1*-Stamm wurden in YPD<sub>ade</sub>-Medium über Nacht bei 30°C kultiviert. Die Kulturen wurden so verdünnt, dass sie nach Kultivierung für 2 h die gleiche optische Dichte erreicht hatten. Danach wurden sie in 96-Loch-Mikrotiterplatten in Zehnerschritten in Wasser verdünnt. Die verschiedenen Verdünnungsstufen wurden mit einem Replikationsstempel gleichmäßig auf die 0,5 M, 1 M bzw. 2 M KCl oder Sorbitol-haltigen Platten gestempelt und nach drei Tagen dokumentiert.

In einem weiteren Wachstumsexperiment wurden ebenfalls Zellen auf KCl-haltige Platten gestempelt. Verwendet wurden hierfür die Nup2-Mutanten  $\Delta nup2$ ,  $NUP2-2xKR$ ,  $NUP2-K569R$  sowie der integrierte  $NUP2-WT$  und der original Wildtyp als Positivkontrolle. Zudem wurde auch der  $\Delta hog1$ -Stamm als Positivkontrolle für ein stressabhängiges Wachstumsdefizit mitgeführt. Zudem wurden die Nup60-Mutanten  $\Delta nup60$ ,  $\Delta nup60/NUP2-WT$ ,  $\Delta nup60/NUP2-2xKR$ ,  $NUP60-UB-KR$  und  $NUP60-SUMO-KR$  sowie der Wildtyp als Positivkontrolle getestet. Die Zellen wurden über Nacht in Vollmedium kultiviert und so verdünnt, dass sie nach zwei weiteren Stunden Inkubation eine  $OD_{600}$  von etwa 0,5 hatten. Anschließend wurden sie in 5er-Schritten in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte in Wasser verdünnt, bevor sie mit einem Replikationsstempel auf 1 M und 1,5 M KCl-haltige sowie KCl-freie Platten transferiert wurden. Die Dokumentation erfolgte nach 1, 2, 3 sowie nach 7 Tagen, wobei in Abbildung 31 nur das Ergebnis nach 3 und 7 Tagen gezeigt ist. Das Wachstum der Zellen war auf den Vollmedium-Platten einheitlich, während auf der Platte mit 1 M KCl das Wachstum des  $\Delta hog1$ -Stamms bereits vollständig gehemmt war. Auf den 1,5 M KCl-Platten war nach 3 Tagen kein Wachstum detektierbar. Nach 7 Tagen konnte jedoch dokumentiert werden, dass die  $NUP60-SUMO-KR$ -Mutante wächst, während keiner der anderen Stämme angewachsen war. Somit scheint in diesem Stamm das Wachstum nur sehr verlangsamt zu sein, während es in den anderen Stämmen vollständig gehemmt ist. Interessanterweise scheint 1,5 M KCl auch die Konzentration zu sein, welche das Wachstum maßgeblich beeinflusst, da Zellen bei geringerer KCl-Konzentration noch wuchsen, während bei 1,5 M das Wachstum auf Platten eingestellt war.

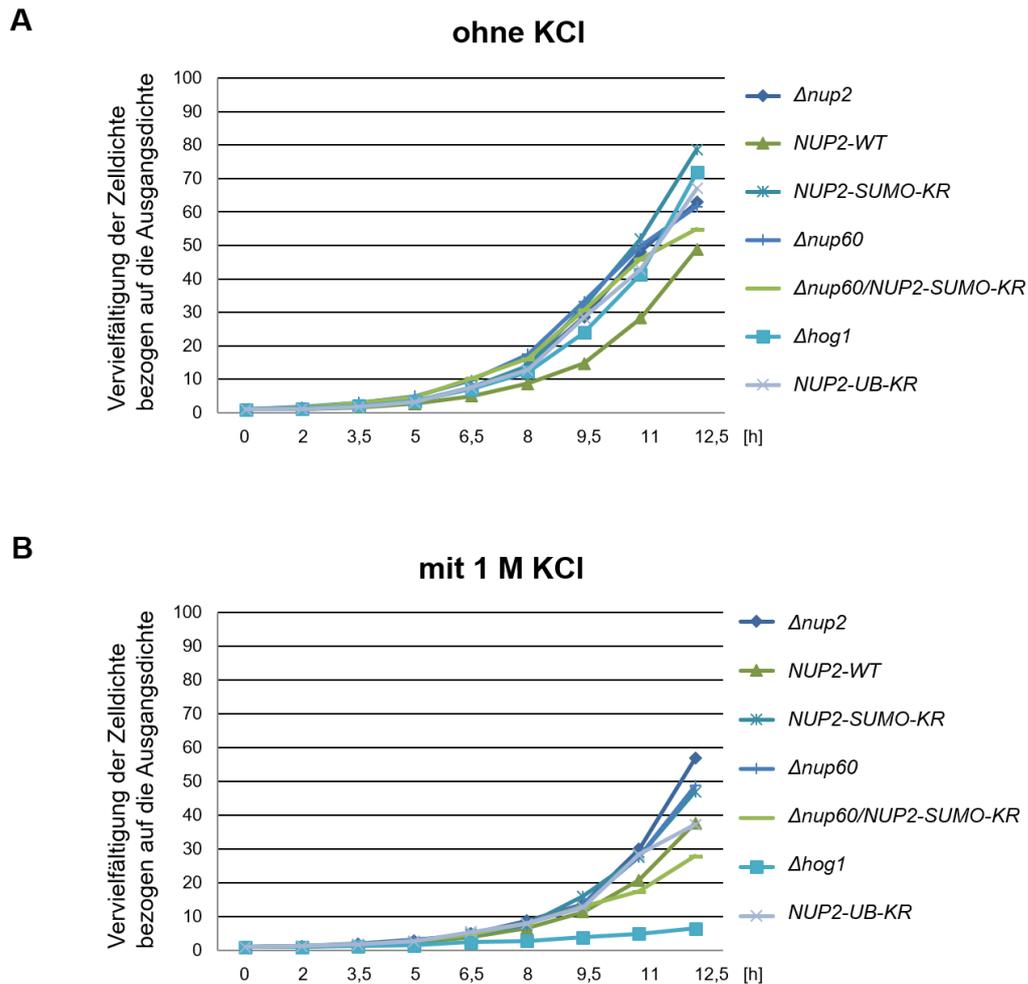
Neben dem Wachstum auf KCl-haltigen Platten wurde das Wachstum der verschiedenen  $NUP2$ -Stämme auch in Flüssigkultur getestet, wobei hier ebenfalls über Nacht Kulturen von  $\Delta nup2$ ,  $NUP2-WT$ ,  $NUP2-2xKR$ ,  $NUP2-K569R$ ,  $\Delta nup60/NUP2-WT$ ,  $\Delta nup60/NUP2-2xKR$  sowie  $\Delta hog1$  bei 30°C inkubiert wurden, welche am Folgetag auf eine  $OD_{600}$  von ~0,1 verdünnt wurden. Für jeden Stamm wurden zwei 100 ml Kulturen angesetzt, wobei eine davon mit 1 M KCl versetzt wurde. Über einen Zeitraum von 12,5 h wurde alle 90 min eine Probe entnommen und photometrisch die Dichte und somit das Zellwachstum dokumentiert. Um einen genauen Vergleich des Wachstums zu haben, wurde der Ausgangswert aller Kulturen auf 1 gesetzt und die Folgewerte auf diesen Wert angepasst und in einem Diagramm visualisiert. Die in Abbildung 32A dargestellten Ergebnisse für die ungestressten Kulturen zeigen, dass alle Stämme vergleichbar wachsen, abgesehen von  $NUP2-WT$ , wobei dieser Stamm auch in der Übernacht-Kultur schon ein wenig langsamer gewachsen ist. Gleiches sieht man in Abbildung 32B auch für die mit KCl gestresste Kultur von  $NUP2-WT$ , wobei dies somit nicht als stressinduzierter Effekt gewertet werden kann, sondern dem an sich langsameren Wachstum geschuldet ist. Ein weiterer Stamm, welcher in dem KCl-haltigen Medium einen leichten Effekt zeigt, ist der  $\Delta nup60/NUP2-2xKR$ -Stamm, wobei dieser ohne osmotischen Schock kein

verlangsamtes Wachstum zeigt. Im Gegensatz zu diesem Stamm zeigt aber der  $\Delta hog1$ -Stamm einen klaren Effekt infolge des osmotischen Schocks, welcher in einem stark gehemmten Wachstum resultiert. Dieser Versuch zeigt, dass keine der *NUP2*-Mutanten gravierend durch den osmotischen Schock beeinflusst wird. Das leicht verringerte Wachstum von  $\Delta nup60/NUP2-2xKR$  müsste in weiteren Versuchen verifiziert werden, um eine klare Aussage treffen zu können. Da jedoch auch bereits auf den Stressplatten kein Effekt ersichtlich war, wurde darauf verzichtet, an dieser Stelle weitere Analysen durchzuführen.



**Abbildung 31: Zellwachstum der Nup2 und Nup60-Mutanten unter osmotischem Stress.**

Der  $\Delta nup2$ -Stamm (GSY432), der *NUP2-2xKR*-Stamm (GSY1488), der dazugehörige integrierte Wildtyp (GSY1487) und die *NUP2-UB-K569R*-Mutante (GSY1518) sowie als Kontrolle der  $\Delta hog1$ -Stamm wurden in  $YPD_{ade}$ -Medium über Nacht bei 30°C kultiviert. Zudem wurden auch Kulturen mit  $\Delta nup60$ -Zellen (GSY1386),  $\Delta nup60$ -Zellen mit integriertem *NUP2*-Wildtyp (GSY1491) bzw.  $\Delta nup60/NUP2-2xKR$ -Zellen (GSY1492) und den Stämmen mit nicht mehr SUMOylierbarem (GSY1500) bzw. nicht mehr ubiquitinierbarem Nup60 (GSY1499) vorbereitet. Die Kulturen wurden so verdünnt, dass sie nach weiteren 2 h Inkubation die gleiche optische Dichte erreicht hatten. Danach wurden sie in 96-Loch-Mikrotiterplatten in Fünferschritten in Wasser verdünnt. Die verschiedenen Verdünnungsstufen wurden mit einem Replikationsstempel gleichmäßig auf die 1 M bzw. 1,5 M KCl-haltigen sowie KCl-freien  $YPD_{ade}$ -Platten gestempelt und nach drei Tagen dokumentiert. Die Platten mit 1,5 M KCl wurden zudem noch nach 7 Tagen dokumentiert.



**Abbildung 32: Zellwachstum in Flüssigkultur unter andauerndem osmotischem Stress.**

Die Deletions-Mutanten  $\Delta nup2$  (GSY432) und  $\Delta nup60$  (GSY1386), der  $NUP2$ -2xKR-Stamm (GSY1488), der dazugehörige integrierte Wildtyp (GSY1487), die  $NUP2$ -UB-K569R-Mutante (GSY1518),  $\Delta nup60$ -Zellen mit integriertem  $NUP2$ -Wildtyp (GSY1491) bzw.  $\Delta nup60/NUP2$ -2xKR-Zellen (GSY1492) sowie als Kontrolle der  $\Delta hog1$ -Stamm wurden in  $YPD_{ade}$ -Medium über Nacht bei 30°C kultiviert. Die Kulturen wurden anschließend in 100 ml Medium ohne und mit KCl mit einer Endkonzentration von 1 M so verdünnt, dass alle eine  $OD_{600}$  von 0,1 hatten und bei 30°C kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde anhand der optischen Dichte für 12,5 h dokumentiert und graphisch dargestellt. Die optische Dichte aller Zellen wurde auf den Anfangswert 1 gesetzt und alle Werte an den ersten Wert angepasst, sodass sich an der y-Achse die Vervielfältigung der Zelldichte bezogen auf die Ausgangsdichte ergibt. **A:** Wachstum der Zellen in KCl-freiem Medium. **B:** Wachstum der Zellen in  $YPD_{ade}$ -Medium mit 1 M KCl.

#### 4.8. Interaktionsstudien von Nup2

Viele biologische Funktionen und Prozesse werden nicht durch einzelne Proteine allein, sondern durch Interaktionen in Proteinkomplexen reguliert. Aus diesem Grund sollten SUMO-spezifische Interaktionspartner sowie weitere noch nicht beschriebene Interaktionspartner von Nup2 identifiziert werden. Die Reinigung Nup2-assoziiierter Proteinkomplexe erfolgte über zwei verschiedene Methoden. Einerseits wurde die *Tandem Affinity Purification (TAP)* (Rigaut *et al.*, 1999) angewendet, welche aufgrund zweier Reinigungsschritte sehr spezifisch ist, aus diesem Grund jedoch auch hohe Proteinverluste mit sich bringt. Andererseits wurde eine Co-

Immunpräzipitation durchgeführt, welche nur einen Reinigungsschritt beinhaltet und somit weniger spezifisch ist, jedoch geringere Proteinverluste verzeichnet. Beiden Methoden liegt die Coreinigung der Interaktionspartner über Reinigen des Zielproteins Nup2 zugrunde.

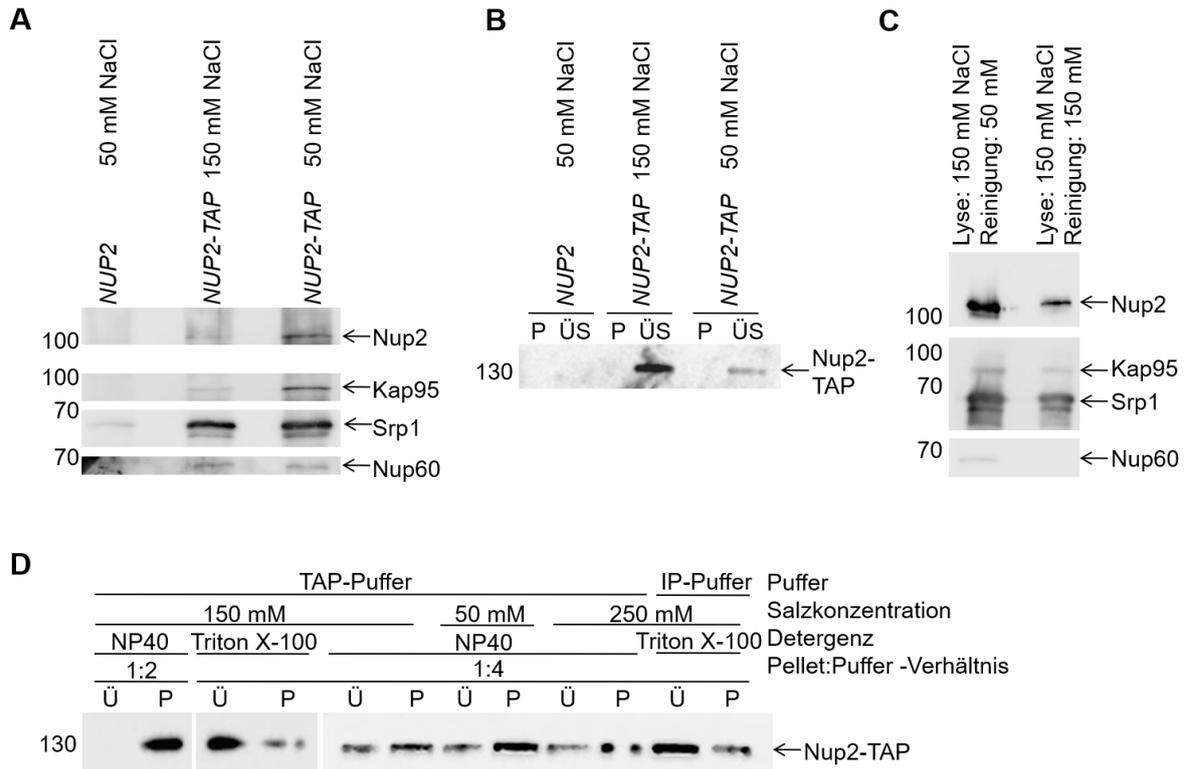
Für beide Reinigungsarten mussten zunächst Bedingungen etabliert werden, welche optimal für Nup2 sind, um darauf die Untersuchung der Interaktionen mittels Massenspektrometrie aufzubauen.

#### **4.8.1. Die Salzkonzentration des Lysepuffers hat sowohl Einfluss auf die Lyse als auch auf die Bindungseffizienz während der TAP-Reinigung**

Bei der Tandemaffinitätsreinigung handelt es sich um eine bereits etablierte Methode zur Reinigung von Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen (Rigaut *et al.*, 1999). Interaktionspartner, welche mit dem C- oder N-terminal mit einem TAP-*tag* fusionierten Protein interagieren, können mit dieser Methode über zwei aufeinanderfolgende Affinitätsreinigungen isoliert werden. Im Fall des zu untersuchenden Proteins Nup2 wurde der TAP-*tag* C-terminal an das Protein fusioniert. Der TAP-*tag* setzt sich aus zwei IgG-bindenden Domänen (ZZ) sowie einem Calmodulin-bindenden Peptid, welche über eine TEV-Schnittstelle verbunden sind, zusammen. Die ZZ-Domäne, welche aus dem Protein A aus *Staphylococcus aureus* stammt, hat eine hohe Affinität für IgG, weshalb der erste Reinigungsschritt über IgG-Sepharose erfolgt. Alle nicht gebundenen Proteine können somit gewaschen werden und die spezifisch gebundenen Nup2-Interaktionspartner-Proteinkomplexe durch Zugabe von TEV-Protease proteolytisch gelöst werden, indem die ZZ-Domänen aus Protein A an der TEV-Spaltstelle abgespalten werden. Das weiterhin vorhandene Calmodulin-bindende Peptid (CBP) ermöglicht den zweiten Reinigungsschritt, da es in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  an Calmodulin bindet und durch Zugabe von EGTA unter  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexbildung gelöst wird, was zu dem gereinigten Eluat führt.

In einem ersten Versuch wurde ein Stamm verwendet, welcher Nup2 zusätzlich zu der Fusion mit TAP in seiner wildtypischen Version enthält und somit Nup2-TAP in genomisch üblichen Mengen synthetisiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mechanisch unter zwei unterschiedlichen nativen Pufferbedingungen, welche zwei verschiedene Konzentrationen an NaCl enthielten. Neben *NUP2-WT-TAP* wurde auch noch der Ausgangsstamm *NUP2-WT* ohne TAP-*tag* mitgeführt, um die Effizienz der Methode zu überprüfen.

Die TAP-Reinigung erfolgte wie in 3.4.6 bis 3.4.11 beschrieben, die über TCA gefällten Proteine wurden anschließend über ein SDS-Gel aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran immunologisch analysiert.



**Abbildung 33: TAP-Reinigung von Nup2-TAP unter verschiedenen Salzkonzentrationen sowie Test verschiedener Lysepuffer.**

2 l Kulturen des *NUP2*-Integrationsstamms (GSY1487) sowie des *NUP2-TAP*-Integrationsstamms (GSY1523) wurden bis zu einer  $OD_{600}$  von 3-3,5 bei 30°C kultiviert, geerntet und anschließend durch mechanische Lyse aufgeschlossen. Das Lysat wurde zum Entfernen von Zelltrümmern zentrifugiert und der Überstand mit IgG-Sepharose bei 4°C für 1,5 h inkubiert. Gebundene Proteinkomplexe wurden durch Inkubation mit TEV-Protease bei 4°C über Nacht abgespalten, bevor sie in einem zweiten Reinigungsschritt an Calmodulin-Sepharose (4°C; 1,5 h) gebunden wurden. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte über  $Ca^{2+}$ -Komplexbildung durch Zugabe von 5 mM EGTA. Die Eluatproben wurden mit Hilfe von TCA gefällt und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **A:** Eluatproben von Nup2-TAP mit Lyse- sowie Bindungspuffer mit 50 mM NaCl oder 150 mM NaCl. Als Kontrolle wurde Nup2 ohne TAP-tag mitgeführt (50 mM NaCl). Die Proben wurden in einem 11 %-igen Gel aufgetrennt und mit vier verschiedenen Primärantikörpern (anti-Nup2-N, anti-Kap95, anti-Srp1 und anti-Nup60) und einem POD-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) inkubiert. **B:** Die Lyseeffizienz wurde durch Auftragen der jeweiligen Überstands- (Ü) und Pelletprobe (P) überprüft. Zur Detektion von Nup2-TAP wurden Nup2-N-Primärantikörper und der POD-gekoppelte Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) verwendet. **C:** Die Herstellung der Zellpellets sowie die Lyse und die TAP-Reinigung erfolgten wie in A beschrieben, jedoch wurden nur zwei Pellets des *NUP2-TAP*-Integrationsstamms verwendet. Bei einer der beiden Proben wurde nach der Lyse die Salzkonzentration für die weitere Prozedur von 150 mM NaCl auf 50 mM reduziert. **D:** 50 OD-Einheiten wurden unter verschiedenen Pufferbedingungen lysiert. Die mechanische Lyse der Zellen erfolgte unter Verwendung des TAP-Lysepuffers in verschiedenen Pellet: Puffer-Verhältnissen (1:2 bzw. 1:4), bei verschiedenen Salzkonzentrationen (50 mM, 150 mM und 250 mM), unter Verwendung verschiedener Detergenzien (Triton X-100 bzw. NP40) sowie unter Verwendung von IP-Lysepuffer statt TAP-Lysepuffer. Das Lysat wurde zum Entfernen von Zelltrümmern zentrifugiert und die Überstandsproben (Ü) sowie die Pelletproben (P) in einem 11 %-igen Gel aufgetrennt und mit Nup2-N-Primärantikörper und einem POD-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) inkubiert.

Neben dem fusionierten Nup2 wurden auch bereits bekannte Interaktionspartner von Nup2, welche am NLS-Import beziehungsweise der Lokalisierung von Nup2 an die Kernhülle beteiligt sind, detektiert. Hierbei handelt es sich um die Importine Kap95 und Srp1 sowie das Nukleoporin Nup60 (Abbildung 33A). Sowohl das Zielprotein Nup2 als auch seine Interaktionspartner wurden in den Eluaten der TAP-Stämme detektiert, wobei die Menge an Nup2 sowie Kap95 in der 150 mM Probe sichtlich geringer war. Das Signal von Srp1 ließ

aufgrund seiner geringen Intensität keine genauen Aussagen zu, ebenso verhielt es sich für Nup60, wobei dies hier der Schwäche des Signals geschuldet war. Während die Effizienz anhand der Eluatproben in der mit 50 mM NaCl lysierten Probe besser zu sein scheint, zeigen die Proben der Lysekontrolle das komplett entgegengesetzte Ergebnis. Die in Abbildung 33B dargestellten Ergebnisse der Zellyse zeigen, dass bei der Lyse mit 150 mM NaCl ein wesentlich stärkeres Signal für Nup2 erkennbar ist, was möglicherweise für eine bessere Lyse sprechen würde.

Um den Einfluss der Salzkonzentration im Lysepuffer während der Bindung genauer zu überprüfen, wurden zwei Pellets des *NUP2-TAP*-Stammes auf gleiche Weise mit 150 mM NaCl-haltigem Puffer lysiert, eine Probe jedoch vor der Bindung an die IgG-Sepharose auf eine Endkonzentration von 50 mM NaCl verdünnt. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte bei beiden Proben wieder auf die gleiche Art. Anhand der in Abbildung 33C dargestellten Eluate lässt sich erkennen, dass die Signale sowohl für Nup2 als auch für Kap95, Srp1 und Nup60 in den Proben mit dem verdünnten Puffer stärker sind, was auch dem Ergebnis des ersten Experiments entspricht.

Nachdem der Einfluss der Salzkonzentration des Puffers auf das Bindungsverhalten überprüft wurde, wurde in kleinem Maßstab an der Optimierung der Lyse gearbeitet. Hierzu wurden verschiedene Pufferbedingungen getestet. Während die TAP-Reinigung mit einem Pellet von etwa 6000-7000 OD-Einheiten durchgeführt wurde, wurden für diesen Versuch pro Bedingung nur 50 OD-Einheiten verwendet. Untersucht wurde einerseits die Lyseeffizienz in TAP-Puffer mit verschiedenen Salzkonzentrationen von 50 mM, 150 mM und 250 mM. Zudem wurde in 150 mM NaCl-haltigem Puffer der Unterschied der Detergenzien Triton X-100 und NP40 überprüft. Außerdem wurde der Einfluss des Verhältnisses von Puffer zu Pellet analysiert, sowie der des Puffers, welcher für die Lyse vor der Immunpräzipitation verwendet wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33D dargestellt.

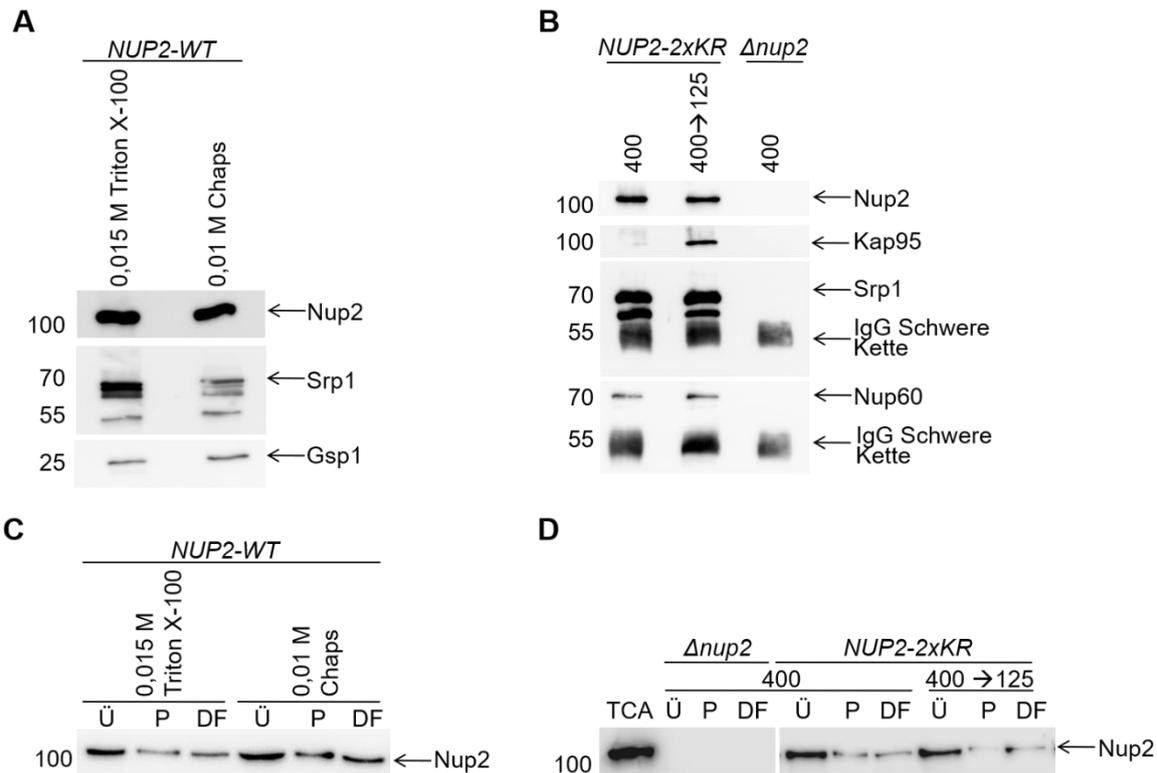
Den größten Einfluss zeigt die Änderung des Verhältnisses von Puffer zu Pellet. Wird das Pellet in einem größeren Puffervolumen aufgenommen, so ist die Lyse effizienter. Die Lyse vor der TAP-Reinigung erfolgt jedoch in weniger Puffer und ist deshalb weniger wirkungsvoll. Möglicherweise reicht die enthaltene Detergenz nicht aus, um die Proteine zu solubilisieren, was sich daran zeigt, dass Nup2 noch fast vollständig im Pellet und so gut wie nicht im Überstand enthalten ist. Das Verhältnis lässt sich hierbei jedoch nicht ändern, da sowohl die Kapazität als auch die Anzahl der Lysebehälter für die TAP begrenzt ist. Wollte man das Puffer zu Pellet Verhältnis erhöhen, müssten viele Lyse Schritte mit je kleinen Zellpellets durchgeführt werden, was sowohl zeitlich als auch bei der Menge des zu verwendenden Lysepuffers zu Problemen führen würde. Zudem scheint das für die TAP üblicherweise verwendete Detergenz 1,5 % NP40 in diesem Puffer weniger effizient zu sein als 1 % Triton X-100. Unter Verwendung von Triton X-100 wird ein Großteil von Nup2 im Überstand detektiert, während unter

Verwendung von NP40 weniger als die Hälfte im Überstand zu finden ist. Dennoch lassen sich auch Unterschiede in den Proben mit NP40 erkennen, da mit der Konzentration an NaCl auch die Löslichkeit von Nup2 steigt. Vergleicht man jedoch die Lyse unter Verwendung des TAP-Puffers unter optimierten Bedingungen mit der unter Verwendung des IP-Puffers, so zeigt sich deutlich, dass die Lyse mit dem IP-Puffer wesentlich effizienter ist.

Da die Lyseeffizienz in dem üblichen TAP-Puffer nicht optimal ist, wurde auf diese Methode der Reinigung verzichtet und die Effizienz der Co-Immunpräzipitation getestet.

#### **4.8.2. Optimierung der IP unter Verwendung zweier Detergenzien**

Nachdem bereits gezeigt wurde, dass die Lyse von Nup2 unter Verwendung von Triton X-100 effizienter ist als mit NP40, wurde zum Test noch Chaps als ein weiteres Detergenz, welches häufig bei Immunpräzipitationen verwendet wird, getestet, um sicherzugehen, dass die Lyse mit Triton X-100 die effizienteste Option ist. Für die IP wurde pro Versuchsbedingung ein Pellet von 50 OD-Einheiten des integrierten *NUP2*-Wildtyps in 1 ml Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 0,2 g Glaskügelchen mechanisch lysiert. Durch Zentrifugation wurde das Pellet sedimentiert und der Überstand auf mit Nup2-Antikörper vorinkubierte magnetische Protein A/G-Kügelchen gegeben und über Nacht inkubiert. Nicht gebundene Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit Puffer entfernt und gebundene Proteine durch Zugabe von SDS-Probenpuffer bei 65°C eluiert. 1/3 des Eluats wurde anschließend in einem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und immunologisch detektiert. Neben dem Zielprotein Nup2 wurde wie auch bei der TAP-Reinigung die Anwesenheit bereits bekannter Interaktionspartner, in diesem Fall Gsp1 und Srp1, überprüft. Wie in Abbildung 34A dargestellt ist, lässt sich Nup2 mit beiden Detergenzien gut reinigen, während Srp1 mit Chaps weniger gut über Nup2 gereinigt wird. Für Gsp1 hingegen erscheint in beiden Proben ein gleich starkes Signal, wobei anzumerken ist, dass Gsp1 unspezifisch gebunden werden kann. Betrachtet man die in Abbildung 34C gezeigte Lysekontrolle, so sieht man, dass die Lyseeffizienz unter Verwendung von Triton X-100 besser ist, da weniger Nup2 im Pellet verbleibt. Lyse und Bindung zusammen deuten darauf hin, dass Triton X-100 das bessere Detergenz für die Immunpräzipitation von Nup2 ist, weshalb es in den folgenden Versuchen verwendet wurde.



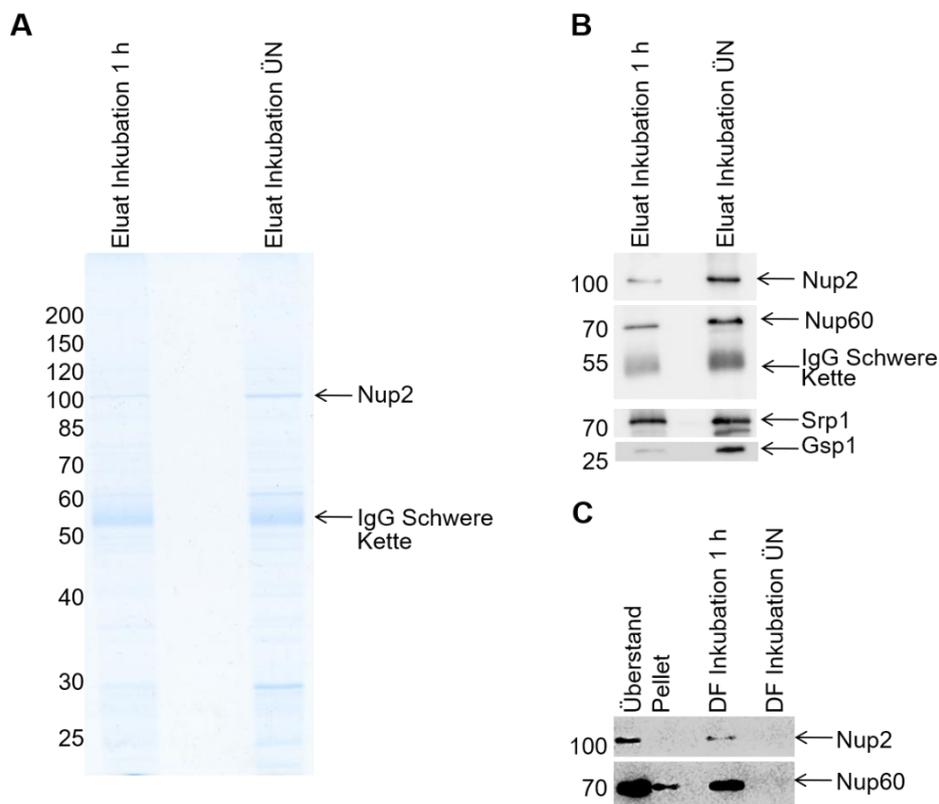
**Abbildung 34: Immunpräzipitation von Nup2 und seinen Interaktionspartnern unter Verwendung von 0,01 M Chaps (0,65 %) im Vergleich zu 1 % Triton X-100 sowie unter Verwendung von IP-Puffer mit niedrigerer Salzkonzentration bei der Bindung.**

**A und C:** Der *NUP2*-Integrationsstamm (GSY1487) wurde bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,8 bei 30°C inkubiert und je 50 OD-Einheiten durch Zentrifugation geerntet. Eine Probe wurde in Anwesenheit von IP-Puffer mit 1 % Triton X-100 und eine in Anwesenheit von IP-Puffer mit 0,01 M Chaps über mechanische Lyse aufgeschlossen. **B und D:** Der *NUP2-2xKR*-Integrationsstamm (GSY1488) sowie  $\Delta nup2$  (GSY432) wurden bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,8 bei 30°C kultiviert und je 50 OD-Einheiten durch Zentrifugation geerntet. Die Lyse erfolgte für alle Proben mit 400 mM NaCl-haltigem Puffer. Eine Probe mit Nup2-2xKR wurde jedoch vor der Bindung auf 125 mM NaCl verdünnt. Das Lysat wurde zuvor durch Zentrifugation von Zelltrümmern befreit, bevor der Überstand auf mit Nup2-N-Antikörper inkubierte (1 h; RT; 3  $\mu$ g), magnetische Protein A/G-Kügelchen gegeben wurde und über Nacht rollend bei 4°C inkubiert wurde. Nicht gebundene Proteine wurden durch Waschen entfernt und gebundene Proteinkomplexe wurden durch Zugabe von 1x-Probenpuffer bei 60°C eluiert. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **A und B:** Die Eluatproben wurden in einem 10 % igen Gel aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran mit Nup2-N-, Srp1- und Gsp1- bzw. mit Nup60- und Kap95-Primärantikörper sowie POD-gekoppeltem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) inkubiert und analysiert. **C und D:** Zur Kontrolle der Lyse- sowie der Bindungseffizienz wurden Proben des Überstands (Ü) sowie der abzentrifugierten Zellbestandteile (P) und der nicht gebundenen Proteine (DF) in einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Nup2-N-Primärantikörper und POD-gekoppeltem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) inkubiert.

#### 4.8.3. Die Effizienz der Immunpräzipitation von Nup2 ist zeitabhängig

Um zu testen, welchen Einfluss der Faktor Zeit auf die Bindungseffizienz von Nup2 an den spezifischen Antikörper hat, wurden 100 OD-Einheiten des *NUP2*-Integrationsstamms lysiert, zentrifugiert und der Überstand auf zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt, in welchen mit Nup2-Antikörper vorinkubierte Kügelchen vorgelegt wurden. Beide Ansätze wurden unter gleichen Bedingungen bei 4°C rotierend inkubiert. Einer der Ansätze wurde nach einer Stunde gewaschen und die gebundenen Proteine wurden eluiert, während der zweite Ansatz über Nacht weiter inkubiert und die gebundenen Proteine erst dann eluiert wurden. Pro SDS-Gel wurde 1/3 der Eluate aufgetragen und anschließend mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt oder nach Transfer auf eine PVDF-Membran immunologisch analysiert. Das in Abbildung 35A

dargestellte mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbte Gel zeigt deutlich, dass bereits nach einer Stunde eine Bande zu sehen ist, welche offensichtlich Nup2 ist, jedoch verstärken sich sowohl diese als auch alle anderen Banden nach der längeren Inkubation über Nacht. Zum Teil werden einige Banden erst nach Immunpräzipitation über Nacht sichtbar. Das gleiche Ergebnis zeigt sich auch nach immunologischer Detektion, wie in Abbildung 35B zu sehen ist. Sowohl Nup2 als auch seine Interaktionspartner Nup60, Srp1 und auch Gsp1 sind nach der Inkubation über Nacht deutlich effektiver präzipitiert worden, was sich auch in den Überstandsproben vor und nach der Bindung widerspiegelt (Abbildung 35C). Während in der Überstandsprobe nach der einstündigen Inkubation sowohl Nup2 als auch Nup60 noch detektierbar sind, verschwindet dieses Signal vollständig nach der Inkubation über Nacht, was darauf hindeutet, dass der Großteil gebunden wurde. Infolge dieses Versuchs wurde die IP für weitere Versuche über Nacht durchgeführt.



**Abbildung 35: Immunpräzipitation von Nup2 und seinen Interaktionspartnern in Abhängigkeit der Bindungsdauer.**

Der Nup2-Integrationsstamm (GSY1487) wurde bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,8 bei 30°C inkubiert und je 50 OD-Einheiten durch Zentrifugation geerntet und über mechanische Lyse aufgeschlossen. Das Lysat wurde durch Zentrifugation von Zelltrümmern befreit, bevor der Überstand auf mit Nup2-N-Antikörper inkubierte (1 h; RT; 3 µg), magnetische Protein A/G-Kügelchen gegeben wurde. Eine Probe wurde für 1 h mit den magnetischen Kügelchen (4°C, rollend) inkubiert, eine zweite wurde über Nacht unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Nicht gebundene Proteine wurden durch Waschen entfernt und gebundene Proteinkomplexe wurden durch Zugabe von 1x-Probenpuffer bei 60°C eluiert. Die Molekulargewichte wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **A:** 1/3 der Eluate wurde auf einem 11 %-igen Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. **B:** Es wurden zweimal je 1/3 der Eluate auf einem 11 %-igen Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit Nup2-N-, Nup60-, Srp1- und Gsp1-Primärantikörper sowie POD-gekoppeltem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) inkubiert. **C:** Zur Kontrolle der Lyse- sowie der Bindungseffizienz wurden Proben des Überstands (Ü) sowie der abzentrifugierten Zellbestandteile (P) und der nicht gebundenen Proteine (DF) in einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Nup2-N- sowie Nup60-Primärantikörper und POD-gekoppeltem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) inkubiert.

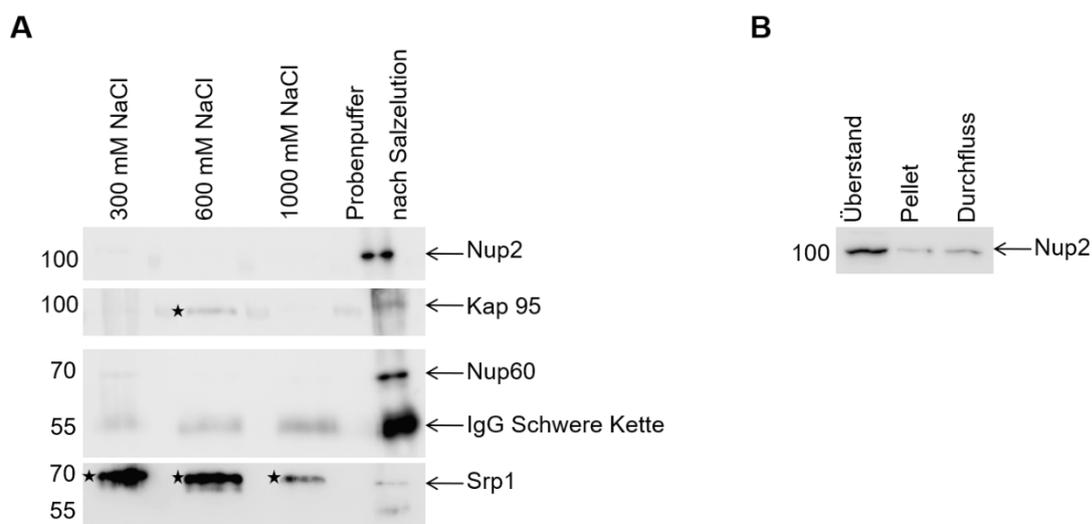
#### 4.8.4. Die Salzkonzentration spielt eine Rolle bei der IP

In Vorversuchen, welche in dieser Arbeit nicht dargestellt sind, wurden bereits verschiedene Salzkonzentration von 125-1000 mM für die Lyse der Zellen vor der IP getestet. Die besten Lyseerfolge wurden im Bereich von etwa 400 mM NaCl erzielt, weshalb diese Salzkonzentration auch in den Versuchen zu Detergenz und dem Faktor Zeit verwendet wurde. Interessanterweise war es aber in keinem dieser Versuche möglich, Kap95 zu detektieren, während unter Verwendung von Puffern mit geringeren Salzkonzentrationen (125-250 mM) trotz schlechterer Lyse ein schwaches Signal zu erkennen war. Diese Beobachtungen ließen darauf schließen, dass schwächere Interaktionspartner möglicherweise durch zu hohe Salzkonzentrationen von Nup2 gelöst werden. Um dies genauer zu überprüfen, wurden zwei Pellets von 50 OD-Einheiten des *NUP2*-Integrationsstamms sowie zur Kontrolle ein  $\Delta nup2$ -Pellet in 400 mM NaCl-haltigem Puffer lysiert und die Zellfragmente sedimentiert. Die Kontroll-IP mit  $\Delta nup2$  sowie die IP mit einer der Wildtypproben wurde in 400 mM NaCl-haltigem Puffer durchgeführt, während der Überstand der zweiten Probe durch Zugabe von salzfreiem Puffer auf eine Endkonzentration von 125 mM NaCl verdünnt wurde. Die Inkubation mit den mit Antikörper vorinkubierten Kügelchen erfolgte über Nacht bei 4°C. Ein Teil der Probe wurde auf einem SDS-Gel aufgetrennt und nach Westernblot mit den jeweiligen Antikörpern dekoriert. Die Negativkontrolle des *knockouts* zeigt nur Signale für die schwere Antikörperkette, jedoch nicht für Nup2 oder einen seiner Interaktionspartner Nup60, Srp1 oder Kap95. Wie in den Versuchen zuvor wurden Nup60, Srp1 sowie Nup2 auch unter höheren Salzbedingungen vergleichbar effizient gereinigt wie bei der Inkubation in Puffer mit niedrigerer Salzkonzentration. Erstaunlich hingegen ist jedoch die Menge an Kap95, welche in der Probe mit verdünntem Puffer nachgewiesen wurde, während bei 400 mM kein Signal zu erkennen war (Abbildung 34B). Die in Abbildung 34D dargestellte Lysekontrolle zeigt, dass die Ergebnisse beider Bedingungen vergleichbar sind, da die Proben für Überstand, Pellet und Durchfluss eine effiziente Lyse und Bindung zeigen. In  $\Delta nup2$  wurde kein Nup2 detektiert. Aufgrund der Ergebnisse dieses Versuchs wurde die Lyse der Zellen weiterhin bei 400 mM durchgeführt, der Puffer jedoch vor Inkubation mit den magnetischen Kügelchen auf 125 mM verdünnt.

#### 4.8.5. Optimierung der Elutionsbedingungen: Salzelution

Zur Elution wurde in den vorherigen Versuchen SDS-Probenpuffer verwendet und die gebundenen Proteine bei 65°C von den magnetischen Kügelchen gelöst. Bei diesem Prozess wurde aber neben den gebundenen Proteinen auch der verwendete Antikörper eluiert, was sich bei der immunologischen Detektion zeigte und zu einem störenden Signal führte. Da die Proben nach erfolgreicher Optimierung der IP massenspektrometrisch analysiert werden

sollten und eine zu große Menge an Antikörper dabei stören könnte, wurden noch weitere Elutionsmethoden getestet, welche weniger stark sind und den Antikörper nicht mit eluieren sollen. Basierend auf dem im vorigen Abschnitt beschriebenen Versuch wurde eine Salzelution durchgeführt, da gezeigt wurde, dass manche Proteine bereits bei niedrigen Salzkonzentrationen ihre Bindung zu Nup2 verlieren und eluiert werden. Die IP wurde mit einem 50 OD-Pellet durchgeführt, wobei die Lyse in 400 mM NaCl-haltigem Puffer und die Bindung in auf 125 mM NaCl verdünntem Puffer durchgeführt wurde. Die Elution erfolgte durch Inkubation in 1 ml Puffer mit 300 mM NaCl bei 4°C für eine Stunde. Anschließend wurde der Überstand mit TCA gefällt und 1 ml Puffer mit 600 mM NaCl auf die magnetischen Kügelchen gegeben. Nach einer Stunde wurde der Überstand wieder entfernt, mit TCA gefällt und 1 ml Puffer mit 1 M NaCl für eine Stunde auf die Kügelchen gegeben. Auch diese Probe wurde mit TCA gefällt und die magnetischen Kügelchen zum Schluss mit SDS-Probenpuffer bei 65°C inkubiert, um die durch das Salz nicht eluierbaren Proteine zu eluieren. Ein Teil der Proben wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen und nach dem Transfer auf eine Membran mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert und analysiert. In Abbildung 36A ist das Ergebnis der einzelnen Elutionsschritte zu sehen. Während Nup60 und Nup2 auch nach dreistündiger Salzelution nicht eluiert wurden und erst nach Elution mit SDS-Probenpuffer detektierbar sind, ist Kap95 bereits nach Elution mit 600 mM NaCl detektierbar. Die Lysekontrolle in Abbildung 36B bestätigt die effiziente Lyse sowie Bindung von Nup2. Dieses Ergebnis verdeutlicht nochmals, dass die Interaktion von Nup2 mit Kap95 relativ schwach ist und in Kombination von Salzkonzentration und Inkubationszeit gelöst wird. Die Elution mit Salz ist somit nicht geeignet für alle gebundenen Proteine, dennoch ergibt sich eine neue Möglichkeit, durch diese Art der Elution zwischen stärkeren und schwächeren Interaktionspartnern zu unterscheiden.



**Abbildung 36: Elution immunpräzipitierter Proteinkomplexe durch verschiedene Salzkonzentrationen.**

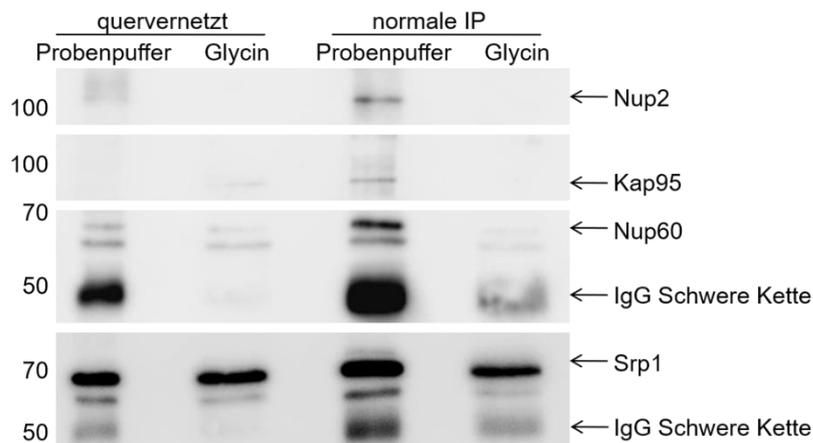
Der *NUP2*-Integrationsstamm (GSY1487) wurde bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,8 bei 30°C inkubiert. 50 OD-Einheiten der Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und über mechanische Lyse in Lysepuffer mit 400 mM NaCl aufgeschlossen. Das Lysat wurde durch Zentrifugation von Zelltrümmern befreit, bevor der Überstand auf mit Nup2-

N-Antikörper inkubierte (1 h; RT; 3 µg) magnetische Protein A/G-Kügelchen gegeben, mit salzfreiem IP-Puffer auf eine Konzentration von 125 mM NaCl verdünnt und über Nacht inkubiert wurde. Nicht gebundene Proteine wurden durch Waschen entfernt und schwächer gebundene potentielle Interaktionspartner von Nup2 wurden durch Zugabe von IP-Puffer mit 300 mM NaCl (1 ml; 1 h; 4°C) eluiert. Anschließend folgte ein Elutionsschritt mit IP-Puffer mit 600 mM NaCl (1 ml; 1 h; 4°C), gefolgt von einem Elutionsschritt mit IP-Puffer mit 1 M NaCl (1 ml; 1 h; 4°C). Um auch stärker gebundene Proteinkomplexe zu eluieren, erfolgte ein Elutionsschritt mit 1x Probenpuffer bei 60°C. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **A:** Die Salzelutionen wurden mit TCA gefällt, bevor 1/3 der Eluate in einem 11 %-igen Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert wurde. Die Membran wurde mit Nup2-N-, Nup60- und Kap95- Primärantikörper sowie POD-gekoppeltem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) inkubiert. **B:** Zur Kontrolle der Lyse- sowie der Bindungseffizienz wurden Proben des Überstands (Ü) sowie der abzentrifugierten Zellbestandteile (P) und der nicht gebundenen Proteine (DF) auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Nup2-N-Primärantikörper und POD-gekoppeltem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) inkubiert und analysiert.

#### 4.8.6. Optimierung der Elutionsbedingungen: Quervernetzung des Antikörpers und saure Elution mit Glycin

Um zu verhindern, dass der Antikörper zusammen mit Nup2 und seinen Interaktionspartnern von den magnetischen Kügelchen eluiert wird, kann er an diese quervernetzt werden. Diese Prozedur der Quervernetzung wurde wie in 3.4.12 beschrieben unter Verwendung des Quervernetzers Dimethylpimelimidat (DMP) durchgeführt. Bei DMP handelt es sich um einen Quervernetzer mit zwei Imidoester-Gruppen, welche unter alkalischen Bedingungen (pH 8-10) mit primären Aminen reagiert. Nachdem der Antikörper an die magnetischen Protein-A/G-Kügelchen quervernetzt wurde, wurde die IP unter den optimierten Bedingungen (siehe vorherige Abschnitte) durchgeführt. Sowohl unter Quervernetzungsbedingungen als auch unter normalen Kontrollbedingungen wurden zwei Ansätze angefertigt, da zwei verschiedene Arten der Elution getestet werden sollten. Einerseits wurde wie in den vorherigen Experimenten die Elution mit SDS-Probenpuffer bei 65°C durchgeführt und andererseits wurde eine saure Elution mit Glycin pH 2,6 getestet. Hierzu wurden dreimal 50 µl 0,2 M Glycin pH 2,6 auf die Kügelchen gegeben und jeweils für 10 min inkubiert, bevor alle Elutionsfraktionen in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß, in welchem 150 µl 1 M Tris pH 8 vorgelegt waren, vereint wurden. Das vorgelegte Tris neutralisierte den pH-Wert der eluierten Proben, da ein zu saures Milieu schädlich für Proteine ist. Die sauer eluierten Proteine wurden vor dem Auftragen auf das SDS-Gel mit TCA gefällt werden. Ein Teil der Eluate wurde anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen und nach dem Westernblot mit spezifischen Antikörpern untersucht. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 37 dargestellt. Sowohl die IP mit quervernetztem Antikörper als auch die normale IP haben funktioniert, jedoch lassen sich starke Unterschiede bei der Elution erkennen. Während Srp1 unter allen Bedingungen gleichermaßen eluiert wurde, gibt es bei Nup2 und Nup60 starke Varianzen. Betrachtet man zunächst die IP unter normalen Bedingungen ohne Quervernetzung, so sieht man, dass bei der Elution viel Antikörper mit eluiert wird, während es bei der Glycin-Elution nur eine geringe Menge ist. Das Mengenverhältnis spiegelt sich auch bei Nup2 wider. Die Interaktion zwischen Nup2 und seinem spezifischen Antikörper scheint so stark zu sein, dass diese durch Glycin allein nicht

gelöst werden kann. Ähnlich scheint es sich auch für die Interaktion von Nup60 und Nup2 zu verhalten, da auch das Nup60-Signal nach Elution mit Glycin wesentlich schwächer ist. Das gleiche Ergebnis lässt sich auch unter den quervernetzten Bedingungen erkennen, wobei hier die Elution des Antikörpers mit SDS-Probenpuffer wesentlich geringer ist. Mit der Menge an eluiertem Antikörper sinkt aufgrund der starken Bindung auch die Menge an eluiertem Nup2 sowie seinem Interaktionspartner Nup60. Kap95 konnte nur in der normalen IP-Probe nach Elution mit SDS-Probenpuffer sowie sehr schwach nach Quervernetzung und saurer Elution detektiert werden, wobei es sich hier um ein Detektionsproblem handelt, da nur sehr wenig Kap95 vorhanden ist und anhand dieses Proteins in diesem Versuch keine Rückschlüsse getroffen werden können. Im Vergleich beider Elutionsmethoden ist zu erkennen, dass die Elution mit SDS-Probenpuffer effizienter ist, auch wenn auf diese Weise mehr Antikörper eluiert wird. Die verwendeten Mengen an Antikörper sind mit 3 µg bei der IP ohnehin so gering, dass sie bei späteren massenspektrometrischen Analysen nicht störend sein sollten. Da auch nach Quervernetzung und Elution unter Verwendung des SDS-Probenpuffers Antikörper eluiert wurde und trotz höherem Aufwand die Elution nicht effizienter war als ohne Quervernetzung, wurde diese Möglichkeit verworfen.



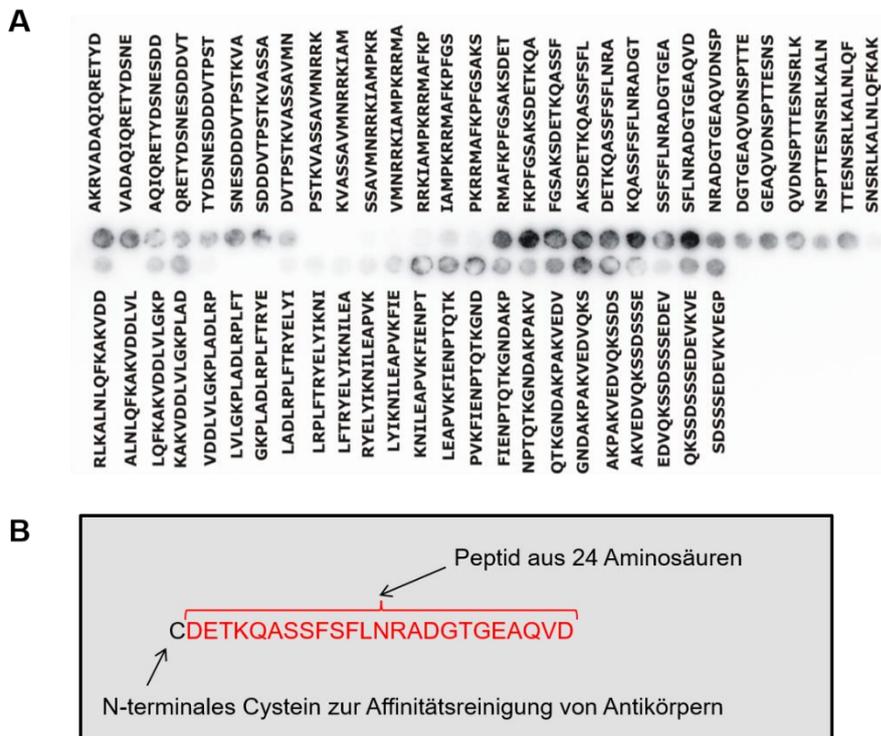
**Abbildung 37: IP nach Quervernetzung des Antikörpers sowie Vergleich der Elutionsbedingungen**

Magnetische Protein A/G-Kügelchen wurden pro Ansatz mit 3 µg Nup2-N-Antikörper inkubiert (1 h; RT). Eine Hälfte der Nup2-gekoppelten Kügelchen wurde mit DMP quervernetzt. Pro Ansatz wurden 50 OD-Einheiten des *NUP2*-Integrationsstamms (GSY1487) in IP-Puffer mit 400 mM NaCl mechanisch lysiert, zentrifugiert und der Überstand nach Verdünnen auf 125 mM NaCl auf die mit Nup2-N-Antikörper inkubierten bzw. quervernetzten magnetischen Kügelchen gegeben. Die Elution erfolgte mit 1x-Probenpuffer bei 60°C oder durch saure Elution mit Glycin pH 2,6 (3x 50 µl; je 10 min). Die sauer eluierten Proben wurden durch Zugabe von 150 µl 1 M Tris pH 8 neutralisiert, bevor sie mit TCA gefällt wurden. 1/2 der Eluatproben wurden in einem 11 %-igen Gel aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran mit den Primärantikörpern gegen Nup2-N, Nup60, Kap95 und Srp1 sowie dem POD-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) inkubiert. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben.

#### 4.8.7. Optimierung der Elutionsbedingungen: Elution mit Peptid

Eine weitere Möglichkeit, gebundene Proteine von einem Antikörper zu lösen, ist die kompetitive Elution über Peptid. Hierzu müssen die genauen Bindungssequenzen des

Proteins an den Antikörper bekannt sein, welche sich anhand synthetisch hergestellter Peptidspots herausfinden lassen. Der für die IP verwendete Antikörper ist gegen den N-terminalen Bereich von Nup2 gerichtet, weshalb ausschließlich dieser Bereich getestet wurde. In Abbildung 38A ist der mit Nup2-Antikörper dekorierte Peptidspot (hergestellt von Prof. Dr. Martin Jung) nach immunologischer Detektion dargestellt. Anhand der Signalintensität lässt sich die Bindungsaffinität nachweisen. Innerhalb des N-Terminus gibt es mehrere Sequenzbereiche, welche von dem Antikörper erkannt werden, wobei ein Bereich ein besonders intensives Signal zeigt. Dieser Bereich wurde synthetisch hergestellt und zudem noch ein N-terminales Cystein zugefügt, um, falls erforderlich, eine Affinitätsreinigung des Antikörpers über dieses Peptid zu ermöglichen (Herstellung Prof. Dr. Martin Jung). Die genaue Peptidsequenz inklusive des angefügten Cysteins ist in Abbildung 38B gezeigt.

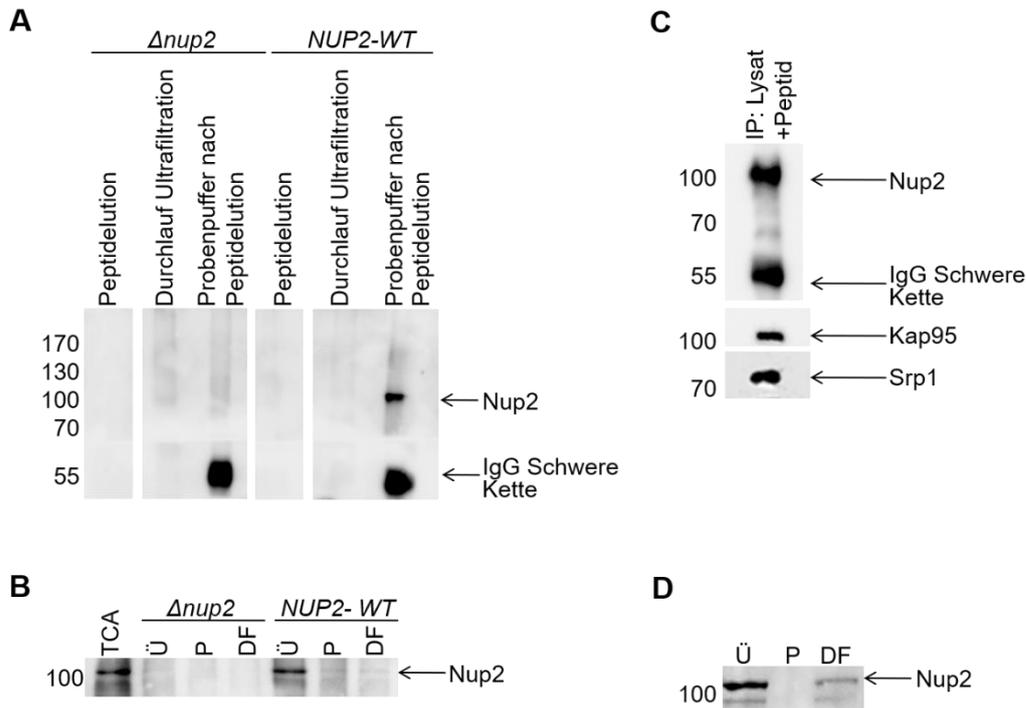


**Abbildung 38: Detektion der genauen Bindestelle des Nup2-N-Antikörpers mittels Peptidspots sowie schematische Darstellung des synthetisch hergestellten Peptids.**

**A:** Der N-Terminus (1-178) von Nup2 wurde als Peptide aus 15 Aminosäuren um je drei Aminosäuren versetzt synthetisch hergestellt und auf eine Membran gespottet. Diese wurde anschließend mit Nup2-N-Antikörper sowie POD-gekoppeltem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) inkubiert. Aminosäuresequenzbereiche, welche vom Antikörper erkannt werden, zeigen ein Chemilumineszenzsignal. **B:** Anhand der Ergebnisse der Peptidspots wurde synthetisch ein Peptid hergestellt, welches neben den 24 Aminosäuren, bei welchen bei den Peptidspots ein starkes Signal erkennbar war, noch ein N-terminales Cystein enthält, welches zur Affinitätsreinigung von Antikörpern benötigt wird.

Die Immunpräzipitation wurde nach den in den vorherigen Kapiteln optimierten Bedingungen durchgeführt, wobei neben dem integrierten *NUP2-WT* der dazugehörige  $\Delta nup2$ -Ausgangsstamm mitgeführt wurde. Zur Kontrolle der Lyse- und Bindungseffizienz wurde die in Abbildung 39B gezeigte Lysekontrolle durchgeführt. Die Elution der Proteinkomplexe

erfolgte durch Zugabe von insgesamt 500  $\mu$ l Peptid-Puffer-Lösung (5 mg/ $\mu$ l) in 100  $\mu$ l Schritten, wobei alle fünf Elutionen vereint wurden. Aufgrund des hohen Probenvolumens sowie der hohen Peptidmenge wurde die Probe unter Verwendung von Ultrafiltrationsröhrchen eingeeengt. Die eluierten Proteine wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und der Durchlauf der Probe wurde mit TCA gefällt und mittels Westernblot analysiert. Um die Effizienz der Elution zu überprüfen, wurden die magnetischen Kügelchen nach der Elution mit Peptid nochmals mit SDS-Probenpuffer bei 65°C inkubiert. Abbildung 39A zeigt die mit Nup2-Antikörper immunologisch detektierten Proben der Elution nach der IP. In den Proben von  $\Delta$ nup2 ist in keiner der Spuren ein Signal erkennbar, abgesehen von der schweren Kette des Antikörpers. Die Peptidelution des integrierten Wildtyps zeigt ebenso wie die über Ultrafiltrationsröhrchen gereinigte Probe ebenfalls keine Bande für Nup2. Die mit SDS-Probenpuffer eluierte Probe nach der Peptidelution zeigt ein starkes Signal für Nup2, welches ebenfalls dafürspricht, dass die Elution mit Peptid nicht erfolgreich war. Um zu testen, ob das verwendete Peptid überhaupt die Fähigkeit besitzt, gebundenes Nup2 zu verdrängen bzw. das Binden von Nup2 an den Antikörper zu verhindern, wurde eine weitere IP durchgeführt, in welcher schon während der Inkubation des Lysats mit den mit Nup2-Antikörper vorinkubierten magnetischen Kügelchen 500  $\mu$ l Peptid-Puffer-Lösung (10 mg/ml) zugegeben wurden. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 39C gezeigt. Die Lyse sowie die Bindung scheinen, wie anhand der Lysekontrolle zu sehen ist, effizient gewesen zu sein (Abbildung 39D). Ebenso zeigt sich eine effiziente Bindung in der Elutionsprobe, in welcher neben einem deutlichen Signal für Nup2 auch Kap95 und Srp1 detektiert wurden. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass das Peptid nicht effizient genug an den Antikörper bindet, um das Protein zu verdrängen.



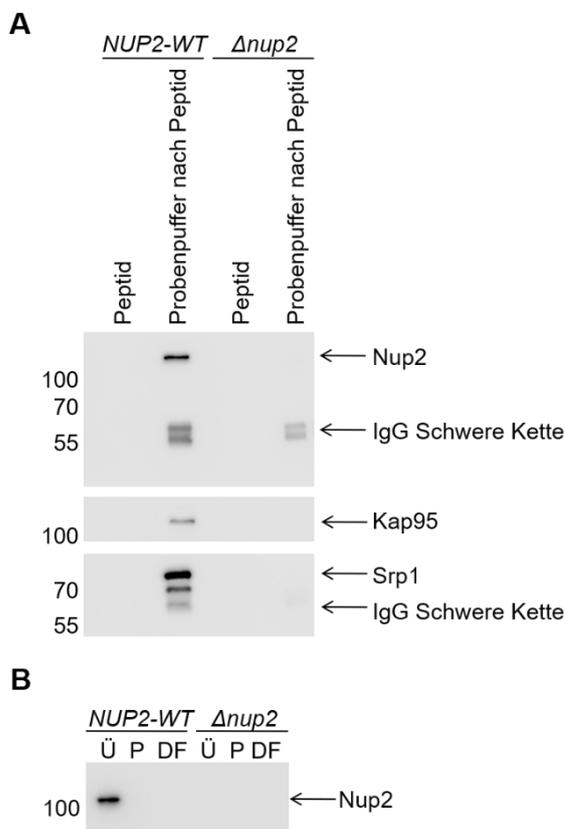
**Abbildung 39: Elution gebundener Proteinkomplexe von über Protein affinitätsgereinigtem Antikörper durch Sättigung mit Nup2-Peptid.**

50 OD-Einheiten des *NUP2*-Integrationsstamms (GSY1487) sowie 50 OD-Einheiten des *Δnup2*-Stamms (GSY432) wurden in IP-Puffer mit 400 mM NaCl mechanisch lysiert, zentrifugiert und der Überstand nach Verdünnen auf 125 mM NaCl auf die mit Nup2-N-Antikörper inkubierten magnetischen Kügelchen gegeben und über Nacht bei 4°C rollend inkubiert. Die nicht gebundenen Proteine wurden mit Puffer gewegewaschen und die gebundenen Proteinkomplexe wurden durch Zugabe von 5 mal 50  $\mu$ l Peptid (5  $\mu$ g/ $\mu$ l) für je 10 min eluiert. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **A:** Die einzelnen Elutionen wurden vereint und über Ultrafiltrations-Röhrchen konzentriert, bevor sie in einem 11 %-SDS-Gel aufgetrennt und nach dem Transfer mit Nup2-N-Primärantikörper sowie POD-gekoppeltem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) inkubiert wurden. Zur Kontrolle der Proteine, welche nicht über Peptid von den magnetischen Kügelchen gelöst werden konnten, wurden die Kügelchen mit 1x-Probenpuffer bei 60°C inkubiert. Zudem wurde der Durchlauf, welcher bei der Aufkonzentration entstand, ebenfalls analysiert. **B:** Zur Kontrolle der Lyse- sowie der Bindungseffizienz wurden Proben des Überstands (Ü) sowie der abzentrifugierten Zellbestandteile (P) und der nicht gebundenen Proteine (DF) auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Nup2-N-Primärantikörper und POD-gekoppeltem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) inkubiert und analysiert. **C:** Die Immunpräzipitation wurde auch in Anwesenheit des Nup2-Peptids während der Bindung an die mit Nup2-N-Antikörper gekoppelten Protein A/G-Kügelchen getestet. Hierzu wurden 2,5  $\mu$ g Peptid zum Lysat gegeben, bevor es über Nacht mit den vorinkubierten Protein A/G-Kügelchen inkubiert wurde. **D:** Neben der Eluatprobe wurde auch die Lyse- sowie Bindungseffizienz überprüft.

Eine mögliche Ursache, weshalb die Elution mit Peptid fehlgeschlagen war, könnte darin liegen, dass es, wie in Abbildung 38A zu sehen ist, noch weitere Sequenzen gibt, an denen der verwendete Antikörper das Protein erkennt. Das Peptid hingegen bindet nur an einer 24 Aminosäuren langen Sequenz, weshalb die anderen Sequenzabschnitte des Antikörpers möglicherweise weiterhin mit Nup2 interagieren können. Der zu diesem Zeitpunkt verwendete Antikörper wurde über den rekombinant hergestellten N-Terminus von Nup2 affinitätsgereinigt, woraus die verschiedenen Bindungssequenzen resultieren. Über eine Affinitätsreinigung mit dem synthetischen Peptid kann der Antikörper spezifischer gereinigt werden und somit möglicherweise eine Elution mit dem Peptid für die Immunpräzipitation ermöglicht werden. Die Affinitätsreinigung des Antikörpers erfolgte wie in 3.3.8 beschrieben und die Ergebnisse der

mit diesem neuen Antikörper durchgeführten IP sind in Abbildung 40A gezeigt. Trotz Verwendung des über Peptid gereinigten Antikörpers war auch bei dieser Immunpräzipitation kein eluiertes Nup2 bei Verwendung des Peptids detektierbar. Jedoch zeigt die mit SDS-Probenpuffer eluierte Probe ein Signal für Nup2 sowie seine Interaktionspartner Kap95 und Srp1 in der Wildtypprobe. Der verwendete  $\Delta nup2$ -Stamm zeigt ein Signal für die schwere Kette des Antikörpers, jedoch nicht für Nup2 oder einen seiner getesteten Interaktionspartner. Die in Abbildung 40B dargestellte Lysekontrolle bestätigt ebenfalls die erfolgreiche Lyse sowie Bindung von Nup2 an die mit Antikörper inkubierten Protein A/G-Kügelchen.

Trotz des optimierten Antikörpers, welcher nur die Peptidsequenz erkennen sollte, wurde keine erfolgreiche Elution gebundener Proteine über das Peptid erzielt, weshalb auf diese Art der Elution für die massenspektrometrische Analyse verzichtet wurde.

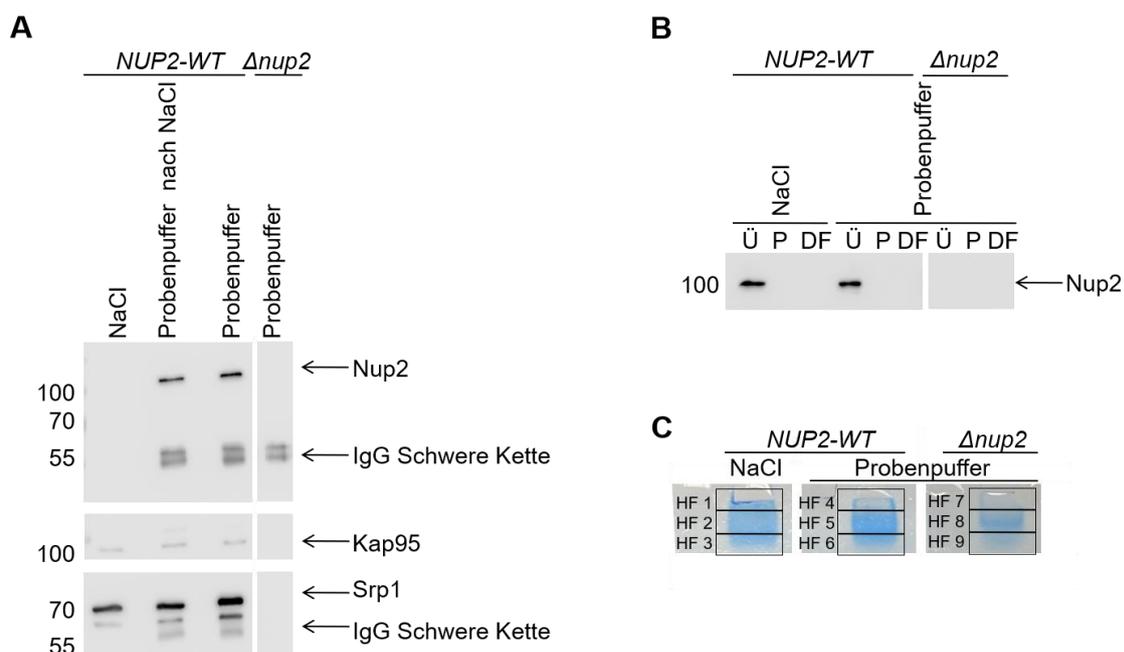


**Abbildung 40: Elution gebundener Proteinkomplexe von über Peptid affinitätsgereinigtem Antikörper durch Sättigung mit Nup2-Peptid.**

50 OD-Einheiten des *NUP2*-Integrationsstamms (GSY1487) sowie 50 OD-Einheiten des  $\Delta nup2$ -Stamms (GSY432) wurden in IP-Puffer mit 400 mM NaCl mechanisch lysiert, zentrifugiert und der Überstand nach Verdünnen auf 125 mM NaCl auf die mit Nup2-N-Antikörper (über Peptid affinitätsgereinigt) inkubierten magnetischen Kügelchen gegeben und über Nacht bei 4°C rollend inkubiert. Nicht gebundene Proteine wurden mit Puffer gewegewaschen und die gebundenen Proteinkomplexe wurden durch Zugabe von 5 mal 50  $\mu$ l Peptid (5  $\mu$ g/ $\mu$ l) für je 10 min eluiert. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **A:** Die einzelnen Elutionen wurden vereint und mittels TCA gefällt, bevor sie in einem 11 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und nach dem Transfer mit Nup2-N-Primärantikörper (über Protein affinitätsgereinigt) sowie POD-gekoppeltem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) inkubiert wurden. Zur Kontrolle der Proteine, welche nicht über Peptid von den magnetischen Kügelchen gelöst werden konnten, wurden die Kügelchen mit 1x-Probenpuffer bei 60°C inkubiert. **B:** Zur Kontrolle der Lyse- sowie der Bindungseffizienz wurden Proben des Überstands (Ü) sowie der abzentrifugierten Zellbestandteile (P) und der nicht gebundenen Proteine (DF) auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Nup2-N-Primärantikörper und POD-gekoppeltem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) inkubiert und analysiert.

#### 4.8.8. Vorbereitung co-immunpräzipitierter Proben für die massenspektrometrische Analyse

Nachdem sowohl Lyse- als auch Bindungsbedingungen sowie die Elution der Co-Immunpräzipitation für Nup2 optimiert worden waren, sollten die mittels immunologischer Detektion erhaltenen Ergebnisse auch massenspektrometrisch verifiziert und möglicherweise weitere, noch nicht bekannte (SUMO-abhängige) Interaktionspartner von Nup2 identifiziert werden. Die Immunpräzipitation wurde für den integrierten Wildtyp unter zwei verschiedenen Elutionsbedingungen durchgeführt und es wurde eine Negativkontrolle ( $\Delta nup2$ ) mitgeführt. Zur Lyse der Pellets von 50 OD-Einheiten wurde Lysepuffer mit 400 mM NaCl sowie 1 % Triton X-100 verwendet, welcher für den Bindungsvorgang auf 125 mM NaCl verdünnt wurde. Die Elution erfolgte für eine Probe sowie die Kontrollprobe unter Verwendung von SDS-Probenpuffer und Inkubation der Probe bei 60°C. Die zweite Probe des integrierten Wildtyps wurde durch einstündige Inkubation mit 600 mM NaCl hergestellt, da bereits in den Vorversuchen gezeigt wurde, dass schwächere Interaktionspartner bereits unter diesen Bedingungen eluiert werden. Somit lässt sich anhand der beiden Elutionsbedingungen ein erster Eindruck über die Stärke der Interaktion verschaffen. Nach der Elution mit NaCl wurden zur Kontrolle alle noch nicht eluierten Proteine ebenfalls durch Inkubation mit SDS-Probenpuffer eluiert. Abbildung 41 zeigt die immunologisch detektierten Ergebnisse der Elution und der Lysekontrolle sowie die in ein SDS-Gel eingelaufenen Proben, welche massenspektrometrisch analysiert wurden.



**Abbildung 41: Immunpräzipitation von Nup2 und seinen Interaktionspartnern sowie Analyse der Elutionseffizienz zur weiteren Bearbeitung mittels massenspektrometrischer Analyse.**

Es wurden 2x je 50 OD-Einheiten des *NUP2*-Integrationsstamms (GSY1487) sowie einmal 50 OD-Einheiten des *Δnup2*-Stamms (GSY432) in Anwesenheit von IP-Puffer mit 400 mM NaCl mechanisch aufgeschlossen und der Überstand nach Zentrifugation in verdünntem IP-Puffer mit 125 mM NaCl in Anwesenheit von mit Nup2-N-Antikörper inkubierter Protein A/G-Sepharose über Nacht bei 4°C inkubiert. Die gebundenen Proteine in einem Ansatz mit Nup2-WT wurden durch Zugabe von 250 µl 600 mM NaCl eluiert, mit TCA gefällt und die Kügelchen anschließend mit 1x-Probenpuffer bei 60°C inkubiert, um nicht eluierte Proteine zu detektieren. Die zweite Probe von GSY1487 sowie die *Δnup2*-Probe wurden mit 1x-Probenpuffer bei 60°C inkubiert um die gebundenen Proteinkomplexe zu eluieren. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **A:** 1/3 der Eluate wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und anschließend mit den Primärantikörpern gegen das Zielprotein Nup2 sowie die bekannten Interaktionspartner Kap95 und Srp1 und dem POD-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) immunologisch detektiert. **B:** Zur Kontrolle der Lyse- sowie der Bindungseffizienz wurden Proben des Überstands (Ü) sowie der abzentrifugierten Zellbestandteile (P) und der nicht gebundenen Proteine (DF) auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Nup2-N-Primärantikörper und POD-gekoppeltem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) inkubiert und analysiert. **C:** 2/3 der Eluatproben wurden in ein vorgefertigtes SDS-Gel der Firma Biorad einlaufen gelassen, mit kolloidalem Coomassie gefärbt und zur Massenspektrometrie (MS) gegeben.

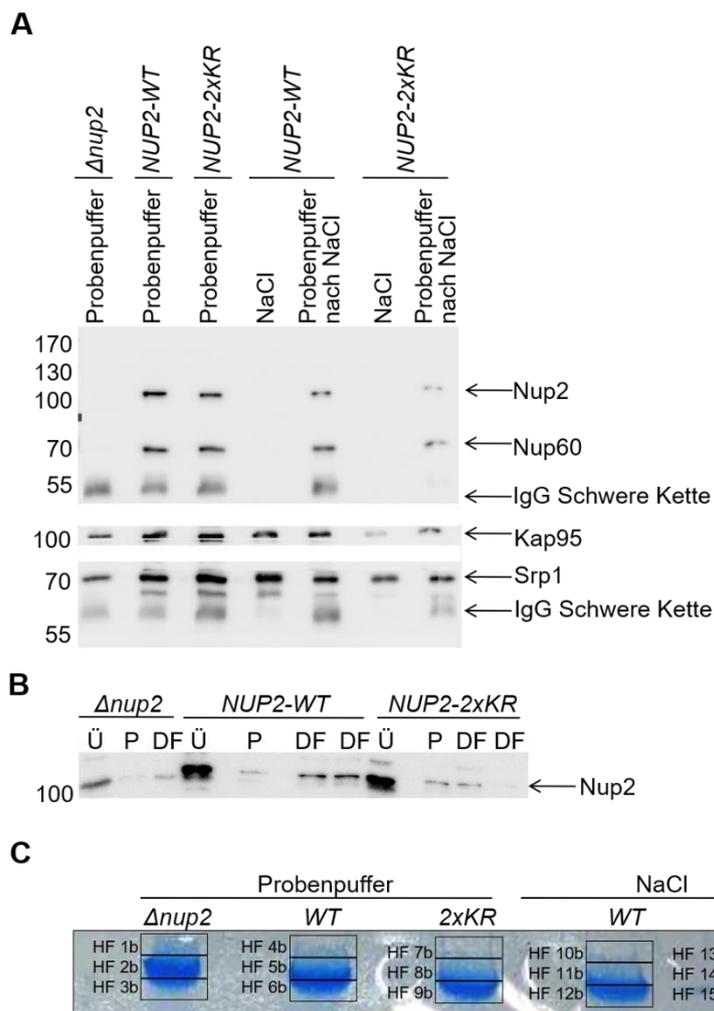
Wie bereits in den vorangehenden Versuchen wurde das Zielprotein Nup2 nicht durch 600 mM NaCl eluiert, sondern es erfordert den Elutionsschritt mit SDS-Probenpuffer bei 60°C. Die Importine Kap95 und Srp1 hingegen wurden zum Teil auch schon durch Salz von ihrem Interaktionspartner Nup2 getrennt und in den Elutionsproben (Abbildung 41A) nachgewiesen. Die Negativkontrolle zeigt keine Signale für die untersuchten Proteine. Nachdem sowohl die Eluate als auch die in Abbildung 41B dargestellte Lyse- und Bindungskontrolle eine erfolgreiche Immunpräzipitation bestätigten, wurden 2/3 der Eluatproben auf ein bereits vorgefertigt gekauftes SDS-Gel für 4 min einlaufen gelassen und nach Fixierung mit kolloidalem Coomassie gefärbt, bevor die jeweiligen Proben unter Verwendung eines Skalpell aus geschnitten, in je etwa drei gleich breite Stücke geschnitten und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt wurden (Abbildung 41C). Diese Proben wurden zur massenspektrometrischen Analyse gegeben. Sowohl der Trypsin-Verdau als auch die Massenspektrometrie sowie die Peptidanalyse wurden von Frau Dr. Claudia Fecher-Trost am Universitätsklinikum des Saarlandes im Bereich der "Experimentellen und Klinischen Pharmakologie und Toxikologie" durchgeführt. Die Rohdaten wurden dann im Rahmen dieser Arbeit analysiert und ausgewertet (Tabelle 22).

Tabelle 18: MS1: Die in der Co-IP gereinigten und massenspektrometrisch identifizierten Interaktionspartner von Nup2

Protein	MW [kDa]	Anzahl der gefundenen Peptide		
		<i>NUP2-WT</i>		<i>Δnup2</i>
		Elution mit NaCl	Elution mit 1x-Probenpuffer	
Nukleoporin <b>Nup2</b>	78	8	63	-
Importin alpha <b>Srp1</b>	60	44	50	-
Importin beta <b>Kap95</b>	95	9	14	-
Nukleoporin <b>Nup60</b>	59	-	25	-
GTP-Bindeprotein <b>Gsp1/Ran</b>	24	6	12	

Einen ersten Eindruck über die Effizienz der IP und der anschließenden MS ergab der Vergleich der immunologisch gewonnenen Ergebnisse mit den gefundenen Peptiden (Tabelle

18). Peptide des Zielproteins Nup2 wurden ausschließlich in den Wildtypproben gefunden, wobei, wie auch anhand der immunologischen Analyse mittels Westernblot gezeigt wurde, der Großteil an Nup2 erst durch Elution mit SDS-Probenpuffer eluiert wird. Während gemäß Westernblot keine Elution von Nup2 mit NaCl erfolgte, wurden während der Massenspektrometrie Peptide von Nup2 gefunden. Nup60 wurde ebenso wie bei der Westernblot-Analyse nur in der mit SDS-Probenpuffer eluierten Probe gefunden, während Kap95 und Srp1 sowie Gsp1 auch bereits in der mit NaCl eluierten Probe durch die Massenspektrometrie nachgewiesen wurden. Die Ergebnisse von Westernblot und MS waren insgesamt vergleichbar, weshalb weitere Ansätze untersucht wurden.



**Abbildung 42: Immunpräzipitation von Nup2 bzw. Nup2-2xKR und seinen Interaktionspartnern.**

Es wurden 2x je 50 OD-Einheiten des *NUP2*-Integrationsstamms (GSY1487) sowie des *NUP2-2xKR*-Integrationsstamms (GSY1488) in Anwesenheit von IP-Puffer mit 400 mM NaCl mechanisch aufgeschlossen und der Überstand nach Zentrifugation in verdünntem IP-Puffer mit 125 mM NaCl in Anwesenheit von mit Nup2-N-Antikörper inkubierter Protein A/G-Sepharose über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurden 50 OD-Einheiten des  $\Delta nup2$ -Stamms (GSY432) mitgeführt und auf die gleiche Art behandelt. Nachdem die nicht gebundenen Proteine gewaschen waren, wurden die gebundenen Proteinkomplexe in je einem Ansatz durch Zugabe von 250  $\mu$ l 600 mM NaCl eluiert, mit TCA gefällt und die Kügelchen anschließend ebenfalls bei 60°C inkubiert. Die jeweils andere Probe von GSY1487 und GSY1488 sowie die  $\Delta nup2$ -Probe wurden mit 1x-Probenpuffer bei 60°C inkubiert um die gebundenen Proteinkomplexe zu eluieren. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **A:** 1/3 der Eluate wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und anschließend mit den Primärintikörpern gegen das

Zielprotein Nup2 und die bekannten Interaktionspartner Nup60, Kap95 und Srp1 sowie dem POD-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) immunologisch detektiert. **B:** Zur Kontrolle der Lyse- sowie der Bindungseffizienz wurden Proben des Überstands (Ü) sowie der abzentrifugierten Zellbestandteile (P) und der nicht gebundenen Proteine (DF) auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Nup2-N-Primärantikörper und POD-gekoppeltem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) inkubiert und analysiert. **C:** 2/3 der Eluatproben wurden in ein vorgefertigtes SDS-Gel einlaufen gelassen, mit kolloidalem Coomassie gefärbt und zur Massenspektrometrie (MS) gegeben.

Die Probenvorbereitung für die zweite massenspektrometrisch zu analysierende IP wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt, wobei noch ein weiterer Hefestamm mit getestet wurde. Hierbei handelt es sich um den integrierten *NUP2-2xKR*-Stamm, in welchem Nup2 nicht mehr SUMOyliert werden kann. Während Nup2 und Nup60 nur in den mit SDS-Probenpuffer eluierten Proben des *NUP2-WT*-Stamms bzw. der *NUP2-SUMO*-Mutante immunologisch detektiert wurden, war für Kap95 und Srp1 neben den Signalen unter allen Elutionsbedingungen auch ein diffuses Signal in der  $\Delta nup2$ -Probe zu erkennen (Abbildung 42A). Die Lyse- und Bindungseffizienz wurden ebenfalls überprüft (Abbildung 42B), bevor die Proben für die massenspektrometrische Analyse auf das vorgefertigte SDS-Gel aufgetragen (Abbildung 42C), wie im vorherigen Abschnitt behandelt und massenspektrometrisch analysiert wurden.

Tabelle 19: MS2: Die in der Co-IP gereinigten und massenspektrometrisch identifizierten Interaktionspartner von Nup2

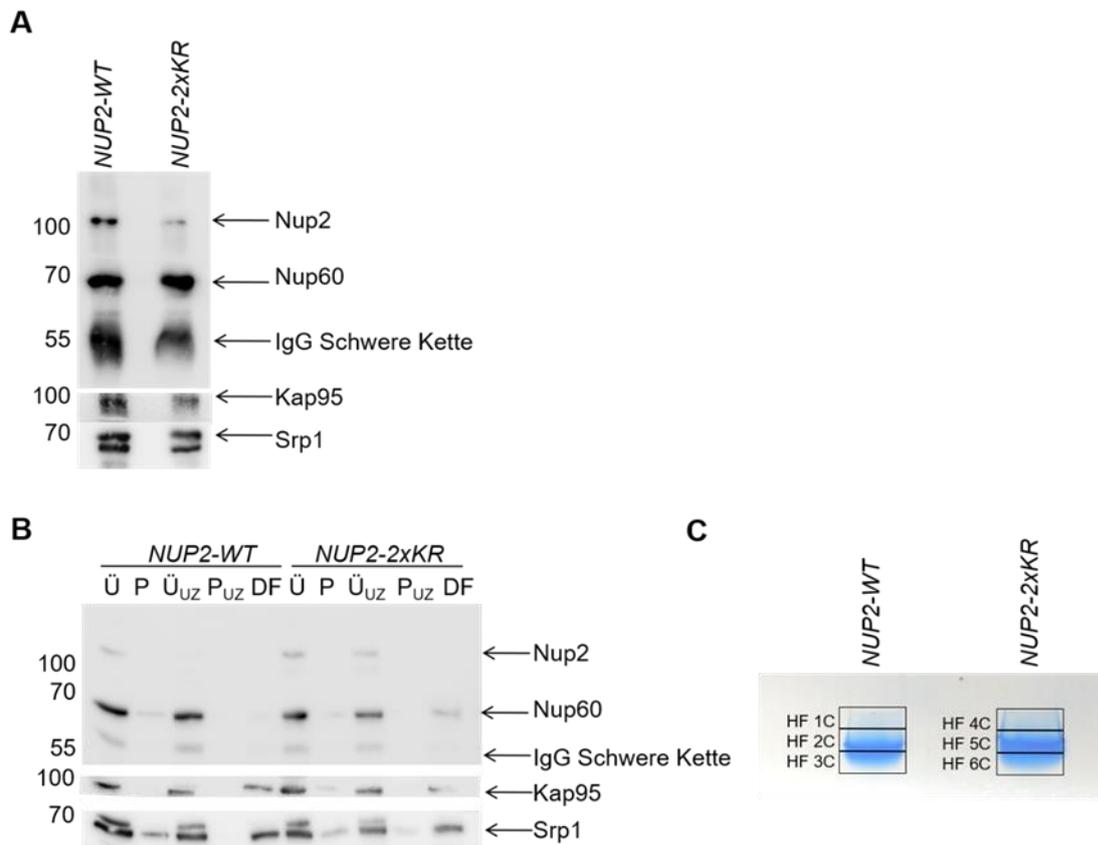
Protein	MW [kDa]	Anzahl der gefundenen Peptide				
		Salzelution		Elution mit 1x-Probenpuffer		
		WT	2xKR	WT	2xKR	$\Delta nup2$
Nukleoporin <b>Nup2</b>	78	-	-	17	21	-
Importin alpha <b>Srp1</b>	60	16	8	12	15	-
Importin beta <b>Kap95</b>	95	-	-	5	6	-
Nukleoporin <b>Nup60</b>	59	-	-	-	2	-
GTP-Binde protein <b>Gsp1/Ran</b>	24	8	5	9	11	9

Für Nup2 wurden in der zweiten MS nach Elution mit SDS-Probenpuffer trotz gleicher Bedingungen und Zellmengen nur etwa ein Viertel der Peptide im Vergleich zur ersten MS gefunden. Ähnlich verhielt es sich auch für die anderen in Tabelle 19 aufgelisteten Proteine. Die Anzahl der gefundenen Peptide von Nup2 in *NUP2-WT* und der *NUP2-2xKR*-Mutante waren, wie in Tabelle 19 zu sehen, vergleichbar, ebenso wie es auch schon der Westernblot zeigte. Nup60 hingegen konnte trotz deutlicher Signale bei der immunologischen Detektion anhand der Peptide nicht bzw. nur in sehr geringer Menge nachgewiesen werden, was die komplette massenspektrometrische Analyse dieses Versuchs in Frage stellt. Srp1 ließ sich in allen Eluatproben abgesehen von der Negativkontrolle nachweisen, während Kap95 in diesem Fall

nur in den mit SDS-Probenpuffer eluierten Proben gefunden wurde, jedoch nicht in der Negativkontrolle.

Eine mögliche Erklärung für die geringere bzw. schwankende Menge an Proteinen könnte laut Frau Dr. Claudia Fecher-Trost eine zu hohe Menge unspezifischer Proteine in den Eluatproben sein. Anhand der ausgewerteten Daten zeigte sich, dass eine Vielzahl der detektierten Proteine, welche auch in der Negativkontrolle gefunden wurden, ribosomale Proteine sind, welche möglicherweise die richtig positiven Signale bei der Messung überlagern.

Aus diesem Grund wurde eine weitere Immunpräzipitation durchgeführt, bei welcher das Lysat vor der Inkubation mit der Sepharose noch für 1 h bei 100.000 x g ultrazentrifugiert wurde. Hierdurch sollten Ribosomen aufgrund ihrer Größe absinken und auf diese Weise entfernt werden. Die Negativkontrolle *Δnup2* wurde in diesem Versuch nicht mitgeführt. Um sicherzugehen, dass durch die Ultrazentrifugation keine wichtigen Interaktionspartner verloren gehen, wurde die Lyse- und Bindungskontrolle für diesen Versuch nicht nur mit dem Antikörper gegen das Zielprotein Nup2 überprüft, sondern auch mit Antikörpern gegen die Interaktionspartner Nup60, Kap95 und Srp1. Wie in Abbildung 43B zu sehen ist, bleiben die Interaktionspartner sowie Nup2 selbst unbeeinflusst von der Ultrazentrifugation, da die Menge an Protein im Überstand nach der Ultrazentrifugation mit der Menge davor vergleichbar ist. Die Eluatproben dieses Versuchs sind in Abbildung 43A dargestellt und zeigen in beiden Proben vergleichbare Mengen an Nup60, Kap95 und Srp1, weshalb die geringere detektierbare Menge an Nup2 in *NUP2-2xKR* als Artefakt gewertet wurde. Abbildung 43C zeigt die für die Massenspektrometrie vorbereiteten Proben und Tabelle 20 die über massenspektrometrische Analyse generierten Ergebnisse für die bekannten Interaktionspartner von Nup2, Nup60, Srp1 und Kap95. Die sehr unterschiedliche Anzahl gefundener Peptide für Nup2 in beiden Proben lassen den Vergleich der anderen Proteine über die gemessenen Peptide nur schwer zu, was vor allem daran liegt, dass in der *NUP2-WT*-Probe zwar insgesamt mehr Peptide gefunden wurden, jedoch aber auch mehr verschiedene Peptide gefunden wurden, was zu einer größeren Proteinabdeckung führt und auch dafür sprechen könnte, dass möglicherweise verschiedene gefundene Peptide aus ein und demselben trypsinverdauten Nup2-Protein stammen. Wäre dies der Fall, könnte trotz einer höheren Menge an Peptiden dennoch die gleiche Menge an Protein vorliegen. Aufgrund dieser nicht eindeutig klärbaren Tatsache wurden die Ergebnisse aus diesem Versuch unter Vorbehalt betrachtet.



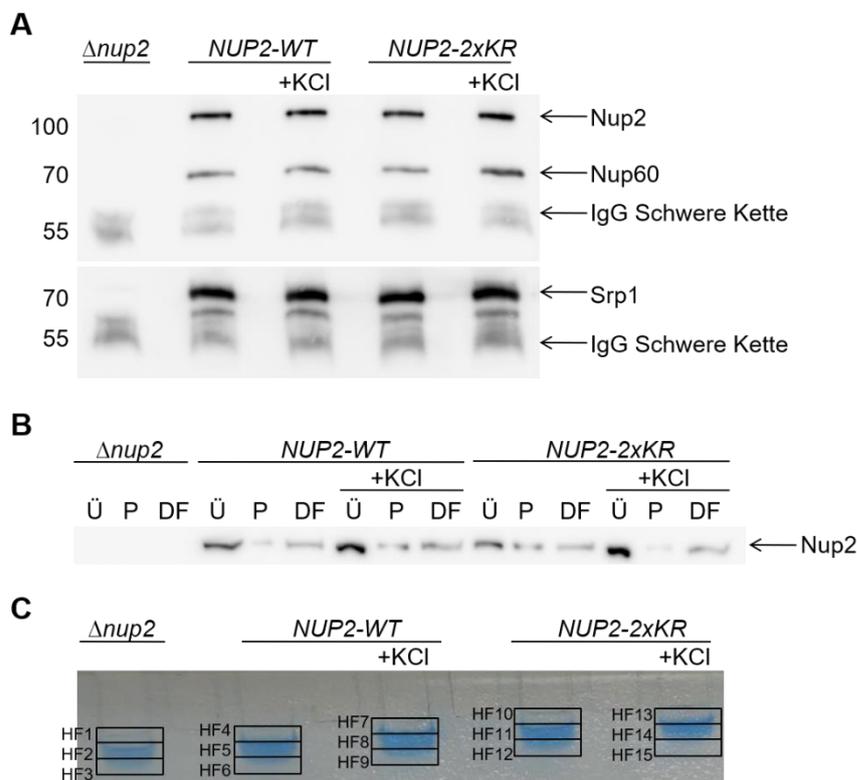
**Abbildung 43: Immunpräzipitation von Nup2 bzw. Nup2-2xKR und seinen Interaktionspartnern nach Ultrazentrifugation.**

Es wurden je 50 OD-Einheiten des *NUP2*-Integrationsstamms (GSY1487) sowie des *NUP2-2xKR*-Integrationsstamms (GSY1488) in Anwesenheit von IP-Puffer mit 400 mM NaCl mechanisch aufgeschlossen. Größere Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt und Ribosomen sollten durch Ultrazentrifugation aus dem Lysat entfernt werden. Der Überstand wurde anschließend in verdünntem IP-Puffer mit 125 mM NaCl in Anwesenheit von mit Nup2-N-Antikörper inkubierter Protein A/G-Sepharose über Nacht bei 4°C inkubiert. Nachdem die nicht gebundenen Proteine gewaschen waren, wurden die gebundenen Proteinkomplexe durch Inkubation mit 1x-Probenpuffer bei 60°C eluiert. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **A:** Zur Kontrolle der Lyse- sowie der Bindungseffizienz wurden Proben des Überstands (Ü) sowie der abzentrifugierten Zellbestandteile (P) und der nicht gebundenen Proteine (DF) auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Nup2-N-Primäntikörper und POD-gekoppeltem Sekundäntikörper (anti-Kaninchen) inkubiert und analysiert. **B:** 1/3 der Eluate wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und anschließend mit den Primäntikörpern gegen das Zielprotein Nup2 sowie die bekannten Interaktionspartner Nup60, Kap95 und Srp1 und dem POD-gekoppelten Sekundäntikörper (anti-Kaninchen) immunologisch detektiert. **C:** 2/3 der Eluatproben wurden in ein vorgefertigtes SDS-Gel einlaufen gelassen, mit kolloidalem Coomassie gefärbt und zur Massenspektrometrie (MS) gegeben.

Tabelle 20: MS3: Die in der Co-IP gereinigten und massenspektrometrisch identifizierten Interaktionspartner von Nup2

Protein	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl der gefundenen Peptide	
		<i>NUP2-WT</i>	<i>NUP2-2xKR</i>
Nukleoporin <b>Nup2</b>	78	47	26
Importin alpha <b>Srp1</b>	60	29	13
Importin beta <b>Kap95</b>	95	-	4
Nukleoporin <b>Nup60</b>	59	10	3
GTP-Bindeprotein <b>Gsp1/Ran</b>	24	17	14

Nachdem bereits in den *in vivo*-SUMOylierungsversuchen gezeigt wurde, dass der osmotische Schock einen großen Einfluss auf die SUMOylierung von Nup2 hat, sollte auch dieser Effekt massenspektrometrisch analysiert werden, da gerade hier möglicherweise SUMOylierungsabhängige Interaktionen in der nicht mehr SUMOylierbaren *NUP2-2xKR*-Mutante unterbunden werden und bestimmte Interaktionspartner nicht mehr nachweisbar sind. Für diesen Versuch wurde der integrierte Wildtyp sowie die *NUP2-2xKR*-Mutante in Vollmedium kultiviert und ein Teil vor bzw. ein zweiter Teil nach Inkubation mit 1 M KCl für 15 min geerntet. Die Zellen wurden ohne Ultrazentrifugation behandelt und die Lyseergebnisse sind in Abbildung 44B gezeigt. Die Eluatproben in Abbildung 44A zeigen deutlich, dass die bereits bekannten Interaktionspartner Nup60 und Srp1 weder stressabhängig noch SUMOylierungsabhängig binden, da sie in allen Proben gleich effektiv mit Nup2 mitgereinigt wurden. Als Kontrolle für unspezifische Bindungen wurde auch der  $\Delta nup2$ -Stamm mitgeführt. Die für die Massenspektrometrie vorbereiteten Proben sind in Abbildung 44C gezeigt. Für die bekannten Interaktionspartner Nup60, Srp1 und Kap95 wurden keine Unterschiede zwischen den unbehandelten und über KCl gestressten *NUP2-WT*- und *NUP2-2xKR*- Zellen gesehen (Tabelle 21).



**Abbildung 44: Immunpräzipitation von Nup2 bzw. Nup2-2xKR und seinen Interaktionspartnern mit und ohne osmotischen Stress durch KCl.**

Es wurden je 50 OD-Einheiten des *NUP2*-Integrationsstamms (GSY1487) sowie des *NUP2-2xKR*-Integrationsstamms (GSY1488) sowohl unbehandelt als auch nach 15-minütigem osmotischen Schock durch 1 M KCl geerntet und anschließend in Anwesenheit von IP-Puffer mit 400 mM NaCl mechanisch aufgeschlossen und zentrifugiert. Der Überstand wurde in verdünntem IP-Puffer mit 125 mM NaCl in Anwesenheit von mit Nup2-N-Antikörper inkubierter Protein A/G-Sepharose über Nacht bei 4°C inkubiert. Nachdem die nicht gebundenen Proteine gewaschen waren, wurden die gebundenen Proteinkomplexe durch Inkubation mit 1x-Probenpuffer

bei 60°C eluiert. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **A:** Zur Kontrolle der Lyse- sowie der Bindungseffizienz wurden Proben des Überstands (Ü) sowie der abzentrifugierten Zellbestandteile (P) und der nicht gebundenen Proteine (DF) auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Nup2-N-Primärantikörper und POD-gekoppeltem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) inkubiert und analysiert. **B:** 1/3 der Eluate wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und anschließend mit den Primärantikörpern gegen das Zielprotein Nup2 sowie die bekannten Interaktionspartner Nup60, Kap95 und Srp1 und dem POD-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) immunologisch detektiert. **C:** 1/3 der Eluatproben wurden in ein vorgefertigtes SDS-Gel einlaufen gelassen, mit kolloidalem Coomassie gefärbt und zur Massenspektrometrie (MS) gegeben.

Tabelle 21: MS4: Die in der Co-IP gereinigten und massenspektrometrisch identifizierten Interaktionspartner von Nup2

Protein	MW [kDa]	Anzahl der gefundenen Peptide				
		Elution mit 1x-Probenpuffer				
		$\Delta nup2$	NUP2-WT		2xKR	
				+KCl		+KCl
Nukleoporin <b>Nup2</b>	78	-	159	262	176	238
Importin alpha <b>Srp1</b>	60	-	90	132	105	117
Importin beta <b>Kap95</b>	95	-	19	31	23	6
Nukleoporin <b>Nup60</b>	59	-	84	113	84	90
GTP-Bindeprotein <b>Gsp1/Ran</b>	24	-	-	-	-	3

Die Rohdaten der MS-Analysen, der 4 durchgeführten Immunpräzipitationen (Abbildung 41, Abbildung 42, Abbildung 43 und Abbildung 44) wurden analysiert und ausgewertet. Basierend auf der Tatsache, dass viele ribosomale Proteine in großen Mengen unspezifisch mit gereinigt wurden, wurden diese bei der Auswertung als falsch Positive gezählt, ebenso wie alle Proteine, welche nicht nur in den zu untersuchenden, sondern auch den Kontrollproben über gleich oder ähnlich viele Peptide identifiziert wurden. Die in Tabelle 22 aufgeführten Ergebnisse zeigen die gefilterte Anzahl gefundener Peptide, wobei nur Proteine, welche mit mindestens zwei verschiedenen Peptiden identifiziert wurden, aufgelistet sind. Zudem wurde darauf geachtet, dass die Wahrscheinlichkeit der richtigen Zuordnung der Peptide zu dem jeweiligen Protein bei mindestens 95 % liegt. Von ursprünglich circa 750 Proteinen blieben letztendlich 141 Proteine übrig. Die Lokalisation der Proteine wurde ebenfalls berücksichtigt, da durch die Lyse der Zellen auch Proteine miteinander in Kontakt treten, welche unter natürlichen Bedingungen und vorhandener Organellenstruktur aufgrund der räumlichen Trennung niemals interagieren könnten. Die Proteine, die zumindest eine partiell kernassoziierte Lokalisation aufweisen, sind in Tabelle 22 hellgrau hinterlegt.

Tabelle 22: Rohdaten der MS-Analysen (nukleäre Proteine grau hinterlegt)

Protein	kDa	MS4					MS2					MS1			MS3	
		ko	WT	WT KCI	KR	KR KCI	ko	WT	KR	WT NaCl	KR NaCl	WT NaCl	WT	ko	WT	KR
<b>Köderprotein</b>																
<b>Nup2</b>	78		159	262	176	238		17	21			8	63	2	47	26
<b>In 4 MS-Analysen Nup2-spezifisch gefunden</b>																
<b>Srp1</b>	60		90	132	105	117		12	15	16	8	44	50		29	13
<b>Nup60</b>	59		84	113	84	90		1	2				25		10	3
<b>Bre1</b>	81		40	51	33	40		12	6				19		7	4
<b>Sro9</b>	48		1	2	1	1		3	2	6		26	7		1	
<b>Sec1</b>	83		2	1	2			1	1	3	4	2	6		2	
<b>In 4 MS-Analysen Nup2-spezifisch gefunden und in 1 MS unspezifisch</b>																
<b>Cbk1</b>	87		29	31	40	30	9	14	17	4			15		5	3
<b>Pab1</b>	64		12	34	7	27	9	25	24	32	11	28	16		6	3
<b>Sec53</b>	29		2	6		8	3	20	5	11		13	14		35	33
<b>Ncl1</b>	78		1	1	2	1	6	12	13	3		7	7		27	28
<b>Mob2</b>	33		13	15	19	14	4	7	7	2		3	13		7	7
<b>Shm2</b>	52		1	5	6	5	3	10	7	6	9		1		11	16
<b>Ymr124w</b>	106		6	7	4	14	1	7	4				1		1	
<b>Lsm12</b>	21		13	10	10	9	2	1	2	2	3	3	5		7	6
<b>Psp2</b>	66		3	7	7	7	1	3	2	2		1	3		1	
<b>Dbp3</b>	59		1				1	4	5	3	1	8	4		17	17
<b>Gua1</b>	58		1	4	4	3	7	36	15	15	2	6	14		56	43
<b>Hmo1</b>	28		4	2	3	3	1	1	1	3	3	6	3		5	1
<b>Sub2</b>	50		2	1	1		2	9	6	3		2	3		3	3
<b>Cla4</b>	94		1	2	5			4	4	1			3	1	2	2
<b>In 4 MS-Analysen Nup2-spezifisch gefunden und in 2 MS unspezifisch</b>																
<b>Ty1b-pr1</b>	199	1	56	98	62	68	130	137	138	65	18	58	70	33	138	96
<b>Sam1</b>	42	5	11	17	12	9	30	32	34	14	2	17	26	17	20	21
<b>Mdn1</b>	559		3	1	5	2	16	45	34	7		4	5	2	37	21
<b>Hyp2</b>	17	1	4	4	9	16	12	26	15	24	9	8	8		23	15
<b>Hta2</b>	14		3	4	3	9	10	11	9	10	13	7	2	1	6	5
<b>Kap95</b>	95		19	31	23	6	2	5	6	2	1	9	14	1	2	4
<b>Ty2b-c</b>	202		12	15	10	11	31	29	35	11		10	23	8	22	8
<b>Gnd1</b>	54		3	5	1	3	5	22	8	14	3	5	12	1	21	13
<b>In 4 MS-Analysen Nup2-spezifisch gefunden und in 3 MS unspezifisch</b>																
<b>Act1</b>	42	2	12	19	14	9	52	71	60	45	7	17	27	6	86	63
<b>Bre5</b>	58	1	31	38	17	32	4	5	4	2		1	3	1	13	12
<b>Ssa2</b>	69	2	33	62	34	38	16	28	19	32	4	23	20	6	10	6
<b>In 3 MS-Analysen Nup2-spezifisch gefunden</b>																
<b>Pol2</b>	256							3	2			1	1		3	4
<b>Lge1</b>	37		7	9	10	9		2				1	4			
<b>Nup157</b>	157							3	5				1		8	9
<b>Hsp26</b>	24							5	4	4		2	2		5	3
<b>Top2</b>	164			1		1		1	1	1		3	3		6	3
<b>Stt4</b>	215							1					1		9	7
<b>Tae2</b>	119							1	1	3		5	3		4	2
<b>Slh1</b>	225							1	2			1	2		3	3
<b>Mit1</b>	73		8	8	6	3		2							1	1
<b>Nam7</b>	109							6	3	1	2	1	1		2	
<b>Nap1</b>	48							2	1	1	1	16	4		1	2
<b>Gpd1</b>	43							5	4			1	6		10	7
<b>Ggc1</b>	33							3	4			4	5		8	6
<b>Bcp1</b>	33							2	1			9	7		1	3
<b>Glk1</b>	55							5		2		1	3		7	4

Protein	kDa	MS4					MS2					MS1			MS3	
		ko	WT	WT KCl	KR	KR KCl	ko	WT	KR	WT NaCl	KR NaCl	WT NaCl	WT	ko	WT	KR
Tcb2	133							1				1	1		2	3
Rbg1	41			1				1	1	1	4	6	2		1	
Cha1	39							1	2			1	3		8	7
Ses1	53							1					5		2	2
Top1	90		1	2	1	1						3	2		1	
Dbp10	113							1	1			2	1		1	1
Sth1	157		1										2		1	3
Acs1	79							5	4				3		9	4
Apl4	94							1	1	2		5	2		1	
Rpn6	50							1	1	2	2	5	3		1	1
Dbp8	48							1	2			1	3		2	3
Pol3	125							1	1				1		2	1
Rho3	25							2	2				2		3	
Ksp1	117		2	2	1	2							1		1	
Pep5	117							1	2				1		2	2
Hgh1	45							2	1	1		3	3		2	1
Gpa1	54							2	1			1	1		1	
Aah1	40							1	1	1			3		1	
Sdh2	30							1					3		2	2
Mes1	86							1	1				3		1	
Cpa1	45							2	1				1		2	2
Pdr1	122							1	1				1		1	
Sgn1	29							1		1			1		1	
Ymr178w	31							1	1				1		1	
<b>In 3 MS-Analysen Nup2-spezifisch gefunden und in 1 MS unspezifisch</b>																
Msb1	130		10	13	17	18	4	7	9				3			2
Hom2	40				1	1	6	17	11	6	1	5	8		17	14
Gsp1	25					3	9	9	11	8	5	6	11		17	14
Dbp9	68						1	1	1		1	1	2		4	3
Urb1	203						4	5	6	1		4	8		5	6
Num1	313				2	3	4	10	15			1	5		7	1
Rho1	23					1	5	7	5	3	1	5	6		11	10
Ach1	59						1	3	2				1		19	22
Rpo21	192		4	2	3	3		4	6	6		4	3	1		2
Bud3	185						1	3	4	1		2	3		5	2
Mak5	87						1	2	2			3	3		6	6
Idh1	39					1	2	6	3	3	3	2	2		4	3
Pol5	116						1	3	5			3	4		2	1
Rvb2	52							3	3	2	1	6	6	1	7	5
Pwp2	104						1	4	6	6	2	2	4		3	
Mrd1	101				1	1	1	2	2	3		4	3		2	2
Nup170	169						1	5	3				1		5	2
Rvb1	50							3	1			4	2	2	4	7
Ura3	29					1		7	5	1		3	2	2	3	2
Nup192	192						2	4	3				2		3	2
Ett1	47						2	2	2	1		6	6		3	4
Pse1	121						1	4	3			2	3		3	1
Noc3	76						1	3	4	2		6	4		2	2
Get3	39						1	3	1			4	3		2	2
Nop9	78						1	1	1			3	2		2	2
Cdc28	34						1	3	2			1	2		7	3
Sec4	24						1	3	5			4	3		5	4
Tif11	17						1	2		3		1	1		3	2
Rpn13	18						1	2	3	4		2	2		3	1

Protein	kDa	MS4					MS2					MS1			MS3	
		ko	WT	WT KCI	KR	KR KCI	ko	WT	KR	WT NaCl	KR NaCl	WT NaCl	WT	ko	WT	KR
<b>Gly1</b>	43							3	2				3	1		
<b>Gpd2</b>	49						1	3	2			2	5		3	
<b>Ty1a-dr6</b>	49						77	95	89				45		99	77
<b>In 3 MS-Analysen Nup2-spezifisch gefunden und in 2 MS unspezifisch</b>																
<b>Rna1</b>	46			1	1		3	6	6	2		3	6	1	6	2
<b>Kap123</b>	123			1		3	9	16	13	4	1	13	9	8	6	2
<b>Cbf5</b>	55						2	6	8	11	3	16	6	1	8	6
<b>Ade4</b>	57						1	2	3			3	22	2	12	15
<b>Cpa2</b>	124						8	22	19	3		3	10	4	15	9
<b>Nan1</b>	101						1	4	2			5	4	1	1	1
<b>Idh2</b>	40						1	3	3			2	2	1	5	5
<b>In 2 MS-Analysen Nup2-spezifisch gefunden</b>																
<b>Ynr021w</b>	47		2	4	3	1									2	3
<b>Lsp1</b>	38							4	3	14		3			5	5
<b>Bul2</b>	105							2	2	1					3	2
<b>Asn1</b>	64							4							3	6
<b>Trm3</b>	165							3	1			1			4	4
<b>Egd2</b>	19		1	1	1	1		1	1	2	2					
<b>Por1</b>	30											2	2		2	1
<b>Ard1</b>	28											1	2		1	
<b>Msh6</b>	140											2	2		1	
<b>Rfc4</b>	36											1	3		1	2
<b>Yat1</b>	78												2		4	2
<b>Ty1b-mr1</b>	199								56				29		42	
<b>Dcp1</b>	26											1	1		1	1
<b>Adh2</b>	37												6		14	
<b>Cit1</b>	53							6	5	13	19				10	5
<b>In 2 MS-Analysen Nup2-spezifisch gefunden und in 1 MS unspezifisch</b>																
<b>Spt16</b>	119						1	6	6	8		29	9			
<b>Ade3</b>	102						2	8	5	9	6				7	10
<b>Tuf1</b>	48						1	3	3						5	3
<b>Spt4</b>	11		2		3	1	1		1			1	2			
<b>Ade12</b>	48						1	2	1						3	1
<b>Sap190</b>	117							4		2			6	1		
<b>Tdh1</b>	36						23	15	19	21	13				18	13
<b>Rpn1</b>	109							3	1				2	3	1	1
<b>In 2 MS Nup2-spezifisch gefunden und in 2 MS unspezifisch</b>																
<b>Mlp2</b>	195						1	3	1					1	16	9
<b>In 1 MS-Analyse Nup2-spezifisch gefunden</b>																
<b>Tif3</b>	49		2	3	3	2				1						
<b>Htz1</b>	14									1	1	2	2			
<b>Ty1b-dr5</b>	199		55	93	59	66										
<b>Lys1</b>	41		2	4		2										
<b>Ssc1</b>	71		2	2		3										
<b>Prp8</b>	280							2		3						
<b>Ty2b-dr2</b>	202												22			

Für die weitere Auswertung wurden zudem nur die Proteine verwendet, welche in mindestens 3 der 4 Co-Immunpräzipitations-Versuchen gefunden wurden. Zudem wurde darauf geachtet, dass die Peptide mindestens in zwei Versuchen Nup2-spezifisch gefunden wurden, wodurch insgesamt 100 Proteine, davon 55 (Tabelle 23) zumindest partiell kernlokalisiert, übrig blieben.

Für keins der gefundenen Proteine konnte eine absolute Abhängigkeit bezüglich der SUMOylierung von Nup2 gefunden werden, jedoch zeigte die E3-Ligase Bre1 in allen MS-Analysen einen partiellen Einfluss der SUMOylierung in Form einer geringeren Interaktion mit der Mutante.

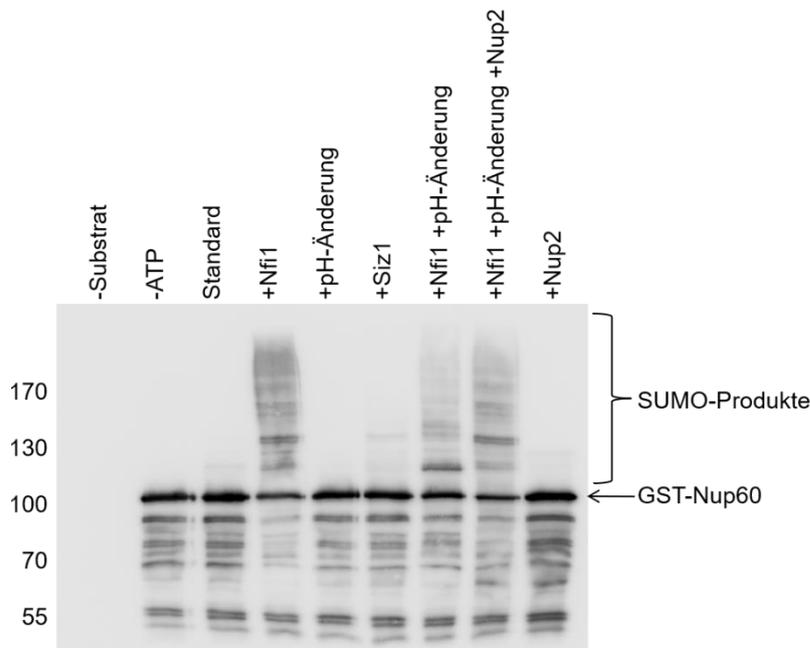
Tabelle 23: In der Co-immunopräzipitation spezifisch gereinigte mit dem Nukleus assoziierte Proteine

<b>Protein</b>	<b>Funktion/biologischer Prozess</b>
Aah1	Adenindeaminase
Bcp1	Essentielles Protein; beteiligt am nukleären Export der Lipidkinase Mss4
Bre1	E3 Ubiquitin-Ligase; mit Chromatin assoziiert
Cbk1	Serin/Threonin-Proteinkinase
Cdc28	Untereinheit der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK), Reguliert die Zellteilung
Cla4	Cdc42p-aktivierte Signaltransduktionskinase
Dbp3	RNA-abhängige ATPase; Ribosomenbiogenese
Dbp8	ATPase, putative RNA-Helikase der DEAD-box Familie
Dbp9	DEAD-box protein; assoziiert mit Präribosomen
Dbp10	Assoziiert mit Präribosomen
Ett1	Nukleäres Protein; inhibiert die Replikation des Brome-Mosaik-Virus
Gpd1	Glycerin-Synthese
Gsp1	Ran GTPase; cNLS-Import
Hgh1	Protein unbekannter Funktion; Ribosomenbiogenese
Hmo1	<i>high mobility group box</i> Protein
Hom2	Aspartat Semi-Aldehyddehydrogenase; Methionin-, Threoninbiosynthese
Hsp26	Hitzeschockprotein
Hta2	Histon; Chromatinassemblierung und Chromosomenfunktion
Kap95	Importin beteiligt am cNLS-import
Ksp1	Serin/Threonin-Proteinkinase
Lge1	Protein unbekannter Funktion, Interaktionspartner von Bre1
Lsm12	Protein unbekannter Funktion; vermutlich an der RNA-Prozessierung beteiligt
Mak5	Assoziiert mit Präribosomen
Mdn1	ATPase; assoziiert mit Präribosomen
Mit1	Transkriptionsregulator von pseudohyphalem Wachstum
Mob2	Aktivator der Serin/Threonin-Proteinkinase Cbk1
Mrd1	Assoziiert mit Präribosomen
Nap1	Histon-Chaperon; Histon-Austausch
Ncl1	tRNA-Methyltransferase
Nop9	Assoziiert mit Präribosomen
Nup60	Nukleäres Nukleoporin; trägt zum nukleocytoplasmischen Transport bei
Nup157	Nukleoporin des inneren Rings
Nup170	Nukleoporin des inneren Rings; beteiligt am Kerntransport
Nup192	Nukleoporin des inneren Rings; beteiligt am Kerntransport
Pab1	Poly(A)-Bindeprotein; RNA-Prozessierung
Pdr1	Transkriptionsfaktor reguliert <i>pleiotrope drug response</i>
Pol2	Untereinheit der epsilon DNA-Polymerase

<b>Protein</b>	<b>Funktion/biologischer Prozess</b>
Pol3	Untereinheit der delta DNA-Polymerase
Pol5	DNA Polymerase phi; Ribosomenbiogenese
Pse1	Importin
Pwp2	90S-Präribosomenkomponente
Rpo21	Untereinheit der RNA-Polymerase II
Rvb1	ATP-abhängigen DNA-Helikasen
Rvb2	ATP-abhängige DNA-Helikase
Sro9	Protein mit SH3-Domänen; involviert in Zellpolarität und Morphogenese
Srp1	Importin beteiligt am cNLS-import
Sth1	ATPase-Komponente des <i>Chromatin remodelling complex</i> RSC
Sub2	TREX-Komplex; mRNA-Export
Top1	Topoisomerasen 1
Top2	Topoisomerasen 2
Ty1a-dr6	Gag-Pol Polyproteine
Ty1b-pr1	Gag-Pol Polyprotein
Ty2b-c	Gag-Pol Polyproteine
Urb1	Assoziiert mit Präribosomen
Ymr178w	FAD-Pyrophosphatase

#### 4.9. Die SUMOylierung von Nup60 wird in Anwesenheit der E3-Ligase Nfi1 begünstigt

In vorherigen Studien (Latta, 2011; Folz, 2014) wurde *in vitro* für Nup2 gezeigt, dass die SUMOylierung sowohl in Anwesenheit von Nfi1 als auch seinem Interaktionspartner Nup60 sowie durch Änderung des pH-Wertes gesteigert werden kann. Alle Bedingungen zeigten additive Effekte. Gleiches wurde auch für Nup60 untersucht.

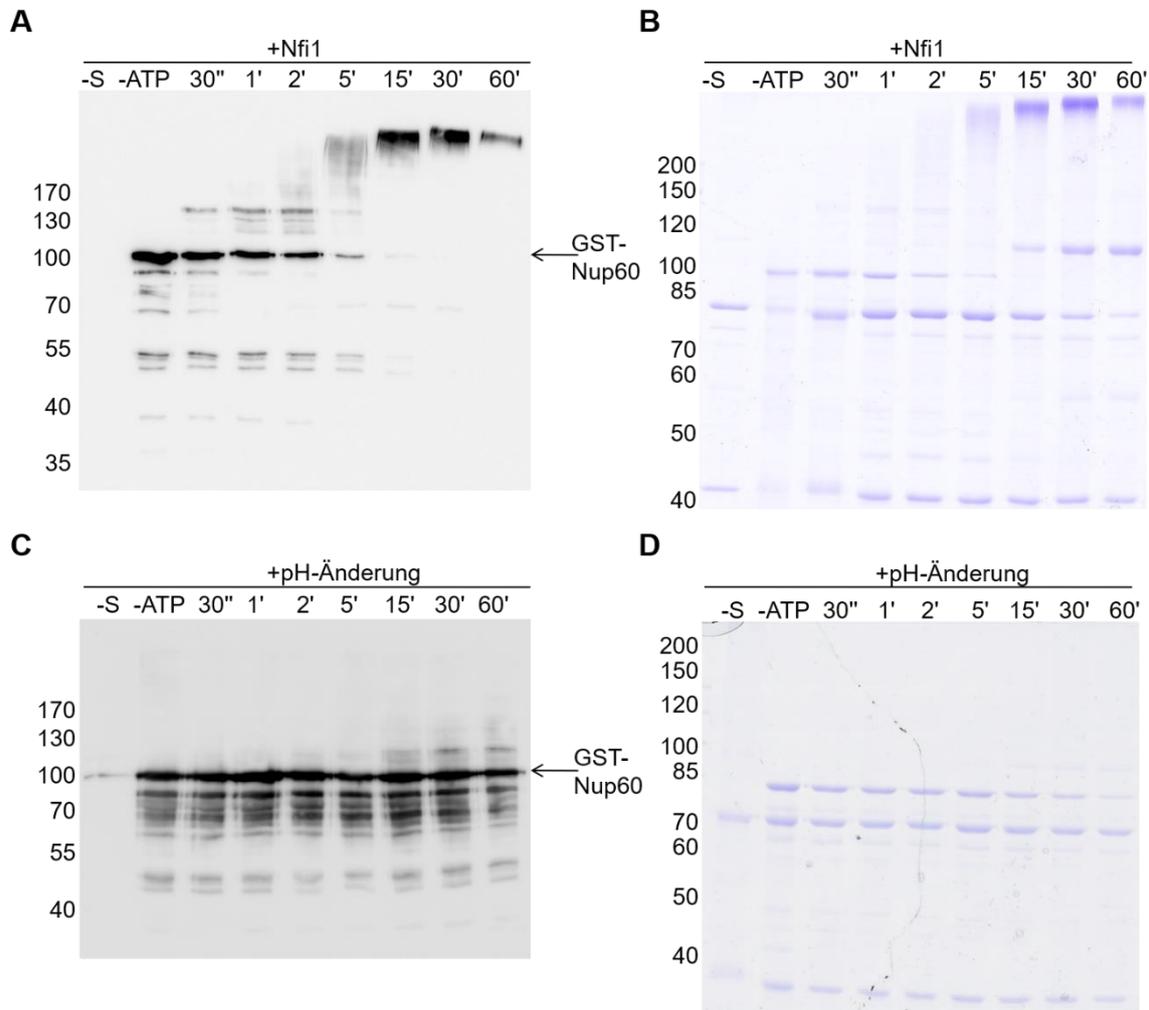


**Abbildung 45: *In vitro*-SUMOylierung von GST-Nup60 unter verschiedenen Bedingungen.**

Standardbedingungen für die SUMOylierung waren 100 ng/μl Substrat (GST-Nup60), 5 mM ATP, 66 ng/μl E1 (Aos1/Uba2), 25 ng/μl E2 (Ubc9), 250 ng/μl Smt3-KR und 1 mM DTT in TEF-Puffer. Als Kontrollen wurden eine ATP-freie Probe sowie eine Probe ohne Substrat mitgeführt. Getestete Bedingungen waren ein Ansatz unter Standardbedingungen, ein Ansatz mit der E3 Ligase Nfi1-N (100 ng/μl), ein Ansatz mit pH-Änderung durch Zugabe von Tris-HCl pH 8,8 zu einem pH-Wert von 8,0, ein Ansatz mit der E3 Ligase Siz1-N (100 ng/μl) sowie ein Ansatz, in welchem die pH-Änderung mit der Zugabe von Nfi1-N kombiniert wurde. In einer weiteren Probe wurde neben der pH-Änderung und der Zugabe von Nfi1-N noch GST-Nup2 dazugegeben. Zur Kontrolle wurde eine Probe unter Standardbedingungen mit GST-Nup2 versetzt. Die SUMOylierung erfolgte bei 30°C für 90 min und wurde durch Zugabe von 3x SDS-Probenpuffer und 0,2 M DTT sowie 20-minütiges Erhitzen abgestoppt. Die Proben wurden über SDS-Gele aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Antikörper gegen Nup60 sowie POD-gekoppeltem sekundärem Antikörper aus Kaninchen dekoriert. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben.

Es wurden verschiedene SUMOylierungsansätze mit rekombinant hergestellten Proteinen untersucht, welche neben den Hauptkomponenten, dem Substrat (GST-Nup60), ATP, E1 (Aos1/Uba2), E2 (Ubc9), Smt3-KR und 1 mM DTT auch die E3-Ligasen Nfi1 oder Siz1, beziehungsweise Nup2 oder Tris pH 8,8 zur Änderung des pH-Wertes enthielten. Zudem wurden kombinierte Ansätze mit Nfi1 und pH-Änderung mit und ohne Nup2 hergestellt. Zur Kontrolle wurden ein Substrat-freier Ansatz sowie ein Ansatz ohne ATP hergestellt. Der stärkste SUMOylierungseffekt wurde durch Zugabe von Nfi1 gesehen, welcher jedoch bei gleichzeitiger Änderung des pH-Wertes verringert wurde. Auch die Anwesenheit von Nup2 hatte keinen begünstigenden Effekt (Abbildung 45).

Vergleichbar mit der *in vitro*-SUMOylierung von Nup2 (Folz, 2014) wird auch die SUMOylierung von Nup60 durch Nfi1 begünstigt. Nup60 wird aber im Gegensatz zu Nup2 durch pH-Änderung oder Anwesenheit von Nup2 nicht stärker, sondern zum Teil sogar weniger effizient SUMOyliert.



**Abbildung 46: Kinetik der *in vitro*-SUMOylierung von GST-Nup60 unter Zugabe von Nfi1 bzw. mit pH-Änderung.**

Die Kinetik erfolgte nach Standardbedingungen und zusätzlicher Zugabe von Nfi1-N (A und B) oder Tris zur Änderung des pH-Wertes (C und D). Als Kontrollen wurden eine ATP-freie Probe sowie eine Probe ohne Substrat mitgeführt. Für die Kinetik wurde ein achtfacher Ansatz hergestellt, sodass nach jedem Zeitpunkt eine Probe entnommen werden konnte. Die SUMOylierung erfolgte bei 30°C für 30 sec bis 60 min und wurde durch Zugabe von 3x SDS-Probenpuffer und 0,2 M DTT sowie 20-minütiges Erhitzen abgestoppt. Die Proben wurden über SDS-Gele aufgetrennt. Die Molekularmassen wurden mit Hilfe eines Proteinstandards bestimmt und sind links in kDa angegeben. **A und C:** Aufgetrennte Proben nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran und Inkubation mit Antikörper gegen Nup60 sowie POD-gekoppeltem sekundärem Antikörper (Kaninchen) **B und D:** Coomassie-Brilliant-Blau gefärbtes Gel.

Bei effizienter *in vitro*-SUMOylierung kann das SUMOylierte Protein auch im Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten Gel sichtbar gemacht werden und anschließend beispielsweise ausgeschnitten und massenspektrometrisch zur Detektion der SUMOylierungsstellen analysiert werden. Hierzu muss jedoch eine klare Bande erkennbar sein, welche möglichst

eine EinfachSUMOylierung darstellt. Aus diesem Grund wurde eine Kinetik durchgeführt, um zu detektieren, wann die stärkste EinfachSUMOylierung zu erwarten ist (Abbildung 46). Obwohl durch Änderung des pH-Wertes keine erhöhte SUMOylierung nachweisbar war, wurde auch diese Bedingung neben der Zugabe von Nfi1 mitgetestet, da unter dieser Bedingung aufgrund der geringeren SUMOylierungseffizienz weniger PolySUMOylierung erwartet wurde. Wie in Abbildung 46A zu sehen, wurde eine klare Nup60-Smt3 Bande bei gleichzeitiger Zugabe von Nfi1 bereits nach 30 sek detektiert, welche nach 2 min bereits in PolySUMOylierung übergeht. Im Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten Gel ist diese Bande nur sehr schwach erkennbar (Abbildung 46B).

Bei Änderung des pH-Wertes konnte ebenfalls nach 2 min eine schwache SUMOylierung nachgewiesen werden (Abbildung 46C), welche jedoch nicht in eine PolySUMOylierung übergeht. Im Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten Gel hingegen ist erst nach circa 15 min eine schwache Bande erkennbar (Abbildung 46D), da im Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten Gel im Gegensatz zur Detektion über Antikörper und ECL keine Verstärkung des Signals erfolgt. Zur Analyse der SUMOylierungsstellen von Nup60 über massenspektrometrische Analyse ist am ehesten die Probe mit Nfi1 nach 1 min geeignet, da hier ein gut sichtbares Signal, jedoch noch keine PolySUMOylierung vorliegt.

## 5. Diskussion

Kernporenkomplexe sind an vielen wichtigen Funktionen in der Zelle beteiligt. Sie spielen eine große Rolle beim Austausch von Ionen, Proteinen, mRNA und weiteren Molekülen zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma. Zudem spielen sie eine Rolle bei der Aktivierung und Repression von Genen und somit auch bei der Anpassung an äußere Veränderungen wie Stress oder Nährstoffmangel. Bei diesen und weiteren Aufgaben des NPC spielt auch das nicht essentielle Nukleoporin Nup2 eine große Rolle, weshalb die Untersuchung dieses Proteins und besonders der Einfluss der posttranslationalen Modifikationen, in dieser Arbeit insbesondere die SUMOylierung von Nup2, von großem Interesse ist.

Nup2 ist zwar ein hefespezifisches Protein, welches kein sequenzspezifisches Homolog in Vertebraten hat, besitzt jedoch funktionale Redundanz mit Nup50. Zudem ist es gleichermaßen lokalisiert und zeigt ähnliche Interaktionen (Cronshaw *et al.*, 2002).

### 5.1. Nup2 als stressspezifisches SUMOylierungssubstrat

Die SUMOylierung stellt eine posttranslationale Modifikation dar, bei der über einen dreistufigen Prozess ähnlich wie bei der Ubiquitinierung ein kleines Protein, Smt3, kovalent an einen Lysinrest gebunden wird. Sie ist reversibel und hat somit regulatorische Eigenschaften. Da sowohl  $\Delta nup2$ -Zellen als auch die SUMO-Mutanten *uba2-1* und *ulp1-133* einen Einfluss auf den klassischen NLS-Transport zeigen (Solsbacher *et al.*, 2000; Stade *et al.*, 2002), wurde Nup2 als potentielles SUMOylierungssubstrat vorgeschlagen und dies in vorangegangenen Studien sowohl anhand von *in silico* als auch *in vitro*-Versuchen bestätigt (Latta, 2011; Folz, 2014; Folz *et al.*, 2019). Zudem wurden in vorherigen Hefe-Zwei-Hybrid Studien auch Interaktionen zwischen Nup2 und den Enzymen der SUMO-Kaskade Aos1, Ubc9, Siz1 und Nfi1 sowie dem Smt3-Protein selbst beschrieben (Folz *et al.*, 2019), weshalb Nup2 in dieser Arbeit auch *in vivo* auf diese Modifikation untersucht wurde.

Aufgrund der Tatsache, dass unter normalen Bedingungen nur etwa 5 % der Proteine in SUMOylierter Form in Zellen vorliegen, lässt sich diese Modifikation *in vivo* nur schwer nachweisen. Im Gegensatz zum *in vitro*-System, bei welchem meist nur ein Substrat durch optimierte Bedingungen größtenteils modifiziert vorliegt, fällt der Anteil an SUMOyliertem Protein *in vivo* meist unter die Nachweisgrenze. Dies liegt zum Teil auch daran, dass im Zelllysate viele verschiedene Proteine mit verschiedenen Modifikationen vorliegen. Zudem handelt es sich bei der SUMOylierung um einen dynamischen Prozess, da die SUMOylierung permanent über Proteasen abgebaut wird. Daher ist es unabdingbar, die Lyse der Zellen in denaturierendem Puffer in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren durchzuführen (Xiao *et al.*, 2015). Eine Möglichkeit zur verbesserten Detektion der in geringen Mengen vorliegenden SUMOylierten Proteine stellt deren Anreicherung über Nickel-NTA-Agarose dar. Hierzu

werden Zellen mit einem *6HIS-SMT3* Plasmid transformiert, was zum einen zu einer Erhöhung der Menge SUMOylierter Proteine führt und zum anderen für die Reinigung benötigt wird, da SUMOylierte Substrate über den *6His-Tag* an der Nickel-NTA-Agarose immobilisiert werden. Eine weitere Steigerung der SUMOylierung kann durch plasmidkodierte Zugabe von Ubc9 ermöglicht werden. Die Transformation mit beiden Plasmiden war jedoch wie in Abbildung 13 zu sehen ist, in wildtypischen Zellen nicht ausreichend, um die SUMOylierung von Nup2 darzustellen, was auch daran liegen kann, dass nicht jedes Protein unter den gleichen Bedingungen SUMOyliert wird. So haben bereits diverse Studien in verschiedenen Zellen eine stressabhängige Induktion der SUMOylierung verschiedener Proteine unter Einfluss externer Stimuli gezeigt. In Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* und Mais wurde eine erhöhte SUMOylierung nach Trockenstress sowie Stress durch Ethanol, Salz, Hitze, Kälte und reaktive Sauerstoffspezies nachgewiesen (Kurepa *et al.*, 2003; Catala *et al.*, 2007; Conti *et al.*, 2008; Augustine *et al.*, 2016). In Hefe wurde ebenfalls ein erhöhtes Level an SUMO-Konjugaten unter anderem nach Alkoholstress sowie in Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies festgestellt (Zhou *et al.*, 2004; Sydorsky *et al.*, 2010). Aber auch humane Zellen zeigen vermehrt SUMOylierte Substrate, beispielsweise infolge von DNA Replikationsstress in der S-Phase (Bursomanno *et al.*, 2015). Stressinduzierte HyperSUMOylierung konnte infolge von Stress durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Testikelzellen von Mäusen ebenso wie in COS-7-Zellen gezeigt werden, welche proteinschädigenden Reizen wie akuten Temperaturschwankungen ausgesetzt sind (Saitoh und Hinchev, 2000; Shrivastava *et al.*, 2010). Die Stressantwort ist evolutionär zwischen Organismen konserviert und zeigt gerade in Hefe gleiche Schutzmechanismen wie in höheren Eukaryoten, was Hefe zu einem idealen Modellorganismus zur Erforschung zellulärer Kontrolle infolge externer Stressoren macht (Trabalzini *et al.*, 2003).

In Lewicki *et al.* (2015) wurde eine erhöhte GesamtSUMOylierung ebenfalls in *S. cerevisiae* für hyperosmotischen, oxidativen sowie Alkoholstress gezeigt, wobei das Maximum der GesamtSUMOylierung nach 5-minütiger Behandlung mit 1 M Sorbitol bzw. 15-minütiger Behandlung mit 1 M KCl erreicht war und die SUMOylierung anschließend wieder verringert nachgewiesen wurde. Für Ethanol-induzierten sowie oxidativen Stress wurde eine rasche Zunahme der GesamtSUMOylierung beschrieben, welche auch nach drei Stunden unverändert war. Diese Bedingungen für die maximale SUMOylierung wurden auch für den hier beschriebenen SUMOylierungsansatz verwendet, wobei für die Ethanolbehandlung eine Zeit von 30 Minuten und eine Endkonzentration von 10 % gewählt wurde (Abbildung 13). Wie bereits in Lewicki *et al.* anhand *His-Flag-Tag* gereinigter Proben über MS-Analysen gezeigt wurde, stieg die SUMOylierung von Nup2 nach osmotischem Schock mit 1 M KCl und 1 M Sorbitol auch in dieser Arbeit (Abbildung 13A). Interessanterweise führt Alkoholstress durch Ethanol trotz langanhaltender, stark erhöhter GesamtSUMOylierung zu keiner nachweisbaren SUMOylierung von Nup2, was wiederum belegt, dass nicht jeder Stress den

gleichen Einfluss auf die SUMOylierung eines Proteins hat, auch wenn die GesamtSUMOylierung bei allen Stressoren ansteigt.

Auch wenn die in Laboren verwendeten Hefestämme nicht genau denen entsprechen, welche in der Lebensmittelindustrie verwendet werden, ist es dennoch interessant, die Stressantwort näher zu betrachten. In der Lebensmittelindustrie verwendete Stämme gehören meist ebenfalls zu *S. cerevisiae*, so auch die Bäcker- und Weinhefe. Während der alkoholischen Fermentation müssen die Hefezellen auf eine Vielzahl äußerer Faktoren reagieren, so auch auf hyperosmotischen Stress durch eine hohe Zuckerkonzentration beispielsweise in Traubenmost. Mit der Zeit sind die Zuckerressourcen erschöpft und der Ethanolgehalt steigt, wodurch es zu Nährstoffmangel und Ethanolstress kommt. Zudem kann es zu oxidativem Stress sowie einer erhöhten Temperatur und somit Hitzestress kommen (Trabalzini et al., 2003; Auesukaree, 2017). Anhand der für Nup2 erzielten Ergebnisse lässt sich zeigen, dass die SUMOylierung von Nup2 wohl keine Rolle bei der Antwort auf Ethanolstress spielt, jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Einfluss bei der Antwort auf osmotischen Stress zu erwarten ist.

Die Tatsache, dass hyperosmotischer Stress einen begünstigenden Einfluss auf die SUMOylierung von Nup2 hat, welcher nach KCl-Behandlung noch deutlicher ist als nach Behandlung mit Sorbitol, führte dazu, dass diese Bedingung als optimierter SUMOylierungsnachweis für alle weiteren Versuche in dieser Arbeit beibehalten wurde.

Zur Charakterisierung der stressabhängigen SUMOylierung von Nup2 sowie zur Detektion der beteiligten Komponenten wurden neben dem Wildtyp auch die Dekonjugase-Mutanten *ulp1-133* und  $\Delta$ *ulp2* sowie die MAP-Kinase-Mutante  $\Delta$ *hog1* analysiert.

Auch in Stämmen ohne die Dekonjugase Ulp2 konnte gezeigt werden, dass die SUMOylierung von Nup2 nach Behandlung mit KCl stark ansteigt (Abbildung 16A). Ohne Ulp2 ist sogar eine PolySUMOylierung in Form eines aus drei Banden bestehenden Musters zu erkennen, welches sich von dem aus zwei Banden bestehenden Muster unterscheidet, welches im Wildtyp detektiert wurde. Ohne hyperosmotischen Schock konnte jedoch auch in diesem Stamm nur eine geringe SUMOylierung vermerkt werden, und diese auch nur wenn sowohl zusätzliches *SMT3* als auch *UBC9* vorhanden sind. Anders sieht es in einem weiteren Stamm aus, in welchem die essentielle Dekonjugase Ulp1 mutiert ist (Abbildung 16C). In diesem Stamm wurde bereits ohne hyperosmotischen Stress und nur mit *SMT3*-Überexpression ein Signal für SUMOyliertes Nup2 detektiert, welches auch nach Stressbehandlung nur unwesentlich anstieg. Dies zeigt eindeutig, dass Nup2 auch ohne externe Stressstimuli SUMOyliert wird, jedoch konstant über Ulp1 deSUMOyliert wird, was zu einem stets niedrigen Level an SUMOyliertem Nup2 führt, welches wie im Wildtyp zu sehen unter die Nachweisgrenze fällt. Auch das stressabhängige SUMOylierungsmuster in *ulp1-133* entspricht mit zwei detektierten Banden dem des Wildtyps, was im Vergleich mit  $\Delta$ *ulp2* unter den gleichen

Bedingungen darauf schließen lässt, dass nach osmotischem Stress mehr polySUMOylierte Nup2-Produkte entstehen, welche unter normalen Umständen von Ulp2 dekonjugiert werden, und Ulp1 hierbei nur eine untergeordnete Rolle einnimmt. Ulp1 hingegen scheint unter normalen zellulären Bedingungen dafür verantwortlich zu sein, die Menge an SUMOyliertem Nup2 zu kontrollieren und Nup2 stetig zu deSUMOylieren.

Ulp2 wurde zusammen mit der E3-Ligase Siz1 in Lewicki *et al.* (2015) als Regulator der *SUMO-stress-response* (SSR) beschrieben. Infolge von Stress soll die SUMOylierung Siz1-abhängig gesteigert und durch das für den Abbau der PolySUMOylierung bekannte Ulp2 abgebaut werden (Bylebyl *et al.*, 2003). Ähnliches wurde auch in Abu Irqeba *et al.* (2014) beschrieben, wobei hier das Hauptaugenmerk auf der MAP-Kinase Hog1 lag, welche wiederum für die DeSUMOylierung über Ulp2 mitverantwortlich sein soll, obwohl keine direkte physikalische Interaktion beschrieben wurde (Abu Irqeba *et al.*, 2014). Aus diesem Grund war es auch interessant, die SUMOylierung in einem  $\Delta hog1$ -Stamm zu analysieren.  $\Delta hog1$ -Zellen zeigten ebenfalls erst nach osmotischem Schock eine starke SUMOylierung von Nup2, welche sich jedoch nicht wie in der  $\Delta ulp2$ - Mutante in einer Dreifach-, sondern ebenso wie in WT- und *ulp1-133*-Zellen nur in einer Doppelbande äußert. Dies spricht dafür, dass die PolySUMOylierung, wenn auch in einem geringeren Maß, auch in Abwesenheit von Hog1 noch durch Ulp2 abgebaut werden kann (Abbildung 16A und Abbildung 17A). Zudem ist die SUMOylierungseffizienz nach osmotischem Schock in  $\Delta hog1$  wesentlich höher als in WT- und *ulp1-133*- aber auch höher als in  $\Delta ulp2$ -Zellen, was darauf schließen lässt, dass neben der DeSUMOylierung durch Ulp2 noch weitere an der (De-)SUMOylierung beteiligte Mechanismen durch die Abwesenheit von Hog1 beeinflusst sind oder die SUMOylierungseffizienz gesteigert ist (Abbildung 18). Wird die zeitabhängige Kinetik in dem Stamm mit fehlendem Hog1 betrachtet, so ist zu erkennen, dass die SUMOylierung nach Sorbitolbehandlung in den ersten 30 min ansteigt und anschließend über einen längeren Zeitraum konstant bestehen bleibt (Abbildung 17C). Im Gegensatz dazu zeigen wildtypische Zellen ein starkes Nup2-Smt3-Signal nach 5-minütiger Behandlung, welches nach 30-minütiger Behandlung stark vermindert ist (Abbildung 13A). Somit wird die SSR infolge von osmotischem Stress über 1 M Sorbitol schnell eingeleitet, was zu einer schnellen, aber transienten GesamtSUMOylierung führt (Lewicki *et al.*, 2015). Geht man davon aus, dass die von Lewicki und Kollegen beschriebene, maßgeblich an der durch osmotischen Stress induzierten SUMOylierung beteiligte E3-Ligase Siz1 auch an der SUMOylierung von Nup2 beteiligt ist, so lassen sich folgende Rückschlüsse ziehen (Lewicki *et al.*, 2015). Die Aktivität von Siz1 und Ulp2 nimmt nach der zellulären Adaption an den externen Einfluss schnell ab, was zur Rückführung der SUMOylierung von Nup2 auf das Grundlevel führt. Bei fehlender Hog1-Kinase hingegen wird die Stressantwort gestartet, was sich an einer starken SUMOylierung zeigt. Diese bleibt jedoch über längere Zeit konstant, was

darauf hindeutet, dass die SSR nicht infolge von Anpassung an den externen Stimulus beendet wird. Entweder bleibt Siz1 in diesem Fall dauerhaft aktiv und SUMOyliert Nup2 und Ulp2 DeSUMOyliert Nup2 konstant, was für einen *turnover* sprechen würde, oder die SUMOylierung über Siz1 stoppt und Ulp2 deSUMOyliert nicht, was ebenfalls zu einem konstanten Level an SUMOyliertem Nup2 führen würde, falls dieses nicht mit der Zeit degradiert wird. Ob es sich um einen *turnover* handelt oder ob das SUMOylierte Nup2 unter diesen Bedingungen entweder degradiert oder die SUMOylierung von Nup2 gestoppt wird, könnte durch Hemmen des proteosomalen Abbaus (MG132) untersucht werden. Wie in Abbildung 17D anhand des freien Smt3 zu sehen, ist dies kein limitierender Faktor.

Die erhöhte stressinduzierte SUMOylierung von Nup2 wirft Fragen auf, da einerseits gezeigt wurde, dass Osmosestress eine verstärkte SUMOylierung von Proteinen wie Nup2 (Nup1 und Nup60 ebenfalls) begünstigt (Lewicki *et al.*, 2015; Folz *et al.*, 2019). Dies ist vermutlich wichtig für die Regulation der Stressantwort, aber andererseits haben Studien beschrieben, dass sowohl Nup2 als auch Nup1 und Nup60 infolge von osmotischem Stress direkt über Hog1 phosphoryliert werden, was zu einer erhöhten mRNA-Produktion sowie deren Export führt (Regot *et al.*, 2013). Für Nup2 wurden mehrere Phosphorylierungsstellen beschrieben, jedoch ist lediglich die Phosphorylierung an Threonin 361 abhängig von Hog1 und Osmosestress. So zeigt die Nup2 T361A-Mutante bei Osmosestress ähnlich wie auch  $\Delta nup2$ -Zellen eine verzögerte und verringerte Genexpression und Defekte im mRNA-Export von *STL1*, einem über osmotischen Stress induzierten Gen, was durch die gehemmte Phosphorylierung über Hog1 erklärt wurde (Regot *et al.*, 2013).

Da sowohl die SUMOylierung als auch die Phosphorylierung von Nup2 nach osmotischem Stress ansteigen, würde man ein Zusammenspiel der beiden Modifikationen erwartet. Es scheint sich hier jedoch um zwei voneinander unabhängige Mechanismen zu handeln, da die SUMOylierung auch in Abwesenheit der für die Osmosestress-abhängige Phosphorylierung von Nup2 verantwortlichen Kinase Hog1 erfolgt. Um dies genau zu klären, wäre es sinnvoll zu analysieren, ob beide Modifikationen doch einen Einfluss aufeinander haben. Hierzu könnte die Nup2-SUMO-Mutante auf Änderungen im Phosphorylierungsmuster an Threonin 361 und im Gegenzug die Nup2-T361A-Mutante auf stressinduzierte SUMOylierung überprüft werden. Anhand der bis dato generierten Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei beiden Modifikationen um zwei verschiedene Wege der Stressantwort handelt, wobei die SUMOylierung nicht zwingend erforderlich ist, wie anhand von Wachstumstests gezeigt werden konnte (vgl. Abbildung 30, Abbildung 31 und Abbildung 32).

Sowohl die SUMO- als auch die Ubiquitin-Mutanten von Nup2 sowie auch die Mutanten seines Interaktionspartners Nup60 zeigen keine Stresssensitivität oder Wachstumsdefizite, wenn sie in KCl-haltigem Flüssigmedium kultiviert oder auf Sorbitol- bzw. KCl-haltigen Platten

angezogen werden. Im Gegensatz dazu können  $\Delta hog1$ -Zellen unter diesen Bedingungen auf Platten nicht mehr und in Flüssigkultur nur sehr verlangsamt wachsen. Dies spricht dafür, dass der kanonische Weg zur Stressregulation über Hog1 und somit wahrscheinlich auch die Phosphorylierung von Nup2 an Threonin 361 eine wichtigere Rolle spielt, weshalb es sinnvoll wäre, auch diese Mutante Wachstumstests zu unterziehen. Dennoch bleibt zu erwähnen, dass auch die Nukleoporine Nup2 und Nup60 an sich nicht essentiell für die Stressantwort sind, da auch *knockout*-Mutanten beider Proteine keine Wachstumsdefizite zeigen.

Wie schon anhand der *in vivo*-SUMOylierung zu erkennen ist, unterscheidet sich osmotischer Stress, welcher durch Salze wie KCl oder Zuckeralkohole wie Sorbitol ausgelöst wird. Während die stressinduzierte SUMOylierung durch Sorbitol rasch ansteigt und wieder abnimmt, bleibt die Modifikation nach KCl-Behandlung länger bestehen (vgl. Abbildung 13). Auch auf Platten war zu erkennen, dass Sorbitol noch bei einer Konzentration von 2 M für die Zellen tolerierbar war, während eine Konzentration von 1,5 M KCl schon kein Wachstum der getesteten Stämme mehr zuließ, mit Ausnahme von einem Stamm. *NUP60-SUMO-KR* verhielt sich 6 Tage wie alle anderen getesteten Stämme, aber ab dem 7. Tag konnte ein langsames Wachstum festgestellt werden (Abbildung 31). Dieses Phänomen lässt sich nur schwer erklären, es ist jedoch naheliegend, dass die Zellen in den ersten Tagen den Zellzyklus anhalten, bis sie sich an die äußeren Gegebenheiten angepasst haben. Interessanterweise wurde in dieser Arbeit auch gezeigt, dass in der *NUP60-SUMO-KR* Mutante nach Osmosestress die SUMOylierung von Nup2 stark induziert ist (Abbildung 19), was wiederum dafürspricht, dass die SUMOylierung von Nup2 doch einen begünstigenden Effekt bei der Stressadaptation hat. Bis jetzt wurde nur der Effekt der verhinderten SUMOylierung analysiert, es wäre jedoch auch denkbar, dass eine stark erhöhte SUMOylierungsrate von Nup2 Effekte zeigt. Während Modifikationen wie Phosphorylierung jedoch leicht imitiert werden können, ist dies für die SUMOylierung komplizierter. Eine potentielle Möglichkeit ist die Analyse des in dieser Arbeit hergestellten Nup2-Smt3-Fusionsproteins (Abbildung 22), in welchem direkt hinter die Sequenz der bestätigten SUMOylierungsstellen Smt3 inseriert wurde, welches jedoch noch nicht bezüglich seiner Osmosestressresistenz untersucht wurde.

## **5.2. Die SUMOylierung von Nup2 hat keinen Einfluss auf die Genaktivität von *INO1* und *GAL1***

Bei Veränderungen in der Umgebung ist eine schnelle und gezielte Zellantwort erforderlich, welche unter anderem auch daraus besteht, reprimierte Gene zu aktivieren oder aber aktive Gene abzuschalten. Neben Hitze, veränderter Osmolarität, Alkohol und vielen weiteren Stress-induzierenden Faktoren kann auch ein Nährstoffmangel bzw. veränderte Nährstoffquellen zu einer Veränderung der Aktivität mancher Gene führen, so beispielsweise, wenn die

Kohlenstoffquelle in Hefe von Glukose zu Galaktose verändert wird oder wenn Hefezellen aufgrund mangelnder Verfügbarkeit die Synthese von Inositol starten müssen. Für die hierfür verantwortlichen Gene *INO1* und *GAL1* sowie für weitere induzierbare Gene wurde gezeigt, dass sie in aktiviertem Zustand an der nukleären Peripherie lokalisiert sind und die mRNA-Produktion steigt (Casolari *et al.*, 2004; Dieppois und Stutz, 2010). Eines der für die periphere Lokalisation mitverantwortlichen Proteine ist das in dieser Arbeit untersuchte Nukleoporin Nup2 (Brickner *et al.*, 2007). Brickner und Kollegen haben anhand konfokaler Mikroskopaufnahmen gezeigt, dass die Lokalisation von *INO1* und *GAL1* infolge einer Umstellung auf galaktosehaltiges Medium bzw. inositolfreies Medium Nup2-abhängig ist. Werden die Gene induziert, lokalisieren sie schnell an die nukleäre Peripherie, während die Transkriptionsaktivierung und der mRNA-Anstieg langsam erfolgen. Die Lokalisation von *INO1* und *GAL1* bleibt durch den spezifischen Einbau der Histonvariante H2A.Z in den reprimierten Promotor über Generationen bestehen, auch wenn keine aktivierenden Bedingungen mehr in der Umgebung der Zellen vorliegen, woraus sich eine schnelle Reaktivierung der Gene ergibt (Brickner *et al.*, 2007). Zellen ohne Nup2 hingegen zeigen eine stark verringerte periphere Lokalisation dieser Gene. Da in dieser Arbeit bereits für andere Stress-induzierende Faktoren ein Anstieg an SUMOyliertem Nup2 gezeigt wurde, wäre potenziell ein Einfluss der SUMOylierung von Nup2 bei der Lokalisation induzierbarer Gene denkbar. Zudem wurde von Rosonina und Kollegen gezeigt, dass SUMO eine große Rolle bei der Aktivierung von Genen, insbesondere induzierbaren Genen wie *GAL1*, aber auch dem Osmosestress-induzierten *STL1* in Hefe spielt und die Promotor-assoziierten Faktoren bei Aktivierung verstärkt SUMOyliert vorliegen. Diese SUMOylierung spielt scheinbar eine Rolle bei der Beendigung der Transkription, wie in *ubc9*-Mutanten gezeigt wurde, welche eine erhöhte Transkriptionsrate aufweisen (Rosonina *et al.*, 2010). Felberbaum und Kollegen beschrieben zudem, dass Inositolmangel die SUMOylierung von Proteinen erhöht und dass das Fehlen des SUMOylierungsenzyms Ubc9 sowie des DeSUMOylierungsenzyms Ulp2 ein starkes Wachstumsdefizit von Hefezellen in inositolfreiem Medium hervorruft, welches in Kombination mit der Deletion des ER-Membranproteins Scs2 in einer verstärkten Inositol-Auxotrophie resultiert. Das Fehlen von Ulp1 führt ebenfalls zu einem Wachstumsdefizit, welches jedoch schwächer ist. Somit spielt die SUMOylierung eine Rolle bei der Inositol-Synthese. Zudem wurde für *INO1* argumentiert, dass Ulp2 wichtig für die Transkriptionsaktivierung, möglicherweise durch DeSUMOylierung eines bestimmten Transkriptionsfaktors oder von Histonen, ist (Felberbaum *et al.*, 2012). Insgesamt wurden sowohl aktivierende als auch reprimierende Funktionen für SUMOzykluskomponenten bei der Transkription beschrieben (Lyst und Stancheva, 2007). Da das Fehlen sowohl von Nup2 als auch von SUMOzykluskomponenten eine Rolle bei der Regulierung induzierbarer Gene spielt, sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob Nup2-SUMO-Mutanten ebenfalls Effekte bezüglich der

Genlokalisierung zeigen. Zudem liegen Promotor-assoziierte Faktoren, wie oben beschrieben, bei Aktivierung meist SUMOyliert vor und von Schmid und Kollegen wurde gezeigt, dass unter anderem auch Nup2 eine Promotorinteraktion (Nup-PI) bei Aktivierung ausbildet, welche unter anderem auch in *GAL*-Genen nachgewiesen wurde (Schmid *et al.*, 2006).

Die Untersuchung der Lokalisation von *INO1* und *GAL1* in Hefezellen in dieser Arbeit zeigt für Nup2 und Nup2-2xKR ein vergleichbares Bild (Abbildung 25), was gegen einen Einfluss der SUMOylierung von Nup2 auf die Lokalisierung der untersuchten Gene an der nukleären Peripherie spricht. Ob die Transkriptionsaktivität in diesen Zellen verändert ist, kann aufgrund der Lokalisation allein nicht geschlussfolgert werden und wurde in dieser Arbeit auch nicht überprüft. Hierzu müsste beispielsweise eine quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) durchgeführt werden. Ob *NUP2-2xKR*-Mutanten Inositol-Auxotrophie aufweisen, könnte ebenfalls noch überprüft werden, indem die Zellen auf inositolfreien Platten kultiviert werden.

### **5.3. Nup2 als SUMOylierungs-Substat unter Berücksichtigung seines Interaktionspartners Nup60**

Zu Beginn dieser Arbeit lag das Ziel darin, die SUMOylierung von sowohl Nup2 als auch Nup60 zu detektieren und zu analysieren, weshalb für Nup60, wie es auch in Vorarbeiten für Nup2 bereits getan wurde, die SUMOylierung *in vitro* bestätigt wurde (Folz, 2014). Es wurde nachgewiesen, dass Nup60 *in vitro* ebenso wie Nup2 durch Zugabe von Nfi1 verstärkt SUMOyliert wird, wohingegen die Änderung des pH-Wertes sowie die Anwesenheit seines Interaktionspartners Nup2 keinen Effekt auf die SUMOylierung von Nup60 haben (Abbildung 45). Im weiteren Verlauf wäre die im SDS-Gel durch kolloidales Coomassie-Brilliant-Blau sichtbar gemachte Nup60-Smt3-Bande (Abbildung 46; nach 1 min und Zugabe von Nfi1) ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse geschickt worden, um die SUMOylierungsstellen zu detektieren. Von Nino und Kollegen wurden jedoch zeitgleich *in vivo* bereits die SUMOylierungsstellen durch systematische Mutation aller Lysine ausfindig gemacht, weshalb weitere Arbeiten zu Nup60 verworfen und für die weiteren Versuche die in Nino *et al.* beschriebenen Stämme *NUP60-SUMO-KR* und *NUP60-UB-KR* verwendet wurden (Nino *et al.*, 2016).

Nup60 bindet Nup2 an die nukleäre Korbstruktur und *in vitro*-Versuche haben gezeigt, dass die Anwesenheit von Nup60 die SUMOylierung von Nup2 begünstigt (Dilworth *et al.*, 2001; Folz, 2014). Die SUMOylierung von Nup2 selbst sowie auch die SUMOylierung von Nup60 haben keinen Einfluss auf die Lokalisation bzw. die Interaktion beider Proteine (Folz, 2014; Nino *et al.*, 2016). Dennoch konnte gezeigt werden, dass sowohl die Abwesenheit als auch die verhinderte SUMOylierung von Nup60 einen Einfluss auf die SUMOylierung von Nup2 haben. So steigt beispielsweise die Menge an Nup2-Smt3-Konjugaten auch bereits stressunabhängig in  $\Delta nup60$ -Zellen und wird bei Stress nur unwesentlich stärker (Abbildung

19) (Folz *et al.*, 2019). Dieser Effekt lässt sich leicht erklären, da ein ähnliches Muster in dieser Arbeit auch für *ulp1-133*-Zellen gezeigt wurde und Nup60 sowohl für die Stabilität als auch die Lokalisation von Ulp1 an der Kernpore verantwortlich ist (Panse *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004). Ohne Nup60 liegt einerseits weniger der Dekonjugase vor und andererseits geht die räumliche Nähe zwischen Nup2 und Ulp1 verloren, weshalb die GrundSUMOylierung weniger stark zurückgeht. Der Abbau der PolySUMOylierung über Ulp2 nach Stress hingegen ist hiervon nicht beeinflusst. Ein wesentlich stärkeres stressabhängiges SUMO-Signal für Nup2 ist zu erkennen, wenn Nup60 nicht mehr SUMOyliert werden kann (Abbildung 19). Ein Einfluss der SUMOylierung von Nup60 auf die Dekonjugase Ulp1 ist auszuschließen, da ohne osmotischen Stress die SUMOylierung von Nup2 wie erwartet abgebaut wird. Ein möglicher Grund hierfür hätte theoretisch sein können, dass durch die verhinderte SUMOylierung von Nup60 mehr Smt3 für Nup2 vorhanden ist. Dies scheint jedoch aufgrund der Tatsache, dass *SMT3* plasmidkodiert überexprimiert ist, doch eher unwahrscheinlich zu sein. Dennoch scheint es ein Zusammenspiel zwischen den Nukleoporinen und ihren Modifikationen zu geben.

Während die SUMOylierung von Nup2 *in vitro* positiv durch die Anwesenheit von Nup60 beeinflusst wird, wirkt sich *in vivo* die Abwesenheit sowie die unterbundene SUMOylierung von Nup60 positiv auf die SUMOylierung von Nup2 aus. Im Gegensatz dazu zeigt sich für Nup60 *in vitro* kein positiver Effekt in Anwesenheit von Nup2 (vgl. Abbildung 45). Hierdurch zeigt sich, dass Nup60 wohl einen relevanteren Einfluss auf die Modifikation von Nup2 hat, was daran liegen kann, dass Nup60 eventuell durch Bindung an Nup2 dessen Konformation ändert und somit Modifikationen begünstigt. Andererseits werden *in silico* auch SIMs in Nup60 vorhergesagt, welche ebenfalls eine Rolle spielen können.

Interessanterweise zeigen auch die Importinmutanten *srp1-54* und *rs11-1* (Kap95) eine erhöhte SUMOylierung von Nup2. In *srp1-54* konnte bereits ohne KCl-Behandlung eine SUMOylierung detektiert werden, welche stärker ist als im Wildtyp aber dennoch schwächer als in  $\Delta nup60$  (Abbildung 15). Nicht gezeigte Daten bestätigten dies auch für Kap95. Beide Importine sind am Import der SUMOzykluskomponenten einschließlich der Dekonjugasen Ulp1 und Ulp2 beteiligt, was sich an der Misslokalisierung der Proteine in den jeweiligen Mutanten zeigt (Grass, 2011). Dies würde auch den erhöhten SUMOylierungseffekt erklären, da in diesem Fall eine geringere Menge der Dekonjugasen im Zellkern vorliegt. Zwar liegen in diesem Fall auch weniger SUMOkomponenten im Zellkern vor, der Effekt hiervon scheint jedoch aufgrund des zusätzlich über Plasmid zugefügten Smt3 geringer zu sein.

*In vitro*-Studien zur SUMOylierung von Nup2 zeigten, dass diese in Anwesenheit von rekombinant hergestelltem Nfi1 verstärkt wird, ebenso wie auch durch Siz1, jedoch in einer geringeren Form (Latta, 2011; Folz, 2014). Hefe-Zwei-Hybrid-Versuche haben ebenfalls gezeigt, dass diese beiden E3-Ligasen mit Nup2 interagieren, weshalb zusammen mit den *in vivo*-Versuchen, welche ebenfalls in allen E3-Mutanten eine SUMOylierung für Nup2 zeigten

(Abbildung 20), geschlussfolgert werden kann, dass nicht eine Ligase allein für die SUMOylierung von Nup2 verantwortlich ist, sondern hierbei wie auch bei Nup60 die Ligasen Siz1 und Nfi1 eine große Rolle spielen.

#### **5.4. Einfluss der SUMOylierung von Nup2 auf seine eigene Lokalisation und den cNLS-Import**

Die SUMOylierung hat verschiedene Einflüsse auf Proteine und kann auch die subzelluläre Lokalisation seiner Substrate beeinflussen. So spielt sie in Vertebraten eine Rolle bei der Rekrutierung des GTPase-Aktivierungsproteins RanGAP1 an den NPC, welches mittels SUMO-1 mit dem cytoplasmatischen Nukleoporin RanBP2 interagiert. Die nicht modifizierte Form von RanGAP1, welches zudem auch das erste entdeckte SUMO-Substrat ist, liegt im Cytoplasma vor (Matunis *et al.*, 1996). Sowohl RanGAP1 als auch RanBP2 sind am nukleocytoplasmatischen Transport beteiligt.

Da es sich bei Nup2 um ein mobiles Nukleoporin handelt (Dilworth *et al.*, 2001), wurde auch hier bereits in Vorarbeiten die Lokalisation von Nup2-SUMO-Mutanten getestet, obwohl die SUMOylierungsstellen bis dato nur *in vitro* bestätigt waren (Folz, 2014). Es konnten keine Änderungen der Lokalisation festgestellt werden, auch wenn die SUMOylierung nicht mehr erfolgen kann (Folz, 2014; Folz *et al.*, 2019). Möglicherweise lag dies aber auch daran, dass zu wenig SUMOyliertes Nup2 vorlag, weshalb die veränderte Lokalisation nicht nachgewiesen werden konnte. Nachdem eine verstärkte SUMOylierung durch osmotischen Stress gezeigt werden konnte, wurde auch die stressabhängige Lokalisation von Nup2 nach osmotischem und Ethanolstress analysiert, wobei auch hier keine Änderung festgestellt wurde (Abbildung 21). Eine zusätzliche Information, welche hierdurch ebenfalls gewonnen werden konnte, ist, dass auch die stressabhängig über Hog1 erfolgte Phosphorylierung an Threonin 361 ebenfalls keinen Einfluss auf die Lokalisation von Nup2 hat.

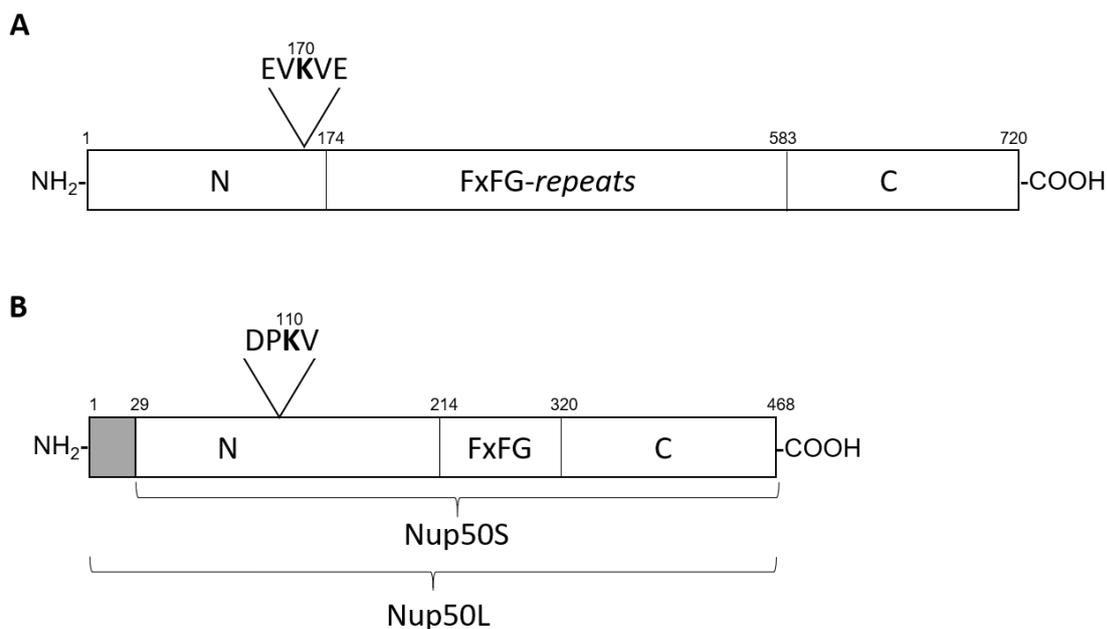
Um die SUMOylierung von Nup2 bestmöglich zu imitieren, wurde in dieser Arbeit ein für ein Nup2-Smt3-Fusionsprotein kodierendes Plasmid hergestellt, in welchem direkt hinter die Sequenz der bestätigten SUMOylierungsstellen Smt3 inseriert wurde. Mikroskopische Untersuchungen von Zellen mit diesem Fusionsprotein als GFP-Konstrukt zeigten jedoch auch keine Veränderung (Abbildung 23A), was darauf hindeutet, dass die Lokalisation nicht vom SUMOylierungsstatus abhängig ist. Neben der Lokalisation wurde in diesen Experimenten auch der cNLS-Transport betrachtet, wobei auch hier keine SUMO-spezifischen Effekte gezeigt werden konnten (Abbildung 23B), auch wenn Mutationen der SUMOylierungsenzyme Effekte auf den Transport haben, wie anhand von *uba2-1* und *ulp1-133* gezeigt wurde (Stade *et al.*, 2002). Nicht gezeigte Daten dieser Arbeit beinhalteten auch die Analyse des cNLS-Transports nach osmotischem Stress mit 1 M KCl, wobei auch hier weder für Srp1 noch das Reporterprotein NLS-GST-GFP eine Änderung der Lokalisation detektiert wurde. Dieses

Ergebnis wurde bereits vorher von Stochaj und Kollegen für NLS-GFP nach osmotischem Stress gezeigt, wobei hingegen andere Stimuli wie Glukosemangel, Ethanol sowie oxidativer Stress und Hitzeschock den cNLS-Import negativ beeinflussen, was sich an einer Misslokalisierung von NLS-GFP zeigt, welches nicht mehr in den Nukleus transportiert wird (Stochaj *et al.*, 2000).

### 5.5. SUMOylierungsstellen und weitere PTMs von Nup2

Wie *in vitro* konnte in dieser Arbeit der Lysinrest an Position 170 auch *in vivo* als HauptSUMOylierungsstelle bestätigt werden, während der Lysinrest an Position 153 einen eher geringen Effekt hat (Abbildung 14). Das Lysin an Position 170 wurde bei verschiedenen *in silico*-Analysen als sehr wahrscheinlich beschrieben, während der Lysinrest 153 einen wesentlich geringeren *score* hatte. Neben diesen beiden Lysinen wurden auch weitere putative SUMOylierungsstellen *in silico* gezeigt, welche jedoch *in vitro* klar ausgeschlossen werden konnten (Folz *et al.*, 2019). Bei genauerer Sequenzbetrachtung und Anwendung eines speziellen Programms zur Analyse von SIM und SUMOylierungsstellen (JASSA; Beauclair *et al.*, 2015) ist für den Lysinrest 170 bzw. für sein Konsensusmotiv eine Besonderheit aufgefallen. Es handelt sich hierbei bereits um ein direktes Konsensusmotiv mit Valin als langkettiger hydrophober Aminosäure, dem Lysin, einer beliebigen Aminosäure (Valin) sowie einer sauren Aminosäure, der Glutaminsäure. Vor dem ersten Valin befindet sich jedoch auch eine Glutaminsäure (EVKVE) was dazu führt, dass es das gleiche Konsensusmotiv auch in entgegengesetzter Richtung gibt, welches in JASSA als starkes invertiertes Konsensusmotiv beschrieben wird. Weitere *in silico* Programme geben solche invertierten Sequenzen nicht an, weshalb diese Stellen oft nicht als putative SUMOylierungsstellen berechnet werden. Für den nukleären Corepressor KAP1 (alternativ TIF1 beta) im Menschen wurden sechs Lysine beschrieben, welche Teil des Konsensusmotivs  $\Psi$ -K-x-D/E sind, wobei lediglich zwei dem kanonischen Motiv entsprechen und vier invertiert sind. Zwei der Lysine dieser invertierten Motive stellen die vorherrschenden SUMOylierungsstellen dar und sind mit für die Repression verantwortlich. Analysen dieses Proteins in Hefe, unter anderem mit Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchen, zeigten, dass in Hefe keine SUMOylierung an den invertierten Sequenzen stattfindet, was darauf hindeutet, dass in Hefe das kanonische Konsensusmotiv bevorzugt wird (Ivanov *et al.*, 2007). Dennoch heißt dies nicht, dass in Hefe keine invertierten Konsensusmotive erkannt werden können, denn eine der in Nino *et al.* bestätigten SUMOylierungsstellen für Nup60 zeigt ebenfalls laut Analyse mit JASSA kein direktes, sondern ein invertiertes Konsensusmotiv (Nino *et al.*, 2016). Ob in Hefe auch das invertierte Motiv in Nup2 erkannt wird, ließe sich anhand ortsspezifischer Mutagenese (*site directed mutagenesis*=SDM) einzelner Basen und somit der Aminosäuren im Konsensusmotiv überprüfen. Dies könnte man auch für das kanonische Motiv durchführen, um sicherzugehen,

dass das Konsensusmotiv für die SUMOylierung an dieser Stelle notwendig ist. Über SDM im Konsensusmotiv wurde auch für das Importin Kap114 bereits gezeigt, dass dieses essentiell für die SUMOylierung der in diesem Protein einzigen SUMOylierungsstelle an Position 909 ist, da Mutationen im Motiv ebenfalls die SUMOylierung unterbinden (Rothenbusch *et al.*, 2012). Mit Programmen zur Vorhersage von SUMOylierungsstellen, wie SUMOplot™, durchgeführte *in silico* Analysen des humanen Nukleoporins Nup50, welches eine funktionale Redundanz mit Nup2 besitzt, zeigen keine SUMOylierungsstellen im N-terminalen Bereich, welcher mit Nup153 (entspricht Nup1 und Nup60) interagiert (Makise *et al.*, 2012). Untersucht man jedoch die Proteinsequenz mit JASSA, so zeigt sich, dass auch für dieses Nukleoporin ein starkes invertiertes Konsensusmotiv an Lysinrest 110 vorliegt, welches ebenso wie bei Nup2, im N-terminalen Bereich liegt und auch in der verkürzten Isoform von Nup50 enthalten ist (Abbildung 47A und B). Bis dato wurde noch keine SUMOylierung von Nup50 nachgewiesen. Eine potentielle SUMOylierung an Lysinrest 110 ist jedoch sehr wahrscheinlich, da, wie anhand des humanen Corepressors KAP1 gezeigt wurde, im Menschen invertierte Konsensusmotive definitiv erkannt werden (Ivanov *et al.*, 2007).



**Abbildung 47:** Schematische Darstellung von Nup2 und seinem Funktionshomolog Nup50 sowie Markierung des invertierten Konsensusmotivs.

In beiden Proteinen Nup2 und Nup50, befindet sich das Motiv im N-terminalen Bereich, welcher für die Interaktion mit Nup60 (für Nup2) und Nup153 (für Nup50) verantwortlich ist **A:** Darstellung von Nup2. **B:** Darstellung von Nup50 (lange Version Nup50L). Der graue Bereich fehlt in der verkürzten Nup50S-Version.

Ein weiteres interessantes Detail bezüglich der SUMOylierungsstelle 170 in Nup2 ist, dass vier der 57 beschriebenen Phosphorylierungsstellen von Nup2 in unmittelbarer Nähe zu dieser sind und drei davon direkt aufeinanderfolgen (S160, S163, S164 und S165) (Abbildung 48), was die Vermutung zulässt, dass diese Modifikationen einen Einfluss aufeinander haben (Chi *et al.*, 2007; Smolka *et al.*, 2007; Albuquerque *et al.*, 2008; Gnad *et al.*, 2009; Holt *et al.*, 2009;

Huber *et al.*, 2009; Bodenmiller *et al.*, 2010). Ein PDSM (*phosphorylation-dependent SUMOylation motif*) ist ein Motiv, welches dem in Nup2 vorgefundenen sehr ähnlich ist, jedoch statt eines zweiten Serins ein Prolin besitzt, welches die Phosphorylierung des vorangehenden Serins begünstigt (PDSM:  $\Psi$ -K-x-D/E-x-x-S-P, für Nup2:  $\Psi$ -K-x-D/E-x-x-S-S) (Hietakangas *et al.*, 2006). Das Motiv kommt hauptsächlich in Transkriptionsregulatoren oder auch Hitzeschockfaktoren vor. Bereits vier Jahre bevor das PDSM als solches beschrieben wurde, wurde für den Hitzeschockfaktor 1 in Vertebraten (Hsf1 in Hefe) beschrieben, dass er stressabhängig am Serinrest 303 phosphoryliert wird und Mutationen an dieser Position zu einer verringerten SUMOylierung mit SUMO-1 an dem Lysinrest 298 führen (Liu *et al.*, 1997; Hietakangas *et al.*, 2003).

Der Transkriptionsfaktor MEF2A besitzt ebenfalls ein PDSM. Die Phosphorylierung an dieser Stelle über die Cyclin-abhängige Kinase 5 (CDK5) verstärkt die SUMOylierung und führt zur Transkriptionshemmung und zur Reifung der Synapsen. Über Kalziumsignalwege erfolgt die Dephosphorylierung über Calcineurin und die Acetylierung über das CREB-Bindeprotein und p300, was die Transkriptionsrepression beendet und zur Transkription sowie zum Abbau der Synapsen führt (Bossis und Melchior, 2006; Riquelme *et al.*, 2006; Gareau und Lima, 2010). Inwiefern die SUMOylierung von Nup2 an Lysinrest 170 zumindest unter bestimmten Bedingungen phosphorylierungsabhängig ist, lässt sich ohne weitere Studien nicht sagen. Ansätze, um dies zu studieren, wären einerseits der Austausch der potentiell phosphorylierten Serine durch Asparagin- oder Glutaminsäure, welche die Phosphorylierung imitieren, oder aber der Austausch zu nicht phosphorylierbaren Aminosäuren, um den Einfluss der Modifikation an diesen Serinen auf die SUMOylierung des Lysinrests 170 zu untersuchen (Maciejewski *et al.*, 1995; Paleologou *et al.*, 2008).

```

1 MAKRVADAQI QRETYDSNES DDDVTPSTKV ASSAVMNRK IAMPKRRMAF KPFGSAKSDE
61 TKQASFSFSL NRADGTGEAQ VDNSPPTESN SRLKALNLQF KAKVDDLVLG KPLADLRPLF
121 TRYELYIKNI LEAPVKSIEN PTQTKGNDAK PAKVEDVQKS SSSSEDEVK VEGPKFTIDA
181 KPPISDSVFS FGPCKENRKK DESSENDIE IKGPEFKFSG TVSSDVFCLN PSTDKNEKKT
241 ETNAKPF SFS SATSTTEQTK SKNPLSLTEA TKTNVDNNSK AEASFTFGTK HAADSQNNKP
301 SFVFGQAAAK PSLEKSSFTF GSTTIEKKND ENSTSNSKPE KSSDSNDSNP SFSFSIPSKN
361 TPDASKP SFS FGVPNSSKNE TSKPVFSFGA ATPSAKEASQ EDDNNNVEKP SSKPAFNLIS
421 NAGTEKEKES KKDSKPAF SF GISNGSESKD SDKPSLPSAV DGENDKKEAT KPAFSFGINT
481 NTKTADTKA PTF TFGSSAL ADNKEDVKKP FSFGTSQPNN TPF SFGKTT ANLPANSSTS
541 PAPSIPSTGF KFSLPFEQKG SQTNTDSKE ESTTEATGNE SQDATKVDAT PEESKPINLQ
601 NGEEDVALF SQKAKLMTFN AETKSYDSRG VGEMKLLKKK DDPSKVRLLC RSDGMGNVLL
661 NATVVDSFKY EPLAPGNDNL IKAPTVAADG KLVTYIVKFK QKEEGRSFTK AIEDAKKEMK

```

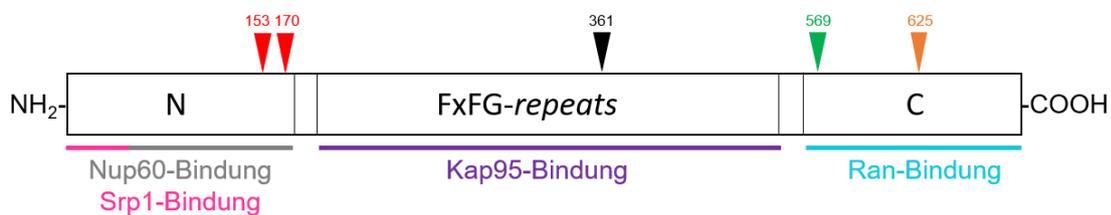
### Hog1-abhängige Phosphorylierung

Phosphorylierung

Succinylierung

SUMOylierung

Ubiquitinierung



**Abbildung 48: Proteinsequenz und schematische Darstellung von Nup2 und bekannten Modifikationsstellen.**

Alle bekannten posttranslationalen Modifikationen für Nup2 wurden farblich in der Proteinsequenz und der schematischen Darstellung dargestellt.

## 5.6. Nup2 als Ubiquitinierungssubstrat

Wie bereits der vorherige Abschnitt klar verdeutlicht, sind es meist nicht einzelne Modifikationen, die die physiologischen Eigenschaften und zellulären Funktionen von Proteinen beeinflussen, sondern vielmehr ein Zusammenspiel verschiedener. Während sich die einen Modifikationen gegenseitig begünstigen oder die eine nur infolge der anderen erfolgen kann, können verschiedene Modifikationen auch in direkter Konkurrenz um einen Lysinrest stehen, welcher Angriffspunkt verschiedener Modifikationen ist.

So auch bei IκBα, dem Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF-κB, welcher am Lysinrest K21 sowohl SUMOyliert als auch phosphorylierungsabhängig ubiquitiniert und das Protein infolge dessen degradiert werden kann. Die Degradation von IκBα hingegen führt zur Aktivierung des im Cytoplasma lokalisierten NF-κB und zu dessen Translokation in den Nukleus (Desterro *et al.*, 1998; Gareau und Lima, 2010). Gerade in diesem Beispiel zeigt sich, wie sich die verschiedenen Modifikationen gegenseitig antagonistisch beeinflussen. Die Phosphorylierung einerseits wirkt hemmend auf die SUMOylierung und begünstigt die Ubiquitinierung, während die Ubiquitinierung wiederum durch die SUMOylierung verhindert wird.

Im Gegensatz dazu wirken die Ubiquitinierung und die SUMOylierung im Falle der PCNA nicht gegeneinander, sondern im Zusammenspiel. In Hefe wird die PCNA/Pol30 am Lysinrest K164 in Anwesenheit DNA-zerstörender Substanzen erst mono- und dann polyubiquitiniert, wobei dies nicht in der Degradation resultiert, sondern zur Rekrutierung von spezifischen Proteinen führt, welche sonst nicht interagieren würden. Gleichmaßen verhält es sich für die SUMOylierung am gleichen Lysinrest, welche in der S-Phase erfolgt und die Rekombination während der Replikation verhindert. Beide Modifikationen können in diesem Fall auch coexistieren, weil die PCNA ein Homotrimer bestehend aus drei identischen Untereinheiten ist (Hoegel *et al.*, 2002; Papouli *et al.*, 2005; Pfander *et al.*, 2005; Gareau und Lima, 2010).

Gerade dieses Zusammenspiel verschiedener Modifikationen erschwert auch die Detektion der funktionellen Eigenschaften der einzelnen Modifikationen, da anhand von Mutationen oft nicht nur eine Modifikation an dieser Position unterbunden bzw. beeinflusst wird.

Für Nup2 konnte in dieser Arbeit neben der SUMOylierung auch die Ubiquitinierung nachgewiesen werden (Abbildung 26), welche unter normalen Bedingungen unabhängig von den SUMOylierungsstellen erfolgt. Dies spricht dafür, dass es keine Konkurrenz um die gleichen Lysinreste gibt und dass die Ubiquitinierung unabhängig von der SUMOylierung ist. Nach osmotischem Schock über KCl wurde jedoch in  $\Delta hog1$ - und  $\Delta ulp2$ -Zellen, wie auch bereits bei der SUMOylierung, eine verstärkte Modifikation, hier in Form von Ubiquitinierung, nachgewiesen (Abbildung 27). Da diese Zunahme der Ubiquitinierung vor allem in den Zellen detektiert wurde, welche auch eine effizientere SUMOylierung von Proteinen zeigten, lag die Vermutung nahe, dass die SUMOylierungsstellen und somit auch die SUMOylierung doch einen Einfluss auf die stressabhängige Ubiquitinierung haben könnten. Diese Vermutung wurde durch Analyse der *NUP2-WT-HA*-Zellen und *NUP2-2xKR-HA*-Zellen bestätigt. Während die Menge an ubiquitiniertem Nup2 unter normalen Wachstumsbedingungen identisch war, stieg die Menge an ubiquitiniertem Nup2-HA nach osmotischem Schock um fast das 2½-fache, während für Nup2-2xKR-HA nur eine Zunahme um das ½-fache detektiert werden konnte (Abbildung 28). Die Wahrscheinlichkeit, dass es hier doch Wechselwirkungen verschiedener Modifikationen, wie beispielsweise über SUMO-abhängige Ubiquitin-Ligasen (STUbls=SUMO-targeted-Ubiquitin-ligasen) gibt, welche meist nur SUMOylierte Proteine modifizieren, steigt somit.

STUbls spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur, der Genomstabilität und der Transkriptionsregulation (Nagai *et al.*, 2011; Sriramachandran und Dohmen, 2014). Sie können aber auch Proteine für den proteolytischen Abbau markieren und für die *protein quality control* verantwortlich sein (Wang und Prelich, 2009; Sriramachandran *et al.*, 2019).

Während es in Hefe zwei nukleär lokalisierte STUbls gibt, das Heterodimer Slx5/Slx8 sowie Uls1, gibt es in Säugern die beiden STUbls Rnf4 und Arkadia/Rnf111, welche sich sowohl im

Nukleus als auch im Cytoplasma befinden, wobei allgemein die primäre Funktion in der Aufrechterhaltung der Chromatinfunktion liegt (Yang *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2007; Uzunova *et al.*, 2007; Nagai *et al.*, 2008; Cook *et al.*, 2009; Garza und Pillus, 2013).

Für Nup2 wurde bereits die Ubiquitinierung am Lysinrest 569 beschrieben und konnte in dieser Arbeit auch mittels *in vivo*-Ubiquitinierung bestätigt werden. Dabei handelt es sich nicht um die alleinige Ubiquitinierungsstelle, da die *NUP2-K569R*-Mutante weiterhin ein Signal für Nup2-Ub zeigt, welches sich jedoch von dem in *NUP2-WT* unterscheidet (Abbildung 29) (Swaney *et al.*, 2013).

Um alle Ubiquitinierungsstellen auffindig zu machen, müssten nacheinander alle Lysine mutiert und in verschiedenen Kombinationen analysiert werden. Zudem wäre es aufgrund der schlecht detektierbaren Ubiquitinierung von Nup2 sicher von Vorteil, dies mit *HA-NUP2*-Plasmiden durchzuführen, um eindeutige Ergebnisse generieren zu können.

### **5.7. Potentielle (SUMO-spezifische) Interaktionspartner von Nup2**

Nachdem verschiedene zelluläre Funktionen, an welchen Nup2 beteiligt ist, auf SUMO-Abhängigkeit überprüft wurden, welche in allen Fällen widerlegt wurde, sollte anhand von Interaktionsstudien nach weiteren möglicherweise SUMO-abhängigen Interaktionen gesucht werden. Dies macht Sinn, da ein Protein allein meist nicht für eine Funktion verantwortlich ist, sondern es sich häufig um Proteinkomplexe handelt, welche sich bei räumlicher Nähe und unter bestimmten zellulären Bedingungen bilden. Hierbei kann es sich um starke, konstante Interaktionen, aber auch um sehr schwache oder transiente Interaktionen handeln, weshalb die Bedingungen für diese Interaktionsstudien in dieser Arbeit optimiert wurden. Obwohl es sich bei der TAP-Reinigung um eine sehr effiziente Methode zur Reinigung von Proteinkomplexen handelt, wurde diese Option nach einigen Vorversuchen in dieser Arbeit verworfen, da zu viele Interaktionspartner bei den Reinigungsschritten verloren gingen, wie man unter anderem an der geringen detektierten Menge an Nup60 sehen kann (Abbildung 33). Die Co-Immunpräzipitation wurde für Nup2 optimiert, indem die Effizienz der Lyse durch Zugabe von Triton X-100 und Einstellen einer Salzkonzentration von 400 mM NaCl gesteigert wurde. Proteaseinhibitoren sowie die Lagerung bei 4°C verhinderten, dass die Proteine während der Lyse degradiert wurden. Eine Schwierigkeit bei solchen Versuchen liegt darin einen Puffer zu verwenden, welcher durch seine Salzkonzentration sowie das verwendete Detergenz effizient zur Lyse beiträgt, aber andererseits nicht so stringent ist, dass er schwache Interaktionen löst. Da unter Verwendung des Lysepuffers bei der Bindung die Interaktion von Nup2 und Kap95 gelöst wurde, wurde der Salzgehalt des Lysepuffers nach der Lyse durch Verdünnen verringert. Somit erfolgte die Bindung über Nacht in einem Puffermilieu mit einer geringeren Salzkonzentration von 125 mM. Gereinigte Proteine können anschließend einen Eindruck geben, welche Interaktionen und somit auch welche Funktionen in Abhängigkeit der

SUMOylierung von Nup2 erfolgen. Die bereits bekannten Interaktionspartner konnten hierbei auch herangezogen werden, um nochmals die Effizienz der Co-IP zu bestätigen. Nup60, welches mit Nup2 an der Kernseite des NPC lokalisiert, wurde ebenso wie auch Nup2 selbst in den Positivproben mit Nup2-WT sowie Nup2 2xKR gefunden, ebenso wie auch die Importine Kap95 und Srp1, welche am cNLS-Import, einer der bekanntesten Funktionen von Nup2, beteiligt sind. Wie zu erwarten, da bei diesen Funktionen kein Einfluss der SUMOylierung von Nup2 nachgewiesen werden konnte, zeigt sich auch bei der Co-Reinigung kein Unterschied zwischen Wildtyp und KR-Mutante, weder anhand der Analyse mittels Westernblot noch bei der anschließenden massenspektrometrischen Analyse.

Insgesamt wurden unter den ausgewählten Einstellungen des zur Auswertung verwendeten Programmes *Scaffold* in allen vier MS-Analysen (Abbildung 41Abbildung 42Abbildung 43Abbildung 44) zusammen Peptide von circa 750 Proteinen spezifisch und unspezifisch gefunden. Eine Vielzahl davon waren Proteine der ribosomalen 40S- bzw. 60S-Untereinheiten, welche hoch abundant in Zellen vorkommen (Ho *et al.*, 2018). Neben diesen hoch abundanten Proteinen wurden auch solche aussortiert, welche nicht Nup2-spezifisch gereinigt wurden oder aber nur in geringen Mengen in weniger als drei Versuchen detektiert wurden. Nachdem alle vermutlich unspezifisch mitgereinigten Proteine aussortiert wurden, blieben 100 Proteine übrig, welche in mindestens drei der vier massenspektrometrischen Analysen größtenteils Nup2-spezifisch gefunden wurden. Nicht alle dieser Proteine zeigen eine nukleäre Lokalisation, weshalb die nachgewiesenen Interaktionen vermutlich im *in vivo*-System nicht zustande kommen und eher artifizieller Natur sind. Aus diesem Grund wurden Proteine ohne nukleäre Assoziation ebenfalls aussortiert. 55 der mit Nup2 co-gereinigten Proteine (Tabelle 23) sind zumindest partiell mit dem Nukleus assoziiert, was eine Interaktion im intakten Zellsystem wahrscheinlicher macht. Neben den bereits bekannten Interaktionspartnern, welche für die Lokalisation von Nup2 und den cNLS-Transport verantwortlich sind, Nup60, Srp1, Kap95 und Gsp1, wurden noch weitere bereits bekannte Interaktionspartner von Nup2 gefunden. Diese Interaktionspartner sind vor allem im Bereich der Chromatinorganisation, der Transkription sowie dem mRNA-Export angesiedelt. Eines dieser Proteine ist das Poly(A)-Bindeprotein Pab1, welches an der RNA-Prozessierung beteiligt ist (Amrani *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 2001). Für das Importin Pse1 wurde ebenfalls sowohl in dieser Arbeit als auch bereits vorher über Förster-Resonanzenergietransfer (kurz FRET) eine Interaktion mit Nup2 beschrieben (Damelin und Silver, 2000). Die ATP-abhängigen DNA-Helikasen Rvb1 und Rvb2 wurden ebenfalls bereits als physikalische Interaktionspartner von Nup2 beschrieben (Dilworth *et al.*, 2005). Sie sind für die Chromatinumgestaltung sowie den Aufbau der RNA-Polymerase II verantwortlich und im Nukleus lokalisiert (Lim *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2000; Jónsson *et al.*, 2001). Auch eine Untereinheit der RNA-Polymerase II, Rpo21, wurde identifiziert, wobei hier bislang keine Interaktion mit Nup2 nachgewiesen wurde. Ebenso verhält es sich für das Histon

H2A (Hta2), welches für die Chromatinassemblierung und die Chromosomenfunktion benötigt wird sowie dem Histin-Chaperon Nap1 (Downs *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2005). Die mit nukleärem Chromatin colokalisierte E3 Ubiquitinligase Bre1, welche unter anderem das Histon H2B monoubiquitiniert und somit zur Transkription, DNA-Replikation und DNA-Reparatur beiträgt, wurde ebenso wie auch ihr Interaktionspartner Lge1 bei der massenspektrometrischen Analyse mit einer relevanten Anzahl an Peptiden identifiziert (Hwang *et al.*, 2003; Wood *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2017).

Weitere identifizierte Proteine aus dem gleichen Funktionsbereich, welche jedoch keine bekannten Interaktionspartner von Nup2 sind, sind die beiden katalytischen Untereinheiten Pol2 der epsilon Polymerase und Pol3 der delta Polymerase. Ebenso wurde auch Sub2 identifiziert, ein Protein des TREX-Komplexes, welches eine Funktion beim mRNA-Export hat (Jensen *et al.*, 2001; Strässer *et al.*, 2001; Strässer *et al.*, 2002). Auch die beiden Topoisomerasen Top1 und Top2 wurden Nup2-spezifisch gereinigt, sowie die ATPase-Komponente des *Chromatin remodelling complex* RSC, Sth1, welche unter anderem die Basenentfernungsreparatur fördert (Garinther und Schultz, 1997; Czaja *et al.*, 2014).

Sro9, ein cytoplasmatisches RNA-Bindeprotein, welches sich zwischen dem Nukleus und dem Cytoplasma hin- und herbewegt und mRNA-Export abhängig aus dem Kern exportiert wird, wurde ebenfalls mit Nup2 gereinigt (Röther *et al.*, 2010).

### 5.7.1. Ribosomenbiogenese und Export

Neben den Proteinen der ribosomalen Untereinheiten, welche bei der Auswertung nicht weiter beachtet wurden, wurden auch weitere Proteine, welche an der Biogenese sowie dem Export von Präribosomen beteiligt sind, Nup2-spezifisch gefunden.

Im Nukleolus erfolgt über die RNA-Polymerase I die Transkription der DNA zur prä-rRNA, welche unter anderem auch über das *high mobility group box* Protein Hmo1 reguliert wird (Gadal *et al.*, 2002; Panday und Grove, 2017). Nach Prozessierung der prä-rRNA, unter anderem durch die in der massenspektrometrischen Analyse gefundenen RNA-abhängigen ATPasen Dbp3, Dbp8, Dbp9, Dbp10 sowie Mak5, werden zusammen mit ribosomalen Proteinen und Biogenesefaktoren die präribosomalen Untereinheiten gebildet (Kressler *et al.*, 2010; Woolford und Baserga; 2013; Henras *et al.*, 2015). Diese werden anschließend durch die Kernporen, jedoch unabhängig von Nup2, ins Cytoplasma exportiert, wo sie zu reifen Ribosomen werden (Weaver *et al.*, 1997; Zemp und Kutay, 2007). Die mitgereinigte Pol5 spielt ebenfalls eine Rolle bei der rRNA-Synthese (Shimizu *et al.*, 2002).

Auch die Proteine Pwp2, Mrd1, Mdn1, Noc3 und Nop9, welche ebenfalls bei der massenspektrometrischen Analyse detektiert wurden, sind unter anderem mit Präribosomen sowie deren Bildung bzw. Export assoziiert (Milkereit *et al.*, 2001; Dosil und Bustelo, 2004; Thomson *et al.*, 2007; Segerstolpe *et al.*, 2008; Ulbrich *et al.*, 2009; Woolford und Baserga,

2013). Einer der ebenfalls mit der Assemblierung der Ribosomen assoziierten, gefundenen Interaktionspartner, Urb1, wurde zuvor bereits als Interaktionspartner von Nup2 beschrieben (Rosado und Cruz, 2004; Dez *et al.*, 2004). Hgh1, ein mitgereinigtes Protein unbekannter Funktion, soll ebenfalls eine Rolle bei der Ribosomen-Biogenese spielen (Wade *et al.*, 2006). Manche der gefundenen Proteine sind mit den 40S-Präribosomen und andere mit den 60S-Präribosomen assoziiert.

Bcp1, ein essentielles Protein, welches unter anderem am nukleären Export der Lipidkinase Mss4 beteiligt ist, wurde ebenfalls als 60S Biogenesefaktor beschrieben (Audhya und Emr, 2003; Ting *et al.*, 2017).

Da die Assemblierung der Präribosomen hauptsächlich im Nukleolus abläuft, liegt die Vermutung nahe, dass die detektierten Interaktionen der Proteine mit Nup2 im geschlossenen System weniger zustande kommen. Dennoch bleiben manche Faktoren auch im Nukleoplasma und teilweise bis zum Export mit den präribosomalen Untereinheiten assoziiert, welche zumindest räumlich mit Nup2 nahe in Kontakt kommen, da sie die Kernpore, wenn auch unter Einfluss anderer Nukleoporine, passieren. Zudem ist die Ribosomenbiogenese ein hoch abundanter Prozess, was eine zufällige Mitreinigung der beteiligten Proteine noch wahrscheinlicher macht.

### 5.7.2. NPC

Neben Nup60 wurden auch drei weitere Proteine des NPC mit Nup2 gereinigt, Nup157, Nup170 und Nup192. Zwar wurde bisher nur für eines der drei Nukleoporine des inneren Rings des NPC (Nup192) eine direkte Interaktion mit Nup2 beschrieben (Tarasov *et al.*, 2008), jedoch interagiert Nup157 mit Nup60 (Alber *et al.*, 2007), was auch die Co-Reinigung dieses Proteins erklären könnte. Für Nup170 hingegen wurde bisher laut Datenbank (<https://www.yeastgenome.org>) keine physikalische Interaktion mit den genannten Nukleoporinen beschrieben, jedoch ist es naheliegend, dass es über weitere Kernporenkomplexbestandteile mitgereinigt wurde und so ein indirekter Interaktionspartner von Nup2 sein könnte. Zudem wurde für Nup157, Nup170 und Nup192 eine physikalische Interaktion mit Nup1 beschrieben (Alber *et al.*, 2007), welches wiederum mit Nup60 interagiert und zusammen mit Nup2 an der Kernseite des NPC lokalisiert (Rout *et al.*, 2000).

Wie für die Nukleoporine beschrieben, sollte auch beachtet werden, dass gefundene Interaktionspartner nicht zwangsläufig mit Nup2 direkt interagieren müssen. Es kann sich auch um Interaktionen mit anderen Interaktionspartnern handeln, welche zusammen mit Nup2 einen Komplex bilden. So wurden ein weiterer bereits bekannter Interaktionspartner von Nup60, Cdc28, die katalytische Untereinheit der cyclinabhängigen Kinase, sowie die bekannten Interaktionspartner von Srp1 Hmo1, das Hitzeschockprotein Hsp26 und die Serin/Threonin-

Proteinkinase Ksp1 gereinigt (Mendenhall und Hodge, 1998; Ito *et al.*, 2001; Ptacek *et al.*, 2005; Ubersax *et al.*, 2003).

Weitere Proteine, die ebenfalls anhand der gefundenen Peptide identifiziert wurden, sind die an der Glycerin-Synthese beteiligte NAD-abhängige Glycerol 3-Phosphatase Gpd1, die FAD-Pyrophosphatase Ymr178w sowie die Adenindeaminase Aah1 (Albertyn *et al.*, 1994; Lynch *et al.*, 2018; Woods *et al.*, 1984). Zudem wurde die Serin/Threonin-Proteinkinase Cbk1 inklusive ihres Aktivators Mob2 gefunden.

Mit1, ein Transkriptionsregulator von pseudohyphalem Wachstum (Cain *et al.*, 2012), wurde ebenso gefunden wie Lsm12, welches vermutlich an der RNA-Prozessierung beteiligt ist (Albrecht und Lengauer, 2004). Daneben wurden auch die Dehydrogenase Hom2 (Thomas und Surdin-Kerjan, 1989), das nukleäre Protein Ett1, welches die Replikation des Bromo-Mosaik-Virus inhibiert, sowie der Transkriptionsfaktor Pdr1, welcher die pleiotrope *drug response* reguliert (Akache *et al.*, 2004), und die S-Adenosyl-L-Methionin-abhängige tRNA: m5C-Methyltransferase Ncl1 (Motorin und Grosjean, 1999) in den Nup2-haltigen Proben gefunden.

Ein weiteres detektiertes Protein ist die Cdc42p-aktivierte Signaltransduktionskinase Cla4, welche unter anderem mit an der Aktivierung von Hog1 beteiligt ist (Tatebayashi *et al.*, 2006).

### 5.7.3. Interpretation der massenspektrometrischen Ergebnisse

#### **Nup2 und sein potenziell SUMO-abhängiger Interaktionspartner Bre1**

Anhand der Immunpräzipitation mit anschließender MS konnten zum einen bereits bekannte Interaktionspartner von Nup2 verifiziert werden. Zudem wurde eine Vielzahl neuer potentieller Interaktionspartner gefunden, wobei sich hier nicht klar neue Funktionen von Nup2 erkennen lassen, da größtenteils die bekannten Funktionen wie cNLS-Transport, Chromatinorganisation, Genregulation und mRNA-Export bestätigt werden. Obwohl auch viele Proteine der Ribosomenbiogenese gefunden wurden, lässt sich ein Einfluss hierbei eher ausschließen. Keine der detektierten Interaktionen ist vollkommen abhängig von der SUMOylierung von Nup2, selbst nicht nach osmotischem Schock, auch wenn hier größere Änderungen erwartet wurden. Ein gewisser Einfluss der SUMOylierung wurde für die E3-Ligase Bre1, welche in allen Versuchen Nup2-spezifisch gefunden wurde, entdeckt. In der *NUP2-2xKR*- Mutante wurden 20-50 % weniger Peptide von Bre1 gefunden.

Bre1 ist eine E3 Ubiquitinligase mit konservierter RING-Finger-Domäne, welche zusammen mit Rad6 unter anderem für die Monoubiquitinierung des Histons H2B sowie die daraus resultierende H3K4- und H3K79-Methylierung (Robzyk *et al.*, 2000; Ng *et al.*, 2002; Sun and Allis, 2002), eine Modifikation, die mit aktivem Chromatin assoziiert ist, erforderlich ist. Es wurde gezeigt, dass sowohl Bre1 als auch seine E2-Ligase Rad6 sowie sein Interaktionspartner Lge1 in Zellen ohne H2A.Z, einem Histon, welches die Formation von

aktivem Chromatin fördert, essentiell ist (Hwang *et al.*, 2003). H2A.Z wurde in dieser Arbeit bereits mit Nup2 assoziiert, da es in Anwesenheit von Nup2 spezifisch in den reprimierten Promotor (gezeigt an *INO1* und *GAL1*) eingebaut wird und somit die Gene an der nukleären Peripherie hält (Brickner *et al.*, 2007).

### **Nup2 und Transposons**

Interessanterweise wurden neben den beschriebenen Proteinen auch 5 Transposon Gag-Pol Polyproteine und ein Gag Polyprotein größtenteils Nup2-spezifisch mitgereinigt. Drei davon wurden in mindestens drei MS-Analysen gefunden, Ty1-pr1, Ty2-c und Ty1-br6. Die anderen drei, Ty1-mr1, Ty1-dr5 und Ty2-dr2, wurden spezifisch in einer bzw. zwei MS-Analysen gefunden.

Die circa 200 kDa schweren Gag-Pol Polyproteine (Gag, Protease, Integrase, reverse Transkriptase) sowie das 49 kDa schwere Gag Polyprotein entstehen durch Translation von Ty1-RNA, welche zuvor über die RNA-Polymerase II (Pol II) transkribiert und aus dem Zellkern ins Cytoplasma exportiert wird. Gag-, Gag-Pol- und ein Heterodimer aus Ty1-RNA und methylierter Ty1-RNA bilden Nukleokapside, die als virusähnliche Partikel (*virus-like-particles*; VLPs) bekannt sind. Innerhalb dieser VLPs wird die Protease autokatalytisch von Gag-Pol abgespalten und katalysiert alle zusätzlichen Spaltungen der Gag- und Gag-Pol-Vorläufer zu Gag, Protease, Integrase und reverser Transkriptase. Nach der Reifung der Ty1-Proteine wird die Ty1-RNA in eine lineare doppelsträngige DNA revers transkribiert. Die daraus resultierende cDNA wird zusammen mit der Integrase in den Kern importiert und anschließend über diese ins Genom integriert. Von dort aus erfolgt wiederum die Transkription über die RNA-Polymerase II, wodurch sich der Kreislauf schließt (Curcio *et al.*, 2015).

Retrotransposons sind die Vorläufer von Retroviren und besitzen konservierte Integraseenzyme (IN). Von Manhas und Kollegen wurde aus diesem Grund das Ty1 Retrotransposon verwendet, um genauer zu analysieren, wie Retroviren die Integration in genomische DNA gelingt, da die nukleäre Hülle eine Barriere darstellt. Viele Viren gelangen in den Zellkern, wenn die nukleäre Hülle bei der Mitose geöffnet ist (Roe *et al.*, 1993; Lewis und Emerman, 1994). Das humane Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) hingegen kann auch in sich nicht teilenden Zellen die nukleäre Hülle durchqueren und sich somit ins Genom integrieren (Weinberg *et al.*, 1991; Lewis *et al.*, 1992). Gerade aus diesem Grund wurden von Manhas und Kollegen Hefezellen gewählt, um diesen Effekt zu überprüfen, da diese bei der geschlossenen mitotischen Zellteilung eine intakte nukleäre Hülle behalten und somit analysiert werden konnte, wie die Überbrückung dieser Barriere erfolgt. Für Ty1-IN wurde bereits zuvor beschrieben, dass diese über eine zweigeteilte NLS verfügt und über Bindung an Srp1 in den Zellkern transportiert wird (McLane *et al.*, 2008). Bezüglich Transposons konnten Manhas und Kollegen zudem zeigen, dass die Deletion von Nup60 sowohl die mRNA-

Expression reduziert als auch das Genom-*targeting* verhindert. Daneben wurde auch ein Einfluss von Nup1, welches ebenso wie Nup60 für die Membrankrümmung verantwortlich ist, beschrieben (Meszaros *et al.*, 2015). Auch Nup2 spielt eine Rolle beim Ty1-Targeting, was zu der Schlussfolgerung führte, dass der NPC die zellulären Prozesse wie tRNA-Expression, Ty1-Expression und Ty1-Integration verbindet. Die FxFG-Repeats sowie der Kap95-basierte Import spielen keine Rolle beim Targeting (Manhas *et al.*, 2018). Für Nup2 wurde gezeigt, dass vor allem die im C-Terminus befindliche Ran-Bindedomäne verantwortlich für ein erfolgreiches Ty1-Targeting ist. Gründe hierfür sollten entweder darin liegen, dass Nup2 ohne seine Ran-Bindedomäne misslokalisiert im Nukleoplasma vorliegt oder dass der Ran-GTP-Gradient gestört ist (Dilworth *et al.*, 2001). Auch in der Arbeit von Manhas und Kollegen wurde bereits ein Einfluss von Ubiquitinierung und SUMOylierung bezüglich Nup60 analysiert. Verwendet wurden hierzu auch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten, in Nino *et al.* beschriebenen Stämme *NUP60-SUMO-KR* und *NUP60-UB-KR*. Für *NUP60-UB-KR* wurde eine um 58 % verringerte Insertion von Ty1 gezeigt und für *NUP60-SUMO-KR* eine um etwa 34 % verringerte. Der Effekt der *NUP60-UB-KR* Mutante wurde hauptsächlich auf die Dissoziation von Nup60 vom NPC zurückgeführt. Bezüglich der SUMOylierung wurden hingegen noch weitere Versuche mit E3-Mutanten durchgeführt, wobei die größte Reduzierung der Ty1-Insertion in *mms21-1* gezeigt wurde. Dies führte folgerichtig zu der Annahme, dass viele der am Ty1-Targeting beteiligten Proteine, darunter Nup60 und wahrscheinlich auch andere NPC-Proteine, über SUMO modifiziert werden. Auch in vorherigen Studien wurde für das HI-Virus bereits eine Assoziation mit Nup153 (Hefe: Nup1-Nup60) sowie den NPCs allgemein beschrieben, was bei verhinderter Interaktion in einer verringerten HIV-1 Infektiosität resultierte (Matreyek und Engelman, 2011; Matreyek und Engelman, 2013; Lelek *et al.*, 2015).

Zwar wurde bei der MS-Analyse kein SUMO-spezifischer Unterschied in der Interaktion von Nup2 mit den Transposon Gag-Pol Polyproteinen gefunden, jedoch wurde eine neue potentielle Funktion gefunden, bei welcher die SUMOylierung von Nup2 eine Rolle spielen könnte. Somit könnte in zukünftigen Arbeiten, wie auch bereits für die *NUP60-SUMO-KR* Mutante gezeigt, überprüft werden, ob das Targeting von Ty1 in *NUP2-2xKR* Mutanten beeinträchtigt ist (Manhas *et al.*, 2018).

### **Nup2 und Meiose**

Eine Besonderheit von Hefezellen als einzelligem eukaryotischem Organismus ist die Fähigkeit, sich sowohl asexuell als auch sexuell fortzupflanzen. In dieser Arbeit wurden ausschließlich haploide Zellen analysiert, welche sich mitotisch teilen (asexuell). Diploide Zellen hingegen können sich neben der mitotischen Zellteilung auch über Meiose (sexuell) vermehren. Bei der Mitose teilt sich eine Zelle und es entstehen zwei Tochterzellen mit

identischem Genmaterial. Während der Meiose hingegen sporuliert eine Zelle und es entwickeln sich Tetraden, welche zu vier Zellen mit unterschiedlichem Genmaterial führen (Hartwell, 1974). Im Gegensatz zu den Hefen können sich bei höheren Eukaryoten nur die Keimzellen auch meiotisch teilen (Ohkura, 2015). Studien in Mäusen haben gezeigt, dass das mit Nup2 funktional redundante Nukleoporin Nup50 essentiell für das Überleben primordiale Keimzellen bei der embryonalen Entwicklung ist (Park *et al.*, 2016). In der Arbeit von Park und Kollegen wurde für primordiale sowie fetale Keimzellen eine erhöhte Expression von *NUP50* nachgewiesen. Eine Deletion von *NUP50* hingegen führte zu einer verringerten Population primordiale Keimzellen, was auf Apoptose zurückgeführt wurde, welche möglicherweise über Nup50 inhibiert wird.

Zudem wurde ebenfalls im Mausmodell gezeigt, dass *NUP50* in den meisten Geweben schwach exprimiert wird, während die Expression in dem sich entwickelnden Neuralrohr und den erwachsenen Hoden, hauptsächlich in einer spezifischen Zone von Spermatozyten, die die Meiose unterlaufen oder vor kurzem abgeschlossen haben, verstärkt ist (Smitherman *et al.*, 2000).

Von Chu und Kollegen (2017) wurde bei der TAP-Reinigung von Ndj1 in meiotischen Hefezellen Nup2 co-präzipitiert, und aus diesem Grund ein Einfluss von Nup2 bei der Meiose angenommen, welcher anhand weiterer Versuche bestätigt wurde. Trotz der Co-Reinigung von Nup2 mit Ndj1 konnten Chu und Kollegen keine Interaktion beider Proteine mit rekombinant in *E. coli* hergestellten Proteinen oder Hefe-Zwei-Hybrid Versuchen nachweisen, weshalb nicht auszuschließen ist, dass die Interaktion über posttranslationale Modifikation in bestimmten Situationen, beispielsweise während der Meiose, reguliert wird.

Für *Δnup2*-Zellen wurde von Chu und Kollegen ebenso wie auch für *Δndj1*-Zellen eine Verzögerung der Kernteilung in der Meiose I Phase gesehen. Zudem wurde in der gleichen Arbeit für Nup2 eine Verzögerung in der Ausbildung von Doppelstrangbrüchen sowie eine verringerte Sporulationseffizienz im Vergleich zu Wildtypzellen gezeigt. Die Viabilität der Sporen war wie auch in *Δndj1* leicht verringert. *Δndj1 Δnup2*-Doppelmutanten zeigten eine stark verringerte Sporulationseffizienz, was möglicherweise auf eine redundante Funktion beider Proteine schließen lässt, wobei die Viabilität prozentual keine Unterschiede zeigte (Chu *et al.*, 2017).

Chu und Kollegen schließen daraus, dass die Chromosomenorganisation im meiotischen Kern sowohl Nup2 als auch das parallel dazu wirkende Ndj1 erfordert, um die dynamischen Chromosomenwechselwirkungen zu unterstützen, die mit Homologenpaarung, Synapsen und homologen Rekombinationen verbunden sind. Fehlt nur eines der beiden Proteine, hat dies geringe Auswirkungen auf die Sporenbildung und die Lebensfähigkeit der Sporen. Wenn hingegen beide fehlen, verhindern aberrante Wechselwirkungen zwischen

Schwesterchromatiden und / oder Interhomologen die Trennung der Sporen bei der Meiose I oder Meiose II (Chu *et al.*, 2017).

Im Rahmen der Arbeit von Chu und Kollegen wurde zudem gezeigt, dass nur ein kleiner Teil von Nup2 wichtig ist bei der Meiose. Es handelt sich um einen 125 Aminosäuren langen Teil, von Aminosäure 50 bis 175, welcher auch für die Interaktion mit Nup60 und somit die Lokalisation an den NPC verantwortlich ist. Interessanterweise befinden sich beide SUMOylierungsstellen in diesem Bereich, weshalb ein neuer Ansatz wäre zu überprüfen, ob die Nup2-SUMO-Mutante mit und ohne Ndj1 ebenfalls eine veränderte Sporulationseffizienz sowie weniger lebensfähige Sporen zeigt.

Zudem könnte auch die in dieser Arbeit durchgeführte Immunpräzipitation oder die in der Arbeit von Chu und Kollegen beschriebene TAP-Reinigung mit diploiden *NUP2-2xKR*-Zellen wiederholt werden, um zu überprüfen, ob die SUMOylierung die Interaktion mit Ndj1 reguliert. Viele Arbeiten zeigen einen Einfluss der SUMOylierung bei der Meiose sowohl bei Hefen als auch bei Keimzellen verschiedener Vertebraten. Unter anderem ist sie an der Aufrechterhaltung von meiotischem zentromerem Heterochromatin, der Reparatur von meiotischen DNA-Doppelstrangbrüchen, der homologen Rekombination, aber auch an der Ausbildung synaptonemaler Komplexe beteiligt (Nottke *et al.*, 2017). Klug und Kollegen zeigten, dass auch die SUMOylierung des SUMOylierungsenzyms Ubc9 selbst eine Rolle bei der Ausbildung synaptonemaler Komplexe spielt (Klug *et al.*, 2013). Zwar wird nur etwa 1 % der Ubc9-Enzyme an Lysinrest 153 SUMOyliert, dennoch führt die Nicht-SUMOylierung zu einer signifikanten Verringerung an meiotischen SUMO-Konjugaten sowie zur Aufhebung der Formation synaptonemaler Komplexe. Während die SUMOylierung von Ubc9 keinen Einfluss auf die Menge an SUMO-Konjugaten unter normalen Bedingungen hatte, zeigte sich bei Zellen, welche durch Kultivierung in Präsporulationsmedium und Sporulationsmedium synchron zur Sporulation gebracht wurden, eine drastische Reduktion der SUMO-Konjugate, wenn Ubc9 nicht mehr SUMOyliert werden kann. Bei diesem Versuch wurden zu bestimmten Zeiten Proben entnommen, um den Verlauf der SUMOylierung über den kompletten Meiosezyklus zu analysieren.

Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur SUMOylierung von Nup2 zusammen mit der beschriebenen Funktion von Nup2 bei der Meiose wäre die Untersuchung der *in vivo*-SUMOylierung von Nup2 in diploiden Zellen während der verschiedenen Phasen der Meiose von großem Interesse. Erste Ansätze dahingehend wurden bereits getan (Daten nicht gezeigt). Es wurden diploide Zellen hergestellt, welche neben *NUP2* bzw. *NUP2-2xKR* das für *6HIS-SMT3* kodierende kupferinduzierbare Plasmid enthalten. Die Zellen wurden in Präsporulationsmedium und anschließend in Sporulationsmedium kultiviert. Zur Induktion des *SMT3*-Plasmids wurde bei Überführung der Zellen ins Sporulationsmedium Kupfer hinzugegeben und eine Kupfer-freie Kontrolle mitgeführt. Während die Sporulation der

Kontrollzellen wie erwartet erfolgte, bildeten die Kupfer-behandelten Zellen keine Sporen. Die Zellen wurden längere Zeit kultiviert, um zu überprüfen, ob es sich lediglich um eine Verzögerung handelte und sich nach längerer Zeit doch noch Tetraden bilden, was jedoch widerlegt wurde. Folglich inhibiert entweder das Kupfer oder aber der Überschuss an Smt3 die Meiose, weshalb der Nachweis der SUMOylierung auf eine andere Art erfolgen müsste. Die Reinigung über Nup2 ist hierbei auszuschließen, da die Menge an SUMOyliertem Nup2 auf diese Weise wahrscheinlich unter der Nachweisgrenze liegen würde. Eine dauerhafte Überexpression von Smt3 hingegen beeinflusst womöglich zu viele zelluläre Prozesse, weshalb die Integration eines 6His-Tags vor das endogene Smt3 vermutlich am sinnvollsten wäre. Über Ni-Agarose könnten alle SUMOylierten Proteine gereinigt und Nup2 mithilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. Ebenso wurde es von Klug und Kollegen auch gemacht, jedoch wurde nach der Reinigung über Ni-Agarose eine massenspektrometrische Analyse statt der Immundetektion über Westernblot durchgeführt. Zudem wurde in diesem Versuch nicht die SUMOylierung eines bestimmten Proteins nachgewiesen, sondern es wurde gezeigt, dass die SUMOylierung von Ubc9 an der Ausbildung von SUMOketten beteiligt ist, indem das SUMOylierte Ubc9 seine katalytische Aktivität verliert und funktional die Eigenschaft einer E3-Ligase annimmt (Klug *et al.*, 2013).

Von Yamashita und Kollegen wurde 2007 gezeigt, dass die Ubiquitinierung des Histons H2B eine Rolle bei der Ausbildung meiotischer Doppelstrangbrüche spielt. So zeigen die nicht mehr über Bre1 ubiquitinierbare H2B Mutante ebenso wie die Deletionmutante der E3-Ligase Bre1 sowie seiner E2-Partnerligase Rad6 eine verringerte Effizienz bei der Ausbildung von Doppelstrangbrüchen (Yamashita *et al.*, 2004).

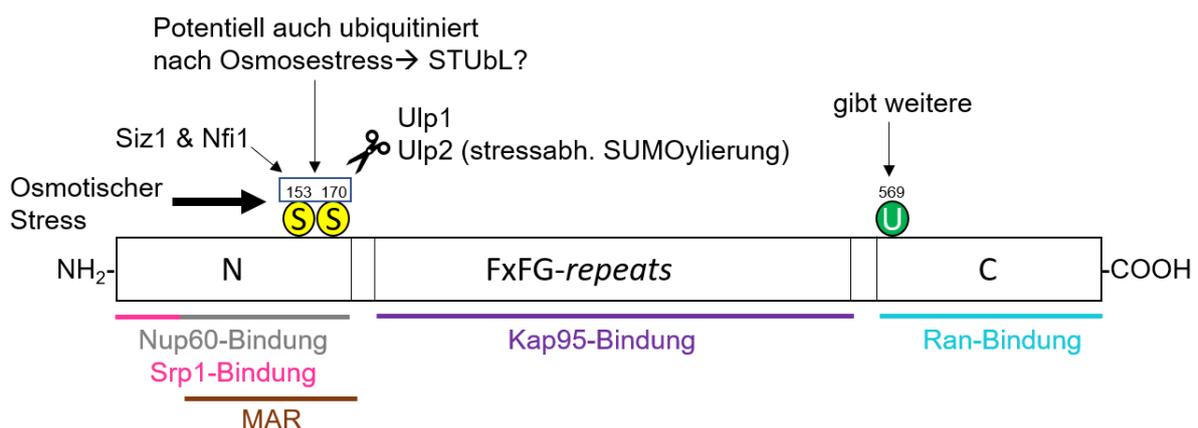
Von Jordan und Kollegen wurde ebenfalls gezeigt, dass die Deletion von *BRE1* sowie auch seines Interaktionspartner *LGE1*, welche in dieser Arbeit beide als potentielle Interaktionspartner von Nup2 beschrieben wurden, die Sporulationseffizienz drastisch verringert. Sowohl  $\Delta lge1$ - als auch  $\Delta bre1$ -Zellen zeigen eine verzögerte und zeitlich verlängerte meiotische DNA-Replikation. Zudem wurde für beide Stämme ein verringertes Level an Doppelstrangbrüchen festgestellt (Jordan *et al.*, 2007). Ähnliches wurde, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, von Chu und Kollegen auch für  $\Delta nup2$ -Zellen gezeigt, welche ebenfalls eine verringerte Sporulationseffizienz sowie eine Verzögerung in der Ausbildung von Doppelstrangbrüchen zeigen. Die Tatsache, dass die Deletion sowohl von *NUP2* als auch *BRE1* und *LGE1* zu Einschränkungen bei der Meiose führt, spricht ebenfalls für eine mögliche Interaktion und verstärkt somit die Ergebnisse der MS-Analyse. Dies ließe sich ebenfalls über eine Co-Immunpräzipitation mit diploiden (prä-)sporulierenden Zellen überprüfen.

Wang und Kollegen zeigten 2017, dass der molekulare Mechanismus und die Funktionen der Ubiquitinierung von H2B von der Hefe bis zum Säuger evolutionär konserviert sind, sich jedoch

die physiologischen Funktionen der daran beteiligten E3-Ligasen voneinander unterscheiden (Wang *et al.*, 2017).

## 5.8. Perspektiven

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diverse Informationen bezüglich der SUMOylierung von Nup2 in *S. cerevisiae* gewonnen, wie in Abbildung 49 gezeigt. So wurde *in vivo* die bereits *in vitro* gezeigte SUMOylierung an Lysinrest 153 sowie 170 bestätigt, welche hauptsächlich über die E3-Ligasen Nfi1 und Siz1 erfolgt. Während die konstante DeSUMOylierung über Ulp1 erfolgt, spielt Ulp2 eine große Rolle bei der DeSUMOylierung der stressinduzierten SUMOylierung von Nup2 infolge von Osmosestress, welcher zudem auch zu einer verstärkten Ubiquitinierung unter anderem am Lysinrest 569 führt. Erste Anzeichen dafür, dass nach osmotischem Stress auch eine verstärkte Ubiquitinierung an den SUMOylierungsstellen, möglicherweise über StUbl erfolgt, wurden ebenfalls erhalten. Obwohl die SUMOylierung von Nup2 keinen Einfluss auf das Zellwachstum unter osmotischen Stressbedingungen hat, spielt Nup2 dennoch eine Rolle bei der Stressantwort. Diese müssten in weiteren Arbeiten genauer analysiert werden, unter anderem auch unter Berücksichtigung der Stelle T361, welche Hog1-abhängig nach Osmosestress phosphoryliert wird. Da in dieser Arbeit eine gesteigerte SUMOylierung von Nup2 nach osmotischem Stress, nicht aber nach Ethanolstress gezeigt wurde, könnten auch andere Stressarten wie oxidativer Stress, Kälte- und Hitzestress sowie Nährstoffmangel usw. analysiert werden, um die Spezifität der SUMOylierung infolge bestimmter Stressarten zu zeigen.



**Abbildung 49: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse.**

Nup2 wird an den Lysinresten 153 und 170 über Siz1 und Nfi1 SUMOyliert (nach osmotischem Stress verstärkt) und unter normalen Bedingungen über Ulp1 deSUMOyliert, während die DeSUMOylierung nach beispielsweise osmotischem Stress über Ulp2 erfolgt. Nach Stress scheinen diese Positionen auch ubiquitiniert zu werden. Der Lysinrest 569 ist eine Ubiquitinierungsstelle, die jedoch nicht die einzige ist. Die SUMOylierungsstellen befinden sich in der Nup60 Bindedomäne, haben jedoch keinen Einfluss auf die Interaktion mit Nup60 sowie die Lokalisation von Nup2 und den klassischen Kernporentransport.

Der aktuelle Stand bezüglich der Nup2-(Smt3-)abhängigen Funktionen ist in Tabelle 24 dargestellt. Die am besten erforschten Funktionen von Nup2, der cNLS-Transport sowie die Lokalisierung von Nup60 sowie sich selbst betreffend sind ebenso wenig über die SUMOylierung von Nup2 beeinflusst wie die Genlokalisierung von *GAL1* und *INO1*.

Anhand der Interaktionsstudien wurde die E3-Ligase Bre1 als neuer Interaktionspartner von Nup2 gefunden, welcher in weiteren Versuchen bestätigt werden müsste, ebenso wie der Einfluss der SUMOylierung von Nup2 auf diese Interaktion.

Zusammen mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen weisen auch die beiden bei der Co-Immunpräzipitation gefundenen Proteine, Bre1 und sein Interaktionspartner Lge1, auf einen potenziell auch SUMO-abhängigen Einfluss von Nup2 bei der Meiose hin. Dies müsste Anhand weiterer Forschungsarbeiten überprüft werden. Da hauptsächlich die MAR-Sequenz für die Meiose wichtig ist und dieser Bereich beide SUMOylierungsstellen enthält, könnten die Versuche von Chu und Kollegen mit der *NUP2-2xKR* Mutante wiederholt werden. Zudem wäre es auch interessant, das SUMOylierungsmuster von Nup2 während der verschiedenen Stadien der Meiose zu analysieren.

Nachdem bei der massenspektrometrischen Analyse der Co-Immunpräzipitation Peptide mehreren Transposons gefunden wurden und ein Einfluss von Nup2 für das Targeting von Transposons bereits beschrieben wurde, könnten die von Manhas und Kollegen mit *NUP60-SUMO-KR* durchgeführten Versuche mit *NUP2-SUMO-KR* wiederholt werden, um den Einfluss der SUMOylierung zu analysieren.

Tabelle 24: Nup2-abhängige und Nup2-Smt3-abhängige Funktionen

	<b>Nup2-abhängig</b>	<b>Nup2-Smt3-abhängig</b>
<b>cNLS-Import</b>	Ja	Nein
<b>Lokalisation von Nup60</b>	Ja	Nein
<b>Lokalisation von Nup2</b>	Ja	Nein
<b>Osmotoleranz/Wachstum</b>	Nein	Nein
<b>Genlokalisierung <i>INO1</i> und <i>GAL1</i></b>	Ja	Nein
<b>Ubiquitinierung von Nup2</b>	Ja	Normale Bedingungen: Nein Nach Osmosestress: weitere Versuche
<b>Phosphorylierung an T361</b>	Ja	Noch offen
<b>Meiose/Sporenbildung</b>	Ja	Noch offen
<b>Transposon Targeting</b>	Ja	Noch offen

Neben der erfolgreichen Charakterisierung der SUMOylierung von Nup2 haben sich durch diese Arbeit weitere interessante Perspektiven die Funktion der SUMOylierung von Nup2 betreffend für künftige Arbeiten ergeben.

## 6. Literaturverzeichnis

Abu Irqeba A, Li Y, Panahi M, Zhu M, Wang Y. 2014. Regulating global sumoylation by a MAP kinase Hog1 and its potential role in osmo-tolerance in yeast. *PLoS One* 9(2): e87306.

Akache B, MacPherson S, Sylvain MA, Turcotte B. 2004. Complex interplay among regulators of drug resistance genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 279(27):27855-60.

Albrecht M, Lengauer T. 2004. Novel Sm-like proteins with long C-terminal tails and associated methyltransferases. *FEBS Lett*. 569(1-3):18-26.

Alber F, Dokudovskaya S, Veenhoff LM, Zhang W, Kipper J, Devos D, Suprpto A, Karni-Schmidt O, Williams R, Chait BT, Rout MP, Sali A. 2007. Determining the architectures of macromolecular assemblies. *Nature*. 450(7170):683-94.

Albertyn J, Hohmann S, Thevelein JM, Prior BA. 1994. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* 14(6): 4135-4144.

Albuquerque CP, Smolka MB, Payne SH, Bafna V, Eng J, Zhou H. 2008. A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. *Mol Cell Proteomics* 7(7): 1389-1396.

Albuquerque CP, Wang G, Lee NS, Kolodner RD, Putnam CD, Zhou H. 2013. Distinct SUMO ligases cooperate with Esc2 and Slx5 to suppress duplication-mediated genome rearrangements. *PLoS Genet* 9(8): e1003670.

Alepuz PM, Jovanovic A, Reiser V, Ammerer G. 2001. Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Mol Cell* 7(4): 767-777.

Alepuz PM, de Nadal E, Zapater M, Ammerer G, Posas F. 2003. Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *EMBO J* 22(10): 2433-2442.

Allen TD, Cronshaw JM, Bagley S, Kiseleva E, Goldberg MW. 2000. The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J Cell Sci* 113 ( Pt 10): 1651-1659.

Allen NP, Huang L, Burlingame A, Rexach M. 2001. Proteomic analysis of nucleoporin interacting proteins. *J Biol Chem* 276(31): 29268-29274.

Amrani N, Minet M, Le Gouar M, Lacroute F, Wyers F. 1997. Yeast Pab1 interacts with Rna15 and participates in the control of the poly(A) tail length in vitro. *Mol Cell Biol* 17(7): 3694-3701.

Anckar J, Sistonen L. 2007. SUMO: getting it on. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 6): 1409-1413.

Andrulis ED, Neiman AM, Zappulla DC, Sternglanz R. 1998. Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature* 394(6693): 592-595.

Audhya A, Emr SD. 2003. Regulation of PI4,5P2 synthesis by nuclear-cytoplasmic shuttling of the Mss4 lipid kinase. *EMBO J* 22(16): 4223-4236.

- Auesukaree C. 2017. Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. *J Biosci Bioeng* 124(2): 133-142.
- Augustine RC, York SL, Rytz TC, Vierstra RD. 2016. Defining the SUMO System in Maize: SUMOylation Is Up-Regulated during Endosperm Development and Rapidly Induced by Stress. *Plant Physiol* 171(3): 2191-2210.
- Babazadeh R, Furukawa T, Hohmann S, Furukawa K. 2014. Rewiring yeast osmostress signalling through the MAPK network reveals essential and non-essential roles of Hog1 in osmoadaptation. *Sci Rep.* 4:4697.
- Baczyk D, Audette MC, Drewlo S, Levytska K, Kingdom JC. 2017. SUMO-4: A novel functional candidate in the human placental protein SUMOylation machinery. *PLoS One* 12(5): e0178056.
- Bayer P, Arndt A, Metzger S, Mahajan R, Melchior F, Jaenicke R, Becker J. 1998. Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280(2): 275-286.
- Bayliss R, Corbett AH, Stewart M. 2000. The molecular mechanism of transport of macromolecules through nuclear pore complexes. *Traffic* 1(6): 448-456.
- Bayliss R, Littlewood T, Strawn LA, Wentz SR, Stewart M. 2002a. GLFG and FxFG nucleoporins bind to overlapping sites on importin-beta. *J Biol Chem* 277(52): 50597-50606.
- Bayliss R, Leung SW, Baker RP, Quimby BB, Corbett AH, Stewart M. 2002b. Structural basis for the interaction between NTF2 and nucleoporin FxFG repeats. *EMBO J* 21(12): 2843-2853.
- Beauchair G, Bridier-Nahmias A, Zagury JF, Saib A, Zamborlini A. 2015. JASSA: a comprehensive tool for prediction of SUMOylation sites and SIMs. *Bioinformatics* 31(21): 3483-3491.
- Bednenko J, Cingolani G, Gerace L. 2003. Importin beta contains a COOH-terminal nucleoporin binding region important for nuclear transport. *J Cell Biol* 162(3): 391-401.
- Bischoff FR, Klebe C, Kretschmer J, Wittinghofer A, Ponstingl H. 1994. RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(7): 2587-2591.
- Black DL. 2003. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72: 291-336.
- Bodenmiller B, Wanka S, Kraft C, Urban J, Campbell D, Pedrioli PG, Gerrits B, Picotti P, Lam H, Vitek O, Brusniak MY, Roschitzki B, Zhang C, Shokat KM, Schlapbach R, Colman-Lerner A, Nolan GP, Nesvizhskii AI, Peter M, Loewith R, von Mering C, Aebersold R.. 2010. Phosphoproteomic analysis reveals interconnected system-wide responses to perturbations of kinases and phosphatases in yeast. *Sci Signal* 3(153): rs4.
- Bohren KM, Nadkarni V, Song JH, Gabbay KH, Owerbach D. 2004. A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J Biol Chem* 279(26): 27233-27238.
- Booth JW, Belanger KD, Sannella MI, Davis LI. 1999. The yeast nucleoporin Nup2p is involved in nuclear export of importin alpha/Srp1p. *J Biol Chem* 274(45): 32360-32367.
- Bossis G, Melchior F. 2006. SUMO: regulating the regulator. *Cell Div* 1: 13.

- Bretes H, Rouviere JO, Leger T, Oeffinger M, Devaux F, Doye V, Palancade B. 2014. Sumoylation of the THO complex regulates the biogenesis of a subset of mRNPs. *Nucleic Acids Res* 42(8): 5043-5058.
- Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin MC. 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259(3102): 1760-1763.
- Brickner DG, Cajigas I, Fondufe-Mittendorf Y, Ahmed S, Lee PC, Widom J, Brickner JH. 2007. H2A.Z-mediated localization of genes at the nuclear periphery confers epigenetic memory of previous transcriptional state. *PLoS Biol* 5(4): e81.
- Brickner DG, Light W, Brickner JH. 2010. Quantitative localization of chromosomal loci by immunofluorescence. *Methods Enzymol* 470: 569-580.
- Brown CR, Silver PA. 2007. Transcriptional regulation at the nuclear pore complex. *Curr Opin Genet Dev* 17(2): 100-106.
- Buetow L, Huang DT. 2016. Structural insights into the catalysis and regulation of E3 ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17(10): 626-642.
- Bursomanno S, Beli P, Khan AM, Minocherhomji S, Wagner SA, Bekker-Jensen S, Mailand N, Choudhary C, Hickson ID, Liu Y. 2015. Proteome-wide analysis of SUMO2 targets in response to pathological DNA replication stress in human cells. *DNA Repair (Amst)* 25: 84-96.
- Bylebyl GR, Belichenko I, Johnson ES. 2003. The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast. *J Biol Chem* 278(45): 44113-44120.
- Cain CW, Lohse MB, Homann OR, Sil A, Johnson AD. 2012. A conserved transcriptional regulator governs fungal morphology in widely diverged species. *Genetics* 190(2): 511-521.
- Casolari JM, Brown CR, Komili S, West J, Hieronymus H, Silver PA. 2004. Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell* 117(4): 427-439.
- Catala R, Ouyang J, Abreu IA, Hu Y, Seo H, Zhang X, Chua NH. 2007. The Arabidopsis E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses. *Plant Cell* 19(9): 2952-2966.
- Chen S, Yang T, Liu F, Li H, Guo Y, Yang H, Xu J, Song J, Zhu Z, Liu D. 2014. Inflammatory factor-specific sumoylation regulates NF-kappaB signalling in glomerular cells from diabetic rats. *Inflamm Res* 63(1): 23-31.
- Cheng CH, Lo YH, Liang SS, Ti SC, Lin FM, Yeh CH, Huang HY, Wang TF. 2006. SUMO modifications control assembly of synaptonemal complex and polycomplex in meiosis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 20(15): 2067-2081.
- Chi A, Huttenhower C, Geer LY, Coon JJ, Syka JE, Bai DL, Shabanowitz J, Burke DJ, Troyanskaya OG, Hunt DF. 2007. Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(7):2193-2198.
- Chu DB, Gromova T, Newman TAC, Burgess SM. 2017. The Nucleoporin Nup2 Contains a Meiotic-Autonomous Region that Promotes the Dynamic Chromosome Events of Meiosis. *Genetics* 206(3): 1319-1337.

- Conti L, Price G, O'Donnell E, Schwessinger B, Dominy P, Sadanandom A. 2008. Small ubiquitin-like modifier proteases OVERLY TOLERANT TO SALT1 and -2 regulate salt stress responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 20(10): 2894-2908.
- Cook CE, Hochstrasser M, Kerscher O. 2009. The SUMO-targeted ubiquitin ligase subunit Slx5 resides in nuclear foci and at sites of DNA breaks. *Cell Cycle* 8(7): 1080-1089.
- Creton S, Jentsch S. 2010. SnapShot: The SUMO system. *Cell* 143(5): 848-848 e841.
- Cronshaw JM, Krutchinsky AN, Zhang W, Chait BT, Matunis MJ. 2002. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* 158(5): 915-927.
- Curcio MJ, Lutz S, Lesage P. 2015. The Ty1 LTR-retrotransposon of budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Spectr* 3(2): 1-35.
- Czaja W, Mao P, Smerdon MJ. 2014. Chromatin remodelling complex RSC promotes base excision repair in chromatin of *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* 16: 35-43.
- D'Angelo MA, Hetzer MW. 2008. Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends Cell Biol* 18(10): 456-466.
- Damelin M, Silver PA. 2000. Mapping interactions between nuclear transport factors in living cells reveals pathways through the nuclear pore complex. *Mol Cell* 5(1): 133-140.
- de Nadal E, Casadome L, Posas F. 2003. Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 23(1): 229-237.
- de Nadal E, Posas F. 2010. Multilayered control of gene expression by stress-activated protein kinases. *EMBO J* 29(1): 4-13.
- Denning D, Mykytka B, Allen NP, Huang L, Ai B, Rexach M. 2001. The nucleoporin Nup60p functions as a Gsp1p-GTP-sensitive tether for Nup2p at the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 154(5): 937-950.
- Denning DP, Uversky V, Patel SS, Fink AL, Rexach M. 2002. The *Saccharomyces cerevisiae* nucleoporin Nup2p is a natively unfolded protein. *J Biol Chem* 277(36): 33447-33455.
- Desterro JM, Rodriguez MS, Hay RT. 1998. SUMO-1 modification of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell* 2(2): 233-239.
- Devos D, Dokudovskaya S, Williams R, Alber F, Eswar N, Chait BT, Rout MP, Sali A. 2006. Simple fold composition and modular architecture of the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(7): 2172-2177.
- Dez C, Froment C, Noaillac-Depeyre J, Monsarrat B, Caizergues-Ferrer M, Henry Y. 2004. Npa1p, a component of very early pre-60S ribosomal particles, associates with a subset of small nucleolar RNPs required for peptidyl transferase center modification. *Mol Cell Biol* 24(14): 6324-6337.
- Dieppois G, Stutz F. 2010. Connecting the transcription site to the nuclear pore: a multi-tether process that regulates gene expression. *J Cell Sci* 123(Pt 12): 1989-1999.
- Dilworth DJ, Suprpto A, Padovan JC, Chait BT, Wozniak RW, Rout MP, Aitchison JD. 2001. Nup2p dynamically associates with the distal regions of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol* 153(7): 1465-1478.

- Dilworth DJ, Tackett AJ, Rogers RS, Yi EC, Christmas RH, Smith JJ, Siegel AF, Chait BT, Wozniak RW, Aitchison JD. 2005. The mobile nucleoporin Nup2p and chromatin-bound Prp20p function in endogenous NPC-mediated transcriptional control. *J Cell Biol* 171(6): 955-965.
- Dingwall C, Laskey RA. 1991. Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci* 16(12): 478-481.
- Dingwall C, Kandels-Lewis S, Seraphin B. 1995. A family of Ran binding proteins that includes nucleoporins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(16): 7525-7529.
- Dosil M, Bustelo XR. 2004. Functional characterization of Pwp2, a WD family protein essential for the assembly of the 90 S pre-ribosomal particle. *J Biol Chem*. 279(36):37385-97.
- Downs JA, Lowndes NF, Jackson SP. 2000. A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature*. 408(6815):1001-4.
- Egecioglu DE, D'Urso A, Brickner DG, Light WH, Brickner JH. 2014. Approaches to studying subnuclear organization and gene-nuclear pore interactions. *Methods Cell Biol* 122: 463-485.
- Enenkel C, Blobel G, Rexach M. 1995. Identification of a yeast karyopherin heterodimer that targets import substrate to mammalian nuclear pore complexes. *J Biol Chem* 270(28): 16499-16502.
- Felberbaum R, Wilson NR, Cheng D, Peng J, Hochstrasser M. 2012. Desumoylation of the endoplasmic reticulum membrane VAP family protein Scs2 by Ulp1 and SUMO regulation of the inositol synthesis pathway. *Mol Cell Biol* 32(1): 64-75.
- Feldherr CM, Akin D. 1997. The location of the transport gate in the nuclear pore complex. *J Cell Sci* 110 ( Pt 24): 3065-3070.
- Ferdinand PH, Borne R, Trotter V, Pages S, Tardif C, Fierobe HP, Perret S. 2013. Are cellulosome scaffolding protein CipC and CBM3-containing protein HycP, involved in adherence of *Clostridium cellulolyticum* to cellulose? *PLoS One* 8: e69360.
- Fernandez-Martinez J, Rout MP. 2009. Nuclear pore complex biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 21(4): 603-612.
- Finley D, Ulrich HD, Sommer T, Kaiser P. 2012. The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 192(2): 319-360.
- Folz H. 2014. Funktionelle Analyse von SUMOylierungsstellen des Nucleoporins Nup2 in *Saccharomyces cerevisiae*. Masterarbeit. Universität des Saarlandes.
- Folz H, Nino CA, Taranum S, Caesar S, Latta L, Waharte F, Salamero J, Schlenstedt G, Dargemont C. 2019. SUMOylation of the nuclear pore complex basket is involved in sensing cellular stresses. *J Cell Sci*. 132(7). pii: jcs224279.
- Fried H, Kutay U. 2003. Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci* 60(8): 1659-1688.
- Gadal O, Labarre S, Boschiero C, Thuriaux P. 2002. Hmo1, an HMG-box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system. *EMBO J* 21(20): 5498-5507.

- Galy V, Olivo-Marin JC, Scherthan H, Doye V, Rascalou N, Nehrbass U. 2000. Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin. *Nature* 403(6765): 108-112.
- Gareau JR, Lima CD. 2010. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(12): 861-871.
- Garinther WI, Schultz MC. 1997. Topoisomerase function during replication-independent chromatin assembly in yeast. *Mol Cell Biol*. 17(7):3520-6.
- Gartmann J, 2017. Funktionelle Charakterisierung des TRP-homologen Ionenkanals Yvc1 in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation. Universität des Saarlandes.
- Garza R, Pillus L. 2013. STUbLs in chromatin and genome stability. *Biopolymers* 99(2): 146-154.
- Geiss-Friedlander R, Melchior F. 2007. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(12): 947-956.
- Gilchrist D, Mykytka B, Rexach M. 2002. Accelerating the rate of disassembly of karyopherin.cargo complexes. *J Biol Chem* 277(20): 18161-18172.
- Gnad F, de Godoy LM, Cox J, Neuhauser N, Ren S, Olsen JV, Mann M. 2009. High-accuracy identification and bioinformatic analysis of in vivo protein phosphorylation sites in yeast. *Proteomics* 9(20): 4642-4652.
- Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA. 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): 11-15.
- Gong L, Kamitani T, Fujise K, Caskey LS, Yeh ET. 1997. Preferential interaction of sentrin with a ubiquitin-conjugating enzyme, Ubc9. *J Biol Chem* 272(45): 28198-28201.
- Görlich D, Henklein P, Laskey RA, Hartmann E. 1996. A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus. *EMBO J* 15(8): 1810-1817.
- Görlich D. 1998. Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J* 17(10): 2721-2727.
- Grass S. 2011. Identifikation von nucleocytoplasmatischen Transportfaktoren der Komponenten des SUMOylierungszyklus in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation. Universität des Saarlandes.
- Guan T, Kehlenbach RH, Schirmer EC, Kehlenbach A, Fan F, Clurman BE, Arnheim N, Gerace L. 2000. Nup50, a nucleoplasmically oriented nucleoporin with a role in nuclear protein export. *Mol Cell Biol* 20(15): 5619-5630.
- Hahn S, Maurer P, Caesar S, Schlenstedt G. 2008. Classical NLS proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 379(4): 678-694.
- Hanahan D. 1983. Studies on Transformation of *Escherichia Coli* with Plasmids. *J Mol Biol* 166(4): 557-580.
- Hannich JT, Lewis A, Kroetz MB, Li SJ, Heide H, Emili A, Hochstrasser M. 2005. Defining the SUMO-modified proteome by multiple approaches in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280(6): 4102-4110.

- Harreman MT, Hodel MR, Fanara P, Hodel AE, Corbett AH. 2003. The auto-inhibitory function of importin alpha is essential in vivo. *J Biol Chem* 278(8): 5854-5863.
- Hartwell LH. 1974. *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol Rev* 38(2): 164-198.
- Hecker CM, Rabiller M, Haglund K, Bayer P, Dikic I. 2006. Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem* 281(23): 16117-16127.
- Henley JM, Craig TJ, Wilkinson KA. 2014. Neuronal SUMOylation: mechanisms, physiology, and roles in neuronal dysfunction. *Physiol Rev* 94(4): 1249-1285.
- Henras AK, Plisson-Chastang C, O'Donohue MF, Chakraborty A, Gleizes PE. 2015. An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 6(2): 225-242.
- Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A. 1983. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* 258(13): 8206-8214.
- Hershko A, Ciechanover A. 1992. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 61: 761-807.
- Hieda M, Tachibana T, Yokoya F, Kose S, Imamoto N, Yoneda Y. 1999. A monoclonal antibody to the COOH-terminal acidic portion of Ran inhibits both the recycling of Ran and nuclear protein import in living cells. *J Cell Biol* 144(4): 645-655.
- Hietakangas V, Ahlskog JK, Jakobsson AM, Hellesuo M, Sahlberg NM, Holmberg CI, Mikhailov A, Palvimo JJ, Pirkkala L, Sistonen L. 2003. Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol Cell Biol*. 23(8):2953-68.
- Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A, Sistonen L. 2006. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(1): 45-50.
- Ho B, Baryshnikova A, Brown GW. 2018. Unification of Protein Abundance Datasets Yields a Quantitative *Saccharomyces cerevisiae* Proteome. *Cell Syst* 6(2): 192-205 e193.
- Hochstrasser M. 2001. SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell* 107(1): 5-8.
- Hochstrasser M. 2009. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 458(7237): 422-429.
- Hoege C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S. 2002. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419(6903): 135-141.
- Holmes MR, Giddings MC. 2004. Prediction of posttranslational modifications using intact-protein mass spectrometric data. *Anal Chem* 76(2): 276-282.
- Holt LJ, Tuch BB, Villen J, Johnson AD, Gygi SP, Morgan DO. 2009. Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science* 325(5948): 1682-1686.
- Hood JK, Silver PA. 1998. Cse1p is required for export of Srp1p/importin-alpha from the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273(52): 35142-35146.
- Hood JK, Casolari JM, Silver PA. 2000. Nup2p is located on the nuclear side of the nuclear pore complex and coordinates Srp1p/importin-alpha export. *J Cell Sci* 113 ( Pt 8): 1471-1480.

- Huber A, Bodenmiller B, Uotila A, Stahl M, Wanka S, Gerrits B, Aebersold R, Loewith R. 2009. Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis. *Genes Dev* 23(16): 1929-1943.
- Hwang WW, Venkatasubrahmanyam S, Ianculescu AG, Tong A, Boone C, Madhani HD. 2003. A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Mol Cell* 11(1): 261-266.
- Ishii K, Arib G, Lin C, Van Houwe G, Laemmli UK. 2002. Chromatin boundaries in budding yeast: the nuclear pore connection. *Cell* 109(5): 551-562.
- Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sakaki Y. 2001. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(8): 4569-4574.
- Ivanov AV, Peng H, Yurchenko V, Yap KL, Negorev DG, Schultz DC, Psulkowski E, Fredericks WJ, White DE, Maul GG, Sadofsky MJ, Zhou MM, Rauscher FJ. 2007. PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing. *Mol Cell* 28(5): 823-837.
- Izaurralde E, Kann M, Pante N, Sodeik B, Hohn T. 1999. Viruses, microorganisms and scientists meet the nuclear pore. *EMBO J* 18(2): 289-296.
- Jensen TH, Boulay J, Rosbash M, Libri D. 2001. The DECD box putative ATPase Sub2p is an early mRNA export factor. *Curr Biol* 11(21): 1711-1715.
- Johnson ES, Blobel G. 1997. Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J Biol Chem* 272(43): 26799-26802.
- Johnson ES, Schwienhorst I, Dohmen RJ, Blobel G. 1997. The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *EMBO J* 16(18): 5509-5519.
- Johnson ES, Gupta AA. 2001. An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* 106(6): 735-744.
- Johnson ES. 2004. Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73: 355-382.
- Jonsson ZO, Dhar SK, Narlikar GJ, Auty R, Wagle N, Pellman D, Pratt RE, Kingston R, Dutta A. 2001. Rvb1p and Rvb2p are essential components of a chromatin remodeling complex that regulates transcription of over 5% of yeast genes. *J Biol Chem* 276(19): 16279-16288.
- Jordan PW, Klein F, Leach DR. 2007. Novel roles for selected genes in meiotic DNA processing. *PLoS Genet* 3: e222.
- Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE. 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39(3 Pt 2): 499-509.
- Keminer O, Peters R. 1999. Permeability of single nuclear pores. *Biophys J* 77(1): 217-228.
- Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M. 2006. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 159-180.

- Kerscher O. 2007. SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Rep* 8(6): 550-555.
- Klebe C, Bischoff FR, Ponstingl H, Wittinghofer A. 1995. Interaction of the nuclear GTP-binding protein Ran with its regulatory proteins RCC1 and RanGAP1. *Biochemistry* 34(2): 639-647.
- Klug H, Xaver M, Chaugule VK, Koidl S, Mittler G, Klein F, Pichler A. 2013. Ubc9 sumoylation controls SUMO chain formation and meiotic synapsis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 50(5): 625-636.
- Kobe B. 1999. Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat Struct Biol* 6(4): 388-397.
- Koepp DM, Wong DH, Corbett AH, Silver PA. 1996. Dynamic localization of the nuclear import receptor and its interactions with transport factors. *J Cell Biol.* 133(6):1163-76.
- Kolawa N, Sweredoski MJ, Graham RL, Oania R, Hess S, Deshaies RJ. 2013. Perturbations to the ubiquitin conjugate proteome in yeast deltaubx mutants identify Ubx2 as a regulator of membrane lipid composition. *Mol Cell Proteomics* 12(10): 2791-2803.
- Kressler D, Hurt E, Bassler J. 2010. Driving ribosome assembly. *Biochim Biophys Acta* 1803(6): 673-683.
- Künzler M, Hurt EC. 1998. Cse1p functions as the nuclear export receptor for importin alpha in yeast. *FEBS Lett* 433(3): 185-190.
- Kurepa J, Walker JM, Smalle J, Gosink MM, Davis SJ, Durham TL, Sung DY, Vierstra RD. 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): 6862-6872.
- Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE, Corbett AH. 2007. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem* 282(8): 5101-5105.
- Lange A, McLane LM, Mills RE, Devine SE, Corbett AH. 2010. Expanding the definition of the classical bipartite nuclear localization signal. *Traffic* 11(3): 311-323.
- Latta L. 2011. Charakterisierung des Nukleoporins Nup2 der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit. Universität des Saarlandes.
- Lee SJ, Matsuura Y, Liu SM, Stewart M. 2005. Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP. *Nature* 435(7042): 693-696.
- Lelek M, Casartelli N, Pellin D, Rizzi E, Souque P, Severgnini M, Di Serio C, Fricke T, Diaz-Griffero F, Zimmer C, Charneau P, Di Nunzio F. 2015. Chromatin organization at the nuclear pore favours HIV replication. *Nat Commun* 6: 6483.
- Lewicki MC, Srikumar T, Johnson E, Raught B. 2015. The *S. cerevisiae* SUMO stress response is a conjugation-deconjugation cycle that targets the transcription machinery. *J Proteomics* 118: 39-48.
- Lewis P, Hensel M, Emerman M. 1992. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO J* 11(8): 3053-3058.
- Lewis PF, Emerman M. 1994. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol* 68(1): 510-516.

- Li SJ, Hochstrasser M. 1999. A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* 398(6724): 246-251.
- Li, SJ, Hochstrasser M. 2000. The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein. *Mol Cell Biol* 20(7): 2367-2377.
- Li, SJ, Hochstrasser M. 2003. The Ulp1 SUMO isopeptidase: distinct domains required for viability, nuclear envelope localization, and substrate specificity. *J Cell Biol* 160(7): 1069-1081.
- Liang YC, Lee CC, Yao YL, Lai CC, Schmitz ML, Yang WM. 2016. SUMO5, a Novel Poly-SUMO Isoform, Regulates PML Nuclear Bodies. *Sci Rep* 6: 26509.
- Lim CR, Kimata Y, Ohdate H, Kokubo T, Kikuchi N, Horigome T, Kohno K. 2000. The *Saccharomyces cerevisiae* RuvB-like protein, Tih2p, is required for cell cycle progression and RNA polymerase II-directed transcription. *J Biol Chem* 275(29): 22409-22417.
- Liu XD, Liu PC, Santoro N, Thiele DJ. 1997. Conservation of a stress response: human heat shock transcription factors functionally substitute for yeast HSF. *EMBO J* 16(21): 6466-6477.
- Loeb JD, Davis LI, Fink GR. 1993. NUP2, a novel yeast nucleoporin, has functional overlap with other proteins of the nuclear pore complex. *Mol Biol Cell* 4(2): 209-222.
- Lokareddy RK, Hapsari RA, van Rheenen M, Pumroy RA, Bhardwaj A, Steen A, Veenhoff LM, Cingolani G. 2015. Distinctive Properties of the Nuclear Localization Signals of Inner Nuclear Membrane Proteins Heh1 and Heh2. *Structure* 23(7): 1305-1316.
- Longtine MS, Mckenzie A, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P und Pringle JR. 1998. Additional Modules for Versatile and Economical Pcr-Based Gene Deletion and Modification in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Yeast* 14(10): 953-961.
- Lynch JH, Sa N, Saeheng S, Raffaelli N, Roje S. 2018. Characterization of a non-nudix pyrophosphatase points to interplay between flavin and NAD(H) homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*. 13(6):e0198787.
- Lyst MJ, Stancheva I. 2007. A role for SUMO modification in transcriptional repression and activation. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 6): 1389-1392.
- Macara IG. 2001. Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* 65(4): 570-594, table of contents.
- Maciejewski PM, Peterson FC, Anderson PJ, Brooks CL. 1995. Mutation of serine 90 to glutamic acid mimics phosphorylation of bovine prolactin. *J Biol Chem* 270(46): 27661-27665.
- Maeda T, Wurgler-Murphy SM, Saito H. 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369(6477): 242-245.
- Maeda T, Takekawa M, Saito H. 1995. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* 269(5223): 554-558.
- Makise M, Mackay DR, Elgort S, Shankaran SS, Adam SA, Ullman KS. 2012. The Nup153-Nup50 protein interface and its role in nuclear import. *J Biol Chem* 287(46): 38515-38522.

- Manhas S, Ma L, Measday V. 2018. The yeast Ty1 retrotransposon requires components of the nuclear pore complex for transcription and genomic integration. *Nucleic Acids Res* 46(7): 3552-3578.
- Matreyek KA, Engelman A. 2011. The requirement for nucleoporin NUP153 during human immunodeficiency virus type 1 infection is determined by the viral capsid. *J Virol* 85(15): 7818-7827.
- Matreyek KA, Engelman A. 2013. Viral and cellular requirements for the nuclear entry of retroviral preintegration nucleoprotein complexes. *Viruses* 5(10): 2483-2511.
- Matsuura Y, Lange A, Harreman MT, Corbett AH, Stewart M. 2003. Structural basis for Nup2p function in cargo release and karyopherin recycling in nuclear import. *EMBO J* 22(20): 5358-5369.
- Matsuura Y, Stewart M. 2005. Nup50/Npap60 function in nuclear protein import complex disassembly and importin recycling. *EMBO J* 24(21): 3681-3689.
- Mattaj IW, Englmeier L. 1998. Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* 67: 265-306.
- Matunis MJ, Coutavas E, 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): 1457-1470.
- Mayor T, Lipford JR, Graumann J, Smith GT, Deshaies RJ. 2005. Analysis of polyubiquitin conjugates reveals that the Rpn10 substrate receptor contributes to the turnover of multiple proteasome targets. *Mol Cell Proteomics* 4(6): 741-751.
- McLane LM, Pulliam KF, Devine SE, Corbett AH. 2008. The Ty1 integrase protein can exploit the classical nuclear protein import machinery for entry into the nucleus. *Nucleic Acids Res* 36(13): 4317-4326.
- Meinema AC, Laba JK, Hapsari RA, Otten R, Mulder FA, Kralt A, van den Bogaart G, Lusk CP, Poolman B, Veenhoff LM. 2011. Long unfolded linkers facilitate membrane protein import through the nuclear pore complex. *Science* 333(6038): 90-93.
- Melchior F. 2000. SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 591-626.
- Mendenhall und Hodge. 1998. Regulation of Cdc28 Cyclin-Dependent Protein Kinase Activity during the Cell Cycle of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(4): 1191-1243.
- Meszaros N, Cibulka J, Mendiburo MJ, Romanauska A, Schneider M, Kohler A. 2015. Nuclear pore basket proteins are tethered to the nuclear envelope and can regulate membrane curvature. *Dev Cell* 33(3): 285-298.
- Milkereit P, Gadal O, Podtelejnikov A, Trumtel S, Gas N, Petfalski E, Tollervey D, Mann M, Hurt E, Tschochner H. 2001. Maturation and intranuclear transport of pre-ribosomes requires Noc proteins. *Cell* 105(4): 499-509.
- Minty A, Dumont X, Kaghad M, 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): 36316-36323.
- Motorin Y, Grosjean H. 1999. Multisite-specific tRNA:m5C-methyltransferase (Trm4) in yeast *Saccharomyces cerevisiae*: identification of the gene and substrate specificity of the enzyme. *RNA*. 5(8):1105-18.

- Mühlhardt C .2009. Der Experimentator Molekularbiologie/ Genomics. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Mukhopadhyay D, Riezman H. 2007. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315(5809): 201-205.
- Muller S, Hoegel C, Pyrowolakis G, Jentsch S. 2001. SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(3): 202-210.
- Murray AW. 1987. Cell cycle control. A cycle is a cycle is a cycle. *Nature* 327(6117): 14-15.
- Nadal-Ribelles M, Conde N, Flores O, Gonzalez-Vallinas J, Eyraes E, Orozco M, de Nadal E, Posas F. 2012. Hog1 bypasses stress-mediated down-regulation of transcription by RNA polymerase II redistribution and chromatin remodeling. *Genome Biol* 13(11): R106.
- Nagai S, Davoodi N, Gasser SM. 2011. Nuclear organization in genome stability: SUMO connections. *Cell Res* 21: 474-485.
- Nagoshi E, Imamoto N, Sato R, Yoneda Y. 1999. Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip)-containing transcription factor, occurs through the direct interaction of importin beta with HLH-Zip. *Mol Biol Cell* 10(7): 2221-2233.
- Nagai S, Dubrana K, Tsai-Pflugfelder M, Davidson MB, Roberts TM, Brown GW, Varela E, Hediger F, Gasser SM, Krogan NJ. 2008. Functional targeting of DNA damage to a nuclear pore-associated SUMO-dependent ubiquitin ligase. *Science* 322(5901): 597-602.
- Ng HH, Xu RM, Zhang Y, Struhl K. 2002. Ubiquitination of histone H2B by Rad6 is required for efficient Dot1-mediated methylation of histone H3 lysine 79. *J Biol Chem*. 277(38):34655-7.
- Nino CA, Guet D, Gay A, Brutus S, Jourquin F, Mendiratta S, Salamero J, Geli V, Dargemont C. 2016. Posttranslational marks control architectural and functional plasticity of the nuclear pore complex basket. *J Cell Biol* 212(2): 167-180.
- Nottke AC, Kim HM, Colaiacovo MP. 2017. Wrestling with Chromosomes: The Roles of SUMO During Meiosis. *Adv Exp Med Biol* 963: 185-196.
- Ogawa Y, Miyamoto Y, Asally M, Oka M, Yasuda Y, Yoneda Y. 2010. Two isoforms of Npap60 (Nup50) differentially regulate nuclear protein import. *Mol Biol Cell* 21(4): 630-638.
- Ohkura H. 2015. Meiosis: an overview of key differences from mitosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(5).
- Palancade B, Liu X, Garcia-Rubio M, Aguilera A, Zhao X, Doye V. 2007. Nucleoporins prevent DNA damage accumulation by modulating Ulp1-dependent sumoylation processes. *Mol Biol Cell* 18(8): 2912-2923.
- Paleologou KE, Schmid AW, Rospigliosi CC, Kim HY, Lamberto GR, Fredenburg RA, Lansbury PT Jr, Fernandez CO, Eliezer D, Zweckstetter M, Lashuel HA. 2008. Phosphorylation at Ser-129 but not the phosphomimetics S129E/D inhibits the fibrillation of alpha-synuclein. *J Biol Chem* 283(24): 16895-16905.
- Panday A, Grove A. 2017. Yeast HMO1: Linker Histone Reinvented. *Microbiol Mol Biol Rev* 81(1).

- Panse VG, Kuster B, Gerstberger T, Hurt E. 2003. Unconventional tethering of Ulp1 to the transport channel of the nuclear pore complex by karyopherins. *Nat Cell Biol* 5(1): 21-27.
- Panse VG, Hardeland U, Werner T, Kuster B, Hurt E. 2004. A proteome-wide approach identifies sumoylated substrate proteins in yeast. *J Biol Chem* 279(40): 41346-41351.
- Papouli E, Chen S, Davies AA, Huttner D, Krejci L, Sung P, Ulrich HD. 2005. Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. *Mol Cell* 19(1): 123-133.
- Park YJ, Chodaparambil JV, Bao Y, McBryant SJ, Luger K. 2005. Nucleosome assembly protein 1 exchanges histone H2A-H2B dimers and assists nucleosome sliding. *J Biol Chem*. 280(3):1817-25.
- Park E, Lee B, Clurman BE, Lee K. 2016. NUP50 is necessary for the survival of primordial germ cells in mouse embryos. *Reproduction* 151(1): 51-58.
- Pemberton LF, Paschal BM. 2005. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* 6(3): 187-198.
- Peters R. 2005. Translocation through the nuclear pore complex: selectivity and speed by reduction-of-dimensionality. *Traffic* 6(5): 421-427.
- Pfander B, Moldovan GL, Sacher M, Hoege C, Jentsch S. 2005. SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* 436(7049): 428-433.
- Polo S, Sigismund S, Faretta M, Guidi M, Capua MR, Bossi G, Chen H, De Camilli P, Di Fiore PP. 2002. A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* 416(6879): 451-455.
- Posas F, Saito H. 1997. Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* 276(5319): 1702-1705.
- Proft M, Pascual-Ahuir A, de Nadal E, Arino J, Serrano R, Posas F. 2001. Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J* 20(5): 1123-1133.
- Ptacek J, Devgan G, Michaud G, Zhu H, Zhu X, Fasolo J, Guo H, Jona G, Breitkreutz A, Sopko R, McCartney RR, Schmidt MC, Rachidi N, Lee SJ, Mah AS, Meng L, Stark MJ, Stern DF, De Virgilio C, Tyers M, Andrews B, Gerstein M, Schweitzer B, Predki PF, Snyder M. 2005. Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* 438(7068): 679-684.
- Regot S, de Nadal E, Rodriguez-Navarro S, Gonzalez-Novo A, Perez-Fernandez J, Gadal O, Seisenbacher G, Ammerer G, Posas F. 2013. The Hog1 stress-activated protein kinase targets nucleoporins to control mRNA export upon stress. *J Biol Chem* 288(24): 17384-17398.
- Reichelt R, Holzenburg A, Buhle EL, Jr., Jarnik M, Engel A, Aebi U. 1990. Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J Cell Biol* 110(4): 883-894.
- Rexach M, Blobel G. 1995. Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* 83(5): 683-692.
- Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD. 2009. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem* 78: 363-397.

- Ribbeck K, Lipowsky G, Kent HM, Stewart M, Görlich D. 1998. NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J* 17(22): 6587-6598.
- Ribbeck K, Görlich D. 2001. Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J* 20(6): 1320-1330.
- Ribbeck K, Görlich D. 2002. The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *EMBO J* 21(11): 2664-2671.
- Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Seraphin B. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17(10): 1030-1032.
- Riquelme C, Barthel KK, Liu X. 2006. SUMO-1 modification of MEF2A regulates its transcriptional activity. *J Cell Mol Med* 10(1): 132-144.
- Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C. 1991. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*. 64(3):615-23.
- Robzyk K, Recht J, Osley MA. 2000. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* 287(5452): 501-504.
- Rodriguez MS, Dargemont C, Hay RT. 2001. SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* 276(16): 12654-12659.
- Roe T, Reynolds TC, Yu G, Brown PO. 1993. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J* 12(5): 2099-2108.
- Romero-Santacreu L, Moreno J, Perez-Ortin JE, Alepuz P. 2009. Specific and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 15(6): 1110-1120.
- Rosado IV, de la Cruz J. 2004. Npa1p is an essential trans-acting factor required for an early step in the assembly of 60S ribosomal subEinheiten in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 10(7): 1073-1083.
- Rosonina E, Duncan SM, Manley JL. 2010. SUMO functions in constitutive transcription and during activation of inducible genes in yeast. *Genes Dev* 24(12): 1242-1252.
- Rothenbusch U, Sawatzki M, Chang Y, Caesar S, Schlenstedt G. 2012. Sumoylation regulates Kap114-mediated nuclear transport. *EMBO J* 31(11): 2461-2472.
- Röther S, Burkert C, Brünger KM, Mayer A, Kieser A, Strässer K. 2010. Nucleocytoplasmic shuttling of the La motif-containing protein Sro9 might link its nuclear and cytoplasmic functions. *RNA*. 16(7):1393-401.
- Rout MP, Blobel G. 1993. Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol* 123(4): 771-783.
- Rout MP, Aitchison JD, Suprapto A, Hjertaas K, Zhao Y, Chait BT. 2000. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* 148(4): 635-651.
- Rout MP, Aitchison JD, Magnasco MO, Chait BT. 2003. Virtual gating and nuclear transport: the hole picture. *Trends Cell Biol* 13(12): 622-628.

- Ruiz-Roig C, Noriega N, Duch A, Posas F, de Nadal E. 2012. The Hog1 SAPK controls the Rtg1/Rtg3 transcriptional complex activity by multiple regulatory mechanisms. *Mol Biol Cell* 23(21): 4286-4296.
- Saito H, Posas F. 2012. Response to hyperosmotic stress. *Genetics* 192(2): 289-318.
- Saitoh H, Hinchev J. 2000. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* 275(9): 6252-6258.
- Schlenstedt G, Wong DH, Koepp DM, Silver PA. 1995. Mutants in a yeast Ran binding protein are defective in nuclear transport. *EMBO J* 14(21): 5367-5378.
- Schmid M, Arib G, Laemmli C, Nishikawa J, Durussel T, Laemmli UK. 2006. Nup-PI: the nucleopore-promoter interaction of genes in yeast. *Mol Cell*. 21(3):379-91.
- Schwarz SE, Matuschewski K, Liakopoulos D, Scheffner M, 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): 560-564.
- Schwienhorst I., Johnson E. S. und Dohmen R. J. 2000. Sumo Conjugation and Deconjugation. *Mol Gen Genet* 263(5): 771-786.
- Segerstolpe A, Lundkvist P, Osheim YN, Beyer AL, Wieslander L. 2008. Mrd1p binds to pre-rRNA early during transcription independent of U3 snoRNA and is required for compaction of the pre-rRNA into small subunit processomes. *Nucleic Acids Res* 36(13): 4364-4380.
- Shen X, Mizuguchi G, Hamiche A, Wu C. 2000. A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* 406(6795): 541-544.
- Shimizu K, Kawasaki Y, Hiraga S, Tawaramoto M, Nakashima N, Sugino A. 2002. The fifth essential DNA polymerase phi in *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the nucleolus and plays an important role in synthesis of rRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(14): 9133-9138.
- Shrivastava V, Pekar M, Grosser E, Im J, Vigodner M. 2010. SUMO proteins are involved in the stress response during spermatogenesis and are localized to DNA double-strand breaks in germ cells. *Reproduction* 139(6): 999-1010.
- Smitherman M, Lee K, Swanger J, Kapur R, Clurman BE. 2000. Characterization and targeted disruption of murine Nup50, a p27(Kip1)-interacting component of the nuclear pore complex. *Mol Cell Biol* 20(15): 5631-5642.
- Smolka MB, Albuquerque CP, Chen SH, Zhou H. 2007. Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(25): 10364-10369.
- Solsbacher J, Maurer P, Bischoff FR, Schlenstedt G. 1998. Cse1p is involved in export of yeast importin alpha from the nucleus. *Mol Cell Biol* 18(11): 6805-6815.
- Solsbacher J, Maurer P, Vogel F, Schlenstedt G. 2000. Nup2p, a yeast nucleoporin, functions in bidirectional transport of importin alpha. *Mol Cell Biol* 20(22): 8468-8479.
- Song J, Durrin LK, Wilkinson TA, Krontiris TG, Chen Y. 2004. Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(40): 14373-14378.

- Sriramachandran AM, Dohmen RJ. 2014. SUMO-targeted ubiquitin ligases. *Biochim Biophys Acta* 1843(1): 75-85.
- Sriramachandran AM, Meyer-Teschendorf K, Pabst S, Ulrich HD, Gehring NH, Hofmann K, Praefcke GJK, Dohmen RJ. 2019. Arkadia/RNF111 is a SUMO-targeted ubiquitin ligase with preference for substrates marked with SUMO1-capped SUMO2/3 chain. *Nat Commun* 10(1): 3678.
- Stade K, Vogel F, Schwienhorst I, Meusser B, Volkwein C, Nentwig B, Dohmen RJ, Sommer T. 2002. A lack of SUMO conjugation affects cNLS-dependent nuclear protein import in yeast. *J Biol Chem* 277(51): 49554-49561.
- Stochaj U, Rassadi R, Chiu J. 2000. Stress-mediated inhibition of the classical nuclear protein import pathway and nuclear accumulation of the small GTPase Gsp1p. *FASEB J* 14(14): 2130-2132.
- Stoffler D, Fahrenkrog B, Aeby U. 1999. The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 11(3): 391-401.
- Strässer K, Hurt E. 2001. Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature* 413(6856): 648-652.
- Strässer K, Masuda S, Mason P, Pfannstiel J, Oppizzi M, Rodriguez-Navarro S, Rondón AG, Aguilera A, Struhl K, Reed R, Hurt E. 2002. TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* 417(6886): 304-308.
- Sun ZW, Allis CD. 2002. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*. 418(6893):104-8.
- Sun H, Levenson JD, Hunter T. 2007. Conserved function of RNF4 family proteins in eukaryotes: targeting a ubiquitin ligase to SUMOylated proteins. *EMBO J* 26(18): 4102-4112.
- Suntharalingam M, Wenthe SR. 2003. Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Dev Cell* 4(6): 775-789.
- Swaney DL, Beltrao P, Starita L, Guo A, Rush J, Fields S, Krogan NJ, Villen J. 2013. Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nat Methods* 10(7): 676-682.
- Sydorsky Y, Srikumar T, Jeram SM, Wheaton S, Vizeacoumar FJ, Makhnevych T, Chong YT, Gingras AC, Raught B. 2010. A novel mechanism for SUMO system control: regulated Ulp1 nucleolar sequestration. *Mol Cell Biol* 30(18): 4452-4462.
- Takahashi Y, Kahyo T, Toh EA, Yasuda H, Kikuchi Y. 2001. Yeast Ull1/Siz1 is a novel SUMO1/Smt3 ligase for septin components and functions as an adaptor between conjugating enzyme and substrates. *J Biol Chem* 276(52): 48973-48977.
- Tarassov K, Messier V, Landry CR, Radinovic S, Serna Molina MM, Shames I, Malitskaya Y, Vogel J, Bussey H, Michnick SW. 2008. An in vivo map of the yeast protein interactome. *Science*. 320(5882):1465-70.
- Tatebayashi K, Yamamoto K, Tanaka K, Tomida T, Maruoka T, Kasukawa E, Saito H. 2006. Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. *EMBO J*. 25(13):3033-44.

- Thomas D, Surdin-Kerjan Y. 1989. Structure of the HOM2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* and regulation of its expression. *Mol Gen Genet.* 217(1):149-54.
- Thomson E, Rappsilber J, Tollervey D. 2007. Nop9 is an RNA binding protein present in pre-40S ribosomes and required for 18S rRNA synthesis in yeast. *RNA* 13(12): 2165-2174.
- Ting YH, Lu TJ, Johnson AW, Shie JT, Chen BR, Kumar SS, Lo KY. 2017. Bcp1 Is the Nuclear Chaperone of Rpl23 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 292(2):585-596.
- Tokunaga F, Sakata S, Saeki Y, Satomi Y, Kirisako T, Kamei K, Nakagawa T, Kato M, Murata S, Yamaoka S, Yamamoto M, Akira S, Takao T, Tanaka K, Iwai K. 2009. Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation. *Nat Cell Biol* 11(2): 123-132.
- Trabalzini L, Paffetti A, Scaloni A, Talamo F, Ferro E, Coratza G, Bovalini L, Lusini P, Martelli P, Santucci A. 2003. Proteomic response to physiological fermentation stresses in a wild-type wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 370(Pt 1): 35-46.
- Ubersax JA, Woodbury EL, Quang PN, Paraz M, Blethrow JD, Shah K, Shokat KM, Morgan DO. 2003. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* 425(6960): 859-864.
- Ulrich HD. 2008. The fast-growing business of SUMO chains. *Mol Cell* 32(3): 301-305.
- Ulbrich C, Diepholz M, Bassler J, Kressler D, Pertschy B, Galani K, Böttcher B, Hurt E. 2009. Mechanochemical removal of ribosome biogenesis factors from nascent 60S ribosomal subEinheiten. *Cell* 138(5):911-22
- Uzunova K, Götsche K, Miteva M, Weisshaar SR, Glanemann C, Schnellhardt M, Niessen M, Scheel H, Hofmann K, Johnson ES, Praefcke GJ, Dohmen RJ. 2007. Ubiquitin-dependent proteolytic control of SUMO conjugates. *J Biol Chem* 282(47): 34167-34175.
- Vasu SK, Forbes DJ. 2001. Nuclear pores and nuclear assembly. *Curr Opin Cell Biol* 13(3): 363-375.
- Wade CH, Umbarger MA, McAlear MA. 2006. The budding yeast rRNA and ribosome biosynthesis (RRB) regulon contains over 200 genes. *Yeast* 23(4): 293-306.
- Wang L, Cao C, Wang F, Zhao J, Li W. 2017. H2B ubiquitination: Conserved molecular mechanism, diverse physiologic functions of the E3 ligase during meiosis. *Nucleus* 8(5): 461-468.
- Wang Z, Prelich G. 2009. Quality control of a transcriptional regulator by SUMO-targeted degradation. *Mol Cell Biol* 29(7): 1694-1706.
- Wasik U und Filipek A. 2014. Non-Nuclear Function of Sumoylated Proteins. *Biochim Biophys Acta* 1843(12): 2878-2885.
- Weaver PL, Sun C, Chang TH. 1997. Dbp3p, a putative RNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for efficient pre-rRNA processing predominantly at site A3. *Mol Cell Biol* 17(3): 1354-1365.
- Weinberg JB, Matthews TJ, Cullen BR, Malim MH. 1991. Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. *J Exp Med* 174(6) 1477-1482.
- Westfall PJ, Thorner J. 2006. Analysis of mitogen-activated protein kinase signaling specificity in response to hyperosmotic stress: use of an analog-sensitive HOG1 allele. *Eukaryot Cell* 5(8): 1215-1228.

- Wilkins MR, Gasteiger E, Gooley AA, Herbert BR, Molloy MP, Binz PA, Ou K, Sanchez JC, Bairoch A, Williams KL, Hochstrasser DF. 1999. High-throughput mass spectrometric discovery of protein post-translational modifications. *J Mol Biol* 289(3): 645-657.
- Wohlschlegel JA, Johnson ES, Reed SI, Yates JR, 3rd. 2004. Global analysis of protein sumoylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279(44): 45662-45668.
- Wood A, Krogan NJ, Dover J, Schneider J, Heidt J, Boateng MA, Dean K, Golshani A, Zhang Y, Greenblatt JF, Johnston M, Shilatifard A. 2003. Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol Cell* 11(1): 267-274.
- Woods RA, Roberts DG, Stein DS, Filpula D. 1984. Adenine phosphoribosyltransferase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol.* 130(10):2629-37.
- Woolford JL, Jr., Baserga SJ. 2013. Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 195(3): 643-681.
- Xiao W. 2006. *Yeast Protocols, Second Edition*. Totowa, New Jersey, Humana Press Inc.
- Xiao Y, Pollack D, Nieves E, Winchell A, Callaway M, Vigodner M. 2015. Can your protein be sumoylated? A quick summary and important tips to study SUMO-modified proteins. *Anal Biochem* 477: 95-97.
- Xue Y, Zhou F, Fu C, Xu Y, Yao X. 2006. SUMOsp: a web server for sumoylation site prediction. *Nucleic Acids Res* 34: W254-257.
- Yamashita K, Shinohara M, Shinohara A. 2004. Rad6-Bre1-mediated histone H2B ubiquitylation modulates the formation of double-strand breaks during meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(31): 11380-11385.
- Yang L, Mullen JR, Brill SJ. 2006. Purification of the yeast Slx5-Slx8 protein complex and characterization of its DNA-binding activity. *Nucleic Acids Res* 34(19): 5541-5551.
- Yang Q, Rout MP, Akey CW. 1998. Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol Cell* 1(2): 223-234.
- Zemp I, Kutay U. 2007. Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subEinheiten. *FEBS Lett* 581(15): 2783-2793.
- Zhang W, Yeung CHL, Wu L, Yuen KKY. 2017. E3 ubiquitin ligase Bre1 couples sister chromatid cohesion establishment to DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Elife*. 6. pii: e28231.
- Zhao X, Blobel G. 2005. A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(13): 4777-4782.
- Zhao X, Wu CY, Blobel G. 2004. Mlp-dependent anchorage and stabilization of a desumoylating enzyme is required to prevent clonal lethality. *J Cell Biol* 167(4): 605-611.
- Zhou W, Ryan JJ, Zhou H. 2004. Global analyses of sumoylated proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Induction of protein sumoylation by cellular stresses. *J Biol Chem* 279(31): 32262-32268.

## 7. Publikationen

Folz H, Nino CA, Taranum S, Caesar S, Latta L, Waharte F, Salamero J, Schlenstedt G, Dargemont C. 2019. SUMOylation of the nuclear pore complex basket is involved in sensing cellular stresses. *J Cell Sci.* 132(7). pii: jcs224279. doi: 10.1242/jcs.224279.

## 8. Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Gabriel Schlenstedt, der mich zu meiner Doktorarbeit motiviert hat und mir die Möglichkeit gab an diesem interessanten Thema zu arbeiten. Ich danke ihm für die kompetente persönliche und fachliche Betreuung sowie für das Vertrauen, mich meine wissenschaftlichen Ideen frei umsetzen zu lassen und für die wissenschaftlichen Diskussionen, welche zu neuen interessanten Versuchsansätzen führten.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Claudia Fecher-Trost danke ich für die massenspektrometrische Analyse meiner Co-Immunopräzipitationsproben und Prof. Dr. Martin Jung für die Herstellung von Antikörpern und Peptiden. Zudem möchte ich mich bei allen Arbeitsgruppen aus unserem *Department Seminar* bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Stefanie Caesar, die stets ein Auge auf alles hatte, sowie eine helfende Hand und mich bei all meinen neuen Ideen mit produktiven Diskussionen unterstützte und letztendlich auch diese Arbeit Korrektur gelesen und so manches Komma auf Abwegen wieder auf den rechten Platz gebracht hat.

Meiner Arbeitsgruppe, und der AG Zimmermann inklusive der ehemaligen Mitglieder danke ich für viele unterstützende Worte, erfrischende Diskussionen und die tolle Arbeitsatmosphäre, die einen jeden Tag mit Freude auf die Arbeit kommen ließ. Ich möchte mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen bedanken, die dafür sorgen, dass der Laden läuft, egal ob es um Reparaturen wichtiger Geräte oder aber auch um die Bereitstellung von Materialien und Geräten sowie fachliche Kompetenz und menschliche Unterstützung geht.

Ganz herzlich möchte ich Dr. Julia Gartmann, trotz ihrer versehentlichen Sabotageversuche, für ihre Freundschaft und die vielen Tassen Kaffee danken, die nach den endlosen Mikroskopiersessions und SUMOylierungsversuchen dringend notwendig waren. Meinem Office Team danke ich für jeglichen Support sowie lustige Momente, die die Stimmung nach so manch missglücktem Experiment wieder hoben.

Von tiefstem Herzen bedanke ich mich bei den für mich wohl wichtigsten Menschen, meiner Mama Marika und meiner leider verstorbenen Oma Christine, die mich stets unterstützt und an mich geglaubt haben und ohne die all das nicht möglich gewesen wäre. Danke an meinen Freund Dominik, der wohl meine größte Stütze ist und mich mit seiner positiven und liebevollen Art immer wieder zu Höchstleistungen treibt. Und letztendlich auch ein Dank an meine Freunde, die mich während der ganzen Doktorarbeit begleitet haben und mir gerade in der Schreibphase viel Verständnis entgegengebracht und mich in den wenigen freien Minuten erfolgreich abgelenkt haben.