

# **Die Integration des MycBP2 in den Ran-GTPase Zyklus**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main



Von

**Angela Dörr**

Aus Rockenhausen

Frankfurt am Main 2014

(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie, Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. Rolf Marschalek

Prof. Dr. Klaus Scholich

Datum der Disputation:

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Das Myc-binding Protein 2 .....	1
1.2. Die RCC1 Superfamilie .....	8
1.3. RCC1 und sein Effektor Ran .....	10
1.4. Zielsetzung der Arbeit .....	20
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
2.1. Chemikalien .....	21
2.2. Antikörper .....	21
2.3. Puffer und Stammlösungen .....	22
2.4. Versuchstiere .....	24
2.5. Methoden .....	25
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>50</b>
3.1. Validierung der Ergebnisse des Antikörperarrayassays .....	50
3.2. Identifikation des 85 kDa-Proteins .....	52
3.3. Interaktion von RanGAP1 mit MycBP2 .....	53
3.4. Funktionelle Interaktion des MycBP2 mit RanGAP1 .....	58
3.5. Mechanistische Interaktion von MycBP2 mit Ran .....	73
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>85</b>
4.1. Interaktion mit SUMOyliertem RanGAP1 .....	86
4.2. Interaktion mit Ran .....	89
4.3. Die duale Funktion des MycBP2 .....	91
4.4. Physiologische Funktion der Ran/MycBP2-Interaktion .....	95
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>97</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>97</b>
<b>7. Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>8. Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>

<b>9. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>10. Anhang .....</b>	<b>XVII</b>
10.1. Danksagung .....	XVII
10.2. Veröffentlichungen.....	XVIII
10.3. Lebenslauf .....	XIX

## 1. Einleitung

In Deutschland leiden übergreifend über alle Altersgruppen, etwa vier Millionen Menschen an chronischen Schmerzen. Da chronische Schmerzen den Alltag eines jeden betroffenen Menschen stark einschränken, aber die Möglichkeiten zur Linderung nur auf bestimmte Schmerzformen begrenzt sind, rückt die Schmerzforschung immer weiter in den Fokus der modernen Forschung. Vor allem der Entstehungsprozess chronischer Schmerzen soll auf zellulärer Ebene geklärt werden, um neue Möglichkeiten zur Behandlung zu finden. Dabei ist es wichtig die Funktionsweisen der involvierten Proteine zu analysieren und so neue therapeutische Angriffspunkte zu schaffen. Eines dieser Proteine, die möglicherweise bei der Schmerzentwicklung eine Rolle spielen, ist das *Myc-binding Protein 2* (MycBP2). Bisher ist bekannt, dass MycBP2 das neuronale Wachstum, die Synaptogenese und die Synapsenstärke reguliert [1-5]. Im Rahmen dieser Arbeit soll MycBP2 nun weiter charakterisiert und seine Funktion identifiziert werden.

### 1.1. Das Myc-binding Protein 2

Das *Myc-binding Protein 2*, kurz MycBP2, ist mit einer molekularen Masse von 510 kDa eines der größten Proteine des Säugetiergenoms. Es wurde ursprünglich 1998 durch seine Interaktion mit dem Protoonkogen cMyc von Guo et al. identifiziert und bildet zusammen mit seinen Orthologen, Phr1 aus *mus musculus*, RPM-1 aus *C.elegans*, Highwire (Hiw) aus *D.melanogaster* und Esrom aus *D. rerio*, die Familie der PHR-Proteine [6]. Charakteristisch sind für die PHR-Proteine die nach ihnen benannten *PHR (PAM-Highwire-RPM-1)-repeats* innerhalb ihrer Aminosäuresequenz, deren genaue Funktion aber noch nicht bekannt ist.

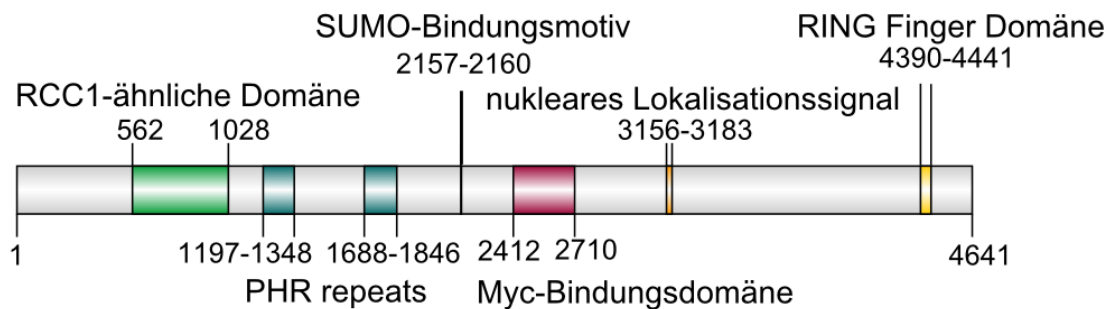
Tabelle 1: Mitglieder der PHR-Protein-Familie

Name	PAM	Highwire	RPM-1	Phr1	Esrom
Spezies	Homo sapiens	D.melanogaster	C.elegans	Mus musculus	D.rerio
Jahr	1998	2000	2000	2004	2005
Referenz	Guo [6]	Wan [4]	Zhen, Schäfer [3, 5]	Burgess [7]	D'Souza [8]

#### 1.1.1. Die Struktur des MycBP2 und seine physiologischen Funktionen

Die Aminosäuresequenz des MycBP2 besitzt mehrere hochkonservierte Domänen mit z.T. enzymatischer Aktivität, die eine Vielzahl an Wechselwirkungen mit anderen Proteinen ermöglichen. Bisher konnten eine *Really Interesting New Gene*-Finger (RING-Finger) Domäne mit einer B-box, ein nukleares Lokalisationssignal (NLS), ein

SUMO-Bindungsmotiv (SBM), eine Myc-Bindungsdomäne, zwei *PHR repeats* und eine RCC1-ähnliche Domäne (RLD) identifiziert werden.



**Abbildung 1: Funktionelle Domänen des MycBP2**

Schematische Darstellung des MycBP2 mit seinen bekannten funktionellen Domänen und deren Lokalisation innerhalb der Aminosäuresequenz.

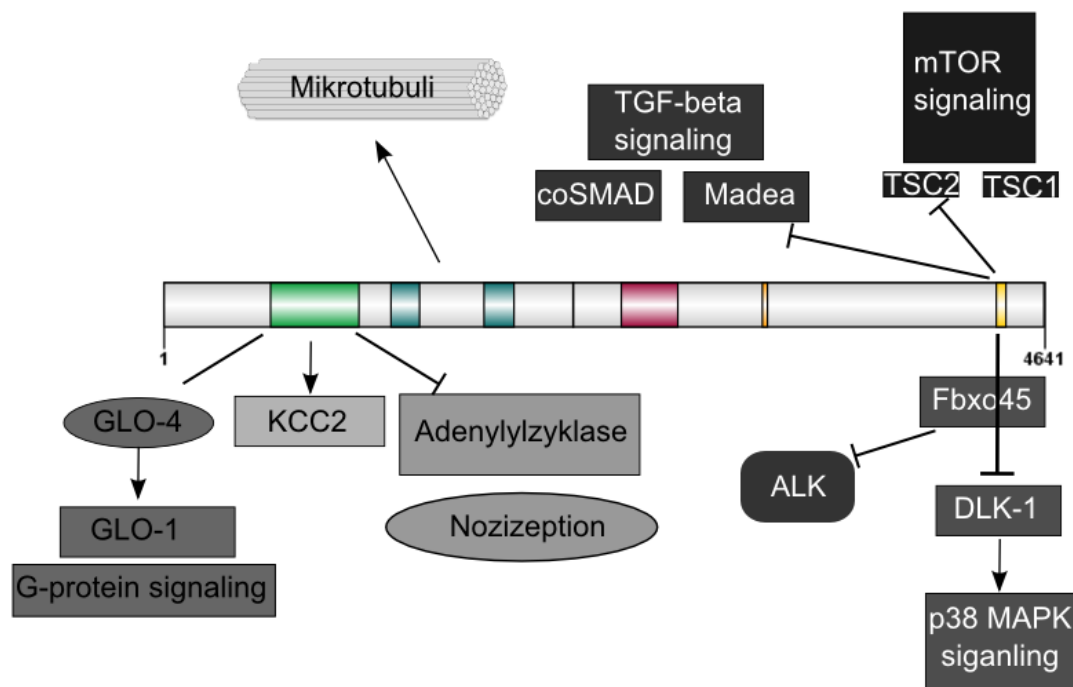
Bei der C-terminal lokalisierten RING-Finger Domäne handelt es sich um eine Proteinstrukturdomäne des Zink-Finger-Typs mit einem Cys<sub>3</sub>HisCys<sub>4</sub>-Motiv [9]. Potuschak konnte erstmals 1998 RING-Finger Domänen mit einer Ubiquitinligase-aktivität in Verbindung bringen [10]. Später konnte dann gezeigt werden, dass diese Domänen die enzymatisch aktiven Bereiche in E3-RING-Ubiquitinligasen darstellen und den letzten Schritt der Ubiquitylierung von Substraten zur Markierung für die proteosomale Degradation katalysieren [11]. Der Nachweis, dass es sich auch bei MycBP2 um eine E3-Ubiquitin-Ligase handelt, gelang 2008 [12].

Für die mittig gelegenen funktionellen Domänen des MycBP2 konnten bisher noch keine enzymatischen Aktivitäten nachgewiesen werden. Die Myc-Bindungsdomäne vermittelt die Bindung an Fbxo45, ein F-box Protein, das Bestandteil von *Skp*, *Cullin*, *F-box* (SCF)-containing complexes, einem Multi-Protein E3-Ubiquitinligase-Komplex ist und dabei als Zielerkennungsmodul fungiert [13]. Die *PHR repeats* steuern den Transport und die Lokalisation von RPM-1 innerhalb von Neuronen [14]. Nukleare Lokalisationssignale beeinflussen im allgemeinen die Lokalisation von Proteinen und können durch Bindung an Importin  $\alpha$  den Transport in den Zellkern vermitteln [15]. Da MycBP2 auch im Kern vorliegt, könnte der Transport über dieses Motiv reguliert werden. Das SUMO-Bindungsmotiv dient generell der nicht-kovalenten Bindung eines *Small Ubiquitin-related modifier* (SUMO)-modifizierten Proteins, wobei SUMO als Adaptermolekül fungiert. Bei kovalenter Bindung von SUMO an ein Protein spricht man von einer SUMOylierung, die als posttranslationale Modifikation gilt und in mehrere zelluläre Prozesse, wie den nukleocytoplasmatischen Transport, involviert ist [16]. Es wäre also möglich, dass MycBP2 über dieses Motiv an SUMOylierte Proteine bindet.

N-Terminal liegt eine RCC1-ähnliche Domäne. Sie ist neben dem RING-Finger die am stärksten konservierte Domäne. Strukturell gleicht sie dem namensgebenden Guanosin Austauschfaktor (GEF) *regulator of chromosome condensation 1* (RCC1), der den Austausch des Guanin-Nukleotid GDP gegen GTP an Ran katalysiert. Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeit wurde seit der Entdeckung eine GEF-Aktivität für diese Domäne postuliert, die aber bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte [6, 17]. Auch für MycBP2 und sein Ortholog Rpm-1 gibt es Indizien für eine GEF-Aktivität [5, 18]. Im Gegensatz dazu konnte aber belegt werden, dass die RCC1-ähnliche Domäne an Protein-Protein-Interaktionen partizipiert und so die Hemmung der Adenylylzyklase vermittelt, sowie den Ionenporter Kalium-Chlorid-Cotransporter 2 (KCC2) reguliert [19-21].

### Physiologische Aufgaben von MycBP2

Die modulare Architektur der PHR-Proteine ermöglicht ihnen eine Vielzahl an direkten und indirekten Interaktionen mit anderen Proteinen, wodurch diverse physiologische Funktionen beeinflusst werden. Bisher wurden überwiegend neuronale Funktionen erforscht, wodurch gezeigt werden konnte, dass die MycBP2-Orthologe das neuronale Wachstum, die Synaptogenese und die neuronale Plastizität regulieren.



**Abbildung 2: Neuronale Funktionen der MycBP2-Orthologe**

Schematische Darstellung des MycBP2 und seiner funktionellen Domänen einschließlich der bereits bekannten Interaktionspartner und die involvierten Signalwege, modifiziert nach Po et al [22].



Betrachtet man das Expressionsmuster der MycBP2-Orthologe, sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene, dann fällt die Korrelation zwischen Expression und neuronaler Entwicklung auf.

PHR Proteine werden sowohl im sich entwickelnden als auch im adulten Nervensystem exprimiert. Während die Expression von Hiw und RPM-1 lokal beschränkt ist [4, 5, 23], können geringe mRNA Mengen der Vertebratorthologen in adulten Organismen fast ubiquitär nachgewiesen werden, wobei die Expressionsrate mit dem Entwicklungsstadium des Organismus variiert [7, 8, 24]. Die Expression der mRNA des Rattenorthologs setzt kurz nach der Geburt ein, mit besonders hohen Raten in Hippocampus, Cerebellum und Thymus, aber auch in den Blutplättchen. Danach steigt sie weiter an und erreicht innerhalb der ersten zwei postnatalen Wochen einen Plateauwert, der bis ins Erwachsenenalter stabil bleibt. Da es sich bei dieser Zeitspanne um die Phase der stärksten Synapsenbildung handelt, scheint dieses Expressionsmuster mit dem neuronalen Wachstum und daher mit erhöhten Replikationsraten und verstärkter Ausbildung von Neuriten und Synapsen zu korrelieren [6, 24, 25]. Im Rückenmark fällt die Expression nach der Geburt dagegen auf einen niedrigeren Plateauwert ab, bleibt dann aber auch stabil [25]. Auf Proteinebene wird MycBP2, aber auch Phr1 und Esrom, vor allem in Axon und Soma von Neuronen des Rückenmarks und der Dorsalwurzelganglien gebildet, wobei in einigen Geweben Splicevarianten auftreten, die auch mit dem Entwicklungsstadium variieren und die Affinität für Bindungspartner, wie cMyc, beeinflussen [7, 8, 25, 26].

Auf nicht-neuronaler Ebene regulieren PHR-Orthologe u.a. keimbahnspezifische Vorgänge. MycBP2 mRNA bindet an das Protein *deleted in azoospermia like* (DAZL) und beeinflusst so die Spermatogenese [27, 28]. Auch ist MycBP2 und sein Ortholog Esrom in den Pteridin-Stoffwechsel involviert. In *D. rerio* führt eine nicht funktionelle Esrom-Mutation durch Störungen in der Pteridin-Synthese zur fehlenden Pigmentierung von Retikulozyten und auf neuronaler Ebene zu einer gestörten Tetrahydrobiopterin (BH4)-Synthese in neuronalen Vorläuferzellen [29].

Erste Studien zu weiteren neuronalen Funktion der PHR-Proteine wurden in *C. elegans* und *D. melanogaster* durchgeführt. Dabei wurde anhand von genetischen Screens für anormale Axon- und Synapsenmorphologie gezeigt, dass es sich bei RPM-1 und Hiw um Regulatoren der Synapsenentwicklung handelt, deren genetische Deletion zu gesteigertem Längenwachstum und Dendritenverzweigung mit eingeschränkter Funktionalität der gebildeten Synapsen resultiert [2-5]. Des Weiteren ist RPM-1 ein negativer Regulator der Axonregeneration [30]. MycBP2, Esrom und Phr-1 scheinen ihre vorherrschende Funktion dagegen in Axonnavigation und –

wachstum während der frühen embryonalen Entwicklung auszuführen [7, 8, 31]. Die Mausmutante *Magellan*, die auf Grund eines frühzeitigen Stopcodons im PHR-1-Gen nicht-funktionelles PHR-1 exprimiert, zeigt Defekte in den Motoneuronen von Mausembryonen. Dies beruht auf einer aberranten Mikrotubuli-Dynamik in sich entwickelnden Axonen, die die räumliche Entwicklung der Wachstumskegel beeinträchtigt [32]. Ähnliche Defekte konnten auch in kortikalen Neuronen und für *Esrom*-Mutanten gezeigt werden [33, 34]. Außerdem führt eine chromosomale *Phr1*-Deletion in Mäusen zu einem postnatal letalen Effekt, da durch verstärktes Neuritenwachstum die Nervenendigungen fehlerhaft gebildet werden, was zu einer fehlerhaften Innervierung der Lunge führt [7, 33].

Mechanistisch sind diese Effekte zum Teil auf die Hemmung des p38 MAPK Signalwegs zurückzuführen. Über seine RING-Finger-Domäne ist MycBP2 dazu in der Lage die *mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase kinase (MAPKKK)* DLK-1 zu ubiquitinieren und damit deren proteosomalen Abbau auszulösen. DLK-1 wiederum steuert z.B. nach einer Nervläsion die Formation, Morphologie und das Verhalten von axonalen Wachstumskegeln und somit die Axonregeneration. [30, 35, 36]. Ein ähnlicher Phänotyp kann nach Deletion des PHR-Bindeproteins *Fbxo45* in Mäusen gefunden werden, was darauf hindeutet, dass eine von beiden Proteinen regulierte Ubiquitylierung das Neuritenwachstum und die Synaptogenese beeinflusst [13]. Aber nicht alle Fehlfunktionen können auf eine DLK-Ubiquitylierung zurückgeführt werden. So konnte z.B. ein Doppelknockout von *Phr1* und *DLK* die Axondefekte nicht verhindern [13, 33]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die PHR-Proteine noch weitere Signaltransduktionswege regulieren.

Ein weiterer Signaltransduktionsweg, der durch MycBP2 beeinflusst wird, ist die mTOR-Signalkaskade, die u.a. die neuronale Entwicklung und damit Axonwachstum, Dendritenentwicklung, Morphogenese von dendritischen Dornfortsätzen und die synaptische Plastizität steuert. Das *mammalian target of Rapamycin (mTOR)* ist eine hochkonservierte Serin/Threonin-Kinase, die in zwei verschiedenen Komplexen vorliegen kann, mTORC1 und mTORC2. Bisher wurde nur die Interaktion von MycBP2 mit mTORC1 untersucht. Unter physiologischen Bedingungen wird der mTORC1-Signaltransduktionsweg durch den heterodimeren TSC1/TSC2 Komplex (*Tuberous Sklerosis Complex*) gehemmt. Nach seiner Dissoziation, induziert TSC2 über seine GTPase aktivierende Funktion (GAP) die Spaltung von GTP durch das G-Protein Rheb und induziert damit die Inaktivierung von Rheb. Da GTP-gebundenes Rheb mTOR aktiviert, GDP-gebundenes Rheb aber nicht, hemmt TSC2 so den mTOR Signalweg. Nach Dissoziation des TSC1/TSC2-Komplexes kann TSC2 durch

MycBP2 polyubiquitiniert und dem entsprechend proteosomal degradiert werden. Dadurch bleibt Rheb in seiner aktiven GTP-gebundenen Form und kann die mTORC1 Signalkaskade aktivieren [18, 37].

Außerdem ist der MycBP2-Ortholog Hiw in den *bone morphogenetic protein* (BMP)-Signaltransduktionsweg integriert. Über seine RING Finger Domäne bindet Hiw Medea, eine coSMAD, was über Nemo und Mad Änderungen in der Signaltransduktion verursacht und daher in Hiw Mutanten zu übersteigertem Synapsenwachstum führt [38, 39].

Die antinozizeptive Wirkung des MycBP2 wird dagegen auf eine direkte Proteininteraktion zwischen der RCC1-ähnlichen Domäne des MycBP2 und dem katalytisch aktiven Bereich der Adenylylzyklase zurückgeführt [19, 21], worauf im nächsten Kapitel näher eingegangen werden soll.

### 1.1.2. Die RCC1 ähnliche Domäne des MycBP2

Obwohl die RCC1-ähnliche Domäne neben der RING-Finger Domäne die am stärksten konservierte funktionelle Einheit ist, ist über die von ihr abhängigen Funktionen des MycBP2 wenig bekannt, daher soll der Fokus dieser Arbeit auf diesem Bereich liegen.

Die *Regulator of chromosome condensation 1* (RCC1)-ähnliche Domäne des MycBP2 wurde bereits bei der Entdeckung von MycBP2 identifiziert. Sie wird durch die Aminosäuren 498 – 1065 gebildet und weist eine strukturelle Homologie zum *Regulator of chromosome condensation 1* (RCC1) auf. Wie RCC1 besteht die RCC1-ähnliche Domäne aus sieben Wiederholungen, die einen siebenblättrigen Propeller bilden [6]. Eine weitere strukturelle Ähnlichkeit, aber keine Aminosäurehomologie, besteht außerdem zur  $\beta$ -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine, deren sieben WD-Wiederholungen auch einen  $\beta$ -Propeller bilden [40].

Bisher konnten der RCC1-ähnlichen Domäne drei Funktionen zugeordnet werden, die alle auf direkten Protein-Protein-Interaktionen beruhen.

#### Hemmung der Adenylylzyklase

Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Bindung der RCC1-ähnlichen Domäne an das katalytisch aktive Zentrum der Adenylylzyklase zu deren Hemmung führt und so die cAMP-Synthese in HeLa-Zellen, im Rückenmark und in den Spinalganglien von Mäusen und Ratten hemmt [19, 21, 41]. Dadurch ist MycBP2 in eine Vielzahl an zellulären und physiologischen Prozessen involviert und moduliert zum Beispiel die

synaptische Aktivität von Neuronen, da die Hemmung der Adenylylzyklase über geringere Mengen des sekundären Botenstoffs cAMP und verminderte Aktivität der PKA zu einer geringeren Erregbarkeit bzw. zur Erhöhung der Reizschwelle von Neuronen führen kann [33, 42]. Auf physiologischer Ebene wurde beobachtet, dass Schmerzreize oder Entzündungen im Rückenmark von adulten Ratten zu einer gesteigerten Expression der MycBP2 mRNA in nozizeptiven Neuronen führen [25]. Wird nun die MycBP2 Expression mittels Antisense Oligonukleotiden verringert, kommt es zu einer Steigerung des nozizeptiven Verhaltens, woraus man auf antinozizeptive Eigenschaften von MycBP2 schließen kann [25]. Von besonderer Bedeutung ist die MycBP2-induzierte Adenylylzyklase-Hemmung außerdem, weil sie die Zeitspanne zwischen kurzfristiger enzymatischer oder Calcium-induzierter Hemmung und der erst nach Stunden einsetzenden transkriptionalen Hemmung überbrückt. S1P-induziert, transloziert MycBP2 etwa 10 Minuten nach dem Stimulus an die Plasmamembran von HeLa-Zellen, wo es an die Adenylylzyklase bindet und diese hemmt [21, 41].

### **Regulation des KCC2**

Eine weitere Funktion der RCC1-ähnlichen Domäne des MycBP2 ist die Regulation des neuronenspezifischen elektroneutralen Kalium- und Chlorid-Ionen Co-Transporters KCC2, der einen Schlüsselregulator der neuronalen Chloridkonzentration darstellt. KCC2 wird überwiegend in der Membran von Somata und Dendriten exprimiert und kann dadurch einen extra/intrazellulären elektrochemischen Chloridionengradienten etablieren, der für die postsynaptische Hemmung verantwortlich ist, wobei KCC2 den durch  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpen generierten Kaliumionengradienten nutzt, um die Chloridionenextrusion zu regulieren [43-48]. Die so generierten niedrigen intrazellulären Chloridkonzentrationen sind entscheidend für die klassische postsynaptische Hemmung durch ionotrope  $\text{GABA}_A$  und Glycin-Rezeptoren [46, 49, 50]. Ein Verlust der KCC2-Aktivität führt daher zum Verlust der hemmenden Regulation und damit zur Entwicklung einer neuronalen Übererregbarkeit [47]. Des Weiteren schützt KCC2 neuronale Netzwerke vor stimulationsinduzierter Excitotoxizität und stellt einen Modulator der Neuroplastizität dar [43, 51-53].

Auf physiologischer Ebene zeigte sich, dass sowohl MycBP2 als auch KCC2 während der postnatalen Entwicklung gleichermaßen hochreguliert sind, vor allem im Nagetierhirn und dort in Pyramidalzellen des Hippocampus und Granularzellen des Gyrus Dentatus und des Cerebellums. Außerdem sind beide Proteine in nozizeptive Prozesse involviert und eine Deletion in Nagetieren führt zu ähnlichen Phänotypen

mit Atemwegsfehlbildungen und zum Tode nach der Geburt [3-5, 8, 24, 25]. Eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen KCC2 und MycBP2 wurde dann mit Hilfe eines 2-Hybrid-Yeast-Screens belegt. Auf dieser Grundlage wurde bewiesen, dass diese Interaktion auf eine Wechselwirkung der RCC1-ähnlichen Domäne des MycBP2 mit dem C-Terminus von KCC2 zurückzuführen ist. Bindet MycBP2 oder seine RCC1-ähnliche Domäne an membranständiges KCC2 führt dies zu einer Konformationsänderung im KCC2 und resultiert in einer verstärkten Co-Transporteraktivität. Außerdem führt eine Coexpression von MycBP2 bzw. seiner RCC1-ähnlichen Domäne in KCC2-transfizierten Zellen zu einer erhöhten Kaliumionenaufnahme [20].

### **Interaktion mit kleinen GTPasen**

Erste Indizien, dass die RCC1-ähnliche Domäne des MycBP2 eine GEF-Funktion vermitteln oder zumindest die GEF-Aktivität anderer Proteine modulieren könnte, zeigen sich durch die Interaktionen des MycBP2 mit GLO-4 und mit dem *Ras homolog enriched in brain* (Rheb) [18, 54].

Bei GLO-4 handelt es sich um den GEF für die kleine GTPase GLO-1, ein Mitglied der Rab (*Ras-related in brain*)-Proteinfamilie aus *C.elegans*, der auch eine RCC1-ähnliche Domäne beinhaltet und dessen Aktivität durch RPM-1 reguliert wird. Durch Modifikation des endosomalen Transports kann RPM-1 über diesen GLO-Signalweg die Axontermination und die Synaptogenese in *C.elegans* regulieren und arbeitet damit parallel zum RPM-1/DLK-1-Signalweg. Grill et al postulieren, dass RPM-1 und GLO-4 gemeinsam als GEF für GLO-1 in Neuronen wirken und dass die lokale Regulation des GLO-Signalwegs durch RPM-1 zur Rekrutierung von AP-3 an spezifische vesikuläre Kompartimente in Neuronen führt, wodurch die Axontermination gesteuert wird [54].

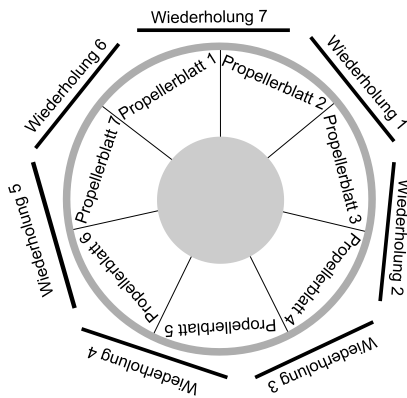
Auch in der mTOR-gesteuerten Signalkaskade spielt die mögliche GEF-Aktivität des MycBP2 eine Rolle. Neben der bisher beschriebenen Regulation dieses Signalwegs über die Ubiquitylierung und den proteosomalen Abbau des TSC2, wurde neuerdings postuliert, dass die S1P induzierte mTOR-Aktivierung über MycBP2 und Rheb vermittelt wird, indem MycBP2 den Nukleotidaustausch für Rheb reguliert und so aktiviert [18].

## **1.2. Die RCC1 Superfamilie**

Auf Grund seiner RCC1-ähnlichen Domäne wird MycBP2 der RCC1-Superfamilie zugeordnet. Diese charakterisiert sich durch die 350 – 500 As lange RCC1-ähnliche Domäne, die alle Orthologe besitzen. Sie wurde mit ihrem ersten Mitglied, dem

namensgebenden RCC1 1987 entdeckt [55] und konnte bisher in vielen verschiedenen Spezies, wie Prokaryoten, einzelligen Eukaryoten, aber auch in Pflanzen, Pilzen und Tieren nachgewiesen werden [56]. Alleine im Menschen sind bisher 18 unterschiedliche Proteine bekannt, die mindestens eine RCC1-ähnliche Domäne beinhalten. Da RCC1-ähnliche Domänen größtenteils in Proteinen mit multiplen funktionellen Domänen vorkommen, vor allem RING-Finger oder HECT-Ubiquitin-Ligasen, erfolgt die Klassifizierung der Superfamilie in fünf Untergruppen über die weiteren funktionellen Gruppen: Bei der ersten Untergruppe handelt es sich um Proteine, bei denen die RCC1-ähnliche Domäne fast das gesamte Protein ausmacht, wie RCC1. Die Mitglieder der zweiten Untergruppe werden als HERC-Proteine bezeichnet, da sie sowohl mindestens eine RCC1-ähnliche Domäne als auch eine HECT-Domäne (*Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*) beinhalten. RCBTB-Proteine, also Proteine die sowohl eine RCC1-ähnliche Domäne als auch eine BTB-Domäne (**B**ric-a-brac, **T**ramtrack, and **B**roadComplex) aufweisen, bilden die dritte Untergruppe. In der vierten Gruppe werden RCC1-ähnliche Domänehaltige Kinasen zusammengefasst. Die fünfte Gruppe vereint alle RCC1-ähnliche Domänehaltigen Proteine, die keine strukturellen Ähnlichkeiten mit einer der vier anderen Gruppen aufweisen, wozu auch MycBP2 zählt [17].

Strukturell setzt sich die RCC1-Domäne aus sieben 51-68 As langen repetierenden Sequenzen zusammen, wobei eine relative, sequentielle Homologie mit RCC1 besteht, aber nicht jedes Protein alle sieben Wiederholungen in seiner Sequenz trägt. MycBP2 weist nur drei klassische RCC1-Wiederholungen auf, während die anderen vier als *bona fide* RCC1-Wiederholungen bezeichnet werden und strukturell abweichen [57]. Außerdem werden bei MycBP2 die sieben Wiederholungen der RCC1-ähnlichen Domäne im Gegensatz zu RCC1 nach der 4. Wiederholung durch eine 134 AS lange Insertion unterbrochen [6]. Im Raum nehmen die sieben RCC1-Wiederholungen die Struktur eines sieben blättrigen Propellers ein, wobei jedes Blatt aus einem viersträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt besteht. Dabei bildet nicht eine Wiederholung ein  $\beta$ -Faltblatt, sondern die erste Wiederholung bildet den 3. und 4. Strang des ersten Blattes und den 1. und 2. Strang des zweiten Blattes. Da damit die siebte und erste Wiederholung zusammen das erste Blatt bilden, schließt sich der Propeller und es bildet sich eine Art molekulare Klammer [58].



**Abbildung 3: Schematischer Aufbau der Propellerstruktur der RCC1-ähnlichen Domäne**

Die sieben Propellerblätter werden durch  $\beta$ -Faltblätter gebildet, wobei jedes Faltblatt aus zwei Strängen bestehen, die von verschiedenen Wiederholungen gebildet werden, modifiziert nach Hadjebi et al [17].

Die Funktionen wie auch die subzelluläre Lokalisation der Proteine der RCC1-Superfamilie sind weit gefächert. Funktional am besten charakterisiert ist RCC1, dessen Aufgabe innerhalb des nukleocytoplasmatischen Transports und während der Bildung der mitotischen Spindel aber auch der Kernmembran bekannt ist, worauf später noch ausführlicher eingegangen werden soll [59-65]. Tendenziell zeigt sich eine Beteiligung an der Chromosomenregulation, der Mikrotubulimodulation und der Spermatogenese [27, 28, 34, 66-68]. Außerdem partizipieren die RCC1-ähnlichen Domänen auch an der Ligase-Aktivität, falls das Protein eine HECT- oder RING-Finger-Domäne aufweist [69, 70].

### 1.3. RCC1 und sein Effektor Ran

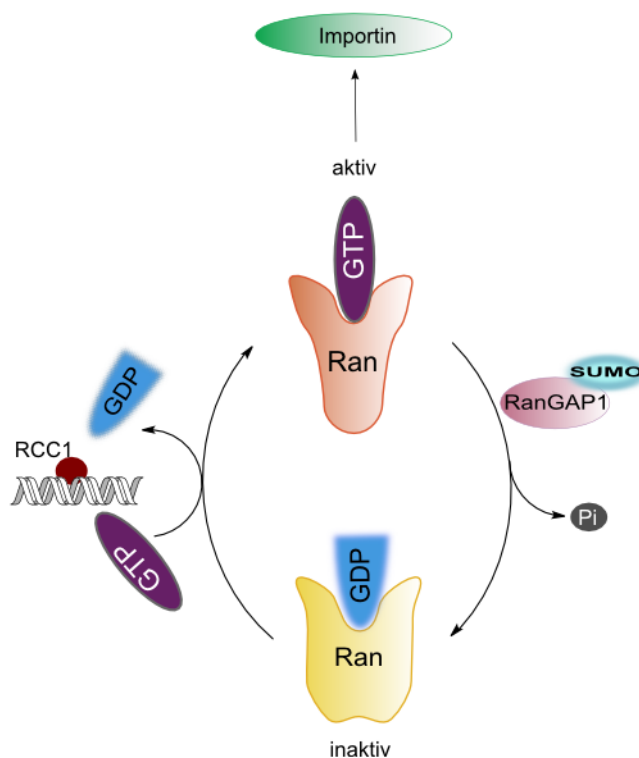
Wie bereits erwähnt handelt es sich bei RCC1 um den GEF der kleinen GTPase **Ras-related nuclear protein** (Ran). Ran gehört der Superfamilie der Ras-GTPasen an, die sich durch die gemeinsame, konservierte G-Domäne auszeichnet, welche für die geringe, aber essentielle intrinsische GTPase und GEF-Aktivität der Ras-Homologe verantwortlich ist. Getrieben durch den daher möglichen alternierenden Wechsel zwischen GTP- und GDP-Bindung, fungieren kleine GTPasen, also auch Ran, als molekularer *switch* und wechseln zwischen aktiver, also GTP-gebundener (RanGTP) und inaktiver, also GDP-gebundener (RanGDP) Form. Eine verstärkte Aktivierung erfolgt dabei über GEFs, während die Inaktivierung über GAPs katalysiert wird.

Ran unterscheidet sich in zwei Punkten von den üblichen Ras-Superfamilie-Proteinen. Zum einen weist die Sequenz von Ran eine saure –DEDDL-Sequenz statt der üblichen Prenylierungsdomäne auf, die in den anderen Ras-GTPasen vorliegt und zu einer posttranslationalen Lipidmodifikationen und so zu einer Rekrutierung der Ras-Proteine an die Zellmembran führt. Daraus resultiert auch der zweite Unterscheid, da Ran hauptsächlich im Nukleus vorliegt [71]. Ran macht 0,4% der zellulären Proteinmenge einer humanen Zelle aus und ist damit eines der häufigsten zellulären Proteine [72], was zusammen mit der stark konservierten Struktur innerhalb verschiedener Spezies auf eine wichtige zelluläre Funktion

schließen lässt. So konnte gezeigt werden, dass Ran den nukleo-cytoplasmatischen bidirektionalen Transport von Proteinen und Ribonukleoproteinen durch den nuklearen Porenkomplex (NPC) während der Interphase reguliert, den Aufbau der mitotischen Spindel während der Mitose steuert und in der Telophase am Wiederaufbau der Kernmembran und der NPCs beteiligt ist [73].

### 1.3.1. Der Ran GTPase-Zyklus

Der zu Grunde liegende Mechanismus für diese Funktionen ist der Ran GTPase-Zyklus und damit die alternierende Bindung von Nukleotiden an Ran, die eine reversible Konformationsänderung bedingt. Die dreidimensionale Struktur des Ran hängt mit dem gebundenen Nukleotid zusammen und bedingt die Bindungsaffinität für diverse Ran-Interaktionsproteine. RanGTP bindet Importine, während die Hydrolyse



**Abbildung 4: Der RanGTPase Zyklus**

Der RCC1 vermittelte Nukleotid-Austausch von GDP gegen GTP führt zu einer Aktivierung des Ran und zur Freigabe der Interaktionspartner. Durch die RanGAP1-vermittelte Hydrolyse des RanGTP zu RanGDP erfolgt die Inaktivierung.

zu RanGDP zur Dissoziation des Ran/Importin-Komplexes führt. Die intrinsische GEF und GAP-Aktivität von Ran ist aber bei der typischen zellulären Magnesiumkonzentration von 2 mM zu gering um zwischen den beiden Zuständen zu wechseln, daher werden, um auf physiologische Raten zu gelangen, verschiedene Regulatoren benötigt [74]. Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei RCC1 um den GEF von Ran, der einen gesteigerten Nukleotidaustausch ermöglicht, obwohl in HeLa-Zellen etwa 20 mal weniger RCC1 als Ran vorliegt, was etwa 500.000 Kopien pro Zelle entspricht [75]. Außerdem zeigt Ran eine zehnfach höhere Affinität für GDP als für GTP, während RCC1 für beide Nukleotide die gleiche Affinität aufweist. Zum Nukleotidaustausch in

die notwendige Richtung kommt es daher nur durch eine 20-30fach erhöhte GTP-Konzentration gegenüber der von GDP [76]. Die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP wird dagegen über RanGAP1 katalysiert. RanGAP1 ist ein Homodimer mit einer molekularen Masse von 65 kDa, das in der cytosolischen Peripherie des NPCs



lokalisiert ist. Durch eine kovalente Bindung des *Small Ubiquitin-related Modifiers 1* (SUMO1) über den SUMO E3-Ligase Komplex RanBP2/UBc9 wird RanGAP1 an die cytosolische Membran des NPCs rekrutiert, wo es die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP katalysiert. Verstärkt wird dieser Effekt durch das Ran-Bindungsprotein 1 (RanBP1), das ausschließlich RanGTP aber nicht RanGDP bindet. Daneben partizipieren noch weitere Ran-Bindeproteine, besonders die Mitglieder der Importin  $\beta$ -Familie, am GTPase-Zyklus und helfen vor allem den nukleo-cytoplasmatischen Transport zu steuern (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2: Ran-Bindeproteine und deren Funktion**

Name	Funktion	Referenz
RanBP1	Inhibiert den GEF von Ran; steigert RanGAP1-induzierte Hydrolyse Bildet einen trimeren Komplex mit RanGTP	[77, 78]
RanBP2	E3 SUMO Ligase; Bindet Exportin1 Vermittelt SUMO1 und SUMO2-Modifikation über UBE2I	[79-83]
RanBP3	Cofaktor des XPO1/CRM1-vermittelten Exports	[84-87]
RanBP4/ Importin 4	Nuklearer Transport Rezeptor; Erkennt NLS in Cargoproteinen Vermittelt die Bindung vom Substrat/Importin-Komplex an den NPC Mitglied der Importin $\beta$ -Familie	[88]
RanBP5/ Importin5	Vermittelt den nuklearen Import von ribosomalen Proteinen und Histonen; Mitglied der Importin $\beta$ -Familie	[89]
RanBP6	Fungiert vielleicht als nuklearer Transportrezeptor Mitglied der Importin $\beta$ -Familie	
RanBP7/ Importin7	Vermittelt autonom den nuklearen Import von ribosomalen Proteinen; Mitglied der Importin $\beta$ -Familie	[89-91]
RanBP8/ Importin8	Spielt Rolle beim nuklearen Import Mitglied der Importin $\beta$ -Familie	[92, 93]
RanBP9	Adapterprotein, verbindet Membranrezeptoren mit Signalwegen Verstärkt das HGF-MET-Signaling; Stabilisiert TP73 $\alpha$ ; Interagiert mit AR	[94-96]
RanBP10	Cytosolischer GEF für Ran in Megakaryozyten beteiligt an Mikrotubulidynamik	[97]
RanBP11/ Importin11	Nuklearer Transportrezeptor; Vermittelt den Import von UbcM2 Mitglied der Importin $\beta$ -Familie	[98]
CRM-1	<i>Chromosome region maintenance 1</i> ; Exportin 1; Mitglied er Importin $\beta$ -Familie; erkennt Proteine mit NES; Hauptrezeptor zum Export von Proteinen	[99-103]

### 1.3.2. Physiologische Bedeutung des Ran

Bisher konnten drei essentielle Funktionen für die kleine GTPase Ran beschrieben werden, die alle von einem lokalen RanGTP-Gradienten abhängig sind.

#### 1.3.2.1. Nukleocytoplasmatischen Transport

Die am besten charakterisierte Funktion des Ran ist die Regulation des nukleocytoplasmatischen Transports.

Ein Erkennungszeichen für eukaryotische Zellen ist die Kompartimentierung in einen durch die Kernmembran abgetrennten nuklearen und einen cytosolischen Raum. Damit während der Interphase im Cytosol gebildete nukleare Proteine oder im Kern gebildete RNA-Moleküle ihre Funktion aufnehmen können, müssen sie die Barriere zwischen den Kompartimenten überwinden. Für Makromoleküle bis 40 kDa ist dies durch passive Diffusion durch die NPCs innerhalb der Kernmembran möglich, Proteine ab 50 kDa müssen dagegen überwiegend aktiv durch die NPCs in den Kern transportiert werden [104]. Dieser selektive Transport wird durch Ran und seine Bindungspartner reguliert, indem sie die Bildung und Dissoziation von nukleocytoplasmatischen Transportkomplexen, bestehend aus Cargoprotein und Transportrezeptormolekül, steuern. Die Transportrezeptoren werden auch Karyopherine genannt und je nach Aufgabe in Importine und Exportine unterteilt. Das zu importierende Cargoprotein zeichnet sich in der Regel durch ein nukleares Lokalisationssignal in seiner Sequenz aus, das mit einem heterodimeren Importin kooperativ wechselwirkt, während zu exportierende Proteine eine nukleare Exportsequenz NES tragen, die die Bindung an Exportine wie CRM-1 vermitteln. Für den nuklearen Import bindet die  $\alpha$ -Untereinheit des Importins, Importin  $\alpha$ , an die NLS des cytosolischen Cargoproteins [15, 105-107], was zur Rekrutierung der  $\beta$ -Untereinheit, Importin  $\beta$ , und damit zur Bildung eines trimeren Cargo-Komplexes führt. Der Komplex transloziert an die cytoplasmatischen Filamente des NPCs, wo Importin  $\beta$  mit dessen Proteinen wechselwirkt [108]. Unter ATP-Verbrauch bindet das Importin  $\beta$  an immer weiter im Inneren liegende NPC-Proteine, wodurch der Transportkomplex in das Kernplasma transloziert [109-112]. Im Kernplasma bindet RanGTP an den Transportkomplex, indem es mit Importin  $\beta$  wechselwirkt, wodurch, durch das GTP bedingt, dessen Konformation geändert wird und der Komplex dissoziiert. Das Cargoprotein wird im Kernplasma freigesetzt, während der Importin/RanGTP-Komplex ins Cytosol exportiert wird, wo durch eine kompetitive Bindung des RanBP1 wiederum das Importin freigegeben wird und eine erneute Bindung durch die von SUMOyliertem RanGAP1 stimulierte Hydrolyse von GTP zu GDP verhindert wird. Um eine Depletion des Rans im Kern zu vermeiden, wird Ran über seinen eigenen Importrezeptor NTF2 in den Nukleus transportiert, wo der RCC1-katalysierte GDP/GTP-Austausch stattfindet.

Der nukleare Export von Proteinen und RNA in das Cytosol verläuft nach einem ähnlichen Mechanismus. Die Bindung von RanGTP führt zu einer Konformationsänderung im Exportin CRM-1, wodurch NES-tragende Cargoproteine gebunden werden können. Der trinäre Ran/CRM/Cargo-Komplex wird durch den NPC aus dem

Kern an die cytoplasmatische Membran des NPCs transportiert, wo RanGAP1 und RanBP1 die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP katalysieren und so eine erneute Konformationsänderung vermitteln. Dies hat die Dissoziation des Transportkomplexes zur Folge und das Cargoprotein wird in das Cytosol freigegeben [100].

Betrachtet man den Mechanismus dieses bidirektionalen nukleocytoplasmatischen Transports, erkennt man, dass dieser nur auf Grund einer asymmetrischen Verteilung des RanGTPs und RanGDPs durch die Kernmembran mit hohen RanGTP-Konzentrationen im Kern und hohen RanGDP-Konzentrationen im Cytosol, die auf einer Kompartimentierung der Ran-Regulatoren beruht, möglich ist. Erzielt wird dieser Gradient zum einen durch die Bindung von RCC1 an Chromatin, wodurch RCC1 primär nuklear lokalisiert ist und der Nukleotidaustausch am Ran auch im Zellkern stattfindet. Zum anderen wird die Hydrolyse dagegen vom cytosolischen RanGAP1 katalysiert, wodurch im Cytosol RanGDP gebildet wird. Damit ist RanGTP weitestgehend auf den Nukleus beschränkt und kann die Initiation des Exports vermitteln, während RanGDP im Cytosol für den Import verantwortlich ist.

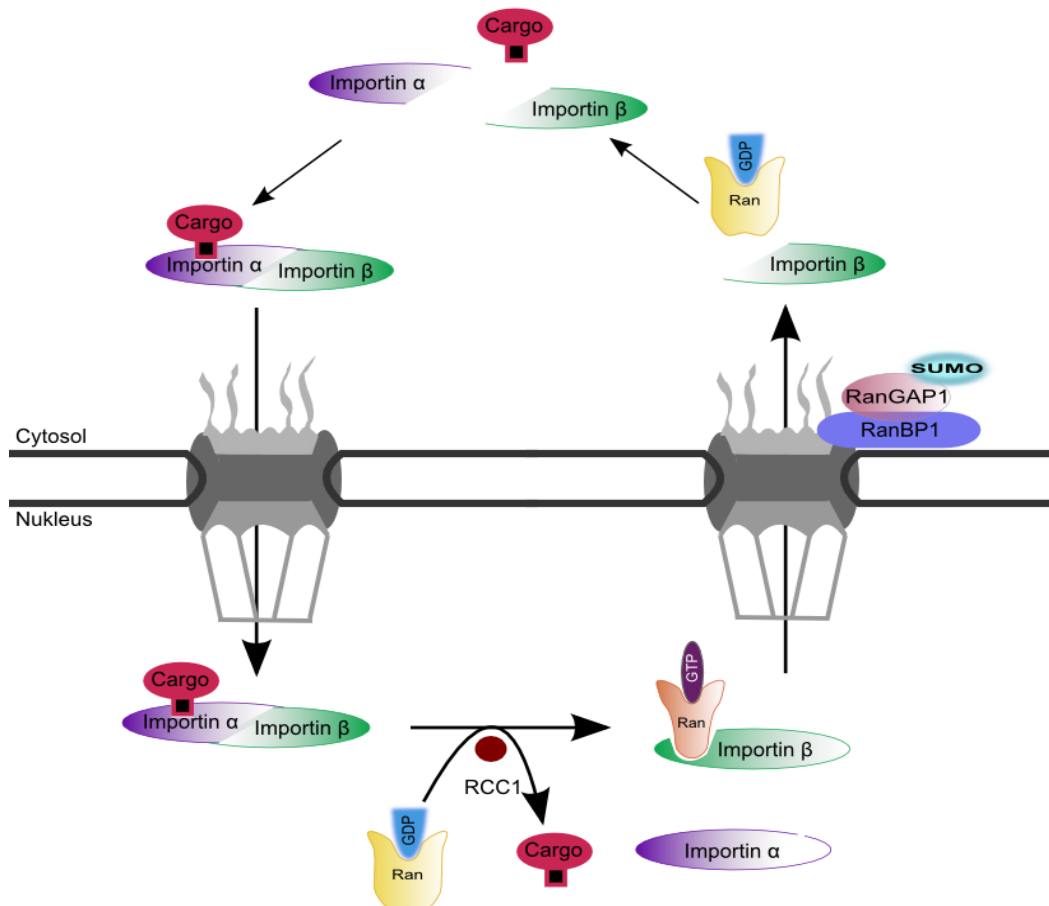


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung des nuklearen Imports

NLS-Sequenz-tragende Cargoproteine werden über Importin  $\alpha$  erkannt und gebunden, wodurch Importin  $\beta$  rekrutiert und der Cargokomplex an die NPCs transportiert wird. Dort wandert der Komplex durch Interaktion von Importin  $\beta$  mit Nucleoporinen in den Nukleus. Im Nukleus induziert chromatingebundenes RCC1 den Guanosin-Austausch an Ran, was dessen Konformationsänderung und eine Interaktion mit Importin  $\beta$  zur Folge hat. Diese Interaktion führt zur Dissoziation des Cargokomplexes, das Cargoprotein wird frei gegeben und RanGTP wird an Importin  $\beta$  gebunden ins Cytosol transportiert. RanGAP1 wird nach SUMOylierung an die äußere Membran der NPCs rekrutiert, wo es die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP in Anwesenheit von RanBP1 katalysiert.

### 1.3.2.2. Bildung der mitotischen Spindel

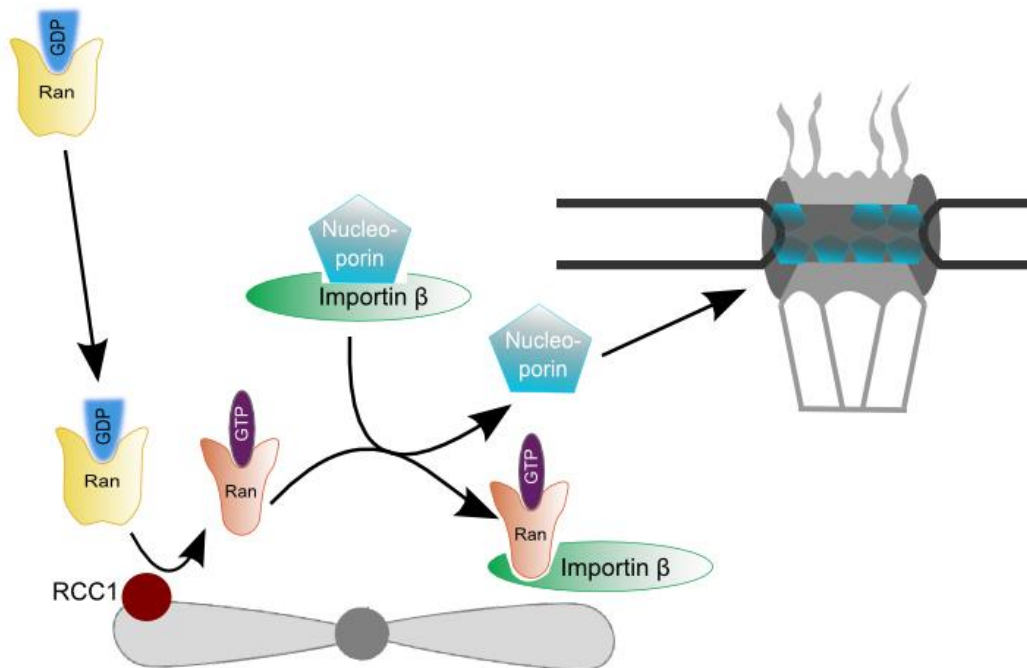
Ran und Ran-Bindungsproteine sind während der Mitose in die Regulation der Spindelassemblierung ausgehend von den Chromosomen involviert [113-117].

Die Mitose dient der Teilung einer Mutterzelle in zwei Tochterzellen mit identischem Chromosomensatz, wobei die Chromosomensegregation sehr präzise und geordnet ablaufen muss, um eine Aneuploidie und daraus resultierende Dysregulationen zu vermeiden. Kontrolliert wird dieser Prozess vom Spindelapparat über den alternierenden Aufbau und Zerfall von Mikrotubuli. Dabei können Mikrotubuli auf der einen Seite ausgehend von den Zentrosomen, die als *microtubule organizing centers* (MTOC) dienen, gebildet werden und auf der anderen Seite ihren Ursprung an den Chromosomen finden, wobei die Bildung dieser Kinetochor-Mikrotubuli über den Ran-Zyklus gesteuert wird [118, 119].

Der Prozess des Kinetochor-Mikrotubuli-Aufbaus wird über **Spindelassemblierungsfaktoren** (SAF), wie TPX2 und NuMA reguliert. Während der Interphase liegen die SAFs als Importin-Komplex vor, wodurch ihre Funktion inhibiert wird. Wird die Mitose eingeleitet, entsteht an den Chromosomen durch die Bindung des RCC1 ein RanGTP-Gradient, der die Dissoziation der Importine von den SAFs katalysiert, wodurch diese aktiviert werden und die Mikrotubuli stabilisieren [120, 121]. Belegt wurde dieser Mechanismus zum einen für das SAF TPX2, ein Mikrotubuli assoziiertes Protein, das über seine NLS an Importin  $\alpha$  bindet und dadurch inaktiviert wird. Nach der Aktivierung über RanGTP kann TPX2 die Aurora A Kinase aktivieren, die wiederum in die Zentrosomenfunktion involviert ist. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass Importin  $\beta$  durch Bindung an den SAF NuMA den Spindelaufbau hemmen kann. Auch hier wird der Komplex in Gegenwart von RanGTP gelöst und der hemmende Effekt aufgehoben [122-127]. Daher kann gesagt werden, dass die RanGTP-abhängige Dissoziation von Importinen von SAFs einen generellen



Membranvesikeln, wobei Importin  $\beta$  als Lokalisierungsfaktor dient. Wie schon beschrieben hat die Interaktion von RanGTP mit Importin  $\beta$  eine Konformationsänderung des Importins zur Folge, wodurch die Nucleoporine und Vesikel lokal freigesetzt werden. Durch Fusion der Vesikel wird eine kontinuierliche Lipiddoppelschicht gebildet, die durch von Nucleoporinen gebildeten Poren durchzogen ist. Direkt danach wird der nukleocytoplasmatische Transport aufgenommen. Der RanGTP/Importin  $\beta$ -Komplex dissoziiert nach der Hydrolyse, katalysiert durch RanGAP1 und RanBP1 [118].



**Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung des Wiederaufbaus der Kernmembran**

Modifiziert nach Fu et al. [133] Während der Telophase wird RanGDP an die Oberfläche des Chromatins rekrutiert, wodurch es dort in hoher Konzentration vorliegt. Chromatin-gebundenes RCC1 induziert den Nukleotid-Austausch, es wird RanGTP gebildet. Dadurch wird über das in diesem Fall als Lokalisationssignal fungierende Importin $\beta$  Nucleoporine und Membranvesikel rekrutiert. Durch die Interaktion zwischen RanGTP und Importin $\beta$  werden die Porine und die Vesikel freigegeben und die Membran inklusive NPCs bildet sich.

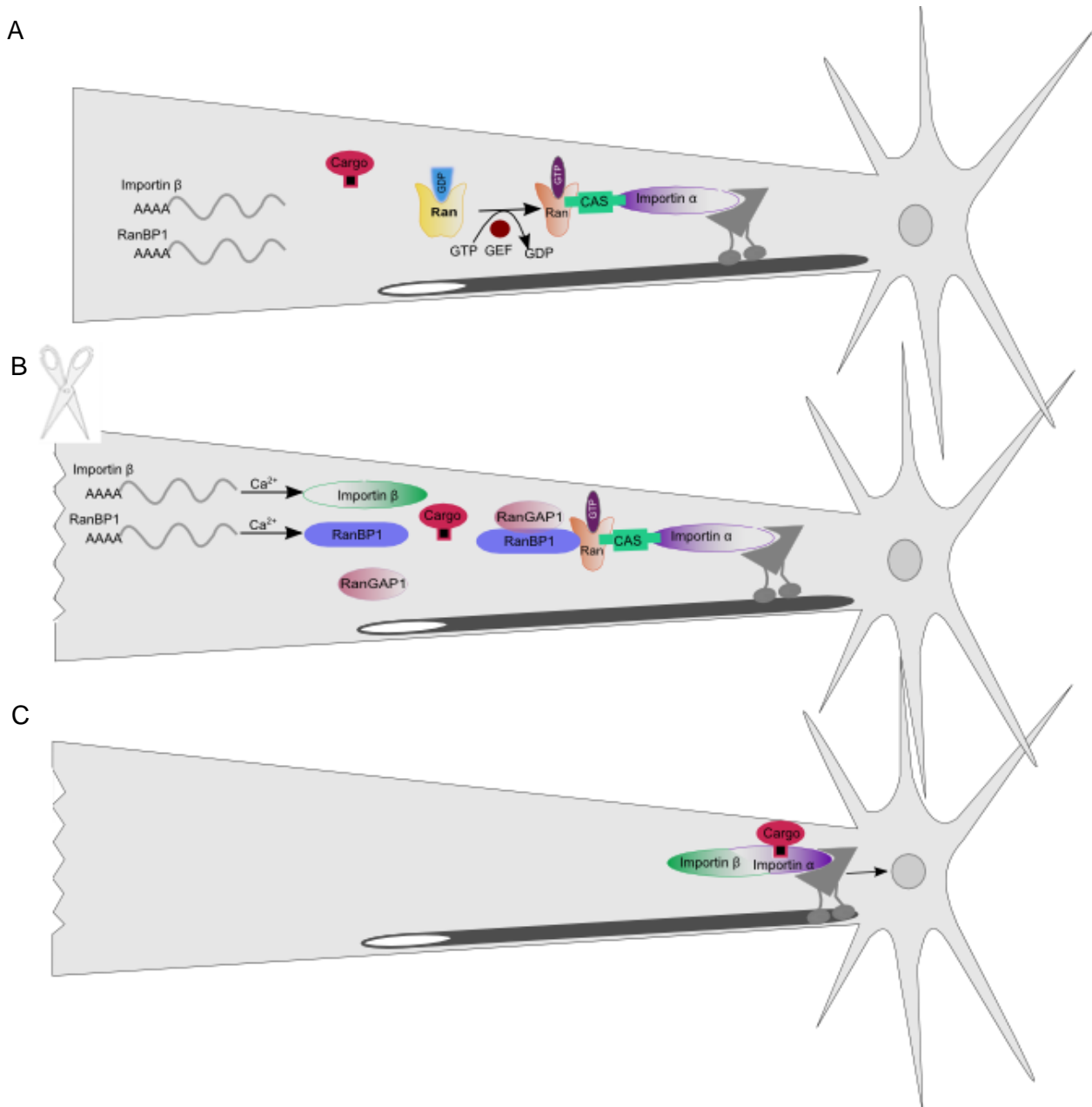
### 1.3.3. Funktion in Neuronen

Neben dem konventionellen nukleocytoplasmatischen Transport im Soma, findet in Neuronen außerdem ein axonaler Transport statt, der besonders effizient sein muss, da die Strecke zwischen peripherem Axonende und Soma z.B. bei Menschen bis zu einem Meter betragen kann [134]. Zur Regulation des axonalen Transports werden Karyopherine und deren assoziierte Proteine mobilisiert, um so Entwicklung, Wachstum und Überleben zu steuern [135, 136]. Dabei kann zwischen langsamen

und schnellen Transport unterschieden werden, wobei der langsame Transport nur vom Soma in das periphere Ende der Axone erfolgt, während der schnelle Transport bidirektional ist. Das schnelle retrograde Signaling vom Axonende zum Soma ist vor allem während der Entwicklung von Bedeutung. Es führt über die empfangenen Signale zur Modifizierung des Transkriptionsprofils während dem Kontakt mit weiteren Neuronen [137]. Im adulten Hirn aktivieren vor allem Verletzungen und Schäden den retrograden Transport von Signalmolekülen [138-140].

Nach axonalen Läsionen im peripheren Nervensystem werden retrograde Verletzungssignale ins Soma transportiert, wo die zur Regeneration notwendigen Gene transkribiert werden. Zur Art, wie diese Verletzungssignale transportiert werden, gab es die ersten Hinweise durch Ambron et al, die zeigen konnten, dass einige retrograde Verletzungssignale ein nukleares Lokalisationssignal (NLS) tragen [141], was zur Entdeckung führte, dass Importine in diese Transmission involviert sind [142]. Während unter normalen Bedingungen Importin  $\beta$  nur als mRNA granularartig detektierbar ist, liegt Importin  $\alpha$  in sensorischen Axonen sowohl in Kontroll- als auch in verletzten Ischiasnerven vor. Yudin et al. konnten zeigen, dass über das Protein cas ein Komplex mit dem Motorprotein Dynein und mit RanGTP bildet wird [143].

Nach der Läsion kommt es zum Einstrom von Calciumionen, RanBP1 wird lokal translatiert, axonales RanGAP1 rekrutiert und so die Dissoziation von RanGDP vom Importin  $\alpha$ -Komplex herbeigeführt. Anschließend wird die Importin  $\beta$ -mRNA translatiert, was zur Bildung eines an das Motorprotein Dynein gebundene Importin  $\alpha/\beta$  Heterodimers führt. Durch eine lokale Aktivierung der NLS-tragenden Verletzungssignale, werden diese an den Komplex gebunden und als Signalcargo retrograd ins Soma transportiert [142-144]. Der RanGTP-Komplex ist also eine Art Sicherung, der eine raumzeitliche Kontrolle des retrograden Transports ermöglicht, indem er die Bildung von Importin-Komplexen und damit den unzuweckmäßigen retrograden Transport von Cargoproteinen verhindert.



**Abbildung 8: RanGTP-gesteuerter axonaler retrograder Transport nach Nervverletzung**

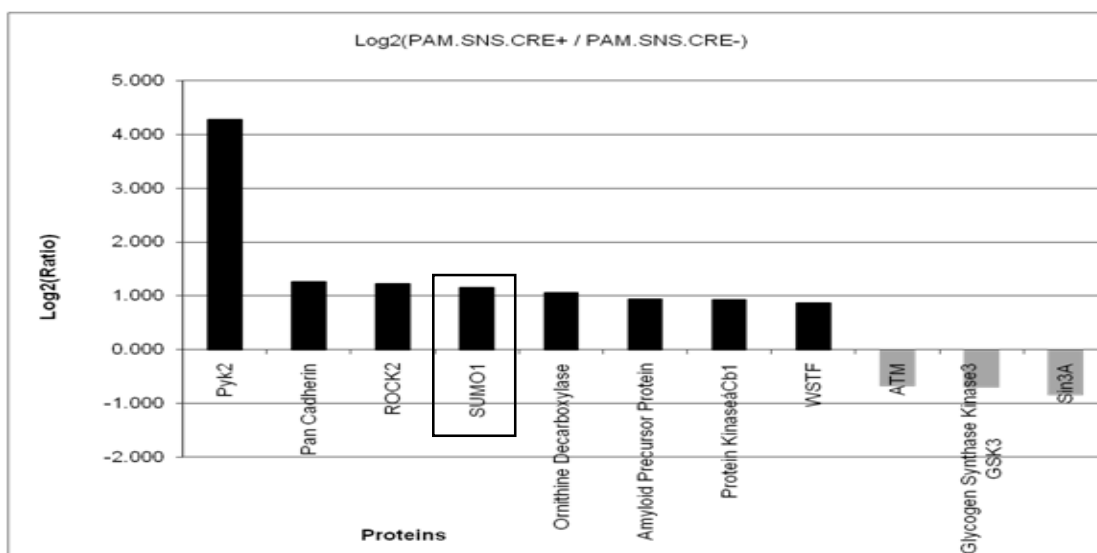
Modifiziert nach Yudin et al. [144]. A) Unter Normalbedingungen wird von einer axonalen GEF RanGTP gebildet, dass wiederum axonales CAS und Importine bindet, wodurch sowohl eine Interaktion zwischen den Importinuntereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  als auch die Bindung von Cargoproteinen verhindert wird. B) Nach Nervläsion kommt es zu einer örtlich begrenzten  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Translation der RanBP1 und Importin  $\beta$  mRNA, wodurch gesteigerte Mengen der korrespondierenden Proteine vorliegen. Begleitend dazu kommt es zu einer Aktivierung von Signalcargos mit NLS. C) Das exprimierte RanBP1 stimuliert die Dissoziation von RanGTP vom CAS-Komplex und zeitgleich die Rekrutierung von RanGAP1, wodurch die RanGAP1-abhängige Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP induziert wird. Dadurch kann ein Cargo-Komplex gebildet werden und das Cargoprotein wird mit Hilfe des Dyneins in den Zellkern transportiert.



## 1.4. Zielsetzung der Arbeit

Auf Grund seiner enormen Größe und modularen Aufbaus, können MycBP2 und seine Orthologe zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen eingehen und somit in diverse zelluläre Prozesse eingreifen. Bisher wurden überwiegend deskriptive Untersuchungen in MycBP2-defizienten Organismen durchgeführt, um physiologische Funktionen zu beschreiben. Mechanistisch wurde sich überwiegend auf die RING-Finger-Domäne und deren E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität konzentriert.

In dieser Arbeit sollen dagegen grundlegende mechanistische Fragen zur Funktion des MycBP2 und seiner RCC1-ähnlichen Domäne geklärt werden. Erste Indizien für Interaktionspartner auf molekularer Ebene lieferte ein von Dr. Sabrina Holland durchgeführter Antikörperarrayassay, der Unterschiede in den Mengen diverser Proteine in DRG-Lysaten von SNS-Cre Knockout und Wildtyp-Mäusen gegenüberstellt.



**Abbildung 9: Antikörperarrayassay**

Fluoreszenz(Cy5)-markierte Proteine aus Dorsalwurzelganglien wurden auf Unterschiede in Expression und Phosphorylierung zwischen SNS Cre-negativer und -positiver Mäuse<sup>lox/lox</sup> mittels *Panorama® 725 Antibody Array* (Sigma, St.Louis, MO) untersucht. Angegeben wurden Expressionsunterschiede als Zweierlogarithmus des Quotienten von SNS Cre positiven und SNS Cre-negativen Messwerten, wenn dieser >0,5 oder <-0,5 ist. In die Berechnungen eingegangen ist jeweils der Mittelwert zweier abhängiger Messungen nach Subtraktion des Hintergrundes und Normalisierung.

Zielsetzung dieser Arbeit ist es nun dieses SUMO1-modifizierte Protein oder die Proteine zu identifizieren, deren Interaktion mit MycBP2 aufzudecken und die Funktion dieser Interaktion zu analysieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden allgemeine Chemikalien von Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Laborchemikalien (Seelze) oder von AppliChem (ST. Louis) bezogen.

Tabelle 3: Anderweitig bezogene Chemikalien und Kits

Substanz	Hersteller
Kollagenase Typ CLS IV	C4-28; Biochrom AG, Berlin; Deutschland
Dispase	04942078001, Roche, Grenzach-Wyhlen; Deutschland
dNTP-Mix	R0191; Thermo Scientific, Waltham, USA
FAM-labeled Non-targeting siRNA	AM4620, Life Technologies, Carlsbad, USA
Fluoromount-G	0100-01; SouthernBiotech, Birmingham, USA
$\gamma$ [ <sup>35</sup> S]GTP	NEG030H25UC; Perkin Elmer, Waltham, USA
$\gamma$ [ <sup>32</sup> P]GTP	FP-302; Hartmann Analytic; Braunschweig
Nickel-NTA Agarose	30210; Qiagen, Hilden, Deutschland
Pfu Turbo DNA-Polymerase	600250-52; Stratagene, La Jolla, USA
10x Cloned Pfu Reaktionspuffer	600153-82; Stratagene, La Jolla, USA
Ubiquitin E1	E-305; Boston Biochem, Cambridge, USA
Ubiquitin E2	U 8882; SIGMA Aldrich, Seelze, Deutschland
Ubiquitin, GST-Fusion	662057; Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Protein A/G PLUS-Agarose	Sc-2003; Santa Cruz, Santa Cruz, USA
SUMOylation Kit	BML-UW8955 ENZO Life Sciences, Lörrach
siGenome Human RanGAP1	D-001206-14-05; Thermo Scientific, Waltham, USA
siGenome Non-targeting siRNA #2	D-001210-02-05; Thermo Scientific, Waltham, USA
siGenome Mouse RanGAP1	M-061875-00-0005; Thermo Scientific, Waltham, USA
siPort Amine	AM4520; Life Technologies, Carlsbad, USA
Turbofect	R0531, Thermo Scientific, Waltham, USA

### 2.2. Antikörper

Tabelle 4: Verwendete Antikörper, Verdünnungen und entsprechende Sekundärantikörper

Primär-antikörper	Firma, Katalognummer	Verdünnung		Sekundär-antikörper
		WB	IH	
ARN (PAM)	Tier41509V	-	1:100	Rabbit
ERK1/2	Promega; V1141	1:1000	-	Rabbit
GST	Sigma; G1160	1:2000	-	Mouse
Histidin	SIGMA; H1029	1:500	-	Mouse
HSC70	Santa Cruz; sc-1059	1:1000	-	Goat
HSP90	Santa Cruz; sc-13119	1:1000	-	Mouse
Kor3	Santa Cruz; sc-15309	Nur IP		Rabbit
NeuN	Millipore; MAB377X		1:200	Mouse
p84	GeneTex; 5E10	1:750	-	Mouse
Ran	BD; 610340	1:5000	1:200	Mouse
RanGAP1	Santa Cruz; sc-1862	1:500	1:50	Goat
SUMO1	Sigma; S8070	1:1000	1:100	Rabbit
TSC-2	Santa Cruz; sc-893	1:500		Rabbit

## 2.3. Puffer und Stammlösungen

### 2.3.1. Molekulargenetische Methoden

Tabelle 5: Zusammensetzung der Medien und Puffer für molekulargenetische Methoden

<b>LB-Medium</b>	10 g/L Trypton; 5 g/L Hefeextrakt; 5 g/L NaCl; pH 7,2
<b>LB-Agar</b>	10 g/L Trypton; 5 g/L Hefeextrakt; 5 g/L NaCl; 18 g/L Agar; pH 7,2
<b>Transformationspuffer 1</b>	30 mM KAc/AcOH pH 5,8; 100 mM KCl; 10 mM CaCl <sub>2</sub> ; 15% Glycerol; 50 mM MnCl <sub>2</sub>
<b>Transformationspuffer 2</b>	10 mM MOPs/KOH pH 6,8; 10 mM KCl; 75 mM CaCl <sub>2</sub> ; 15% Glycerol
<b>Isolierungspuffer 1</b>	25 mM Tris/HCl pH 8,0; 50 mM Glucose; 10 mM EDTA pH 8,0; 20 µg/mL RNase; bei 4°C lagern
<b>Isolierungspuffer 2</b>	1% SDS; 0,2 M NaOH
<b>Isolierungspuffer 3</b>	3 M Natriumacetat pH 5,2
<b>TE Puffer</b>	10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; Optional : 20 µg/mL RNase
<b>TAE-Puffer</b>	2 M Tris base; 1 M HAc; 0,1 M Na <sub>2</sub> EDTA

### 2.3.2. Zellbiologische Methoden

Tabelle 6: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden

<b>PBS(Phosphat-gepufferte Saline)</b>	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Boratpuffer</b>	50 mM Borsäure; 23,6 mM Borax 23,6; pH 8,5
<b>Poly-L-Lysin-Lösung</b>	1 mg/mL Poly-L-Lysin in Boratpuffer Sterilfiltrieren; bei -20°C lagern

### 2.3.3. Proteinbiochemische Methoden

Tabelle 7: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

<b>Lysepuffer</b>	50 mM Tris, pH 7,8; 0,1% TritonX100; 1 mM PMSF; 5 mM Benzamidin; 5 µg/ml Aprotinin; 50 µg/ml Trypsininhibitor; 1 mM DTT
<b>Zellkern Lysepuffer</b>	20 mM Hepes pH 8,0; 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 25% Glycerol; 420 mM NaCl; 0,2 mM EDTA; 1 mM DTT
<b>4x Lämmli-Puffer</b>	100 mM Tris/HCl, pH 7,4; 8% (w/v) SDS; 10% (w/v) β-Mercaptoethanol; 40% (w/v) Glycerol; 0,1% (w/w) Bromphenolblau; Bei -20°C lagern
<b>4x Trenngelpuffer:</b>	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8; 0,4% (w/v) SDS Bei 4°C lagern
<b>4x Sammelgelpuffer</b>	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8; 0,4% (w/v) SDS Bei 4°C lagern
<b>SDS-PAGE Laufpuffer</b>	25 mM Tris/HCl, pH 8,3; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS Bei RT lagern
<b>Coomassie-Blau-Färbelösung</b>	50% (v/v) Methanol; 0,005% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250; 10% Essigsäure; 40% H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> ; Bei RT lagern

<b>Coomassie Entfärbelösung</b>	5% (v/v) Methanol; 7,5 % (v/v) Essigsäure; 87,5% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> ; Bei RT lagern
<b>MYCBP2-Lysepuffer</b>	20 mM Tris/HCl, pH 7,4; 30 µg/µL Trypsininhibitor; 5 mM Benzamidin; 1 mM PMSF; 5 µg/mL Aprotinin; 0,5 mM DTT
<b>RLD-Lysepuffer</b>	50 mM Tris/HCl pH 8,0; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 30 µg/µL Trypsininhibitor; 5 mM Benzamidin; 1 mM PMSF; 5 µg/mL Aprotinin; 1 mM DTT
<b>His-Ran Lysepuffer</b>	50 mM Tris/HCl pH 8,0; 50 mM NaCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 30 µg/µL Trypsininhibitor; 5 mM Benzamidin; 1 mM PMSF; 5 µg/mL Aprotinin; 1 mM DTT
<b>Eluationspuffer</b>	50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM Imidazol
<b>RanGAP1-Lysepuffer</b>	50 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA
<b>Harnstoffwaschpuffer</b>	50 mM Tris/HCl pH 7,4; 2 M Harnstoff; 30 µg/µL Trypsininhibitor; 5 mM Benzamidin; 1 mM PMSF; 5 µg/mL Aprotinin; 1 mM DTT
<b>Harnstoffpuffer</b>	50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 8 M Harnstoff; 30 µg/µL Trypsininhibitor; 5 mM Benzamidin; 1 mM PMSF; 5 µg/mL Aprotinin; 1 mM DTT
<b>Dialysepuffer</b>	50 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 30 µg/µL Trypsininhibitor; 5 mM Benzamidin; 1 mM PMSF; 5 µg/mL Aprotinin; 1 mM DTT
<b>Transportpuffer</b>	20 mM Hepes/KOH pH 7,3; 110 mM Kaliumacetat; 2 mM Magnesiumacetat; 1 mM EGTA; 2 mM DTT; 30 µg/µL Trypsininhibitor; 5 mM Benzamidin; 1 mM PMSF; 5 µg/mL Aprotinin;
<b>Ran Lysepuffer</b>	50 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM DTT; 1 mg/mL Lysozym; 30 µg/µL Trypsininhibitor; 5 mM Benzamidin; 1 mM PMSF; 5 µg/mL Aprotinin;
<b>Ran Puffer A</b>	50 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM DTT
<b>Ran Puffer B</b>	50 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM DTT; 2 M NaCl
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4aq</sub></b>	95 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in 100 mL H <sub>2</sub> O; über Nacht bei RT rühren. Bei 4°C lagern
<b>Ubiquitylierungspuffer</b>	40 mM Tris/ HCl pH 7,4; 8,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 5 mM ATP; 1,5 mM DTT; 10 mM Kreatin Phosphat; 3,5 U/mL Kreatin Kinase
<b>GTPase Puffer</b>	25 mM Hepes, pH 7,3; 120 µM MgCl <sub>2</sub> ; 100 µM EDTA; 1 mM DTT
<b>GTPase-Stop-Puffer</b>	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8,0; 5%Aktivkohle
<b>γ<sup>35</sup>S-GTP-Bindungsassay-Puffer</b>	50 mM Tris, pH 7,4; 3 mM MgCl <sub>2</sub> ; 100 mM NaCl; 200 µM EDTA; 1 mM DTT

#### 2.3.4. Immunologische Methoden

Tabelle 8: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für immunologische Methoden

<b>SDS-PAGE Transferpuffer</b>	50 mM Tris/HCl pH 8,3; 190 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol Bei 4°C lagern
<b>Ponceau S-Lösung</b>	2 g Ponceau; 5 mL Essigsäure; Mit H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> auf 1 L auffüllen Bei RT lagern
<b>Natriumazid-Lösung</b>	1% Natriumazid in H <sub>2</sub> O; Bei RT lagern

<b>TN Puffer</b>	10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 100 mM NaCl; Bei RT lagern
<b>TNT Puffer</b>	10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 100 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween Bei RT lagern
<b>Stripping-Puffer</b>	50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 2% SDS; 100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol; Bei RT lagern
<b>PFA</b>	4% PFA in PBS
<b>DAPI</b>	Stock: 1 mg/mL in PBS; Arbeitskonz.: 1:1000 verdünnt
<b>Sudan-Schwarz</b>	Stock: 6% in 79% EtOH; Arbeitskonz.: 0,6%
<b>IP-Puffer</b>	50 mM Tris/HCl pH 7,4; 300 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% Triton X-100; 0,02% NaAz; 30 $\mu$ g/ $\mu$ L Trypsininhibitor; 5 mM Benzamidin; 1 mM PMSF; 5 $\mu$ g/mL Aprotinin
<b>IP-Waschpuffer</b>	50 mM Tris/HCl pH 7,4; 300 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% Triton X-100; 0,02% NaAz

## 2.4. Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurden zum einen Mäuse des C57BL/6N Stammes von Janvier, Frankreich bzw. Harlan, Niederlande und zum anderen konditionelle MycBP2SNS Cre<sup>+/-</sup> Mäuse verwendet. Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen gehalten (Raumtemperatur 22  $\pm$ 0,5° C; Hell-/Dunkelzyklus 6/18 Uhr). Sie erhielten Trockenfutter und Wasser ad libitum. Alle Experimente wurden durch die zuständige Tierethikkommission genehmigt.

Zur peripheren nozizeptiven Stimulation injizierte Herr Zhang Dongdong 20  $\mu$ L einer 12,5 mg/mL Zymosan A-Lösung in PBS intraplantar in eine oder beide Hinterpfoten der Mäuse. Nach variierender Inkubationszeit wurden die lumbalen DRGs (L5-L6) wie in Kapitel 2.5.2.3 beschrieben isoliert, unfixiert direkt in Einfriermedium (*Tissue Freezing Medium*, Jung, Leica Instruments, Nussloch) überführt und auf Trockeneis schockgefroren.

## 2.5. Methoden

### 2.5.1. Molekulargenetische Methoden

#### 2.5.1.1. Kultivierung von Bakterien

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit dem *E.coli* Stamm BL21(DE3)plysS (Promega) gearbeitet. Die Zellen wurden in LB-Medium kultiviert. Als Selektionsmedium nach der Transformation diente LB-Medium mit Ampicillin (Stock: 40 mg/mL; Endkonz.: 100 µg/mL). Übernachtskulturen wurden hauptsächlich im 5 mL Maßstab mit Ampicillin angesetzt.

#### 2.5.1.2. Manganchlorid-Methode zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden 5 mL einer stationären Kultur des vorgesehenen *E.coli* Stammes dazu genutzt, um 500 mL LB-Medium anzupflegen. Die Kultur wurde bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,8 hochgezogen und anschließend wurden die Bakterien in 50 mL *falcons* pelletiert (3.000 rpm, RT, 12 min). Die Überstände wurden gründlich entfernt und die Pellets in je 15 mL Transformationspuffer 1 vorsichtig resuspendiert. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut pelletiert (3.000 rpm, 4°C, 10 min). Die Überstände wurde verworfen und die Pellets vorsichtig in 2 mL Transformationspuffer 2 resuspendiert. 50 µL Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert [145].

#### 2.5.1.3. Transformation mit Hitzeschock

Die Transformation wurde vorgenommen, um kompetente Bakterienzellen zur Aufnahme von Plasmid-DNA zu zwingen, um so Proteine überexprimieren und isolieren zu können.

Für die Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Zellen, wurden zunächst die kompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurde die DNA zugegeben (1 µL Plasmid-DNA bzw. 5 µL Ligationsprodukt) und die Zellen 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock durchgeführt (1,5 min; 42°C) und die Bakterien erneut für 3 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in 1 mL LB-Medium aufgenommen, 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend pelletiert (7.500 rpm; 2 min). 850 µL des Überstandes wurden entnommen, im restlichen Überstand wurden die Bakterien vorsichtig resuspendiert und auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin (100 µg/mL) ausplattiert [146].

#### 2.5.1.4. Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse

Die Plasmid-DNA Isolierung mittels alkalischer Lyse mit anschließender Isopropanol-Fällung wurde durchgeführt, wenn DNA aus einer größeren Anzahl an Proben isoliert werden musste. Dazu wurde zunächst mindestens 1 mL der Übernachtskulturen entnommen und die Bakterien pelletiert (3 min; 7.000 xg; RT). Anschließend wurde der Überstand gründlich entfernt und das Pellet in 250 µL Isolierungspuffer 1 aufgenommen und durch kurzes vortexen vollständig resuspendiert. Die alkalische Lyse erfolgte durch Zugabe von 250 µL Isolierungspuffer 2, der SDS und Natriumhydroxid enthält. Durch zehnmaliges invertieren und einer bis zu 5 minütigen Inkubation bei RT entstand ein klares Lysat. Dieses wurde mit 350 µL Isolierungspuffer 3 versetzt und erneut zehnmal invertiert, wodurch die chromosomale DNA als unlösliches SDS-Aggregat ausfällt. Das Präzipitat wurde zusammen mit der bakteriellen Debris pelletiert (10 min; 13.000 xg; RT) und verworfen. Der Überstand wurde mit 0,6 Volumen Isopropanol versetzt. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Trockeneis wurde die präzipitierte Plasmid-DNA pelletiert (15 min; 13.000 xg; 4°C) und zweimal mit 70% Ethanol gewaschen (500 µL EtOH; Zentrifugation: 5 min; 13.000 xg; RT). Dabei wurde auf vortexen verzichtet um ein Scheren der DNA zu vermeiden. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand verworfen, das DNA-Pellet bei 37°C getrocknet und anschließend in 50 µL H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> bzw. TE-Puffer aufgenommen. Bei Plasmidisolierungen für Sequenzierungen mussten die Plasmide mit einer höheren Reinheit isoliert werden, daher erfolgte die Isolierung mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen; Hilden; 27104) und wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mit einem Biowave S2100 Spectrophotometer (WPA, Cambridge, UK) bei 260 nm bestimmt [147].

#### 2.5.1.5. Restriktion

In der Genetik versteht man unter einer Restriktion die gezielte Spaltung artfremder DNA an spezifischen Positionen zur Phagenabwehr durch Restriktionsendonukleasen. Für *in vitro* Analysen macht man sich diese Methode zu nutzen, indem die Restriktionsendonukleasen aus Bakterien oder Archaeen isoliert werden und zum Verdau von zuvor isolierter Plasmid-DNA eingesetzt werden. Anhand des daraus resultierenden Schnittmusters können Aussagen über die Plasmid-DNA getroffen werden oder die Restriktion dient zur Linearisierung der DNA, wodurch sie mit weiteren linearisierten DNA-Fragmenten legiert werden kann.

Der generelle Reaktionsansatz für eine Restriktion setzt sich folgendermaßen zusammen:

**Tabelle 9: Allgemeiner Reaktionsansatz für Restriktionen**

10x Restriktionspuffer	1,5 µL
BSA	1,5 µL
Restriktionsendonuklease	2,0 u
DANN	1,5 µg
H <sub>2</sub> O	X
Gesamtvolumen	15 µL

Der Restriktionspuffer richtet sich je nach eingesetztem Enzym und variiert zwischen NEB Puffer 1, 2, 3 und 4, BSA wurde nur eingesetzt, wenn es für das benutzte Enzym erforderlich war und die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37°C, konnte aber enzymabhängig auch abweichen. Gegebenenfalls wurde eine Hitzeinaktivierung für 20 Minuten bei 65°C bzw. 80°C durchgeführt.

**Tabelle 10: verwendete DNA-Konstrukte und Restriktionsenzyme**

DNA-Sequenz	Enzyme	NEB Puffer	BSA	Hitze-Inaktivierung
Ran in Pet11d	Xba1, HindIII	Puffer 2	+	65°C
	BglII	Puffer 3	-	-
RanGAP1 in pet23a	EcoR1, Xba1	Puffer 2	+	65°C
RLD in TrcHisA	EcoR1, EcoR5	Puffer 3	+	80°C

#### 2.5.1.6. Agarose Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der größenabhängigen Aufspaltung von DNA-Gemischen und wird meistens nach Restriktion oder PCR durchgeführt.

Zum Anfertigen der Agarosegele wurde zunächst die Agarose (Agarose Basic, Applichem, Darmstadt) durch Erhitzen in TAE-Puffer gelöst, wobei sich der Agaroseanteil nach der Größe des zu analysierenden DNA-Fragments richtet. So wurden für DNA-Fragmente mit einer Größe von um die 1.000 Basenpaare Gele mit einem Agaroseanteil von 1% benutzt. Außerdem wurde, um die Detektion mit UV-Licht zu ermöglichen, zur Agarose-Lösung *Roti-Safe GelStain* (Carl Roth, Karlsruhe) zugegeben. Das DNA-Gemisch wurde mit 5x DNA-Ladepuffer versetzt, zusammen mit einem Größenstandard auf das Agarosegel aufgetragen und durch ein EasyCast Elektrophoresesystem (Thermo Scientific, Rochester, USA) aufgetrennt. Die Detektion erfolgte im UV-Licht bei einer Wellenlänge von 365 nm mit Hilfe eines Gel Doc™ Systems (Bio-Rad, Hercules, USA) und ermöglichte einen Vergleich der aufgetrennten DNA mit dem Größenstandard.



Sollte nach dem Gel noch eine Sequenzierung oder eine Ligation durchgeführt werden, wurden die benötigten DNA-Fragmente aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA mit Hilfe eines *Gel Extraction Kits* (Qiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben aus der Agarose eluiert.

#### 2.5.1.7. Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung dient der Bestimmung der Abfolge an Nukleotiden innerhalb der zu analysierenden DNA-Sequenz, was hier überwiegend zur Überprüfung von Klonierungsprodukten genutzt wird.

Die Sequenzierung der Klonierungsprodukte wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) übernommen. Die Plasmid-DNA zur Probengenerierung wurde wie in Kapitel 2.5.1.4 beschrieben mit einem Kit isoliert.

#### 2.5.1.8. Stimulation der Proteinexpression

Die Stimulation der Proteinexpression erfolgte in dieser Arbeit mittels IPTG. Dazu wurden zuerst 1 L LB-Medium (mit Ampicillin) mit 25 mL der benötigten stationären Bakterienkultur angeimpft und die Proteinexpression bei der in der nachfolgenden Tabelle angegebenen  $OD_{600}$  mit der angegebenen Menge IPTG induziert. Die Expressionsdauer sowie die IPTG-Konzentration und die Temperatur richteten sich nach dem zu exprimierenden Protein:

**Tabelle 11: Parameter für die rekombinante Überexpression der verwendeten Proteine**

<b>Protein</b>	<b>Medium</b>	<b>Temp</b>	<b>OD600</b>	<b>IPTG</b>	<b>Zeit</b>
Ran	LB+Ampicillin mit 1% Glucose und 1 mM MgCl <sub>2</sub>	37°C	0,6	0,6 mM	3 h
RanGAP1	LB+Ampicillin mit 1% Glucose und 1 mM MgCl <sub>2</sub>	37°C	1	1 mM	1 h
RLD	LB+Ampicillin mit 1% Glucose und 1 mM MgCl <sub>2</sub>	23°C	0,4	0,1 mM	15 h
His-Ran	LB+Ampicillin mit 1% Glucose und 1 mM MgCl <sub>2</sub>	37°C	0,6	0,6 mM	3 h
T24N	LB+Ampicillin mit 1% Glucose und 1 mM MgCl <sub>2</sub>	37°C	0,6	0,6 mM	3 h
Q69L	LB+Ampicillin mit 1% Glucose und 1 mM MgCl <sub>2</sub>	37°C	0,6	0,6 mM	3 h

Nach der angegebenen Zeitspanne wurden die Bakterien pelletiert (10 min; 5.000xg; 4°C) und der Überstand verworfen. Die Ran-Pellets und das RLD-Pellet wurden direkt bei -80°C gelagert, während das RanGAP1-Pellet zuerst in 40 mL RanGAP1-Lysepuffer aufgenommen und dann eingefroren wurde.

### 2.5.1.9. Ortsspezifische Mutagenese

Bei der ortsspezifischen Mutagenese werden mittels rekombinanter DNA gezielt einzelne Nukleinbasen innerhalb der DNA-Sequenz eines Proteins ausgetauscht. In dieser Arbeit wurde die DNA-Sequenz von Ran so verändert, dass es entweder konstitutiv aktiv oder inaktiv vorliegt. Für die konstitutiv aktive Form wurde das Threonin an Position 24 der Aminosäuresequenz gegen ein Asparagin ausgetauscht. Dazu wurde mit Hilfe eines Primers die Codierung von ACG für das Threonin zu AAC für das Asparagin geändert. Die Mutagenese für die inaktive Form beruht auf einem Glutamin gegen Leucin-Austausch an Position 69. Dazu wurde das Glutamin codierende CAA gegen ein Leucin codierendes CUG ausgetauscht.

Die Mutagenese wurde nach der Anleitung des *QuickChange Site-directed Mutagenesis Kit* durchgeführt. Die Template-DNA (50 ng, 100 ng oder 200 ng pro Ansatz) wurde mit 5 µL 10x PFU Reaktionspuffer, 1 µL dNTP-Mix, 125 ng pro Primer und 1 µL Turbo PFU-Polymerase versetzt. Anschließend wurde mit H<sub>2</sub>O das Volumen auf 50 µL eingestellt.

Primer	Sequenz
431 RanT24Ndirect	GGTGGTACTGGAAAAACACCTTCGTGAAACGT
432 RanT24Nrevers	ACGTTTCACGAAGGTGTTTTTCCAGTACCACC
433 RanQ69Ldirect	TGGGACACAGCCGGCCTGGAGAAATTCGGTGGA
434 RanQ69Lrevers	TCCACCGAATTTCTCCTGGCCGGCTGTGTCCCA

Um die gewünschte DNA zu amplifizieren wurde folgendes PCR-Programm gefahren:

MutanSP	
Temp.	Zeit
95°C	30 s
95°C	30 s
51°C	1 min
68°C	5 min
} 18x	
4°C	End

Anschließend wurde das PCR-Produkt für 2 min auf Eis platziert. Um die nicht modifizierte DNA zu verdauen wurde 2 µL DpnI (10 U/µL) zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden je 5 µL aller Ansätze für eine Hitzeschock-Transformation genutzt. Außerdem wurde mit 20 µL der Ansätze ein 1% Agarosegel gefahren, um zu überprüfen, ob die PCR funktioniert hat.

Um die Mutanten zu überprüfen wurde deren DNA sequenziert (siehe 2.5.1.7).

### 2.5.1.10. Genotypisierung

Die Genotypisierung dient der Bestimmung des Genotyps der MYCBP2 SNS Cre-Mäuse. Dazu musste zuerst die genomische DNA der Mäuse isoliert und dann mit Hilfe einer PCR amplifiziert werden. Anhand der DNA-Fragmente der ersten PCR wurde bestimmt, ob es sich um SNS Cre<sup>+</sup> oder SNS Cre<sup>-</sup> handelt. Die Fragmente der zweiten PCR geben Ausschluss darüber, ob die Mäuse das MYCBP2-Gen aufweisen.

#### Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde mit Hilfe des *REDEExtract-N-AMP Tissue PCR Kit* (Sigma, St. Louis, USA) aus Mäuseschwänzen nach dem Protokoll des Herstellers isoliert.

#### Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von bestimmten DNA-Abschnitten mittels PCR wurden Primer der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) mit den in Tabelle 12 angegebenen Sequenzen genutzt, wobei das erste Primerpaar die Cre-Sequenz der Knockout-Mäuse und das zweite Primerpaar das MYCBP2-Gen flankiert.

Tabelle 12: Sequenzen der zur Genotypisierung verwendeten Primer

Primer	Sequenz
290MYCBP2 fw	TGCCAAGAGGGTGCTAGGAATTGAACC
291MYCBP2 rev	TTAGCGCAAATTCTCGTCCTGCACC
296 Cre fw	GAAAGCAGCCATGTCCAATTTACTGACCGTAC
297 Cre rev	GCGCGCCTGAAGATATAGAAGA

Der generelle Reaktionsansatz für eine PCR mit *REDEExtract* setzt sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 13: Allgemeiner PCR-Ansatz für die Genotypisierung

Genomische DNA	1,0 µg
<i>REDEExtract-N-AMP PCR Reaction Mix</i>	10 µL
Forward-Primer	0,4 µM
Reverse-Primer	0,4 µM
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	X
Gesamtvolumen	20 µL

Um die gewünschte DNA zu amplifizieren wurde folgendes PCR-Programm gefahren:

MYCBP2(Primer 290/291)		SNS Cre (Primer 296/297)	
Temp.	Zeit	Temp.	Zeit
95°C	5 min	94°C	5 min
95°C	30 s	94°C	30 s
54°C	30 s	55°C	30 s
72°C	45 s	72°C	45 s
72°C	5 min	72°C	5 min
4°C	End	4°C	End

Die erwarteten Fragmentgrößen sehen folgendermaßen aus:

**Tabelle 14: Zu erwartende Fragmentgrößen zur Genotypisierung**

Primerpaar (Gen)	Wildtyp	Knockout
290/291 (MYCBP2)	530 bp	642 bp
296/297 (Cre)	--	200 bp

Zur Bestimmung ob MYCBP2 Knockout- oder Wildtyp-Mäuse vorliegen wird nun folgendermaßen vorgegangen:

Zuerst wird die SNS Cre-PCR gefahren und die PCR-Produkte mittels Agarose-Gel aufgespalten. Ist die 200 bp Bande sichtbar, handelt es sich um MYCBP2-Knockout-Mäuse. Da man beim Fehlen der Bande nicht unterscheiden kann, ob es sich um SNS Cre<sup>-</sup>-Mäuse handelt oder die DNA-Isolierung nicht funktioniert hat, wird anschließend die MYCBP2-PCR durchgeführt. Zeigt sich danach im Agarosegel eine Bande bei 530 bp, handelt es sich um eine Wildtyp-Maus. Ist dagegen keine Bande detektierbar, dann hat die DNA-Isolierung nicht funktioniert.

## 2.5.2. Zellbiologische Methoden

### 2.5.2.1. Kultivierung von Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde überwiegend mit der adhärenz Zellelinie HeLa gearbeitet. Die HeLa-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% FKS und den Antibiotika Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 µg/mL) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Zellkulturinkubator (HeraCell, Heraeus, Hanau) kultiviert. Die Größe der Kulturschale war variabel und hat sich nach der Verwendung der Zellen gerichtet.

**Tabelle 15: Verwendete Kulturschalen mit Verwendungszweck und eingesetzte Zellzahl**

Kulturschalengröße	Verwendungszweck	Zellzahl
150 mm Ø	Kultivierung	Konfluente Schale gesplittet: 1:5-10

100 mm Ø	Stimulationsversuche, Zellkern-Isolierung	1.500.000 Zellen in 10 mL Medium
35 mm Ø	siRNA Transfektion	150.000 Zellen in 2 mL Medium
35 mm Ø mit Deckglas	Immunhistochemie	50.000 Zellen in 100 µL Medium

Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dies erfolgte, indem der Zellrasen zuerst mit PBS gewaschen und anschließend durch die Inkubation mit 1 mM EDTA/PBS (5 min; 37°C) vom Schalenboden gelöst wurde. Nach Zentrifugation (3 min; 1.000 xg; RT) wurden die pelletierten Zellen mit einer Verdünnung von 1:5 in Kulturmedium resuspendiert und auf neuen Schalen plattiert.

Für verschiedene *in vitro* Assays wurde eine definierte Zellzahl benötigt. Dazu wurden die Zellen nach der Pelletierung mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt und entsprechend plattiert.

#### 2.5.2.2. Langfristige Lagerung und Auftauen von Zelllinien

Die langfristige Lagerung der Zelllinie erfolgt in flüssigem Stickstoff mit einem speziellen Einfriermedium (RPMI 1640; 10% FKS; 20% DMSO). Dazu wurden die Zellen vor Erreichen der Konfluenz zuerst wie oben beschrieben geerntet und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in Einfriermedium so resuspendiert, dass sich eine Konzentration von 1 Mio. Zellen/mL ergab und in Kryogefäße aliquotiert (1 mL pro Kryogefäß). Die Aliquots wurden in einer Gefrierkammer mit Isopropanolumgebung sukzessive (1°C/min) auf -80°C abgekühlt und zur Endlagerung in flüssigen Stickstoff gegeben.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryogefäße kurz in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt. Danach wurden die Zellen in 5 mL FKS überführt, mit Kulturmedium auf 15 mL aufgefüllt, pelletiert, in 5 mL Kulturmedium resuspendiert und schließlich auf einer Kulturschale (Durchmesser 150 mm) ausplattiert.

#### 2.5.2.3. Isolierung und Kultivierung primärer Neurone aus Dorsalwurzelganglien

Zur Kultivierung von Neuronen auf Deckgläsern mussten diese zuerst mit Poly-L-Lysin beschichtet werden, indem die Deckgläser am Vortag mit Poly-L-Lysin (1 mg/mL in Boratpuffer) bei RT inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden sie dreimal mit sterilem Wasser gewaschen und nach dem Trocknen bei 4°C gelagert. Zur Isolierung primärer Neurone wurden zuerst möglichst alle Dorsalwurzelganglien der Maus entnommen. Dazu wurde der Rückenmarkskanal geöffnet, das Rückenmark entfernt und so die Dorsalwurzelganglien frei gelegt, wodurch diese heraus präpariert und in eiskaltem HBSS (SIGMA, St. Louis, USA) gesammelt werden

konnten. Anschließend wurden die DRGs in Neurobasal Medium (Invitrogen, Carlsbad, USA), mit 500 U/mL Kollagenase (Biochrome AG, Berlin, Deutschland) und 2,5 U/mL Dispase II (Roche, Mannheim, Deutschland), überführt und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Das dadurch gelöste Gewebe wurde dann zweimal mit 10% FKS/Neurobasalmedium und einmal mit HBSS gewaschen und anschließend für 10 Minuten mit Trypsin/EDTA (SIGMA, St. Louis, USA) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 10% FKS/Neurobasalmedium wurden die Zellen in Neurobasalmedium mit 2 mM Glutamin, 0,1% Gentamycin, 1% Pen/Strep und B27, resuspendiert und je 50 µL auf Poly-L-Lysin (SIGMA, St. Louis, USA) beschichteten Deckgläsern ausplattiert.

### 2.5.3. Proteinbiochemische Methoden

#### 2.5.3.1. Proteinlysate

##### **Aus adhärent wachsenden Zellen**

Die Lyse adhärent wachsender Zellen erfolgte nach Waschen der Zellen mit PBS entweder durch direktes Ernten mit heißem 4x Lämmli-Puffer oder durch das Lösen der Zellen mit 1 mM EDTA/PBS vom Schalenboden und anschließender Zugabe des Lysepuffers zum Zellpellet. Eine Homogenisierung des Lysats wurde durch Ultraschallbehandlung (3 mal 10 s, Puls 7; 50% Leistung; Sonoplus Bandelin, Berlin) erreicht. Falls nötig wurden unlösliche Zelltrümmer durch Pelletierung (5 min; 14.000 xg; 4°C) entfernt. Die Lämmli-Lysate wurden für 5 Minuten bei 95°C gekocht und anschließend bis zur SDS-PAGE bei -80°C gelagert. Die Lysate in Lysepuffer wurden direkt aliquotiert und bei -80°C gelagert.

##### **Aus Gewebeproben**

Das zu untersuchende Gewebe wurde entnommen und entweder direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder kurz in HBSS gelagert, dann pelletiert und anschließend schockgefroren. Bei Bedarf wurde dann Lysepuffer auf das Gewebe gegeben und mittels Ultraschall (3 mal 10 s; Puls: 7; 50% Leistung) homogenisiert. Unlösliche Bestandteile und Zelltrümmer wurden anschließend zentrifugativ separiert (14.000 xg; 5 min; 4°C) und verworfen. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### 2.5.3.2. Zellkern Isolierung

Die Isolierung der Zellkerne aus HeLa-Zellen wurde mit Hilfe des *Nuclei Isolation Kit* von SIGMA gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die isolierten Zellkerne

wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert, während die cytosolischen Fraktionen auf 2 mL aufkonzentriert und erst dann eingefroren wurden. Zur Lyse der Zellkerne wurde der Aufbewahrungspuffer durch Zentrifugation entfernt, das Pellet in Zellkern-Lysepuffer resuspendiert, für 30 s bei maximaler Geschwindigkeit gevortext und anschließend bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 30 Minuten rotierend inkubiert. Zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile wurde das Lysat 2 Minuten bei  $14.000 \times g$  zentrifugiert. Danach konnte es aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

#### 2.5.3.3. Proteinbestimmung nach Bradford

Proteinkonzentrationen wurden mit der Methode von Bradford bestimmt. Diese Methode basiert auf der Komplexbildung des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau mit unpolaren und kationischen Seitenketten von Proteinen in saurer Lösung. Diese Komplexbildung führt zur Stabilisierung der blauen Sulfonatform des Farbstoffes und damit zur Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm auf 595 nm. Diese Verschiebung korreliert mit der vorhandenen Proteinmenge und kann photometrisch bestimmt werden. Da die Farbänderung proteinabhängig ist, wurde zur Kalibrierung eine Verdünnungsreihe mit BSA herangezogen, die BSA-Mengen von 0 bis  $5 \mu\text{g}$  Protein in einem Volumen von  $10 \mu\text{L}$  enthielt. Die zu vermessenden Proben wurden bis zu 1:10 mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  auf ein Volumen von  $10 \mu\text{L}$  verdünnt und zusammen mit den Kalibrierungswerten mit  $190 \mu\text{L}$  Bradford-Reagenz versetzt. Der Farbumschlag wurde 5 Minuten nach Zugabe des Bradford Reagenz (SIGMA-Aldrich, St. Louis USA) bei einer Wellenlänge von 595 nm mit einem *Microplate Reader* Modell 550 von BioRad (BioRad, München) bestimmt.

#### 2.5.3.4. SDS PAGE

Zur größen-spezifischen Analyse von Proteingemischen wurde die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*SDS PAGE; sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) verwendet, bei der das SDS die Eigenladung der Proteine überdeckt und so eine Trennung des Gemischs nach der Molekülmasse im elektrischen Feld möglich ist. Dazu wurden  $20\text{-}30 \mu\text{g}$  der zu untersuchenden Lysate mit der entsprechenden Menge an 4x Lämmli-Puffer versetzt und anschließend 5 Minuten auf  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Anschließend wurden die Proben zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker (PeqLab, Erlangen) auf ein diskontinuierliches Polyacrylamidgel aufgetragen (Trenngel: 7-15%, je nach der Größe des zu untersuchenden Proteins; Sammelgel: 4%) und die Elektrophorese bei  $10\text{-}20 \text{ V/cm}$  für ca. 90 Minuten in Laufpuffer durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine

wurden dann entweder unspezifisch mit Coomassie-Blau angefärbt oder einzelne Proteine wurden spezifisch durch eine Western Blot Analyse nachgewiesen.

#### 2.5.3.5. Coomassie Färbung

Die Coomassie Färbung dient der unspezifischen Detektion aller Proteine auf einem *SDS PAGE* Gel. Die Färbung basiert auch hier auf der Bindung des Coomassie-Brilliant-Blau-Farbstoffs an die basischen Seitenketten der Aminosäuren.

Die Färbung erfolgte durch Erhitzen des Elektrophoresegels in der Coomassie-Lösung. Danach wurde das Gel wieder durch Erhitzen mit Entfärbelösung entfärbt und mit Wasser gewaschen, so dass nur noch eine Färbung der Proteinbanden vorlag. Anschließend wurde das Gel digital dokumentiert.

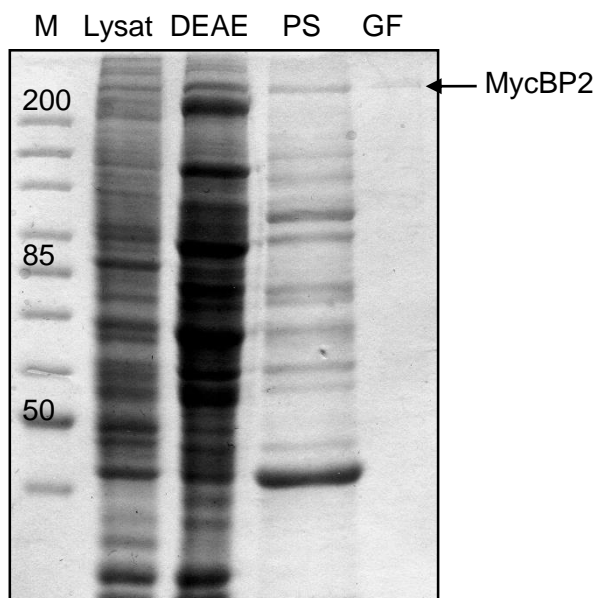
#### 2.5.3.6. Proteinaufreinigung

##### **Native MycBP2-Aufreinigung mittels FPLC**

Zur Aufreinigung von nativen MYCBP2 wurde das Verfahren nach Scholich et al modifiziert. Das Protein wurde aus HeLa-Zellen mittels *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) aufgereinigt. Die Zellen von 50 konfluenten 150 mm Schalen mit 1 mM EDTA/PBS wurden geerntet, pelletiert und bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wurden die Zellen wieder aufgetaut, mit 10 mL MYCBP2-Lysepuffer resuspendiert und durch Ultraschall (3x; 10 s; 50 % Leistung; Puls 7; Sonoplus Bandelin, Berlin) sonifiziert. Um unlösliche Bestandteile zu entfernen wurde das Lysat zentrifugiert (18.000xg; 10 min; 4°C), der Überstand abgenommen und das Pellet erneut resuspendiert. Diese Lyseprozedur wurde insgesamt fünfmal wiederholt. Der vereinigte Überstand wurde anschließend auf eine mit Tris-NaCl Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,9; 9 mM NaCl) voräquibrierte DEAE-Sephrose-Säule (Amersham Bioscience, Piscataway, USA) aufgetragen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte dann mittels eines NaCl-Gradienten (40 mM – 640 mM NaCl in 50 mM Tris/HCl pH 7,4) über 45 Minuten bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min. Es wurden 3 mL Fraktionen gesammelt, die mittels Coomassie-färbung (2.5.5.) auf ihre MYCBP2-haltigkeit überprüft wurden. MYCBP2 positive Fraktionen wurden vereinigt, ihr NaCl-Gehalt durch Zugabe von 4 M NaCl in 50 mM Tris/HCl pH 7,4 auf 1,8 M eingestellt und auf eine Phenylsepharose-Säule (äquibriert mit 1,8 M in 50 mM Tris/HCl pH 7,4; Amersham Biosciences, Piscataway, USA) aufgetragen. Gebundene Proteine wurden durch stufenweises Absenken der NaCl-Konzentration mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,5 mL/min eluiert, wobei die erste Stufe (1,3 M) dem Abtrennen von Verunreinigungen galt, während MYCBP2 erst in der zweiten Stufe



mit 0,6 M eluiert wird. MYCBP2-haltige Fraktionen wurden mittels Coomassie-Färbung identifiziert, vereinigt und mit einem Vivaspin 100 kDa (Sartorius, Göttingen) Filtrationsröhrchen auf ca. 1 mL aufkonzentriert. Nach Lagerung über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  wurde das Eluat langsam auf Eis aufgetaut, mit 50 mM Tris/HCl pH 7,4 auf 2 mL aufgefüllt und auf eine SuperDex PG200 Gelfiltrationssäule (äquibriert mit 50 mM Tris/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, über Nacht; Amersham Biosciences, Piscataway, USA) mit einer Flussrate von 0,5 mL/min geladen. MYCBP2 passierte nach etwa 40 mL die Säule. MYCBP2-haltige Fraktionen wurden erneut durch SDS-PAGE und Coomassiefärbung identifiziert, vereinigt und mit einem Vivaspin 100 kDa Filtrationsröhrchen auf ein Volumen von ca. 50  $\mu\text{L}$  konzentriert. Nach Aliquotation erfolgte die Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Abbildung 10: Coomassie-Gel zum Verlauf der nativen MycBP2-Aufreinigung**

Nach jedem Reinigungsschritt wurde ein Aliquot für die Auftrennung auf einem 10% SDS-PAGE Gel abgenommen. Nach dem Lauf wurde das Gel mit Coomassie-blau-Färbelösung gefärbt, um die Reinheit der Aufreinigung zu überprüfen. Zell-Lysat (30  $\mu\text{g}$ ); DEAE: Diethylaminoethyl-Sepharose Säule (15  $\mu\text{g}$ ); PS: Phenylsepharose Säule (5  $\mu\text{g}$ ); GF: Gelfiltrationssäule (0,5  $\mu\text{g}$ ). Angabe in Klammern: aufgetragener Proteinmenge

## Aufreinigung rekombinanter His-tag Proteine

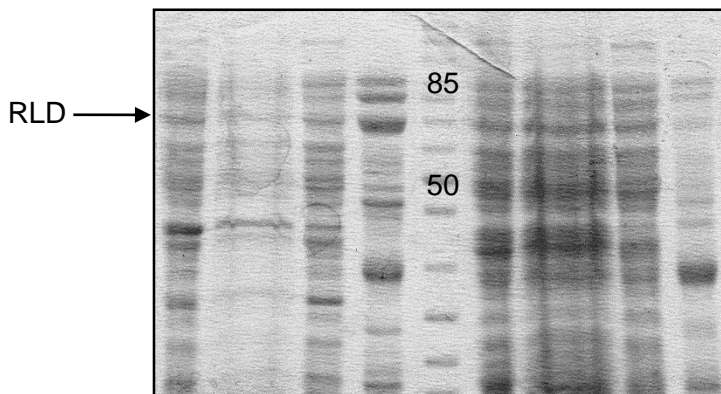
### RLD-Aufreinigung mittels Nickelaffinitätschromatographie

Zur Aufreinigung der RCC1-ähnlichen Domäne des MycBP2 musste neben der eigentlichen Proteindomäne als Kontrolle zusätzlich Proteinlysate aus Bakterien, transformiert mit einem leeren TrcHis-Vektor, aufgereinigt werden. Beide Kulturen und Lysate wurden gleich behandelt.

Die Proteinexpression wurde in beiden Kulturen gemäß Tabelle 11 induziert. Nach 15 Stunden Wachstumszeit bei  $23^{\circ}\text{C}$  wurden die Zellen für 10 Minuten bei  $5.000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  pelletiert. Anschließend wurde der Überstand gründlich entfernt und das Pellet entweder direkt in 20 mL RLD-Lysepuffer resuspendiert oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Nach der Resuspension erfolgte dann die Zellyse mittels Sonifikation

(10x 15 s; puls 7; 70%) und die unlöslichen Bestandteile wurden zentrifugativ (27.000; 30 min; 4°C) entfernt. Zum Binden des His-Tag markierten Proteins wurde das Lysat anschließend für eine Stunde mit 1 mL Ni-NTA-Agarose rotierend inkubiert. Danach wurde die Suspension auf eine Poly-Prep Chromatographie-Säule mit 10 mL Reservoir-Volumen gegeben und das entstehende Pellet zuerst mit 10 Säulenvolumen RLD-Waschpuffer 1 und anschließend mit 10 Säulenvolumen RLD-Waschpuffer 2 gewaschen. Die Elution erfolgte mit 3 Säulenvolumen Elutionspuffer. Das Volumen des Eluats wurde mit einem 2 mL Vivaspin 30 kDa Filtrationsröhrchen eingengt und der Puffer gegen 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 ausgetauscht. Beide Proteinlösungen wurden aliquotiert und bei 80°C gelagert. Die Aufreinigung erfolgte mit leichten Modifikationen nach Scholich et al. [21].

Lysat Pellet Wasch Ni M Lysat Pellet Wasch Ni



**Abbildung 11: Coomassie-Gel zum Verlauf der RLD-Aufreinigung**

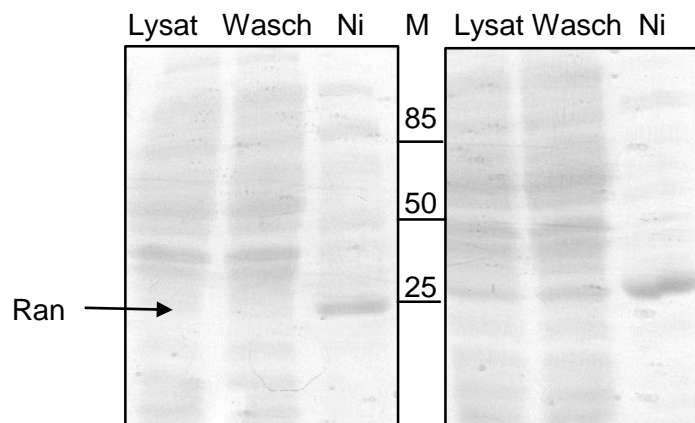
Zeitgleich zur RLD-Aufreinigung wurde auch Kontroll-TrcHis-Lysat aufgereinigt. Nach jedem Reinigungsschritt wurde ein Aliquot für die Auftrennung auf einem 10% SDS-PAGE Gel abgenommen. Nach dem Lauf wurde das Gel mit Coomassie-blau-Färbelösung gefärbt, um die Reinheit der Aufreinigung zu überprüfen. Zell-Lysat (30 µg); Pellet (15 µg); Wasch: Waschschrift (5 µg); Ni: Nickel-Affinität-Chromatographie (0,5 µg). Angabe in Klammern: aufgetragener Proteinmenge

### His-Ran-Aufreinigung mittels Nickelaffinitätschromatographie

His-getaggtetes Ran und die beiden Mutanten T24N und Q69L wurden ebenfalls mittels Nickelaffinitätschromatographie aus dem Pellet von einem Liter LB-Kultur aufgereinigt.

Die Proteinexpression wurde gemäß Tabelle 11 induziert. Nach drei Stunden Wachstumszeit bei 37°C wurden die Zellen für 10 Minuten bei 5.000 xg und 4°C pelletiert. Anschließend wurde der Überstand gründlich entfernt und das Pellet bei -80°C tiefgefroren. Zur Zellyse wurden die Pellets in 25 mL His-Ran Lysepuffer

mit 0,2 mg/mL Lysozym resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat sonifiziert (10x 15 s; puls 7; 70%) und die unlöslichen Bestandteile zentrifugativ (18.000 xg; 10 min; 4°C) entfernt. Zum Binden des His-Tag markierten Proteins wurde das Lysat anschließend für eine Stunde mit 1 mL Ni-NTA-Agarose rotierend inkubiert. Danach wurde im *batch*-Verfahren unspezifisch gebundenes Protein heraus gewaschen. Dazu wurde das Agarose-Pellet drei Mal in je 5-10 mL 50 mM Tris/HCL pH 8,0 und ein weiteres Mal in 5 mL His-Ran Lysepuffer resuspendiert, erneut pelletiert (18.000 xg; 5 min; 4°C) und der Überstand verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 5 mL Lysepuffer aufgenommen und auf eine Poly-Prep Chromatographie-Säule mit 10 mL Reservoir-Volumen überführt. Die Elution erfolgte mit 2 mL Elutionspuffer. Das Volumen des Eluats wurde mit einem 6 mL Vivaspin 10 kDa Filtrationsröhrchen eingeeengt und die Imidazol-Konzentration durch Zugabe von 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 auf einen Wert unter 0,001 verringert. Anschließend wurde der Puffer gegen den Transportpuffer inklusive GDP bzw. GTP ausgetauscht. Die Proteinlösungen wurden aliquotiert und bei 80°C gelagert. Die Aufreinigung erfolgte mit leichten Modifikationen nach Scholich et al. [21].



**Abbildung 12: Coomassie-Gel zum Verlauf der His-Ran T24N und Q69L-Aufreinigung**

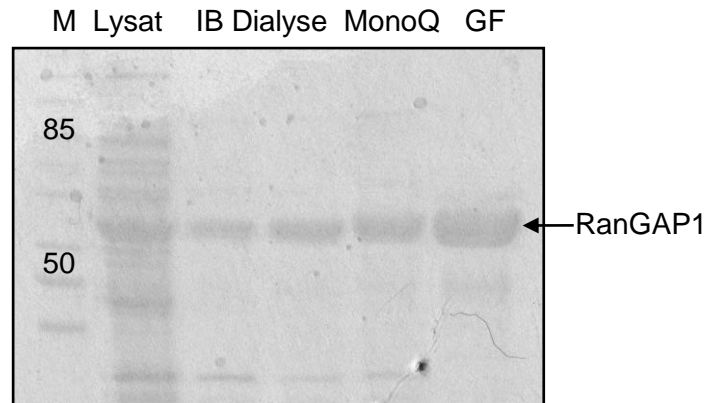
Nach jedem Reinigungsschritt wurde ein Aliquot für die Auftrennung auf einem 12% SDS-PAGE Gel abgenommen. Nach dem Lauf wurde das Gel mit Coomassie-blau-Färbelösung gefärbt, um die Reinheit der Aufreinigung zu überprüfen. Zell-Lysat (30 µg); Wasch: Waschschrift (5 µg); Ni: Nickel-Affinität-Chromatographie (0,5 µg). Angabe in Klammern: aufgetragener Proteinmenge

### Aufreinigung rekombinanter nativer Proteine

Sowohl die RanGAP1 als auch die Ran-Aufreinigung erfolgte mit leichten Modifikationen gemäß dem Protokoll von Melchior et al.

## Denaturierende Aufreinigung des RanGAP1

Die Proteinexpression erfolgte wie in Kapitel 2.4.1.8. beschrieben. Für die Aufreinigung wurde das Pellet von 2 L Übernachtskultur genutzt, welches zuvor in 50 mL RanGAP1-Lysepuffer aufgenommen und bei -80°C gelagert worden war. Nach dem Auftauen auf Eis wurden 1 mg/mL Lysozym, 1 mM DTT und die Proteaseinhibitoren (30 µg/µL Trypsininhibitor; 5 mM Benzamidin; 1 mM PMSF; 5 µg/mL Aprotinin) zugegeben. Nach Inkubation auf Eis bis zum Erreichen einer hohen Viskosität wurde das Lysat 1 Stunde bei 55.000xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mittels eines Glashomogenisators in 50 mL kaltem Waschpuffer resuspendiert und durch Ultraschall homogenisiert (auf Eis; dreimal; 65%; 15 s; kein Puls). Nach erneuter Pelletierung (20 min; 55.000xg; 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet nochmal mit 50 mL Waschpuffer und einmal mit 50 mL Harnstoffwaschpuffer gewaschen. Nach der abschließenden Zentrifugation (20 min; 55.000xg; 4°C) wurde das Pellet in den Glashomogenisator überführt und mit 50 mL zimmertemperaturwarmen Harnstoffpuffer solubilisiert. Die nächste Zentrifugation erfolgte dann bei Raumtemperatur (20 min; 55.000xg). Anschließend wurde der Überstand gegen 2 L zimmertemperaturwarmen Dialysepuffer bei 4°C dialysiert. Nach 2 Stunden wurden der Puffer gegen frischen, 4°C kalten Dialysepuffer ausgetauscht und über Nacht weiter dialysiert, wobei am nächsten Morgen der Puffer nochmal gewechselt wurde. Nach weiteren 3 Stunden Dialyse wurde das Dialysat 45 Minuten bei 55.000xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand auf eine zuvor mit 150 mM NaCl in 50 mM Tris/HCl pH 7,4 äquibrillierte MonoQ-Säule mit einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen. Nach einem Waschschriff mit 300 mM NaCl, wurde das RanGAP1 mit 1 M NaCl von der Säule eluiert. RanGAP1-haltige Fraktionen wurden mittels *SDS-PAGE* und Coomassie-Färbung identifiziert und mit 30 kDa Amicon Filtrationsröhrchen auf ein Volumen von 1 mL aufkonzentriert. Das Konzentrat wurde mit Transportpuffer auf 10 mL verdünnt und anschließend erneut auf 1 mL aufkonzentriert. Das Volumen des Konzentrats wurde mit Transportpuffer auf 2 mL eingestellt und anschließend wurde diese Verdünnung auf eine mit Transportpuffer äquibrillierte SuperDex-Säule aufgetragen. Nach ca. 77 mL Transportpuffer konnten RanGAP1-haltige Fraktionen identifiziert werden. Diese wurden bis zu einem Volumen von ca. 100 µL mit einem Vivaspin 10 kDa Filtrationsröhrchen aufkonzentriert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.



**Abbildung 13: Coomassie-Gel zum Verlauf der RanGAP1-Aufreinigung**

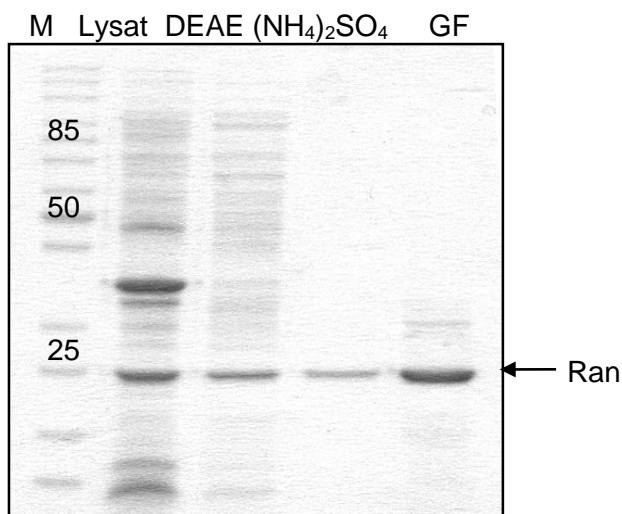
Nach jedem Reinigungsschritt wurde ein Aliquot für die Auftrennung auf einem 10% SDS-PAGE Gel abgenommen. Nach dem Lauf wurde das Gel mit Coomassie-blau-Färbelösung gefärbt, um die Reinheit der Aufreinigung zu überprüfen. Zell-Lysat (30 µg); IB: *Inclusion Bodies* (15 µg); Dialyse: Zur Renaturierung (5 µg); MonoQ: Anionentauscher (0,5 µg)GF: Gelfiltrationssäule (0,5 µg). Angabe in Klammern: aufgetragener Proteinmenge

### Native Aufreinigung des Ran

Bei der Ran-Überexpression war neben der Zugabe von  $MgCl_2$  und Glucose zur Verminderung der Ran-Toxizität, zu beachten, dass die Ran Plasmid-DNA vor jeder Überexpression frisch in BL21 Zellen transformiert wurde.

Das gefrorene Pellet von 2 L LB-Kultur wurde in 50 mL kaltem Ran-Lysepuffer gründlich resuspendiert und so lange auf Eis inkubiert bis das Lysat stark viskos war. Anschließend wurde das Lysat so lange mittels Ultraschall homogenisiert (auf Eis; 65%; 15 s; Puls 9) bis die Viskosität derer von Wasser ähnelte. Nach einer Pelletierung der unlöslichen Bestandteile (18.000xg; 10 min; 4°C) wurde das Pellet in 10 mL Lysepuffer resuspendiert und sonifiziert. Nach erneuter Pelletierung wurden die Überstände vereint und auf ein Volumen von 50 mL mit Lysepuffer verdünnt. Danach wurde das Lysat mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min auf eine mit 10 mM NaCl in Ran-Puffer A äquibriillierte DEAE-Säule aufgetragen. Ran konnte mit 150 mM NaCl von der Säule eluiert werden. Zum Eluat wurde dann bei 4°C gesättigte Ammoniumsulfatlösung zu getropft bis eine 53%ige Sättigung erreicht war. Diese Lösung wurde dann über Nacht bei 4°C rühren gelassen. Am nächsten Morgen wurde das Präzipitat bei 29.000 rpm und 4°C für 20 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 mL kaltem, 250 µM GDP-haltigem Transportpuffer resuspendiert und bei 18.000xg und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit Transportpuffer äquibriillierte SuperDex-Säule mit einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen. Ran-haltige Fraktionen konnten nach 95 mL Puffer eluiert

und mittels *SDS-PAGE* und Coomassie-Färbung identifiziert werden. Anschließend wurden sie auf ein Volumen von ca. 100  $\mu\text{L}$  aufkonzentriert, aliquotiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.



**Abbildung 14: Coomassie-Gel zum Verlauf der Ran-Aufreinigung**

Nach jedem Reinigungsschritt wurde ein Aliquot für die Auftrennung auf einem 10% *SDS-PAGE* Gel abgenommen. Nach dem Lauf wurde das Gel mit Coomassie-blau-Färbelösung gefärbt, um die Reinheit der Aufreinigung zu überprüfen. Zell-Lysat (30  $\mu\text{g}$ ); DEAE: Diethylaminoethyl-Sepharose Säule (15  $\mu\text{g}$ );  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : Ammoniumsulfat-Fällung (5  $\mu\text{g}$ ); GF: Gelfiltrationssäule (0,5  $\mu\text{g}$ ). Angabe in Klammern: aufgetragener Proteinnmenge

#### 2.5.3.7. Ubiquitylierungsassay

Die Ubiquitylierung dient der Markierung von Zielproteinen, so führt z.B. eine Polyubiquitylierung über Lys48 überwiegend zu einer proteosomalen Degradation, wohingegen eine Monoubiquitylierung die intrazelluläre Lokalisation beeinflusst.

Die Ubiquitylierung besteht aus einem dreischrittigen Prozess. Zuerst erfolgt eine Aktivierung des Ubiquitins unter ATP-Verbrauch durch das E1-Enzym. Danach wird das Ubiquitin auf ein Carrier-Protein, genannt E2 übertragen. Zum Schluss verknüpft die E3-Ligase das Ubiquitin mit dem Zielprotein, wobei jedes Zielmolekül sein eigenes E3-Enzym besitzt.

Um zu überprüfen, ob es sich bei MYCBP2 um die E3-Ligase für Ran oder RanGAP1 handelt, wurde ein Ubiquitylierungsassay durchgeführt.

Dazu wurden 2,3  $\mu\text{g}$  Ubiquitin mit 50 nM rekombinanten humanen E1 Enzym (Boston Biochem; Cambridge), 750 nM UbcH5c E2 (SIGMA, St. Louis) und 100 nM MYCBP2 mit 5  $\mu\text{g}$  des entsprechenden Proteins in Ubiquitylierungs-Puffer bei einem Gesamtvolumen von 12  $\mu\text{L}$  für 90 Minuten bei  $27^\circ\text{C}$  inkubiert. Zur Überprüfung der Ubiquitylierung von TSC2 wurden zusätzlich 20  $\mu\text{g}$  HeLa-Lysat zugegeben. Die Reaktion wurde mit 4  $\mu\text{L}$  4x Lämmli-Puffer abgestoppt und die Proben direkt für 5 Minuten auf  $95^\circ\text{C}$  erhitzt. Zur weiteren Analyse wurde ein Western Blot durchgeführt (siehe 2.6.1.). Es wurde immer der komplette Reaktionsansatz für die *SDS PAGE* genutzt, das verwendete Gel richtete sich aber nach dem zu analysierenden Protein.

Wurde eine Autoubiquitylierung nur mit MYCBP2 durchgeführt, so wurde ein 7%iges Gel genutzt, die Ubiquitylierung von RanGAP1 wurde mit einem 10%igen Gel untersucht und die von Ran mit einem 12%igen Gel. Das Blotting erfolgte für 1 Stunde bei 4°C, das Blockieren mit 3% BSA in für 1 Stunde bei RT. Die Inkubation mit Primäranitkörper erfolgte über Nacht bei 4°C, wobei die Antikörperkonzentration Tabelle 4 entnommen werden kann. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit Sekundäranitkörper (1:5000 verdünnt; In 1% BSA in TNT) für 1 Stunde bei RT und nach fünfmaligem Waschen das Entwickeln mit Hilfe von ECL-Reagenz.

#### 2.5.3.8. SUMOylierungsassay

Die SUMOylierung von RanGAP1 mit MYCBP2 wurde entsprechend der Herstellerangaben mit dem SUMOylierungs-Kit von Enzo Life Sciences (Enzo Life Sciences GmbH; Lörrach) durchgeführt. Die Analyse der Proben erfolgte per Western Blot (siehe 2.6.1.). Auch hier wurde immer der komplette Reaktionsansatz und ein 10%iges Gel für die SDS PAGE genutzt. Das Blotting erfolgte für 1 Stunde bei 4°C, das Blockieren mit 3% BSA in TNT für 1 Stunde bei RT. Die Inkubation mit Primäranitkörper erfolgte über Nacht bei 4°C, wobei die Antikörperkonzentration Tabelle 4 entnommen werden kann. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit Sekundäranitkörper (1:5000 verdünnt; In 1% BSA in TNT) für 1 Stunde bei RT und nach fünfmaligem Waschen das Entwickeln mit Hilfe von ECL-Reagenz.

#### 2.5.3.9. siRNA-Transfektion

Zur Hemmung der RanGAP1-Expression wurden verschiedene Zellsysteme mit humanen bzw. murinem SmartGenome siRNA RanGAP1-Pool und zur Kontrolle mit Non-targeting siRNA # 2 bzw. FAM-labeled Non-targeting siRNA transfiziert.

#### **siRNA-Transfektion in DRGs**

Die Transfektion in DRGs wurde als Kotransfektion konzipiert. Sämtliche DRGs einer Bl6-Maus wurden wie in Abschnitt 2.5.2.3 beschrieben isoliert und kultiviert. Pro Maus wurden Zellen auf fünf Deckgläsern ausplattiert. Die Zellen sollen mit 50 nM siRNA in einem Endvolumen von 2,5 mL transfiziert werden. Daher wurde nach vier Tagen Anwachszeit das Medium gegen 2,3 mL frisches Neurobalsamedium mit B27 pro Deckglas ausgetauscht. Pro Ansatz wurden 5 µL siPORTAmine mit 100 µL Neurobasalmedium versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2,5 µL der FAM-labeled Non-targeting siRNA (50 µM Stock) bzw. 2,5 µL der RanGAP1 siRNA (50 µM Stock) und 0,25 µL der FAM-labeled Non-targeting siRNA (50 µM Stock) auch mit 100 µL Neurobasalmedium pro Ansatz versetzt. Danach

wurde die verdünnte siRNA zum verdünnten siPORT zugegeben, die Lösung gut vermischt und vorsichtig auf die entsprechenden Deckgläser getropft. 24 h nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und 48 h nach der Transfektion erfolgte die Inkubation mit FKS mit abschließender Immunfärbung für MycBP2 bzw. RanGAP1

### **siRNA-Transfektionen in HeLa-Zellen**

Zur Transfektion von HeLa-Zellen wurden für eine spätere Analyse der Proteinexpression 50.000 Zellen in 100  $\mu$ L Medium auf Deckgläsern bzw. 150.000 Zellen in 6 *well* Schalen in Kulturmedium ausplattiert. Nach vier Stunden Anwachszeit wurde das Medium gegen serumfreies Medium ausgetauscht. Am nächsten Morgen wurde das Medium gegen 3,6 mL frisches serumfreies Medium ausgetauscht. 12  $\mu$ L der RanGAP1 bzw. Non-Target siRNA-Stocks (10  $\mu$ M) wurden in 4 mL Medium gegeben und mit 60  $\mu$ L Turbofect versetzt. Nach mehrmaligem Durchmischen und 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde je 400  $\mu$ L verdünnte siRNA pro Schale zugegeben. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Stimulation mit 10% FKS. Nach 30 min wurden die Zellen aus den 6 *well* Schalen für einen Western Blot geerntet und die Deckgläschen zur Durchführung von Immunfärbungen für MycBP2 benutzt.

#### 2.5.3.10. GTPase Assays

Ran funktioniert als molekularer Switch, in dem es zwischen seiner GTP und seiner GDP gebunden Form zirkuliert. Um physiologisch bedeutsame Umsetzungsraten zu erzielen ist Ran sowohl von einer GAP für die Hydrolyse von GTP als auch von einer GEF für den Austausch von GDP gegen GTP abhängig. Um nun die GAP Aktivität eines Proteins bestimmen zu können wurde hier der stationäre GTPase Assay herangezogen, während die GEF-Aktivität von Proteinen durch einen  $^{35}\text{S}$ -GTP Bindungsassay bestimmt wurde.

#### 2.5.3.11. Stationärer GTPase Assay

Im stationären GTPase Assay wird die durch Hydrolyse freigesetzte ortho-Phosphat Menge pro Zeiteinheit bestimmt. Dies dient zum einen der Bestimmung der intrinsischen GTPase-Aktivität von G-Proteinen und zum anderen der Untersuchung möglicher GTPase aktivierender Proteine.

Je nach Ansatz wurden 25 nM MYCBP2 und 100 nM RanGAP1 bzw. SUMOyliertes RanGAP1 oder beide zusammen mit 1  $\mu$ L  $\gamma^{32}\text{P}$ -GTP und 100 nM GTP versetzt und im GTPase-Puffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die



GTPase-Reaktion durch Zugabe von 2  $\mu\text{M}$  Ran gestartet. Nach einem zuvor definierten Zeitintervall wurde die Reaktion durch Zugabe von 850  $\mu\text{L}$  GTPase-Stop-Puffer gestoppt. Die Aktivkohle im Stop-Puffer bindet sowohl alle Proteine als auch die Nukleotide, nur freies Phosphat bleibt in Lösung und kann dadurch quantifiziert werden. Dazu wurde die Aktivkohle mehrmals pelletiert (13.000 RPM; 5 min; RT) und je 200  $\mu\text{L}$  des Überstandes mit 3 mL Szintillationsflüssigkeit versetzt. Abschließend wurden die Proben im *Liquid Scintillation Analyzer* Tri-Carb 2900TR (PerkinElmer, Waltham, USA) vermessen, wobei bei jeder Messung eine definierte Menge an  $\gamma^{32}\text{P}$ -GTP für die spätere Auswertung mit gemessen wurde.

#### 2.5.3.12. Ein-Zyklus-GAP-Assay

Der Ein-Zyklus-GTPase-Assay nach Kehlenbach bezieht sich ebenso auf die freigesetzte ortho-Phosphat Menge pro Zeiteinheit. Im Gegensatz zum stationären GTPase-Assay wird in diesem Assay auf Grund der vorherigen Beladung von Ran mit GTP nur die Hydrolyse und nicht der gesamte GTPase-Zyklus betrachtet. Während ein Anstieg an freiem Phosphat im stationären Assay entweder auf eine GEF-Aktivität oder einer Aktivierung der GAP-Aktivität zurückgeführt werden kann, zeigt dieser Assay nur eine Steigerung der Hydrolyse, also eine Zunahme der GAP-Aktivität.

Zum Beladen des Ran mit aus  $\gamma^{32}\text{P}$ -GTP wurden 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  Ran in Transportpuffer mit 10 mM EDTA, 2 mM DTT und 20  $\mu\text{M}$  GTP aus einem Stock bestehend aus 200  $\mu\text{M}$  GTP, 17 nM  $\gamma^{32}\text{P}$ -GTP, 20 mM  $\text{MgCl}_2$  und 20 mM Hepes/KOH pH 7,3, für 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 50 mM  $\text{MgCl}_2$  zugegeben und das Volumen mit Transportpuffer auf das doppelte verdünnt.

Für den eigentlichen GAP-Assay wurden 2  $\mu\text{M}$  Ran mit 400  $\mu\text{M}$  GTP, 100 nM RanGAP1 und gegebenenfalls 35 nM MycBP2 in Reaktionspuffer (36 mM Tris/HCl pH 8,0; 75 mM NaCl; 6 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1 mM DTT) bei einem Volumen von 40  $\mu\text{L}$  pro Ansatz für 10 Minuten bei RT inkubiert. Um die Hydrolyse abzustoppen wurde 1 mL GTPase-Stopp-Puffer zugegeben. Das freie Phosphat wurde wie in Abschnitt 2.5.3.11 beschrieben aus 500  $\mu\text{L}$  des Überstandes bestimmt.

#### 2.5.3.13. $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP Bindungsassay

Die Dissoziation des GDPs von Ran zum Austausch gegen GTP verläuft nur sehr langsam und muss um relevante Raten zu erreichen durch einen GEF katalysiert werden. Um nun die GEF-Aktivität eines Proteins validieren zu können wird der  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP Bindungsassay herangezogen. Dabei wird das G-Protein mit dem möglichen

GEF und  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP inkubiert und nach Schnell-Filtration die aufgenommene Nukleotidmenge gemessen.

Je nach Ansatz wurden 150  $\mu\text{L}$   $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindungsassay-Puffer mit 15  $\mu\text{M}$  GDP und 2  $\mu\text{M}$  Ran pro Kavität in einer Multi Screen<sub>HTS</sub> FB 96-well Filtrationsplatte (Millipore, Billerica US) vorgelegt und mit 100 nM RanGAP1 bzw. variierenden MYCBP2-Konzentrationen (1 – 50 nM) oder einer äquivalenten Menge der RCC1-ähnlichen Domäne versetzt. Anschließend wurden 100  $\mu\text{L}$  Assay-Puffer mit 1 nM  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP zugegeben und die Ansätze 30 Minuten bei RT schüttelnd inkubiert. Nach sechsmaligem waschen mit je 250  $\mu\text{L}$  Assay-Puffer wurde der Plattenboden entfernt und die Platte bei 45°C getrocknet. Pro Kavität wurden 30  $\mu\text{L}$  Szintillationsflüssigkeit (Quicksafe A; Zinsser Analytic; Frankfurt am Main) zugegeben und am 2450 Microplate Counter Micro Beta2 (PerkinElmer, Waltham, USA) vermessen. Bei jeder Messung wurde eine definierte Menge an  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP für die spätere Auswertung mit gemessen. Außerdem wurde bei Verwendung der RCC1-ähnlichen Domäne als Kontrolle zusätzlich noch Lysat der leeren TrcHis-Kulturen vermessen.

## 2.5.4. Immunologische Methoden

### 2.5.4.1. Western Blot Analyse

Die Western Blot Analyse ist ein Verfahren, bei dem Proteine auf eine Trägermembran übertragen werden und anschließend u.a. mithilfe von spezifischen Antikörpern immunologisch nachgewiesen werden können.

Die Übertragung der größenspezifisch aufgetrennten Proteine erfolgte mittels Elektrophorese in einer *Wet-Blotting* Apparatur (BioRad, München) bei einer konstanten Spannung von 100 V für 70 Minuten bzw. von 10 V für 16 Stunden von dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran. Um unspezifische Antikörperbindungen an freie Bindestellen auf der Membran zu vermeiden, wurde die Membran danach für 60 Minuten mit 3% BSA bzw. 5% Milchpuffer in TN-Puffer blockiert. Danach wurde die Membran gemäß der nachfolgenden Tabelle mit dem für das Zielprotein spezifischen Primärantikörper über Nacht bei 4°C oder 1,5 Stunden bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TNT-Puffer erfolgte die Inkubation der Membran mit Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Sekundär-antikörper (Verdünnung: 1:5.000 in TNT; 1% BSA), der sich nach dem Host des Primärantikörpers richtet, für 1 Stunden bei RT. Danach wurde fünfmal für 5 Minuten mit TNT-Puffer gewaschen, um ungebunden Antikörper zu entfernen. Zur Detektion des Zielproteins wurde die Membran für 1 Minute mit *ECL Western Blotting Detection*

Reagenz (GE Healthcare) inkubiert, woraufhin die auftretende Chemolumineszenz durch Exposition auf einen Röntgenfilm übertragen wurde.

Nach dem Scannen mit einem Epson *Perfection V10* Scanner wurden die Blots mit dem Programm *ImageJ* densitometrisch ausgewertet. Dazu wurde die zu analysierende Bande markiert, deren Pixeldichte geplottet, die Grundlinie eingezeichnet und die Fläche unter der Kurve bestimmt. Anschließend wurden die so ermittelten Werte noch auf eine Ladekontrolle bezogen. Um Signifikanzen zu bestimmen und die Ergebnisse zu validieren, wurden die Versuche mindestens dreimal wiederholt.

Um weitere Proteine auf der gleichen Membran zu detektieren, wurde die Membran mit zuerst gestrippt. Dazu wurde die Membran für 30 Minuten mit 50°C warmen Strippingpuffer inkubiert, anschließend zuerst mit Wasser und danach mit TNT-Puffer gewaschen und erneut blockiert und mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert.

#### 2.5.4.2. Immunhistochemie mit DRG-Schnitten

Die Immunhistochemie ist eine Methode, um spezifische Proteine in Gewebsschnitten nachzuweisen, um so deren Lokalisation oder Verteilung zu analysieren.

Zur Analyse von Proteinen in DRGs wurden diese präpariert und entweder unfixiert direkt in Einfriermedium (*Tissue Freezing Medium*, Jung, Leica instruments, Nussloch) überführt und auf Trockeneisschockgefroren oder nach dem Präparieren mit 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert, mit Glucose inkubiert und danach im Einfriermedium eingebettet. Nachdem die Gewebssproben ausgehärtet waren, konnten mit einem Kryostaten (Leica CM 3050 S, Leica, Nussloch) 10-15 µm dünne Gefrierschnitte hergestellt werden, die dann auf Objektträger (SuperFrost, Menzel-Gläser, Braunschweig) überführt und nach kurzem antrocknen bei -80°C gelagert wurden. Für die Immunfärbung wurden die Gewebsschnitte zuerst für 10 Minuten mit 4%iger PFA-Lösung fixiert und nach 10 minütigem Waschen mit PBS mit 0,1% Triton X-100/PBS permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte zuerst das Blockieren mit 3%BSA in PBS-T für 1 Stunde bei RT, dann mehrere kurze waschschritte mit PBS-T und anschließend die Inkubation mit Primärantikörper, der gemäß nachfolgender Tabelle angesetzt war, für 1,5 Stunden bei RT. Danach wurde wieder mit PBS-T gewaschen und die Schnitte mit dem, dem Host des Primärantikörpers entsprechenden, fluoreszenzmakiertem Sekundärantikörper (Verdünnung: 1:500 in 1%BSA/PBS-T) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellkerne mit DAPI (1 µg/mL) angefärbt und der Hintergrund mit einer Sudan-Schwarz-Färbung (0,06% in 70% EtOH) minimiert. Zum Schluss wurden

die Schnitte unter einem Deckglas (Marienfeld, Lauda Königshofen) in Fluoromount G (Southern Biotech, Birmingham, USA) eingebettet. Nach dem Aushärten wurde die Proteinverteilung anhand der Fluoreszenz mit Hilfe eines Axio Observer.Z1 Mikroskops und der Kamera AxioCam analysiert und dokumentiert.

#### 2.5.4.3. Immunzytochemie mit HeLa-Zellen

Die Lokalisation von Proteinen innerhalb von kultivierten Zellen kann mittels der Immunzytochemie analysiert werden.

Die HeLa-Zellen wurden wie in Kapitel 6.1 beschrieben auf sterilen Deckgläschen (50.000 Zellen pro Deckglas; 100 µL Volumen; Mediumwechsel nach 2 Stunden Anwachszeit) über Nacht kultiviert und gegebenenfalls wie in der nachfolgenden Tabelle angegeben stimuliert. Die Immunfärbung erfolgte, nachdem die Zellen mit 4% PFA-Lösung für 10 Minuten bei RT fixiert, mit Triton X-100/PBS permeabilisiert und mit 3% BSA/PBS für 1 Stunde bei RT blockiert wurden. Die Inkubation mit Primärantikörper erfolgte für 1,5 Stunden bei RT mit einer nach dem Antikörper gerichteten Verdünnung (siehe Tabelle 4). Die Inkubation mit Sekundärantikörper (Verdünnung: 1:500; 1% BSA/PBS-T) folgte dann nach mehrmaligem Waschen mit PBS für eine Stunde bei RT. Auch hier wurden die Kerne wieder mit DAPI angefärbt (Bedingungen), bevor die Zellen in Fluoromount G auf einem Objektträger eingebettet wurden. Nach dem Austrocknen wurde die Proteinverteilung anhand der Fluoreszenz mit Hilfe eines Axio Observer.Z1 Mikroskops und der Kamera AxioCam analysiert und dokumentiert.

#### 2.5.4.4. Nachweis der MYCBP2-Translokation

Zum Nachweis der MYCBP2-Translokation wurden HeLa-Zellen wie im vorherigen Abschnitt beschrieben kultiviert. Jedoch wurde das Medium nach den 2 Stunden Anwachszeit gegen serumfreies Medium ausgetauscht. DRG-Neurone wurden wie bereits beschrieben kultiviert. Am nächsten Morgen wurde das Medium gegen 10% FKS haltiges Medium bzw. als Kontrolle gegen serumfreies Medium ausgetauscht. Nach 30 min Inkubation in HeLa-Zellen bzw. 3 h in Neuronen-Kulturen wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen, die Zellen mit 4%iger PFA-Lösung fixiert und wie im vorherigen Abschnitt beschrieben weiter behandelt, wobei als Primärantikörper der  $\alpha$ ARN-Antikörper mit einer Verdünnung von 1:100 und als Sekundärantikörper KaninchenCy3 wurde verwendet. Die Lokalisation von MYCBP2 innerhalb der Zellen wurde anhand der Fluoreszenz mit Hilfe eines Axio Observer.Z1 Mikroskops und der Kamera AxioCam analysiert und dokumentiert.

Die MYCBP2 Translokation wurde modifiziert nach dem Verfahren von Pierre et al bestimmt. Dazu wurden Bilder von etwa 50 Zellen angefertigt. Anschließend wurde innerhalb einer Zelle je eine gerade Linie mit der gleichen Länge sowohl in den Kern als auch ins Cytosol gelegt. Zur Auswertung wurden mit Hilfe des Programms ImageJ 1.48 die Pixelintensitäten bestimmt und damit liniendensitometrische Profile erstellt. Die Werte von beiden Linienprofilen wurden jeweils gemittelt und die Werte für die Kerne durch die Werte für das Cytosol geteilt. Betrug die MYCBP2 Signalstärke im Kern mindestens das 1,5fache der Stärke im Cytosol wurde MYCBP2 als transloziert betrachtet.

#### 2.5.4.5. Immunpräzipitation

Um Protein-Protein-Interaktionen oder posttranslationale Modifikationen nachweisen zu können, kann die Immunpräzipitation herangezogen werden. Wird bei der Präzipitation eines Proteins ein weiteres mit heruntergezogen, so kann davon ausgegangen werden, dass sich beiden Proteinen eine Bindung besteht.

Immunpräzipitationen wurden nach einem leicht abgewandten Protokoll aus *Current Protocols in Molecular Biology* [148] durchgeführt. Dazu wurden zuerst Antikörper konjugierte *beads* hergestellt, indem 30  $\mu$ L 50% AG-Agarose mit 0,5 mL eiskaltem PBS und 1  $\mu$ g Antikörper für mindestens 1 Stunde rotierend bei 4°C inkubiert wurden. In dieser Arbeit wurden überwiegend der SUMO1-Antikörper und ein MYCBP2-Antikörper zur Präzipitation genutzt. Zur Kontrolle wurde zusätzlich noch mit dem Kor3-Antikörper gefällt und eine Fällung ohne Antikörper nur mit Agarose *beads* durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die *beads* für 30 s bei ca. 14.000 xg pelletiert und anschließend dreimal mit IP-Puffer gewaschen. Dazu wurde 1 mL IP-Puffer auf das Pellet gegeben, das *tube* 3 – 4 mal invertiert und erneut zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand abgenommen und die Antikörper konjugierten *beads* auf Eis gestellt.

In der Zwischenzeit wurden die gewünschten Zellen bzw. Gewebe in IP-Puffer lysiert. Dazu wurden für die Analyse von HeLa-Zellen je Ansatz etwa die Hälfte der Zellen aus einer 150 mm Kulturschale pelletiert, in 500  $\mu$ L IP-Puffer resuspendiert und mit Ultraschall (3x 55%; Puls 7; 10 s) homogenisiert. Wurde aus DRG-Lysat präzipitiert, dann wurden die DRGs wie zuvor beschrieben präpariert, in 250  $\mu$ L IP-Puffer pro Maus aufgenommen und mit Ultraschall (3x 55%; Puls 7; 10 s) homogenisiert. Die Lysate wurden anschließend für 30 Minuten mit 50%iger AG-Agarose inkubiert. Anschließend wurden die *beads* und alle nicht löslichen Bestandteile des Lysats mittels Zentrifugation (5 min; 16.000xg; 4°C) entfernt.

Für die eigentliche Präzipitation wurden 10  $\mu\text{L}$  einer 10%igen BSA-Lösung zu den Antikörper-konjugierten *beads* gegeben, 1000  $\mu\text{g}$  Protein bei HeLa, 500  $\mu\text{g}$  bei Zellkern- und DRG-Lysat zugefügt und der Ansatz mit IP-Puffer auf 1 mL verdünnt. Nach mindestens 2 Stunden Inkubation bei 4°C wurden die *beads* pelletiert (1 min; 16.000 xg; 4°C) und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet fünfmal mit je 1 mL Waschpuffer gewaschen, wobei das Pellet zwischen jedem Waschschrift 5 Minuten auf Eis gestellt wurde. Nachdem der Überstand vollständig entfernt wurde, wurden die *beads* in 30  $\mu\text{L}$  heißem 4x Lämmli-Pufferaufgenommen und 7,5 Minuten auf 95°C erhitzt. Nach erneuter Zentrifugation wurden 20 mL des Überstandes abgenommen, auf ein 10%iges Gel aufgetragen und mittels Western Blot analysiert.

### 2.5.5. Statistik

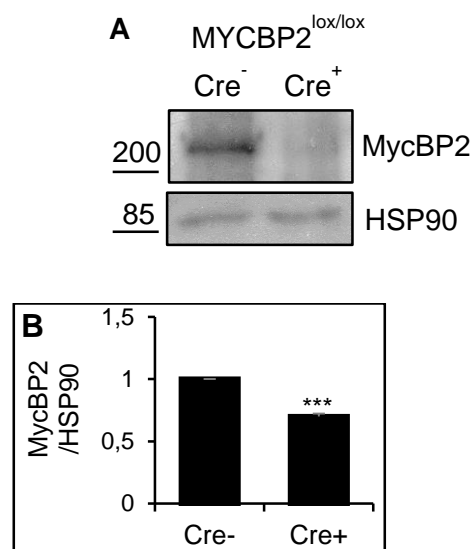
Zur Bestimmung von Signifikanzen wurden statistische Tests durchgeführt. Handelte es sich bei den ermittelten Werten um ungepaarte Stichproben (homoskedastisch) wurde der *t*-Test herangezogen. Bei multifaktoriellen Vergleichen wurde dagegen eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem *Dunett's Multiple Comparison Test* als Post-hoc Test genutzt. Versuchsergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Liegt der p-Wert unterhalb von 0,05 (\*) gelten die Unterschiede als signifikant.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Validierung der Ergebnisse des Antikörperarrayassays

Wie bereits in der Zielsetzung beschreiben, wurde ein Antikörperarray für Zellsignalwege mit 726 verschiedenen Antikörpern durchgeführt, um neue MycBP2-Interaktionspartner zu identifizieren. Dazu wurde Lysat aus den DRGs von SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen genutzt.

Daher sollte zuerst gezeigt werden, dass mit der genetischen Deletion auch wirklich eine Verringerung der MycBP2-Expression in DRGs einhergeht. Wie in Abbildung 15 deutlich zu erkennen ist, ist die MycBP2-Expression in DRGs von SNS-Cre positiven MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen stark verringert.



**Abbildung 15: MycBP2 Expression in DRGS von SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen**

A: Repräsentativer Western Blot mit DRG-Lysat von SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen. MycBP2 wurde mit dem PAM44-Antikörper detektiert. Eine gleichmäßige Beladung wurde anhand der HSP90-Expression überprüft.

B: Densitometrische Auswertungen des MycBP2-Blots. Die MycBP2-Expression ist in DRG-Lysaten von SNS-Cre positiven MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen gegenüber den Wildtyp-Mäusen signifikant verringert. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=4). Statistische Signifikanz wurde durch einen 2-seitigen t-Test ermittelt, \*\*\*P=2,3·10<sup>-5</sup>.

Der Antikörperarray zeigte bei 28 Proteinen deutliche Änderungen in ihren Expressionsraten wovon elf Proteine in cytoskeletale Prozesse, wie Rezeptor- und Vesikeltransport oder Wachstumsregulation, involviert sind. Zehn partizipieren an der Regulation der Genexpression und die restlichen sieben Proteine beeinflussen die generelle Signalübertragung oder Ubiquitylierungsprozesse [149].

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die Unterschiede in der Modifikation mit SUMO1 als Forschungsgrundlage gewählt. Da der Antikörperarray die Bindung an Antikörper quantifiziert, aber die Größe der gebundenen Proteine nicht bestimmt, wodurch diese nicht eindeutig identifizieren werden können, müssen die Ergebnisse mit einem Western Blot validiert werden. Daher wurde ein Western Blot mit DRG-Lysat von SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen durchgeführt, wobei die Detektion mit SUMO1-Antikörper erfolgte.

Wie in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** zu erkennen ist, liegt in den DRGs von MycBP2-Knock out Mäusen eine SUMOylierung von drei Proteinen mit den Größen 50, 70 und 85 kDa vor. Um eine Aussage über die Proteinmengen treffen zu können wurden fünf Western Blots für p85, p70 und p50 densitometrisch ausgewertet. Die densitometrischen Daten (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** B, C, D) zeigen, dass nur für die 85 kDa Bande eine signifikante Hochregulation vorliegt, während sich die Mengen der beiden anderen Proteine zwischen MycBP2 knockout und Wildtyp nicht unterscheiden. Daher sollte im nächsten Schritt identifiziert werden, welches Protein durch die 85 kDa-Bande repräsentiert wird.

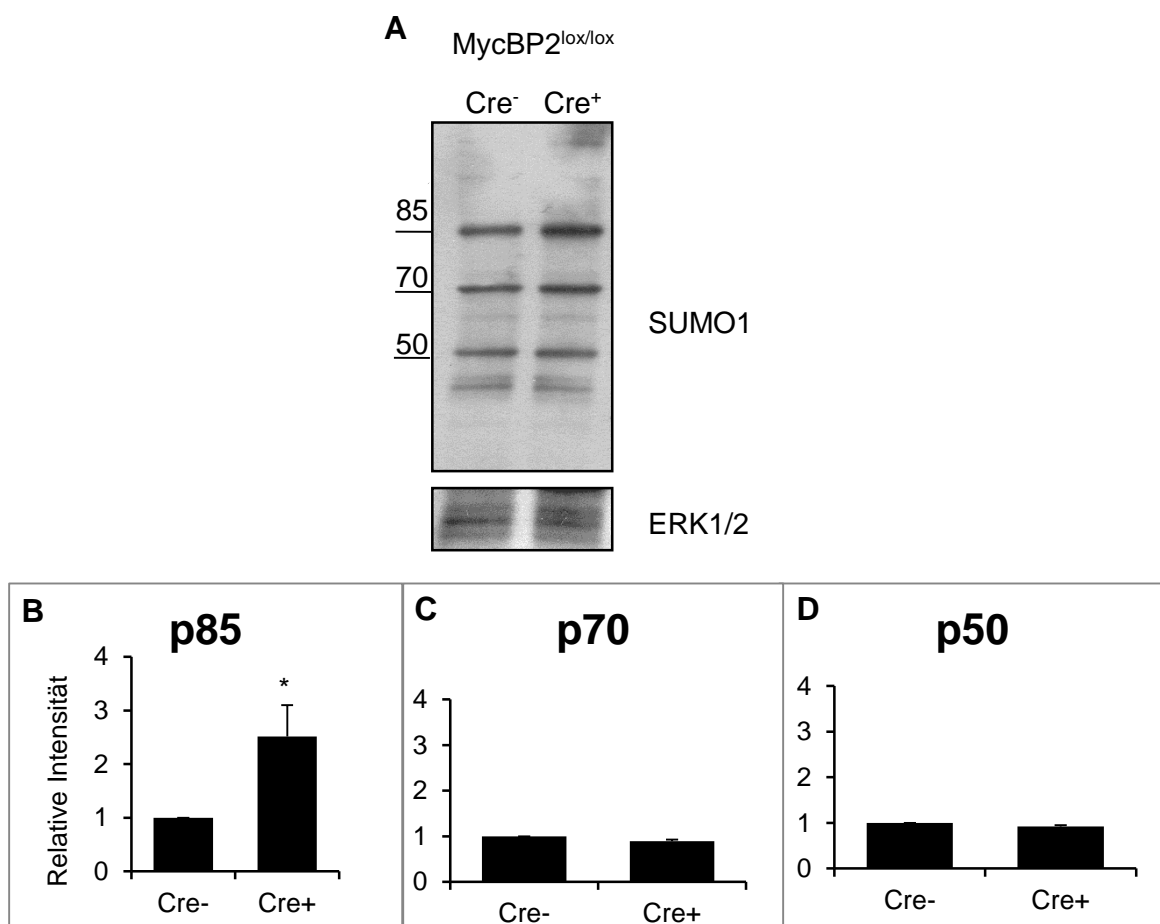


Abbildung 16: Western Blot Analyse auf Unterschiede in der SUMOylierung verschiedener Proteine



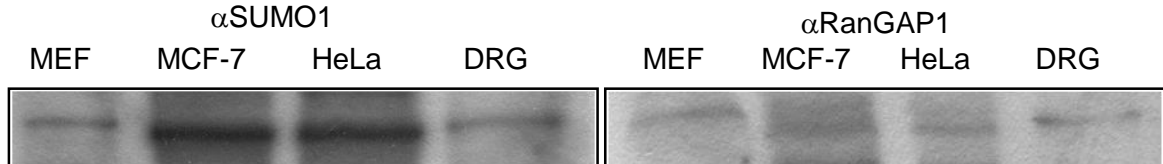
A: Repräsentativer Western Blot mit DRG-Lysat von SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen. Proteine wurden mit dem SUMO1-Antikörper detektiert. Eine gleichmäßige Beladung wurde mit dem ERK1/2-Antikörper überprüft.

B-D: Densitometrische Auswertungen des SUMO1-Blots. Die SUMOylierung eines 85 kDa-Proteins (B) ist in SNS-Cre positiven MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Dagegen zeigen die Proteine p70 (C) und p50 (D) keine Unterschiede. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3-5). Statistische Signifikanz wurde durch einen 2-seitigen t-Test ermittelt, \*P=0,03.

### 3.2. Identifikation des 85 kDa-Proteins

Das bekannteste SUMO1-modifizierte Protein ist RanGAP1, dessen molekulare Masse nach SUMOylierung etwa 85 kDa beträgt. Daher wurde zuerst in einem Western Blot mit verschiedenen Zelllysaten überprüft, ob die in Abschnitt 3.1 beschriebene Bande auch mit einem RanGAP1-Antikörper nachgewiesen werden kann. Analysiert wurden dazu die Lysate von embryonalen Mausfibroblasten, DRGs, HeLa- und MCF-7 Zellen.

Wie in Abbildung 17 zu erkennen ist, zeigen sowohl das gesuchte Protein als auch einfach SUMO1-modifiziertes RanGAP1 im Western Blot die gleiche molekulare Masse.

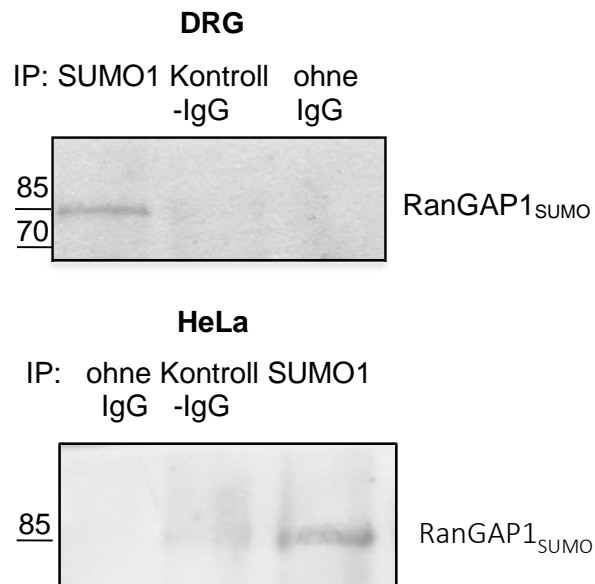


**Abbildung 17: Western Blot Analyse der Laufhöhe von RanGAP1 in verschiedenen Zelllysaten**

Laufhöhe der bereits zuvor detektierten 85 kDa-Bande im Vergleich zu SUMOyliertem RanGAP1 in MEF-, MCF-7-, HeLa- und DRG-Lysat. Beide Proteine haben die gleiche molekulare Masse.

Daher wurde dieser Western Blot als erstes Indiz für die Identität des 85 kDa-Proteins gewertet. Um diese Vermutung zu validieren, wurde als nächstes eine Immunpräzipitation aus DRG-Lysat von Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Die Proteine wurden mit einem anti-SUMO1-Antikörper gefällt, als Kontrolle dienten ein Antikörper gegen den  $\kappa$  Opioid-Rezeptor (Kor3), weiterhin als Kontroll-IgG bezeichnet, und ein Immunpräzipitationen-Ansatz ohne Antikörper, um unspezifische Bindungen auszuschließen.

Wie in Abbildung 18 zu erkennen ist, kann die 85 kDa-Bande nach Fällung mit dem SUMO1-Antikörper mit dem RanGAP1-Antikörper detektiert werden. Damit bestätigt sich, dass es sich bei der 85 kDa-Bande um SUMO1-modifiziertes RanGAP1 handelt.



**Abbildung 18: Identifikation des p85-Proteins als SUMOyliertes RanGAP1**

Immunpräzipitation von RanGAP1 aus Wildtyp-DRG-Lysat bzw. HeLa-Lysat. Proteine wurden mit dem SUMO1-Antikörper bzw. zur Kontrolle mit dem Kontroll-IgG Kor3 oder ohne Antikörper im Immunpräzipitationsansatz gefällt. Die Detektion erfolgte mit dem RanGAP1-Antikörper.

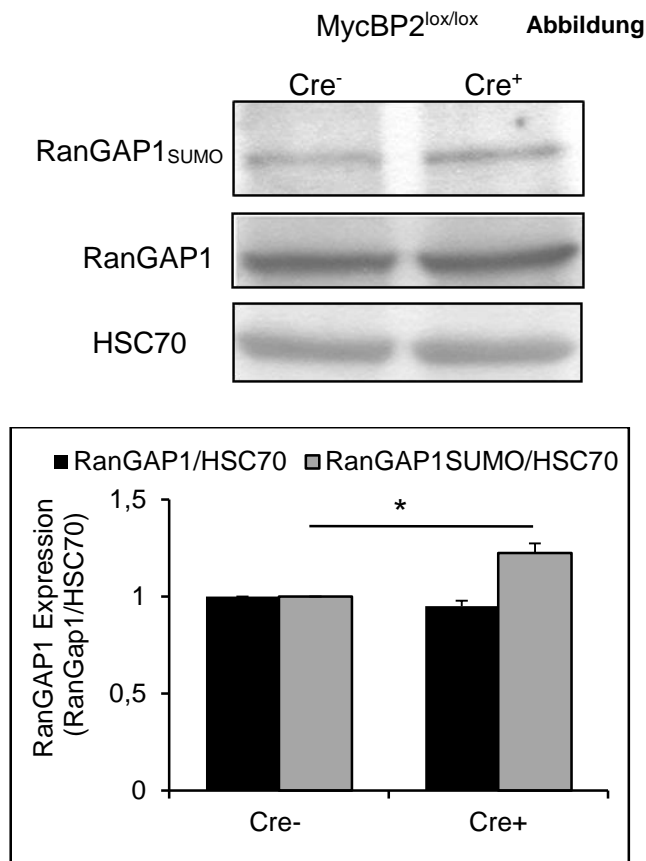
### 3.3. Interaktion von RanGAP1 mit MycBP2

Als nächstes sollte die Interaktion zwischen MycBP2 und SUMOyliertem RanGAP1 näher analysiert werden. Dazu wurde zum einen die Interaktion auf Proteinebene und zum anderen die Expressionsregulation beider Proteine während einer Entzündungsreaktion untersucht.

#### 3.3.1. MycBP2-abhängige RanGAP1 Expression und SUMOylierung

Nachdem bestätigt werden konnte, welches Protein durch die 85 kDa-Bande repräsentiert wurde, sollte als nächstes die Interaktion zwischen MycBP2 und SUMOyliertem RanGAP1 näher untersucht werden. Die erste Frage die sich nach den bisherigen Ergebnissen stellte war, ob in der Abwesenheit von MycBP2 die Expression von RanGAP1 oder seine SUMOylierung gesteigert ist. Um dies zu klären, wurden sowohl die Expressions- als auch die SUMOylierungsraten von RanGAP1 in DRG-Lysaten von SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen mittels Western Blot quantifiziert und densitometrisch ausgewertet.

Die densitometrische Analyse zeigt, dass die RanGAP1-Expressionsraten durch MycBP2 nicht beeinflusst werden, während die SUMOylierungsraten in der Abwesenheit von MycBP2 signifikant ansteigen.



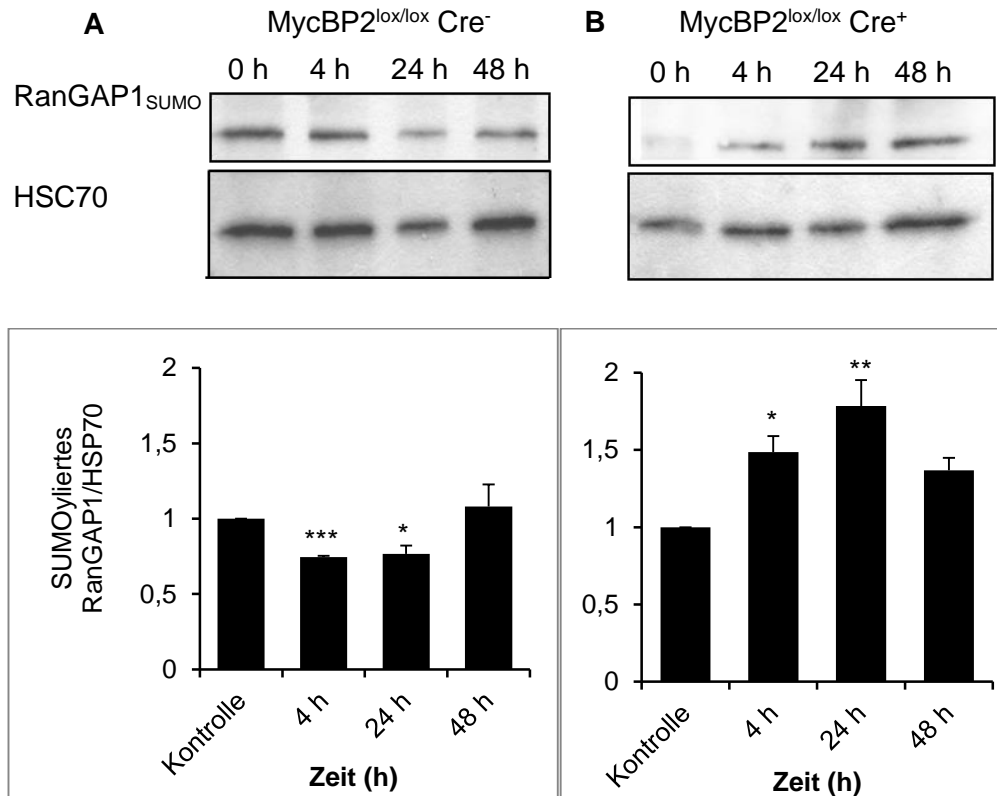
### 19: RanGAP1-Expression und SUMOylierung in DRGs von SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen

Western Blot aus DRG-Lysat von SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen. Proteine wurden mit dem RanGAP1-Antikörper detektiert. Eine gleichmäßige Beladung wurde mit dem HSC70-Antikörper überprüft.

Die densitometrische Analyse zeigt, dass die Expressionsrate von RanGAP1 MycBP2 unabhängig ist, während die SUMOylierung von RanGAP1 in der Abwesenheit von MycBP2 signifikant ansteigt. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3). Statistische Signifikanz wurde durch einen 2-seitigen t-Test ermittelt, \*P=0,03.

Zur Untersuchung der physiologischen Interaktion von MycBP2 mit SUMOyliertem RanGAP1 wurde die Zymosan-induzierte Hyperalgesie als Entzündungsmodell verwendet. Dazu wurden 20  $\mu$ L einer 12,5 mg/mL Zymosansuspension in eine Hinterpfote von SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen injiziert. Anschließend wurden die DRGs L5 und L6 4, 24 und 48 Stunden nach der Zymosaninjektion präpariert. Zusätzlich wurden zur Kontrolle die DRGs L5 und L6 von unbehandelten Tieren entnommen.

Mittels Western Blot wurden dann die SUMOylierung und die Proteinexpression von RanGAP1 visualisiert und densitometrisch ausgewertet. Betrachtet man zuerst die Ergebnisse für die SUMOylierung von RanGAP1, so fällt auf, dass in den DRGs von Wildtyp-Mäusen die SUMOylierung von RanGAP1 während einer Entzündung relativ konstant bleibt, mit einer leichten, aber signifikanten Verringerung nach vier und 24 Stunden (Abbildung 20A). In DRGs von MycBP2-Knockout-Mäusen steigt dagegen die RanGAP1-SUMOylierung während einer Entzündungsreaktion nach 24 Stunden signifikant zur Kontrolle an und fällt nach 48 Stunden wieder auf Basalniveau ab (Abbildung 20B).



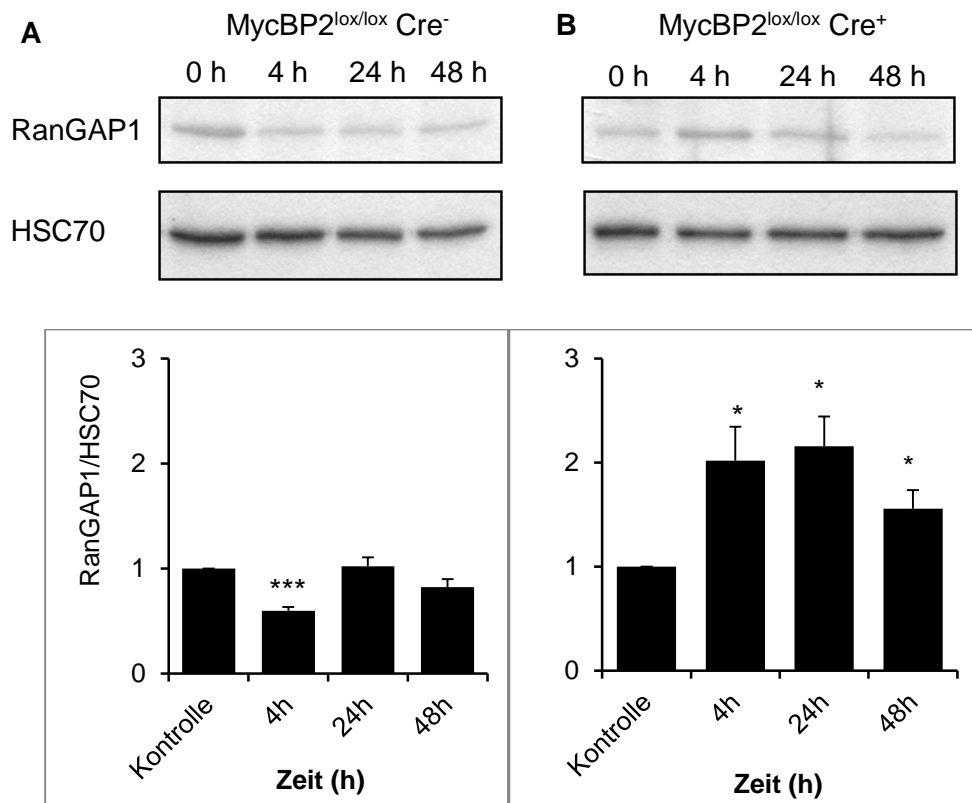
**Abbildung 20: Signifikanter Anstieg der RanGAP1-SUMOylierung nach Zymosanbehandlung in der Abwesenheit von MycBP2**

A: SUMOylierung von RanGAP1 nach Zymosanbehandlung (20  $\mu$ L; 12,5 mg/mL Zymosan; 0-48 h) in DRGs von SNS-Cre negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen. Die Detektion erfolgte mit RanGAP1-Antikörper. Als Ladekontrolle diente HSC70. Die Densitometrie zeigt eine signifikante Abnahme der SUMOylierung von RanGAP1 in Wildtyp-Mäusen 4 und 24 Stunden nach der Injektion. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3). Statistische Signifikanzen wurde durch eine einfaktorielle Varianzanalyse und anschließend Dunett-Test ermittelt, \*p<0,05; \*\*\*p<0,001.

B: SUMOylierung von RanGAP1 nach Zymosanbehandlung (20  $\mu$ L; 12,5 mg/mL Zymosan; 0-48 h) in DRGs von SNS-Cre positiven MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen. Die Detektion erfolgte mit RanGAP1-Antikörper. Als Ladekontrolle diente HSC70. Die Densitometrie belegt einen signifikanten Anstieg der SUMOylierung von RanGAP1 nach 24 h Zymosan in MycBP2-Knockout-Mäusen. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3). Statistische Signifikanzen wurde durch eine einfaktorielle Varianzanalyse und anschließend Dunett-Test ermittelt, \*p<0,05; \*\*p<0,01.

Die Western Blot Analysen mit DRG-Lysat zur Überprüfung der RanGAP1-Expression nach Zymosan in SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen zeigen ein ähnliches Muster wie das zuvor bei der SUMOylierung gesehene (siehe Abbildung 21). Bei den Cre-negativen Mäusen ist die RanGAP1 Expression nach 4 übereinstimmend mit SUMOylierung signifikant reduziert, liegt aber nach 24 Stunden wieder auf basalem Niveau. Die Expression

verhält sich in Cre-positiven Mäusen wie die SUMOylierung und ist nach 24 Stunden signifikant hoch reguliert, geht aber auch nach 48 Stunden wieder zurück auf Normalwerte.



**Abbildung 21: Signifikanter Anstieg der RanGAP1-Expression nach Zymosanbehandlung in der Abwesenheit von MycBP2**

A: Expression von RanGAP1 nach Zymosanbehandlung (20  $\mu$ L; 12,5 mg/mL Zymosan; 0-48 h) in DRGs von SNS-Cre negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen. Die Detektion erfolgte mit RanGAP1-Antikörper. Als Ladekontrolle diente HSC70. Die Densitometrie zeigt eine signifikante Abnahme der RanGAP1 Expression 4 h nach Zymosanbehandlung in RanGAP1 in Wildtyp-Mäusen. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3). Statistische Signifikanzen wurde durch eine einfaktorische Varianzanalyse und anschließendem Dunett-Test ermittelt, \*\*\*p<0,001.

B: Expression von RanGAP1 nach Zymosanbehandlung (20  $\mu$ L; 12,5 mg/mL Zymosan; 0-48 h) in DRGs von SNS-Cre positiven MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen. Die Detektion erfolgte mit RanGAP1-Antikörper. Als Ladekontrolle diente HSC70. Die Densitometrie belegt einen signifikanten Anstieg der Expression von RanGAP1 nach 24 h Zymosan in MycBP2-Knockout-Mäusen. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3). Statistische Signifikanzen wurde durch eine einfaktorische Varianzanalyse und anschließendem Dunett-Test ermittelt, \*p<0,05.

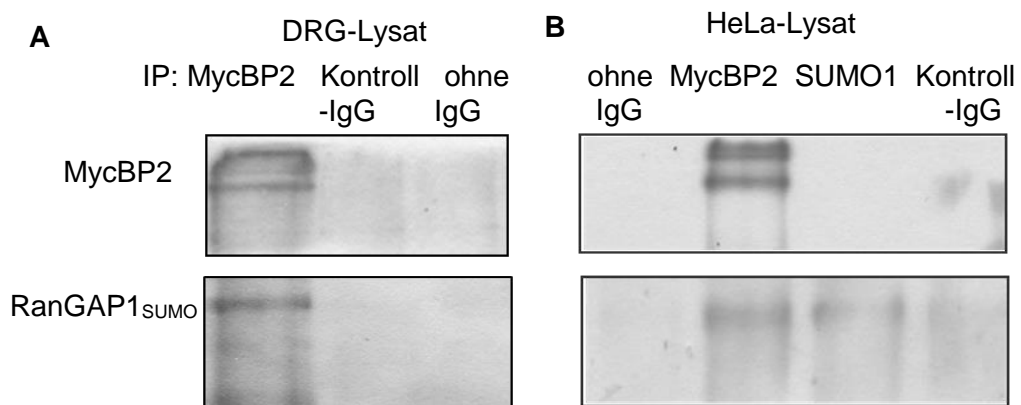
Die Abwesenheit von MycBP2 führt in DRGs zu einem signifikanten Anstieg sowohl der RanGAP1-Expression als auch der RanGAP1-SUMOylierung. Dies könnte auf zwei mögliche Ursachen zurückzuführen zu sein. Zum einen könnte MycBP2 über

eine Ubiquitylierung den proteosomalen Abbau von RanGAP1 regulieren und zum anderen könnte die fehlende Interaktion zwischen MycBP2 und RanGAP1 zu einer kompensatorischen Hochregulation von RanGAP1 führen.

### 3.3.2. MycBP2 bindet an SUMOyliertes RanGAP1

Als nächstes sollte anhand einer Co-Immunpräzipitation geklärt werden, ob eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen MycBP2 und RanGAP1 besteht. Dazu wurde MycBP2 (ARN-Antikörper) aus DRG-Lysat und HeLa-Lysat gefällt und das Präzipitat mittels Western Blot auf RanGAP1-Haltigkeit untersucht.

Wie in Abbildung 22 zu erkennen ist, ist es sowohl in DRG- als auch in HeLa-Lysat möglich MycBP2 und SUMOyliertes RanGAP1 zu koimmunpräzipitieren. Durch den MycBP2-Antikörper ARN wird nicht nur MycBP2 sondern auch SUMOyliertes RanGAP1 präzipitiert. Eine Kopräzipitation von unmodifiziertem RanGAP1 konnte dagegen nicht beobachtet werden.

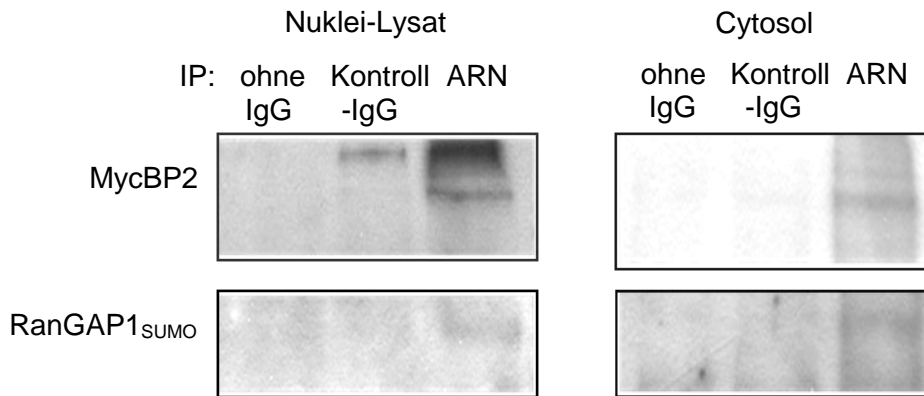


**Abbildung 22: Co-Immunpräzipitation von MycBP2 mit SUMOyliertem RanGAP1 A) in DRGs, B) in HeLa-Zellen.**

Bei beiden Präzipitationen wurde mit dem MycBP2-Antikörper ARN gefällt, als Kontrolle dienten der Kontroll-IgG Kor3 und ein Ansatz ohne Antikörper. Detektiert wurde im Western Blot mit MycBP2 und RanGAP1-Antikörper. Es konnte eine spezifische Interaktion zwischen MycBP2 und SUMOyliertem RanGAP1 sowohl in DRG-Lysat als auch in HeLa-Zellen beobachtet werden. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot.

Da SUMOyliertes RanGAP1 zur Kernmembran rekrutiert wird, wurde im nächsten Schritt überprüft, in welchem HeLa-Kompartiment die Interaktion zwischen MycBP2 und SUMOyliertem RanGAP1 stattfindet. Auch hier wurde wieder eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt, dieses Mal zum einen aus dem Cytosol und zum anderen aus Nukleilysat von HeLa-Zellen.

Diese Co-Immünpräzipitationen belegen, dass MycBP2 sowohl im Cytosol als auch im Nukleus mit SUMOyliertem RanGAP1 interagiert (siehe Abbildung 23). Auch hier kann keine Kopräzipitation mit unmodifiziertem RanGAP1 festgestellt werden.



**Abbildung 23: Co-Immünpräzipitation von MycBP2 mit SUMOyliertem RanGAP1 aus HeLa-Cytosol und Nuklei-Lysat.**

Bei beiden Präzipitationen wurde mit dem MycBP2-Antikörper ARN gefällt, als Kontrolle dienten der Kontroll-IgG Kor3 und ein Ansatz ohne Antikörper. Detektiert wurde im Western Blot mit MycBP2 und RanGAP1-Antikörper. Es konnte eine spezifische Interaktion zwischen MycBP2 und SUMOyliertem RanGAP1 sowohl im Nuclei-Lysat als auch im Cytosol beobachtet werden. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine spezifische Protein-Protein-Interaktion zwischen MycBP2 und SUMOyliertem RanGAP1 vorliegt, die sowohl in murinem DRG-Lysat als auch in HeLa-Lysat nachgewiesen werden kann. Außerdem erstreckt sich diese Interaktion sowohl über das Cytosol als auch über die Kernfraktion von HeLa-Zellen.

### 3.4. Funktionelle Interaktion des MycBP2 mit RanGAP1

Da bisher die Interaktion von MycBP2 und SUMOyliertem RanGAP1 auf Proteinebene belegt werden konnte und eine Beziehung zwischen der MycBP2 und der RanGAP1-Expression besteht, sollte im nächsten Abschnitt geklärt werden, welche Funktion die Wechselwirkung zwischen MycBP2 und SUMOyliertem RanGAP1 ausübt.

### 3.4.1. Ubiquitylierung von RanGAP1

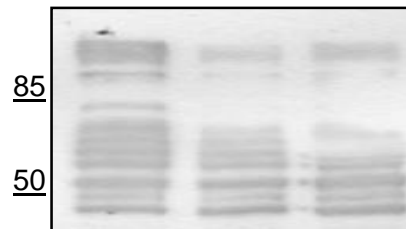
Da es sich bei MycBP2 um eine E3-Ubiquitinligase handelt, ist die nächstliegende Hypothese, dass MycBP2 SUMOyliertes RanGAP1 für die proteosomale Degradation ubiquitiniert. Dies würde in Abwesenheit von MycBP2 zu einem verminderten Abbau und damit erhöhten RanGAP1-Mengen führen.

#### Ubiquitylierung mit unmodifizierten RanGAP1

Im nächsten Schritt wurde dann eine Ubiquitylierung mit nativem RanGAP1 durchgeführt. Um die Ubiquitylierungsreaktionen durchführen zu können, wurden die benötigten Proteine zuerst wie in Abschnitt 2.5.3.6 beschrieben, aufgereinigt. Die Ubiquitylierungsreaktion wurde nach 90 Minuten durch Zugabe von Lämmli-Puffer abgestoppt und die Proteine durch *SDS-PAGE* aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine immunologische Detektion mit einem gegen den His-Tag des Ubiquitin gerichteten Antikörper.

Die Ubiquitylierung mit nativem RanGAP1 führte zu keinem signifikanten Ergebnis (siehe Abbildung 24). Es konnte kein Anstieg des Molekulargewichts von RanGAP1 detektiert werden.

MycBP2	-	+	+
RanGAP1	-	-	+



**Abbildung 24: Ubiquitylierung mit nativem RanGAP1 und MycBP2**

Repräsentative Western Blot Analyse der Ubiquitylierungsreaktion mit nativem RanGAP1 und MycBP2. Zur Kontrolle wurde eine Ubiquitylierung ohne MycBP2 oder RanGAP1 und eine nur mit MycBP2 durchgeführt. Die Ubiquitylierung wurde nach 90 min durch Zugabe von Lämmli-Puffer gestoppt und das Gemisch über SDS PAGE aufgetrennt. Die immunologische Detektion erfolgte mit einem gegen den His-Tag des Ubiquitin gerichteten Antikörper. Es konnte keine Ubiquitylierung von RanGAP1 beobachtet werden.

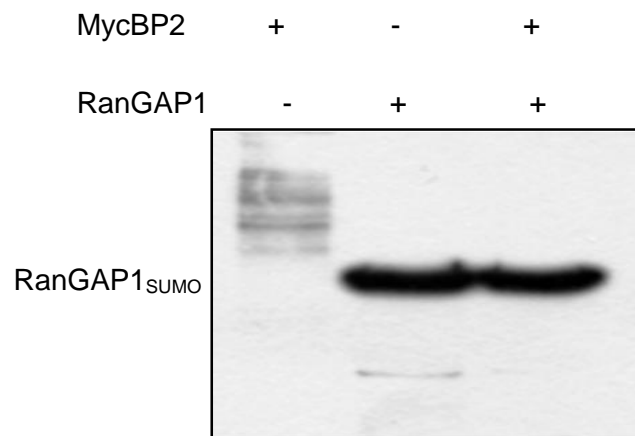


### Ubiquitylierung mit SUMOyliertem RanGAP1

Da die bisherigen Ergebnisse darauf hindeuten, dass MycBP2 ausschließlich mit SUMOyliertem RanGAP1 interagiert, wurde im nächsten Schritt RanGAP1 mit SUMO1 modifiziert und anschließend eine Ubiquitylierung durchgeführt.

Die SUMOylierung von RanGAP1 wurde mit Hilfe eines SUMOylierungs-Kits von ENZO durchgeführt. Um zu überprüfen, ob sich MycBP2 auf die SUMOylierung von RanGAP1 auswirkt, wurde ein Reaktionsansatz mit beiden Proteinen sowie ein Ansatz entweder nur mit MycBP2 oder nur mit RanGAP1 durchgeführt (siehe Abbildung 25).

Der Western Blot zeigt eine starke SUMOylierung des RanGAP1, die nicht von MycBP2 beeinflusst wird.



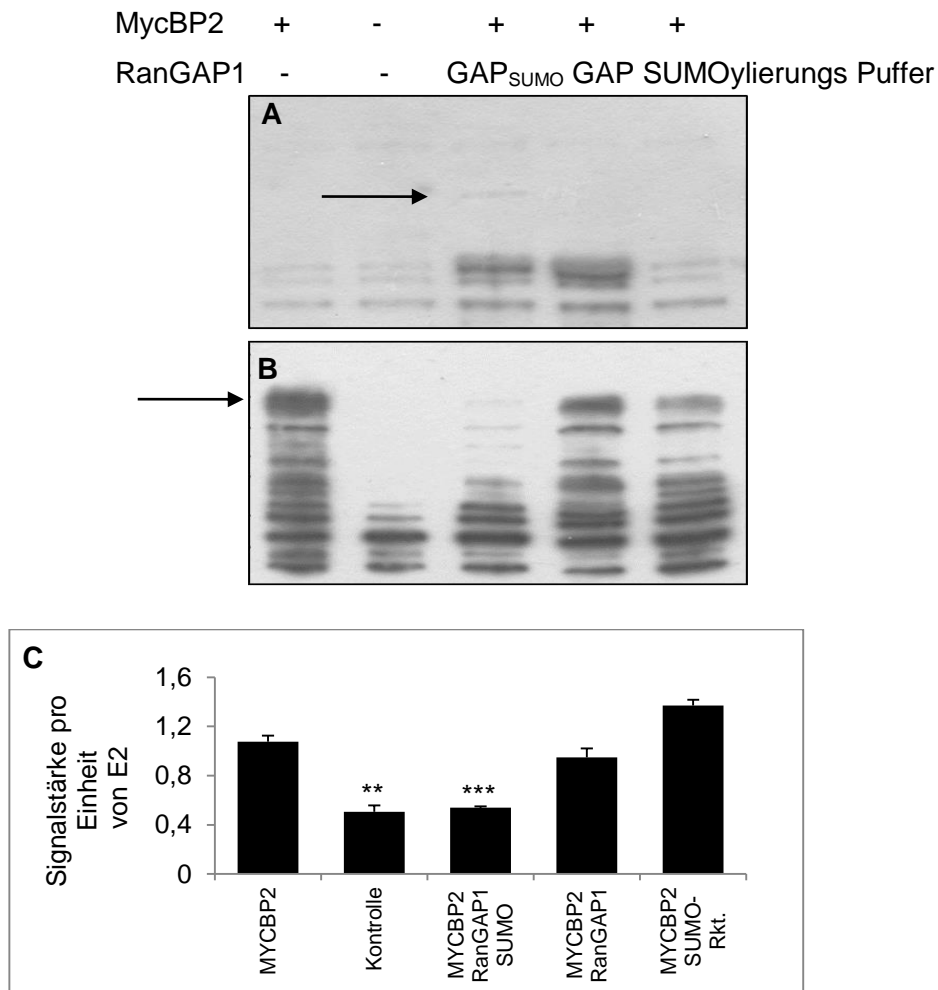
**Abbildung 25: SUMOylierung von RanGAP1**

Die SUMOylierung wurde nach Anweisung mit einem SUMOylierungs-Kit von ENZO durchgeführt. Die Detektion im Western Blot nach der SUMOylierung von RanGAP1 in An- oder Abwesenheit von MycBP2 erfolgte mit SUMO1-Antikörper. Die SUMOylierung ist mit dem SUMO1-Antikörper gut detektierbar und es zeigt sich kein MycBP2-abhängiger Unterschied.

Wird nun SUMOyliertes RanGAP1 zum Ubiquitylierungsansatz zugegeben, zeigt sich auch hier bei der Detektion mit dem RanGAP1-Antikörper keine Größenzunahme für das SUMOylierte RanGAP1, dessen molekulares Gewicht nach der Ubiquitylierung mit His-Tag-Ubiquitin um jeweils 10 kDa steigen sollte. Stattdessen kann eine schwache RanGAP1<sub>SUMO</sub>-Bande bei 85 kDa detektiert werden (Abbildung 26 A). Erfolgt dagegen die Detektion mit einem gegen den His-Tag des Ubiquitins gerichteten Antikörper erkennt man, dass durch Zugabe des SUMOylierten RanGAP1s die Menge eines ubiquitinierten 110 kDa Proteins stark abnimmt, während die Zugabe von nativem RanGAP1 oder den SUMOylierungs-Reagenzien zu keiner

Änderung führt (Abbildung 26 B). Durch densitometrische Auswertung konnte eine Hemmung der Ubiquitinligase-Aktivität des MycBP2 durch SUMOyliertes RanGAP1 um etwa 50% festgestellt werden (siehe Abbildung 26 C).

Die Ubiquitylierungen zeigen eine spezifische Hemmung der E3-Ubiquitinligase-Aktivität des MycBP2 durch SUMOyliertes RanGAP1. Hinweise auf eine Ubiquitynylierung von RanGAP1 ergaben sich nicht.



**Abbildung 26: Ubiquitylierung mit SUMOyliertem RanGAP1 und MycBP2**

Western Blot Analyse der Ubiquitylierungsreaktion mit SUMOyliertem RanGAP1 und MycBP2. Zur Kontrolle wurden Ubiquitylierungen ohne MycBP2 oder RanGAP1, ohne RanGAP1 oder mit nativem RanGAP1 oder den SUMOylierungsreagenzien durchgeführt. Die Ubiquitylierung wurde nach 90 min durch Zugabe von Lämmli-Puffer gestoppt und das Gemisch über SDS PAGE aufgetrennt. Die immunologische Detektion erfolgte A) mit einem RanGAP1-Antikörper, der keine Änderung für SUMOyliertes RanGAP1 zeigte und B) mit einem gegen den His-Tag des Ubiquitin gerichteten Antikörper. Hier konnte eine Abnahme der Ubiquitylierung eines 110 kDa Proteins in Anwesenheit von SUMOyliertem RanGAP1 beobachtet werden. C) Die Densitometrie bezieht sich auf die Menge an E2 und zeigt eine Abnahme der MycBP2-E3-

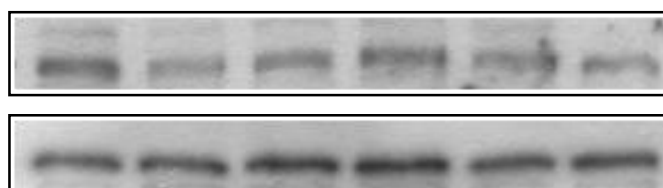
Ubiquitinligaseaktivität um etwa 50% in der Anwesenheit von SUMOyliertem RanGAP1. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3). Statistische Signifikanzen wurde durch eine einfaktorische Varianzanalyse und anschließendem Dunnett-Test ermittelt, \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

### 3.4.2. SUMOyliertes RanGAP1 hemmt die Ubiquitylierung von TSC2 durch MYCBP2

Um die Hemmung der Ubiquitinligase-Aktivität zu validieren, wurde die MycBP2-abhängige Ubiquitylierung von TSC2 in Anwesenheit von SUMOyliertem RanGAP1 untersucht. Dazu wurden den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Reaktionsansätzen 20  $\mu$ g HeLa-Lysat zugefügt. Als Bezugspunkt für die TSC2-Menge wurde eine Ubiquitylierung ohne Zugabe von MycBP2 oder eine Form von RanGAP1 herangezogen. Außerdem wurde eine Ubiquitylierung mit MycBP2 durchgeführt, um die proteosomale Degradation von TSC2 zu bestätigen. Als Kontrolle dienten zusätzlich die Ubiquitylierung mit SUMOyliertem RanGAP1 ohne MycBP2, die Ubiquitylierung mit nicht-modifizierten RanGAP1 und die Ubiquitylierung mit den SUMOylierungsreagenzien. Nach der Ubiquitylierung unter den angegebenen Bedingungen wurden die vorhandenen Proteine über ein 7%iges Acrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt und die TSC-2-Menge anhand eines TSC-2 Antikörpers analysiert.

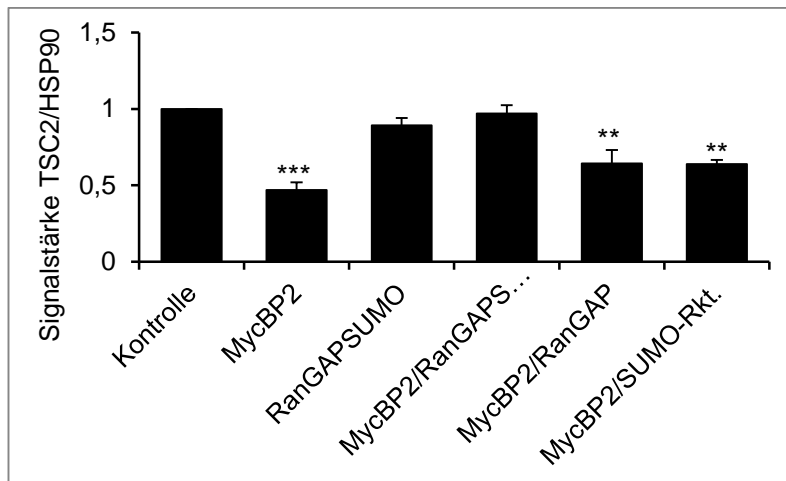
Wie in Abbildung 27 zu erkennen ist, verringert sich die Menge an TSC2 durch Ubiquitylierung mit MycBP2 um 50% gegenüber der Kontrolle ohne MycBP2. Die Ubiquitylierung mit SUMOyliertem RanGAP1 und MycBP2 zeigt die gleichen TSC2-mengen wie die Kontrolle, während in den weiteren Kontrollen mit nativem RanGAP1 und SUMOylierungsreagenzien auch eine signifikante Abnahme der TSC-2-Menge detektierbar ist. Die alleinige Zugabe von SUMOyliertem RanGAP1 zeigt keine Verringerung der TSC2-Menge, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass die Ubiquitylierung MycBP2-abhängig ist.

MycBP2	-	+	-	+	+	+
RanGAP1	-	-	GAP <sub>SUMO</sub>	GAP <sub>SUMO</sub>	GAP	SUMOylierungs Puffer



TSC2

HSP90



**Abbildung 27: MycBP2-abhängige Ubiquitylierung des TSC2 in Anwesenheit von SUMOyliertem RanGAP1**

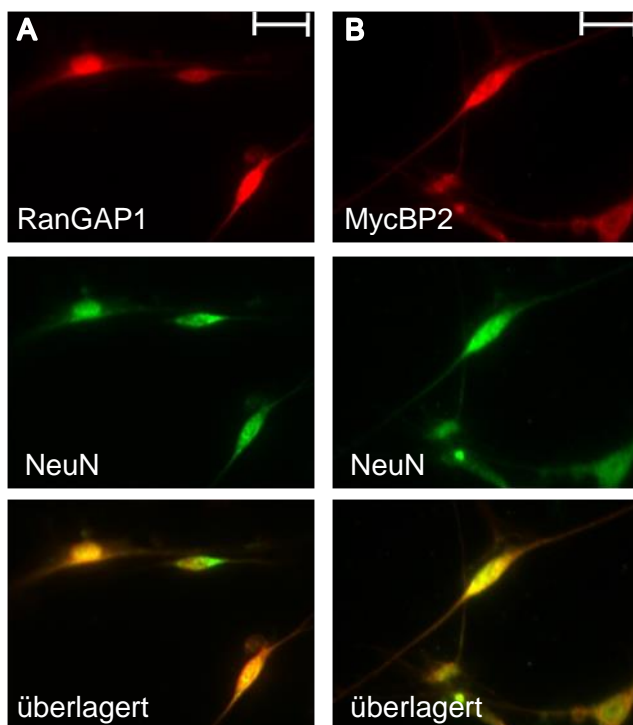
Western Blot Analyse der Ubiquitylierungsreaktion von TSC2 in Anwesenheit von MycBP2 und SUMOyliertem RanGAP1. Zur Kontrolle wurden Ubiquitylierungen ohne MycBP2, mit SUMOyliertem RanGAP1, mit nativem RanGAP1 oder den SUMOylierungsreagenzien durchgeführt. Die Ubiquitylierung wurde nach 90 min durch Zugabe von Lämmli-Puffer gestoppt und das Gemisch über SDS PAGE aufgetrennt. Die immunologische Detektion erfolgte mit einem TSC2-Antikörper. Eine gleichmäßige Beladung wurde mit HSP90 überprüft. Die Densitometrie zeigt eine Abnahme der TSC2-Menge in Anwesenheit von MycBP2 um etwa 50%, die gleiche Abnahme kann auch in den Kontrollen mit nativem RanGAP1 oder den SUMOylierungsreagenzien detektiert werden. SUMOyliertes RanGAP1 hemmt dagegen den proteosomalen Abbau von TSC2. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt ( $n=3$ ). Statistische Signifikanzen wurde durch eine einfaktorische Varianzanalyse und anschließendem Dunett-Test ermittelt, \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

Diese Ergebnisse validieren das vorherige Ergebnis und zeigen eine für SUMOyliertes RanGAP1 spezifische Hemmung der E3-Ubiquitinligase-Aktivität des MycBP2.

### 3.4.3. Translokation von RanGAP1 und MycBP2 an Nuklei von Neuronen

Die SUMOylierung von RanGAP1 führt zu einer Translokation des Proteins an die Kernmembran. Auf Grund der selektiven Interaktion von MycBP2 mit SUMOylierten RanGAP1 stellte sich die Frage, ob die Proteinbindung zwischen den beiden Proteinen auch eine Translokation des MycBP2 zur Folge hat.

Bevor die eigentlichen Translokationsversuche gestartet werden konnten, sollte nachgewiesen werden, dass sowohl RanGAP1, als auch MycBP2 am bzw. im Nukleus von DRG-Neuronen lokalisiert ist. Dazu wurden DRG-Kulturen zum einen mit einem RanGAP1-Antikörper bzw. dem MycBP2-Antikörper ARN und zum anderen mit dem neuronalen Marker NeuN, der das Protein *Feminizing Locus on X-3* überwiegend in neuronalen Nuclei, aber auch im Cytosol erkennt, gefärbt. Wie Abbildung 28 zeigt, kolokalisieren beide Proteine mit dem neuronalen Marker.



**Abbildung 28: Nachweis der Expression von RanGAP1 und MycBP2 am bzw. im Kern von DRG-Neuronen**

Immunfärbung von DRG-Neuronen mit A) einem RanGAP1-Antikörper und B) einem MycBP2-Antikörper und NeuN. Die überlagerten Bilder zeigen, dass sowohl RanGAP1 als auch MycBP2 in DRG-Neuronen exprimiert wird.

#### Translokation von RanGAP1 und MycBP2 in DRG-Neuronen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass RanGAP1 und MycBP2 in Neuronen exprimiert werden, soll nun untersucht werden, ob RanGAP1 an der Translokation von MycBP2 in den Zellkern partizipiert. Dazu wurde zuerst ein Stimulus bestimmt, der zu einer verstärkten Lokalisation von MycBP2 im Nukleus führt. In Tabelle 16 sind die getesteten Stimuli zur Induktion einer Translokation aufgeführt. Das Screening wurde mittels Immunfärbung in HeLa-Zellen durchgeführt und zeigte, dass in HeLa-Zellen eine Stimulation mit 10% FKS für 30 min die gewünschte Translokation herbeiführt.

Tabelle 16: Verschiedene Stimuli zur Induktion der MycBP2-Translokation in den Zellkern

Substanz	Konzentration	Dauer
LPS	100 ng/mL	30 min
FKS	10% in Medium	30 min
S1P	1 mM	30 min
TNF $\alpha$	50 ng/mL	30 min
Insulin	4 mg/mL	30 min
NGF	100 $\mu$ g/mL	90 min
IFN $\gamma$	1 mg/mL	30 min

Da aber in erster Linie mit neuronalen Kulturen gearbeitet werden sollte, wurde die Anwendbarkeit des Stimulus auf DRG-Neuronen überprüft, wobei sich zeigte, dass in DRG-Kulturen die Inkubationszeit auf 3 h erweitert werden muss, um einen ebenso starken Effekt zu erreichen.

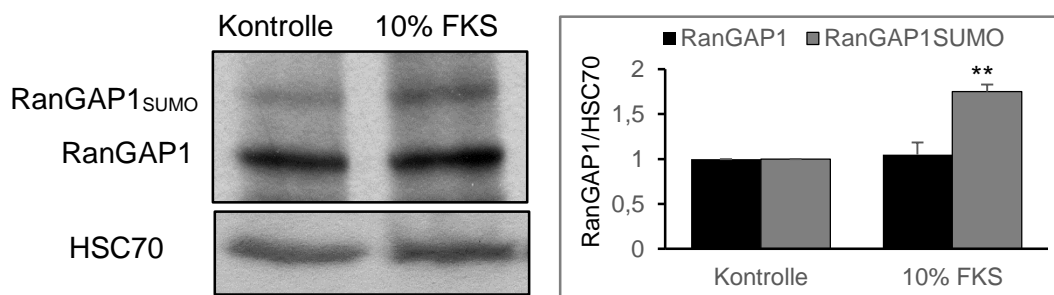
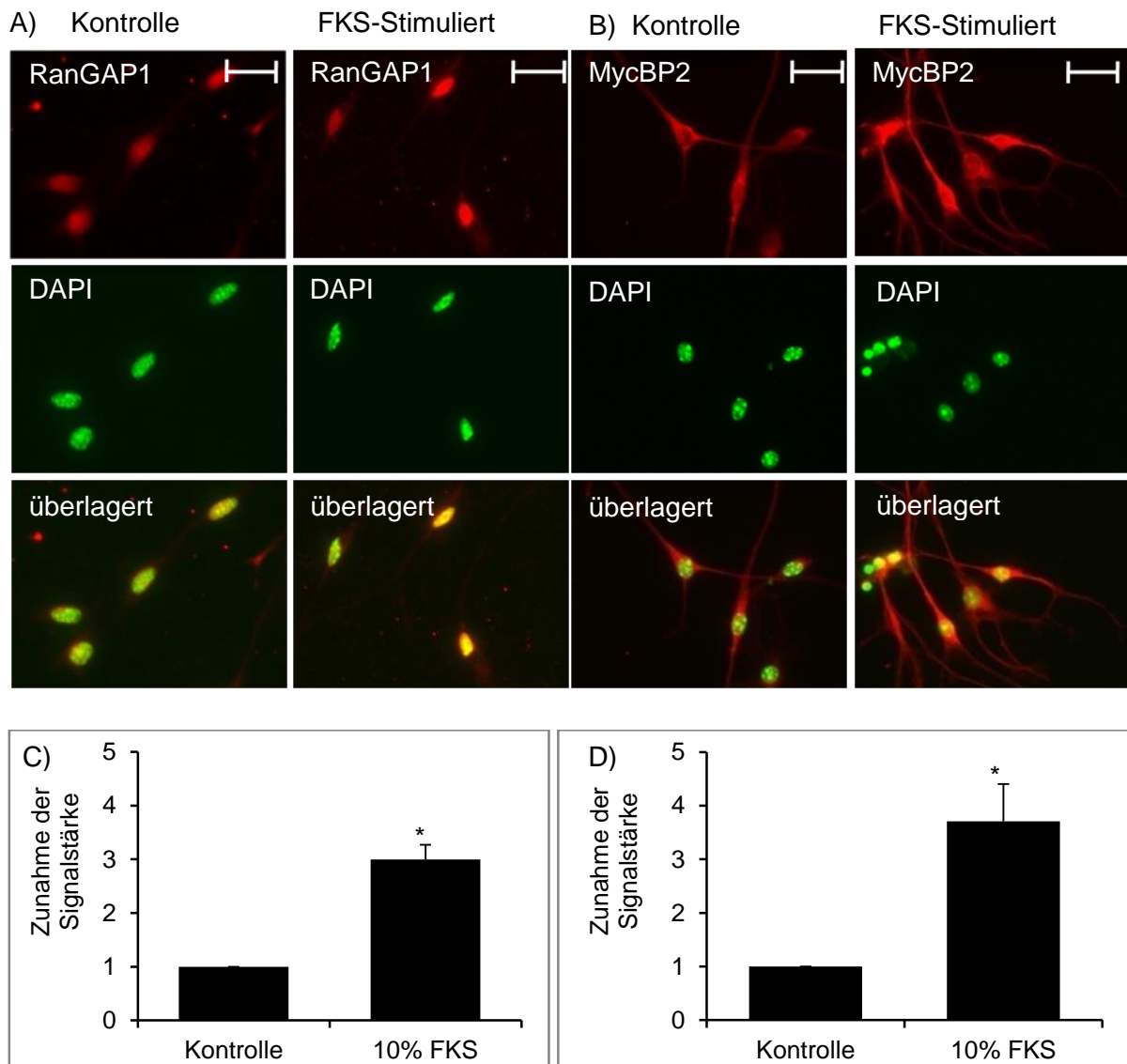


Abbildung 29: RanGAP1 Expression und SUMOylierung nach FKS-Stimulation in DRGs

Repräsentative Western Blot Analyse zur Expression und SUMOylierung von RanGAP1 nach FKS-Stimulation (10%; 3 h). Die Detektion erfolgte mit RanGAP1-Antikörper, als Ladekontrolle diente HSC70. Während die Expression von RanGAP1 nicht beeinflusst wird, zeigt die Densitometrie einen signifikanten Anstieg der SUMOylierung. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3). Statistische Signifikanzen wurde durch eine einfaktorielles Varianzanalyse und anschließendem Dunnett-Test ermittelt, \*p<0,05.

Nachdem die Bedingungen für die FKS-Stimulation abgesteckt werden konnten, wurde die Translokation von MycBP2 durch Inkubation mit 10% FKS für 3 h in Kulturen von DRG-Neuronen induziert. Anschließend wurden die Zellen mit dem MycBP2-Antikörper ARN und zur Identifikation der Kerne mit DAPI gefärbt. Eine Beteiligung von RanGAP1 an der Translokation von MycBP2 an den Nukleus würde auch eine Translokation von RanGAP1 und damit eine verstärkte SUMOylierung bedingen. Daher wurde die Stimulation wiederholt und die Zellen mit RanGAP1-Antikörper und DAPI gefärbt, um die Translokationsrate von RanGAP1 zu bestimmen (siehe Abbildung 30). Um eine verstärkte SUMOylierung nachzuweisen, wurden zusätzlich DRG-Neurone kultiviert, lysiert und mittels Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem RanGAP1-Antikörper.

Wie anhand der densitometrischen Auswertung der Immunfärbung (Abbildung 30 C+D) deutlich zu erkennen ist, steigt die Lokalisation von MycBP2 sowie von RanGAP1 am Nukleus durch FKS-Stimulation um das Dreifache an.



**Abbildung 30: Translokation des RanGAP1 und MycBP2 in DRG-Neuronen nach FKS-Stimulation**

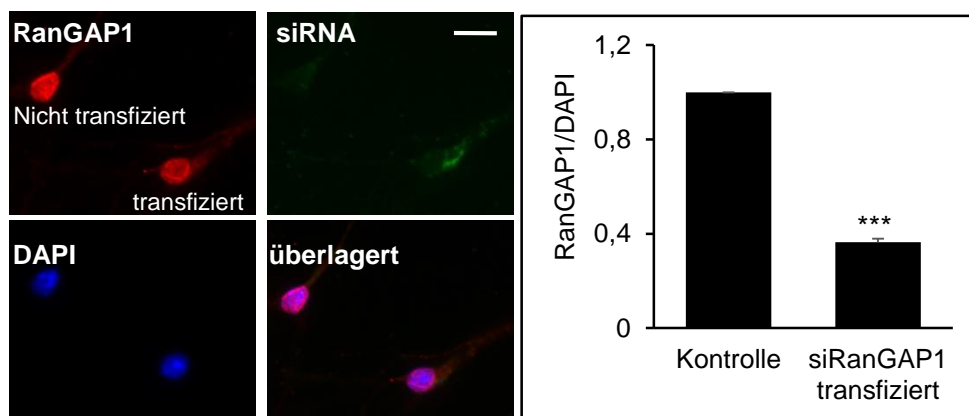
Immunfärbung von neuronalen DRG-Kulturen nach FKS-Stimulation (10%; 3 h) A) für RanGAP1 und B) für MycBP2. Als Kontrolle dienen unstimulierte Zellen. Die Kerne wurden mittels DAPI angefärbt. Die überlagerten Bilder weisen sowohl für RanGAP1 als auch für MycBP2 nach FKS-Stimulation auf eine verstärkte Expression im Nukleus hin. C+D) Die densitometrische Auswertung zeigt, dass für RanGAP1 eine dreifache und für MycBP2 sogar eine vierfache gesteigerte Translokation in den Nukleus vorliegt. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3). Statistische Signifikanzen wurde durch einen zweiseitigen T-Test ermittelt, \*p<0,05.

## RanGAP1 vermittelt in DRG Neuronen die Translokation von MYCBP2 zum Nukleus

Um die Abhängigkeit der MycBP2-Translokation von RanGAP1 zu belegen, wurden knockdown-Versuche durchgeführt. Dazu wurden primäre Kulturen von DRG-Neuronen für 48 h mit muriner RanGAP1 siRNA bzw. Non-Target siRNA transfiziert, um so die RanGAP1-Expression runter zu regeln. Um transfektionsbedingte Nebeneffekte auszuschließen wurden Kontroll-Neuronen mit FAM-markierter Non Targeting siRNA transfiziert. So konnten transfizierte Zellen direkt identifiziert werden. Bei der Transfektion mit RanGAP1 siRNA (50 nM) wurde daher auch eine geringe Menge markierter Non Targeting siRNA (5 nM) zugegeben.

Um zu überprüfen, ob die RanGAP1-Expression wirklich reduziert wurde, wurden die DRG-Neuronen nach der Transfektion mit RanGAP1-Antikörper und DAPI angefärbt. Um einheitliche Bilder zu erzeugen wurden die Rohdaten mit der automatischen Min/Max-Korrektur der AxioVisionLE Software ausgewertet. Anschließend wurden RanGAP1 zu DAPI-Verhältnisse berechnet und diese zwischen transfizierten und nicht transfizierten Zellen verglichen.

Wie in Abbildung 31 deutlich zu erkennen ist, wird die RanGAP1-Expression durch Transfektion mit siRNA signifikant um ca. 65% runter geregelt.



**Abbildung 31: RanGAP1 Expression nach Transfektion mit muriner RanGAP1 siRNA**

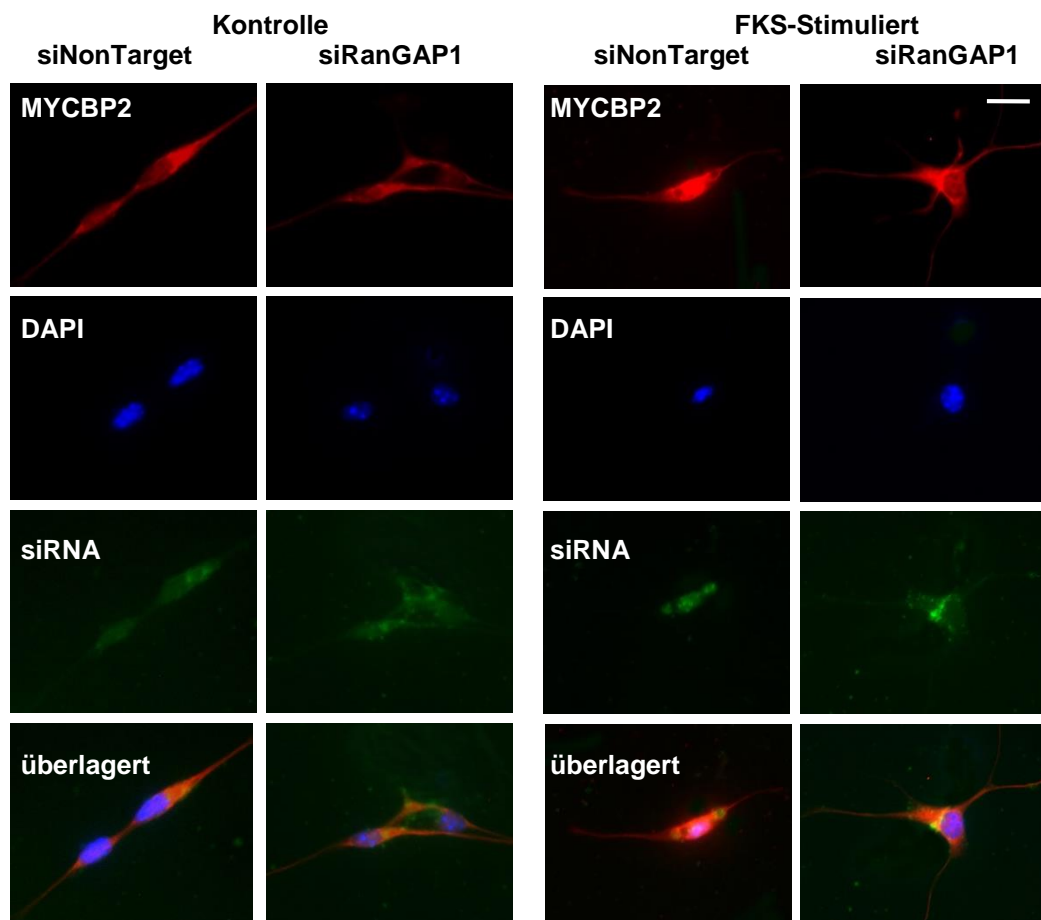
Repräsentative Immunfärbung von neuronalen DRG-Kulturen 48 h nach Transfektion mit muriner RanGAP1 siRNA (50 nM) und FAM-gelabelte (grün) Non Targeting siRNA (5 nM) für RanGAP1 (rot). Die Kerne wurden mittels DAPI angefärbt. Es zeigt sich eine verstärkte RanGAP1 Expression in nicht transfizierten Zellen. Die liniendensitometrische Auswertung erfolgte für je 30 Zellen von 3 unabhängigen Experimenten und zeigt einen signifikanten Rückgang der RanGAP1 Expression nach Transfektion mit muriner RanGAP1 siRNA. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3). Statistische Signifikanzen wurde durch einen zweiseitigen T-Test ermittelt, \*\*\*p<0,001.

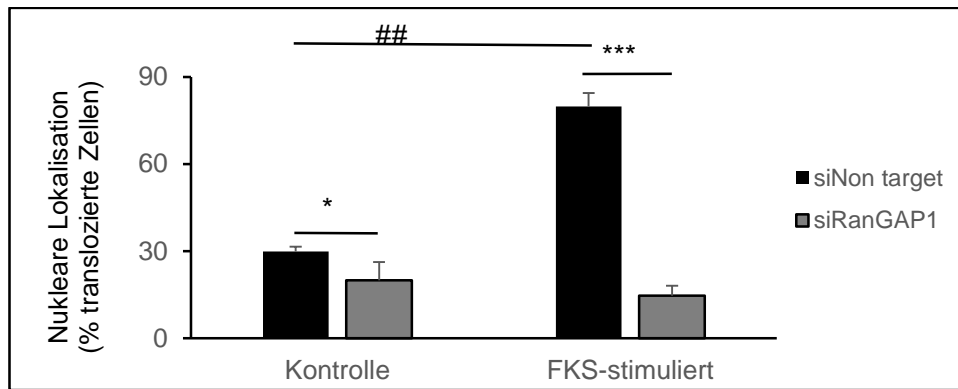


Anschließend wurden die siNonTarget bzw. siRanGAP1 transfizierten Zellen für drei Stunden mit 10% FKS stimuliert. Danach erfolgte eine Immunfärbung für MYCBP2 und die Färbung der Kerne mit DAPI, um densitometrische Auswertungen die MycBP2-Translokation in den Kern bestimmen zu können.

In Abbildung 32 ist deutlich zu erkennen, dass sowohl in siRanGAP1 als auch in siNonTarget transfizierten Kontrollneuronen nur eine geringe Menge an MycBP2 im Nukleus detektierbar ist. Durch die Stimulation mit 10% FKS wird in siNonTarget transfizierten Zellen die Translokation um ein dreifaches gesteigert, wodurch fast 90% der Zellen als transloziert gelten. In siRanGAP1 transfizierten Zellen bleibt die MycBP2 dagegen konstant niedrig.

Damit wurde die RanGAP1-abhängige Translokation von MycBP2 in primären DRG-Neuronen bestätigt.

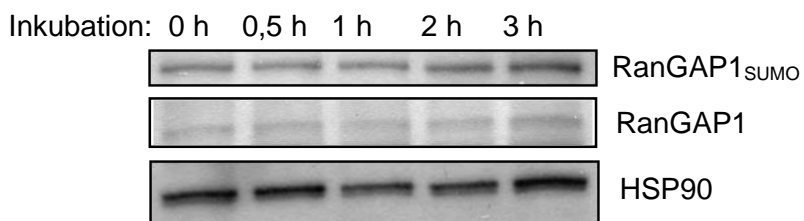


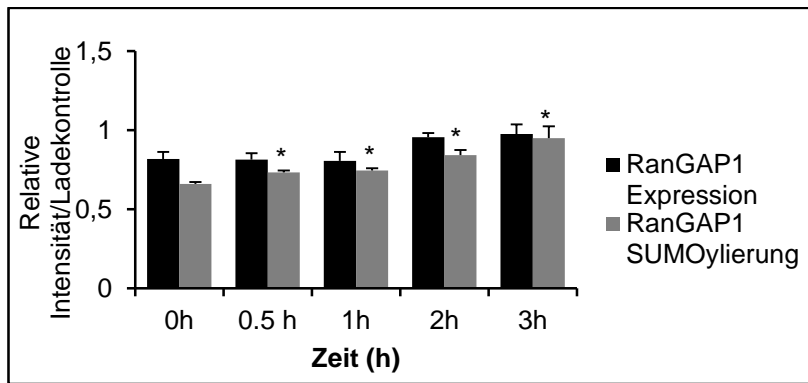


**Abbildung 32: MycBP2 Translokation nach FKS-Stimulation in siRNA transfizierten Zellen**

Repräsentative Immunfärbung. Primäre DRG-Kulturen wurden mit siPORTamin mit RanGAP1- und Non-Targeting-siRNA transfiziert (50 nM). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 3 h mit 10% FKS stimuliert. Die anschließende Immunfärbung erfolgte für MycBP2. Zellen mit einem Kern/Cytosol-Verhältnis  $>1,5$  in der liniendensitometrischen Auswertung der MycBP2-Lokalisation wurden als transloziert betrachtet. Durch FKS-Stimulation steigt die Translokation des MycBP2 in NonTarget-transfizierten Zellen um das 3 fache an, während die Translokationsrate für siRanGAP1-transfizierte Zellen auch nach Stimulation konstant unter 20% bleibt. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3). Statistische Signifikanzen wurde durch eine einfaktorielle Varianzanalyse und anschließendem Dunett-Test ermittelt, \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; Signifikanzen innerhalb der Gruppe mittels zweiseitigem TTest ## $p < 0,01$ .

**RanGAP1 vermittelt in HeLa Zellen die Translokation von MYCBP2 zum Nukleus**Im nächsten Schritt wurden die Translokationsversuche auf ein weiteres Zellsystem erweitert. Dazu wurde zuerst ein Zeitverlauf für die SUMOylierung und die Expression von RanGAP1 in HeLa-Zellen nach FKS-Stimulation erstellt (Abbildung 33).



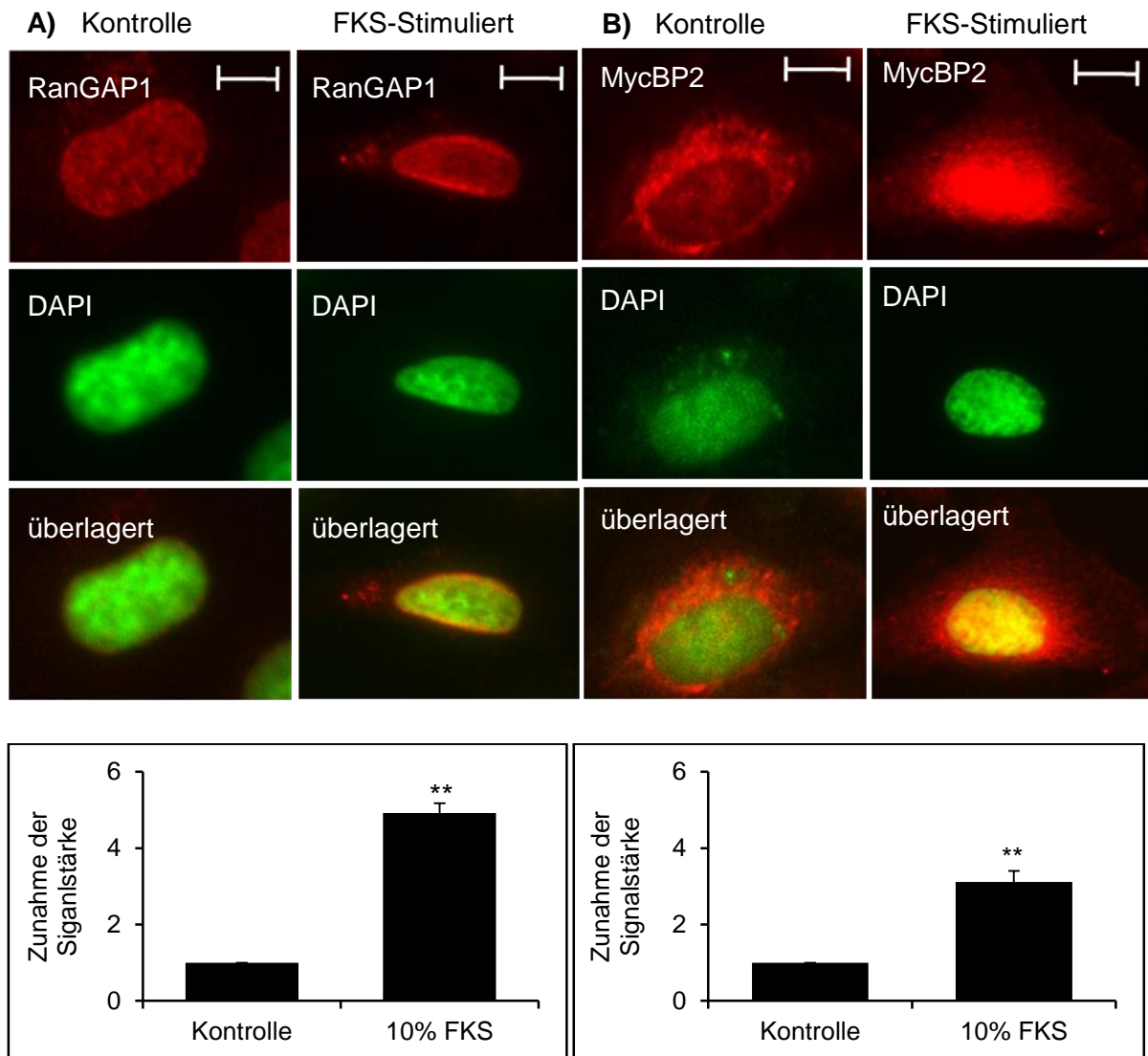


**Abbildung 33: Zeitverlauf zur SUMOylierung und Expression von RanGAP1 nach FKS-Stimulation**

HeLa-Zellen wurden mit 10% FKS stimuliert und nach 0,5 h, 1 h, 2 h und 3 h geerntet. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot die RanGAP1 Expression und SUMOylierung analysiert. Als Ladekontrolle diente HSP90. Die densitometrische Auswertung zeigt sowohl eine Zunahme der Proteinexpression mit der Zeit als auch eine signifikant gesteigerte SUMOylierung. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt ( $n=3$ ). Statistische Signifikanzen wurde durch eine einfaktorische Varianzanalyse und anschließendem Dunnett-Test ermittelt,  $*p<0,05$ .

Wie durch die densitometrische Auswertung in Abbildung 33 zu erkennen ist, steigt die SUMOylierung von RanGAP1 bereits nach 0,5 Stunden Stimulation mit 10% FKS signifikant an, während sich die Expression über den gesamten Zeitraum nicht signifikant gegenüber der Kontrolle ändert.

Anschließend erfolgte die Immunologische Detektion und liniendensitometrische Auswertung der RanGAP1 und MycBP2-Lokalisation nach einer 30 minütigen Stimulation mit 10% FKS. Für beide Proteine kann eine Translokation an bzw. in den Zellkern festgestellt werden. Nach der Stimulation ist die dreifache Menge an MycBP2 und sogar die fünffache an RanGAP1 kolokalisiert mit dem nuklearen Marker DAPI vor (siehe Abbildung 34).



**Abbildung 34: Translokation des RanGAP1 und MycBP2 an bzw. in den Zellkern von HeLa-Zellen nach FKS-Stimulation**

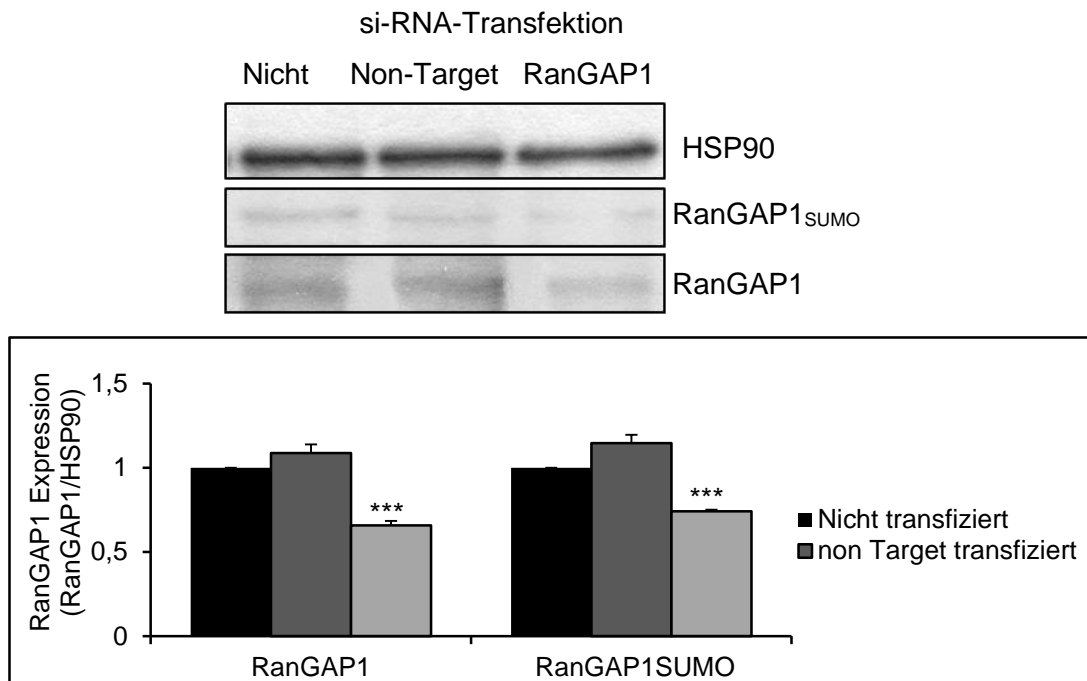
Immunfärbung von HeLa-Zellen nach FKS-Stimulation (10%; 0,5 h) A) für RanGAP1 und B) für MycBP2. Als Kontrolle dienen unstimulierte Zellen. Die Kerne wurden mittels DAPI angefärbt. Die überlagerten Bilder weisen sowohl für RanGAP1 als auch für MycBP2 nach FKS-Stimulation auf eine verstärkte Expression im Nukleus hin. C+D) Die densitometrische Auswertung zeigt, dass für RanGAP1 eine fünffache und für MycBP2 eine dreifache gesteigerte Translokation in den Nukleus vorliegt. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3). Statistische Signifikanzen wurde durch einen zweiseitigen T-Test ermittelt, \*\*p<0,01.

Um zu überprüfen, ob die Translokation des MycBP2 nach FKS-Stimulation auch in HeLa-Zellen RanGAP1-abhängig ist, wurde im nächsten Schritt die RanGAP1-Expression mittels siRNA gehemmt und dann erneut eine Stimulation mit 10% FKS durchgeführt.

Dazu wurde zunächst die RanGAP1 siRNA bzw. eine Kontroll-siRNA mit Turbofect-Transfektionsreagenz in HeLa-Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen

geerntet und lysiert und dann sowohl die RanGAP1-Expression als auch die RanGAP1-SUMOylierung mittels Western Blot bestimmt (Abbildung 35).

Anhand der densitometrischen Auswertung zeigte sich, dass nach Transfektion mit RanGAP1-siRNA die RanGAP1-Expression um 35% und die RanGAP1-SUMOylierung um 25% gehemmt wird (Abbildung 35).

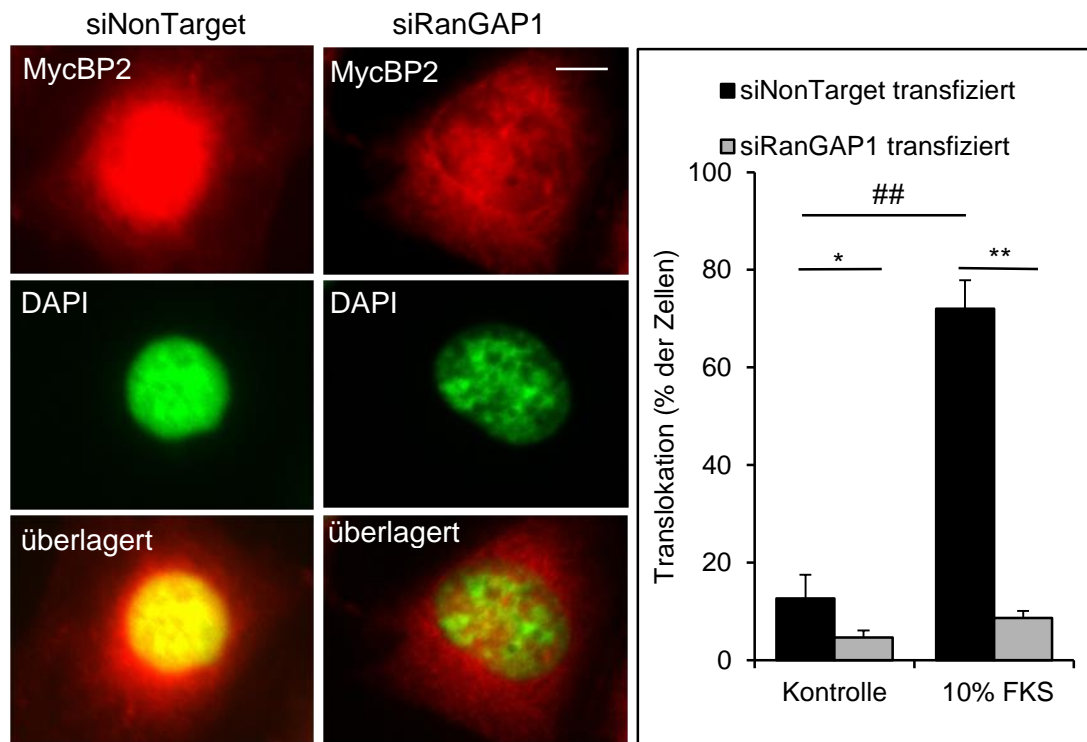


**Abbildung 35: RanGAP1-Expression und SUMOylierung nach der Transfektion mit RanGAP1- bzw. Non-Target-siRNA**

HeLa-Zellen (150.000 Zellen/Schale) wurden mit Turbofect mit RanGAP1- und Non-Targeting-siRNA transfiziert (30  $\mu$ M). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und sowohl die RanGAP1-Expression als auch die SUMOylierung mittels Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mittels RanGAP1-Antikörper. Als Ladekontrolle diente HSP90. Die densitometrische Auswertung zeigt eine Hemmung der RanGAP1-Expression und SUMOylierung um jeweils etwa 30%. Die Non-Target-transfizierten Zellen zeigen dagegen keinen Effekt. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3). Statistische Signifikanzen wurde durch einen zweiseitigen T-Test ermittelt, \*\*\*p<0,001.

Anschließend wurden dann die transfizierten Zellen für 30 Minuten mit 10% FKS stimuliert und die MycBP2-Lokalisation mittels Immunfärbung bestimmt. Betrachtet man die MycBP2-Translokation nach FKS-Stimulierten Zellen in Non-Target-siRNA-transfizierten Zellen, fällt auf, dass MycBP2 überwiegend im Kern lokalisiert ist. Die RanGAP1-siRNA-transfizierten Zellen zeigen dagegen keine Translokation des MycBP2. Es ist weiterhin überwiegend im Cytosol lokalisiert.

Densitometrisch ausgewertet zeigt sich in Abbildung 36 eine fast vollständige Hemmung der MycBP2-Translokation nach einer Hemmung der RanGAP1-Expression bzw. SUMOylierung. Die Kontrolle mit Non-Target-transfizierten HeLa-Zellen weist dagegen die erwartete MycBP2-Translokation in den Zellkern nach FKS-Stimulation auf.



**Abbildung 36: MycBP2-Translokation nach FKS-Stimulation in transfizierten HeLa-Zellen**

Repräsentative Immunfärbung. HeLa-Zellen (50.000 Zellen/Deckglas) wurden mit Turbofect mit RanGAP1- und Non-Targeting-siRNA transfiziert (30  $\mu$ M). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 min mit 10% FKS stimuliert. Die anschließende Immunfärbung erfolgte für MycBP2. Zellen mit einem Kern/Cytosol-Verhältnis  $>1,5$  in der liniendensitometrischen Auswertung der MycBP2-Lokalisation wurden als transloziert betrachtet. Durch FKS-Stimulation steigt die Translokation des MycBP2 in NonTarget-transfizierten Zellen um das 3,5 fache an, während die Translokationsrate für siRanGAP1-transfizierte Zellen auch nach Stimulation konstant unter 20% bleibt. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3). Statistische Signifikanzen wurde durch eine einfaktorielle Varianzanalyse und anschließendem Dunett-Test ermittelt, \*p<0,05; \*\*p<0,01; TTest innerhalb der Gruppe: ##p<0,01.

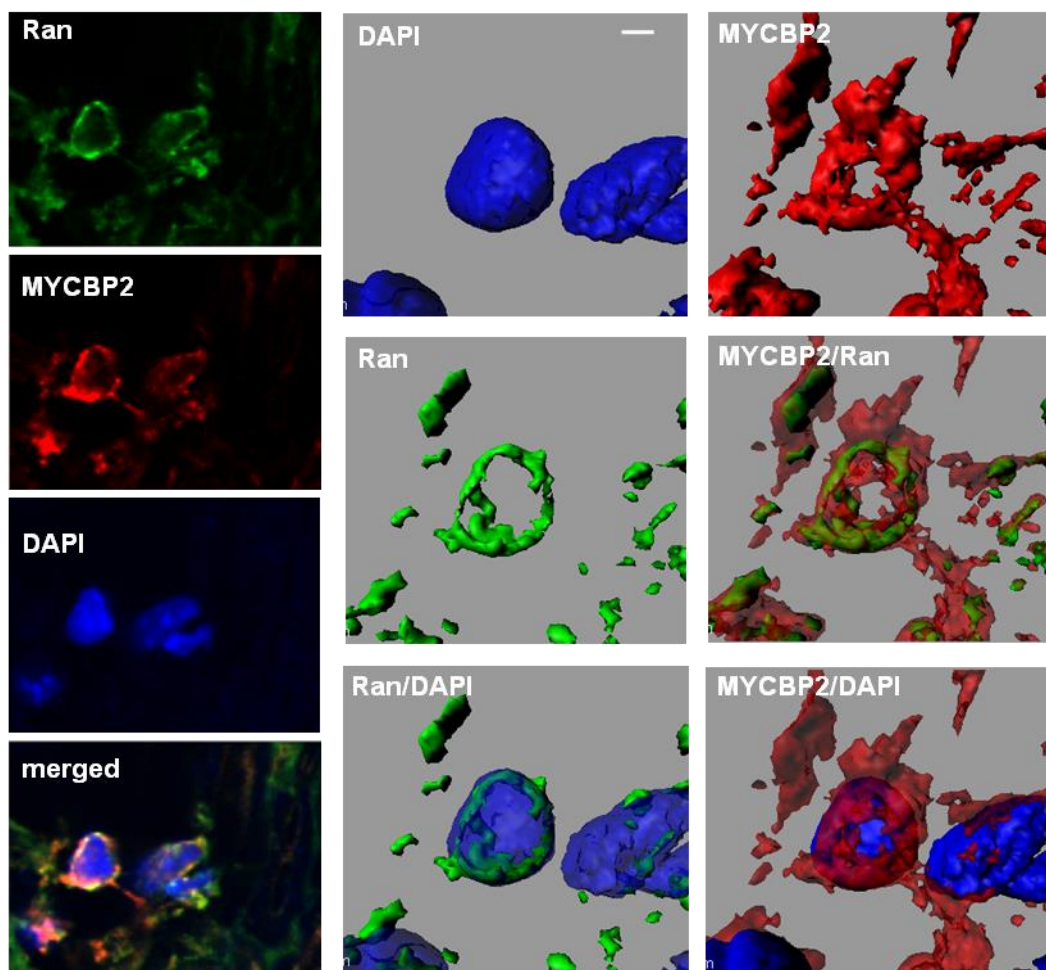
### 3.5. Mechanistische Interaktion von MycBP2 mit Ran

Die SUMO1-abhängige Rekrutierung des RanGAP1 an die Zellmembran ist ein essentieller Bestandteil des GTPase-Zyklus, daher stellt sich die Frage, ob MYCPB2 in diesen Zyklus involviert ist und inwieweit MycBP2 mit der kleinen GTPase Ran interagiert.

### 3.5.1. MycBP2-abhängige Lokalisation und Expression von Ran

Um eine Interaktion zwischen MycBP2 und Ran zu validieren, wurde zuerst die Expression und die Verteilung von Ran in Abhängigkeit von MycBP2 in SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen untersucht.

Dazu wurden MycBP2 und Ran in DRG-Neuronen immunologisch angefärbt. Wie anhand der 3D-Bilder in Abbildung 37 deutlich zu erkennen ist, befinden sich sowohl Ran als auch MycBP2 überwiegend im Zellkern. Außerdem zeigt sich, dass beide Proteine im Zellkern und im Cytosol kolokalisiert vorliegen.



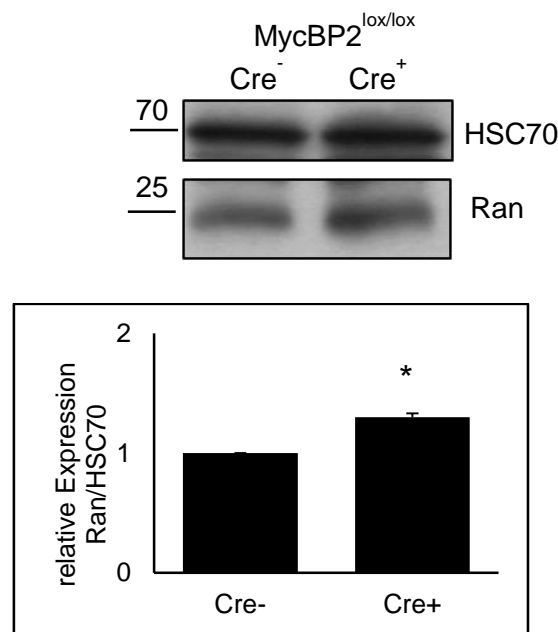
**Abbildung 37: Kolokalisation des MycBP2 und Ran im Zellkern und Cytosol von DRG-Neuronen**

Repräsentative Immunfärbung von DRG-Neuronen mit Ran und MycBP2-Antikörper. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die linke Spalte zeigt 2D-Bilder, wobei im überlagerten Bild deutlich zu erkennen ist, dass eine Kolokalisation von MycBP2 und Ran am Kern vorliegt. Die rechte Spalte zeigt eine aus Z-Schnitten generierte 3D-Ansicht, die die nukleare Lokalisation von MycBP2 und Ran noch stärker verdeutlicht.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass beide Proteine kolokalisiert vorliegen, musste als nächstes geklärt werden, ob auch eine funktionelle Interaktion besteht. Dazu

wurde zunächst DRG-Lysat von SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen mittels Western Blot bezüglich der Ran-Expression untersucht.

Wie in Abbildung 38 zu sehen ist, liegt in der Abwesenheit von MycBP2 eine leichte, aber signifikante Hochregulierung der Ran-Expression vor.



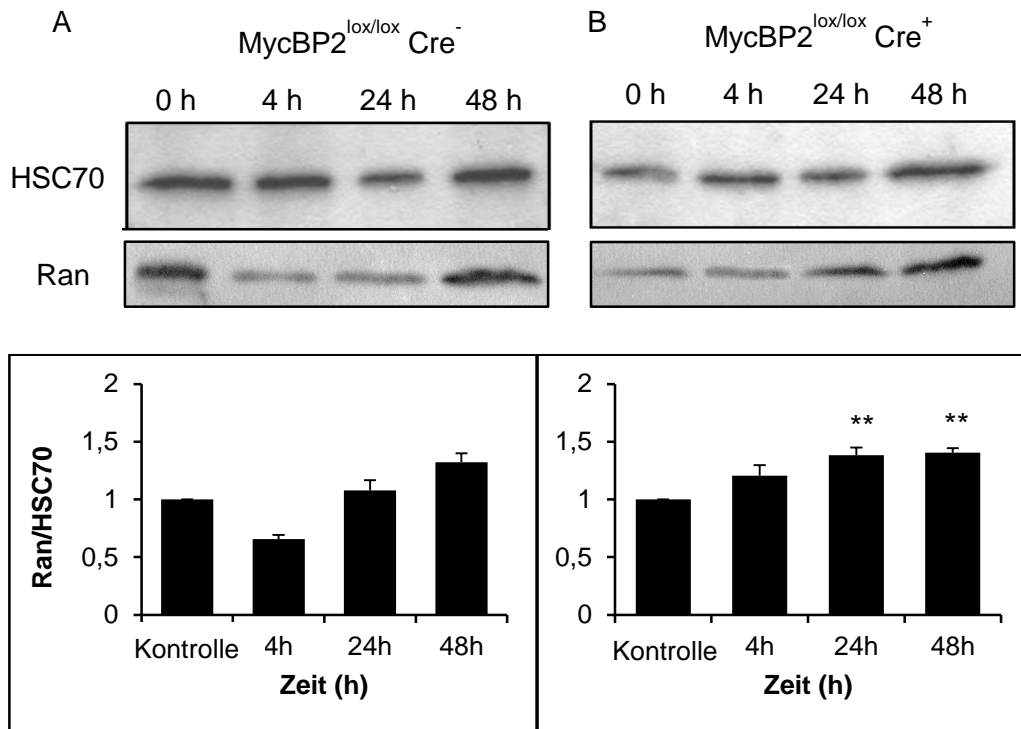
**Abbildung 38: Ran-Expression in DRGs von SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen**

Repräsentativer Western Blot aus DRG-Lysat von SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen. Die Ranexpression wurde über den Ran-Antikörper bestimmt. Als Ladekontrolle diente HSC70. Die densitometrische Auswertung zeigt einen signifikanten Anstieg der Ranexpression in Abwesenheit von MycBP2. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3). Statistische Signifikanzen wurde durch einen zweiseitigen T-Test ermittelt, \*p<0,05.

Die physiologische Interaktion zwischen Ran und MycBP2 wurde erneut anhand dem Entzündungsmodell der Zymosan-induzierte Hyperalgesie untersucht.

Nach der Induktion einer Entzündung in den Hinterpfoten von SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen, zeigt sich für Ran ein ähnliches Expressionsmuster wie für RanGAP1. In SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen kann nach vier Stunden eine nicht signifikante Hemmung der Ran-Expression detektiert werden, die aber nach 24 Stunden wieder auf basales Niveau zurückgekehrt ist (siehe Abbildung 39A). In SNS-Cre-positiven MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen kann analog zum RanGAP1 ein signifikanter Anstieg der Expression nach 24 Stunden gezeigt werden (siehe Abbildung 39B).





**Abbildung 39: Ran-Expression in SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen nach Zymosan-Behandlung**

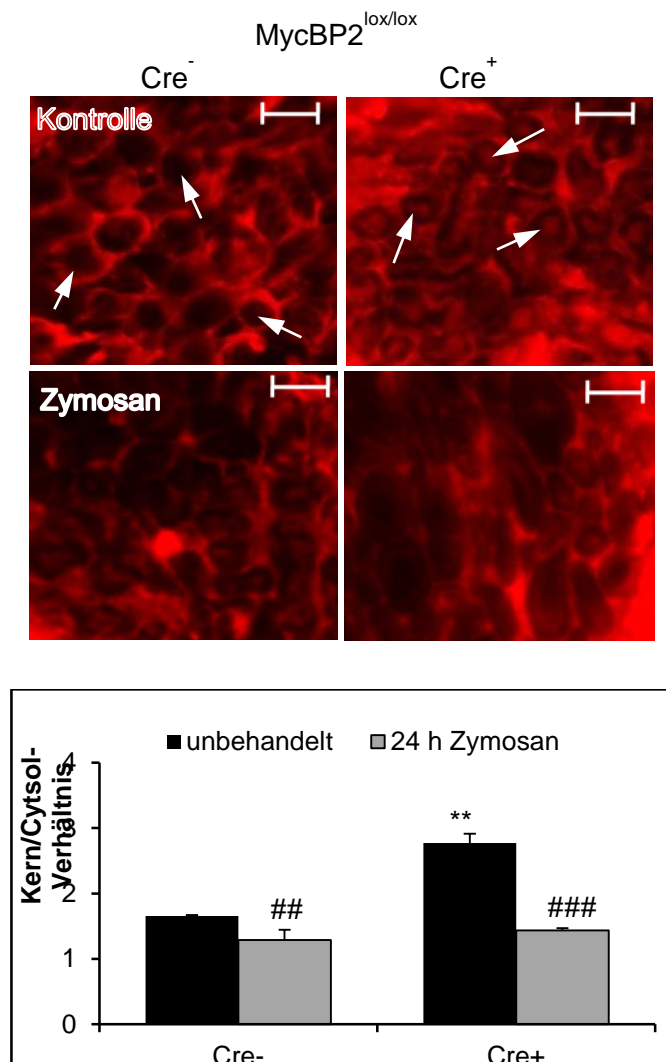
A: Expression von Ran nach Zymosanbehandlung (20  $\mu$ L; 12,5 mg/mL Zymosan; 0-48 h) in DRGs von SNS-Cre negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen. Die Detektion erfolgte mit Ran-Antikörper. Als Ladekontrolle diente HSC70. Die Densitometrie zeigt keine Änderung der Expression von Ran in Wildtyp-Mäusen. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3). Statistische Signifikanzen wurde durch eine einfaktorische Varianzanalyse und anschließendem Dunnett-Test ermittelt.

B: Expression von Ran nach Zymosanbehandlung (20  $\mu$ L; 12,5 mg/mL Zymosan; 0-48 h) in DRGs von SNS-Cre positiven MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen. Die Detektion erfolgte mit Ran-Antikörper. Als Ladekontrolle diente HSC70. Die Densitometrie belegt einen signifikanten Anstieg der Expression von Ran 24 und 48 h nach Zymosininjektion in MycBP2-Knockout-Mäusen. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3). Statistische Signifikanzen wurde durch eine einfaktorische Varianzanalyse und anschließendem Dunnett-Test ermittelt, \*\*p<0,01.

Da der Ran GTPase-Zyklus auf der Verteilung des Ran innerhalb der Zellkompartimente beruht, sollte als nächstes untersucht werden, inwieweit sich MycBP2 auf die Lokalisation von Ran auswirkt.

Vergleicht man daher in Abbildung 40 die Verteilung von Ran in DRG-Neuronen von unbehandelten und Zymosan-behandelten SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen dann fällt auf, dass sich die Lokalisation von Ran im Verhältnis zu Ran im Nukleus in unbehandelten Neuronen SNS-Cre positiver MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäuse fast verdoppelt, während sie in behandelten Tieren zum einen

signifikant geringer gegenüber den unbehandelten Tieren und zum anderen ein Unterschied zwischen SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen nicht mehr nachweisbar ist.



**Abbildung 40: Ran Lokalisation in SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen nach Zymosanbehandlung**

Repräsentative Immunfärbung von DRG-Schnitten der DRGs L5 und L6 24 h nach Zymosan-behandlung in SNS-Cre MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen. Als Kontrolle dienen unbehandelte Mäuse. Die Detektion erfolgte mit einem Ran-Antikörper. Über die Liniendensitometrie wurde ein Kern/Cytoplasma-Verhältnis der Ranexpression bestimmt. In unbehandelten Tieren liegt in der Abwesenheit von MycBP2 mehr Ran im Kern vor. Nach der Zymosanbehandlung nimmt dagegen sowohl in SNS-Cre positiven als auch in SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen die Ranexpressionsrate im Kern ab. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3). Statistische Signifikanzen wurde durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse und anschließend Bonferoni-Test ermittelt, ##p<0,01; ###p < 0,001. Außerdem zweiseitiger T-Test zwischen Cre- und Cre+: \*\*p<0,01.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass diese Daten belegen, dass eine funktionelle Interaktion zwischen Ran und MycBP2 besteht, die sich auch auf physiologischer Ebene durch die MycBP2-abhängige Expression von Ran während einer Zymosan-induzierte Hyperalgesie zeigt. Außerdem liegt eine MycBP2-abhängige Verteilung des Ran innerhalb der Zellkompartimente vor, die zusammen mit der in Abbildung 38 erkennbaren Hochregulation der Ranexpression in Abwesenheit von MycBP2 auf eine Kompensierungsreaktion bedingt durch den Arrest des Ran im Zellkern zurückzuführen ist.

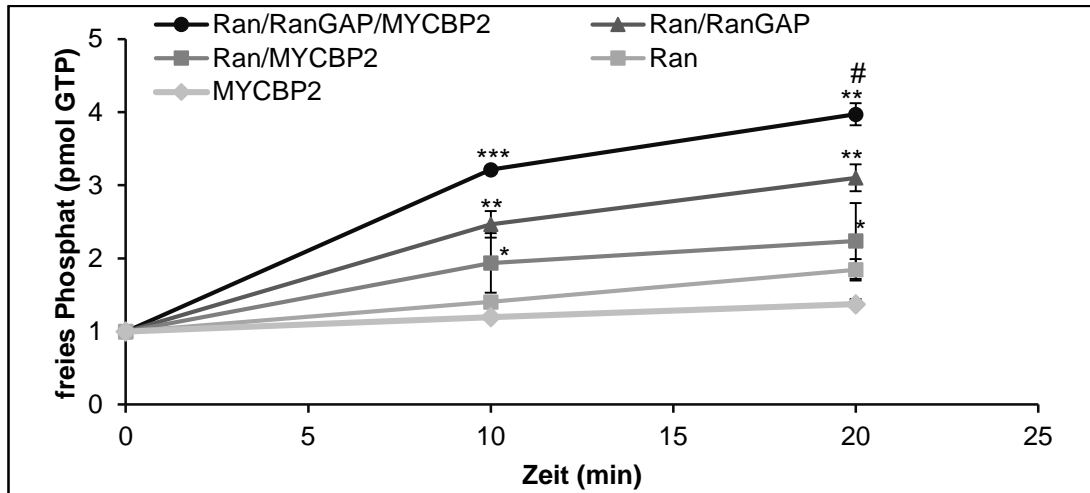
### **3.5.2. Einfluss des MycBP2 auf den Ran-GTPase-Zyklus**

Die veränderte Ran-Kompartimentierung in DRG-Neuronen von MycBP2-defizienten SNS-Cre positiven Mäusen, könnte auf eine verringerte GDP/GTP-Austauschrate an Ran zurückzuführen sein. Nur in GTP-gebundener Form kann Ran an Importin  $\beta$  binden und so aus dem Zellkern ins Cytoplasma transportiert werden. Da MycBP2 bereits für Rheb leichte GEF-Aktivität zeigte, wurde im folgenden Abschnitt der Einfluss von MycBP2 auf den Ran-GTPase-Zyklus untersucht.

#### **Stationärer GTPase-Assay**

Anhand des stationären GTPase-Zyklus, sollte MycBP2 auf eine mögliche GAP-Aktivität oder auf eine verstärkende Wirkung auf die GAP-Aktivität des RanGAP1 untersucht werden. Dazu wurde zum einen die GTP-Hydrolyserate des Ran bestimmt. Anschließend wurde die GTP-Hydrolyse in Abhängigkeit von RanGAP1 gemessen.

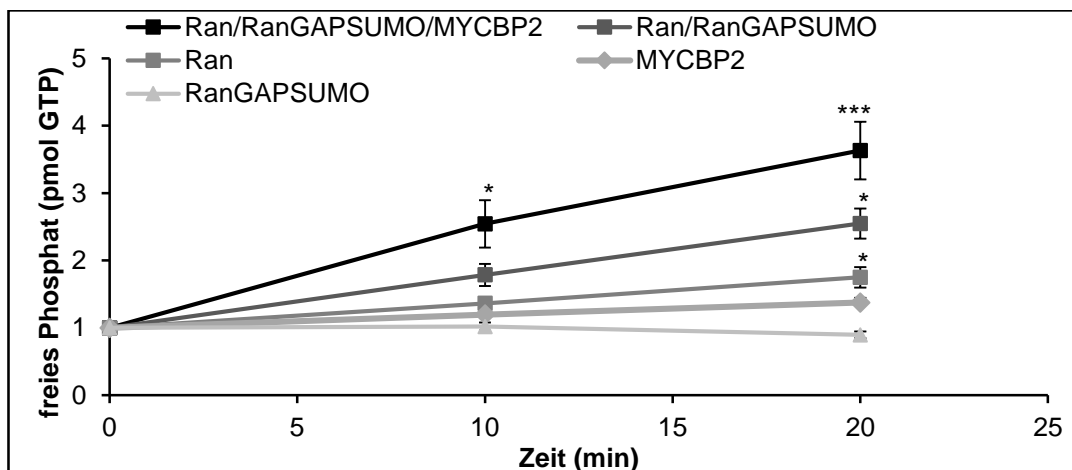
Wie in Abbildung 41 gezeigt, steigt die GTP-Hydrolyse durch Zugabe von 100 nM RanGAP1 im Vergleich zur intrinsischen GTPase-Aktivität des Ran in etwa um das Dreifache. Durch Zugabe des MycBP2 wird die GTP-Hydrolyse im Vergleich zu Ran alleine verdoppelt. Werden alle drei Proteine zusammen gegeben steigt die GTP-Hydrolyse ungefähr um das Vierfache.



**Abbildung 41: GTP-Hydrolyse in Abhängigkeit von Ran, RanGAP1 und MycBP2**

Stationärer GTPase Assay zur Hydrolyse von RanGTP (2  $\mu$ M) in Anwesenheit von RanGAP1 (100 nM) und/oder MycBP2 (35 nM) und in Abhängigkeit von der Zeit (0, 10, 20 min). In Anwesenheit von MycBP2 und RanGAP1 wird die Hydrolyse von RanGTP gesteigert. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3-10). Statistische Signifikanzen wurde durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse und anschließendem Bonferoni-Test ermittelt, \*p < 0,5; \*\*p<0,01; \*\*\*p < 0,001.

Da in der vorliegenden Arbeit eine spezifische Interaktion des MycBP2 mit SUMOyliertem RanGAP1 gezeigt werden konnte, wurde der stationäre GTPase-Assay mit zuvor SUMOyliertem RanGAP1 wiederholt. Auch hier zeigt sich die MycBP2-abhängige Steigerung der GTP-Hydrolyse (siehe Abbildung 42)



**Abbildung 42: GTP-Hydrolyse in Abhängigkeit von Ran, SUMOyliertem RanGAP1 und MycBP2**

Stationärer GTPase Assay zur Hydrolyse von RanGTP (2  $\mu$ M) in Anwesenheit von SUMOyliertem RanGAP1 (100 nM) und/oder MycBP2 (35 nM) und in Abhängigkeit von der Zeit (0, 10, 20 min). In Anwesenheit von MycBP2 und SUMOyliertem RanGAP1 wird die Hydrolyse von RanGTP gesteigert. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3-10). Statistische Signifikanzen wurde durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse und anschließendem Bonferoni-Test ermittelt, \*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001.

Daher kann gesagt werden, dass die Zugabe von MycBP2 eine verstärkte Hydrolyse des RanGTP zur Folge hat.

### Ein-Zyklus GAP-Assay

Da die eben beschriebenen Beobachtungen auf mehrere Funktionen des MycBP2 zurückzuführen sein könnten, wurde in diesem Abschnitt ein Ein-Zyklus-GAP-Assay nach Kehlenbach durchgeführt. Mit diesem Assay kann bestimmt werden, ob es sich bei MycBP2 um eine GAP für Ran handelt oder ob eine MycBP2-abhängige Verstärkung der GAP-Aktivität des RanGAP1 vorliegt.

Im Ein-Zyklus-GAP-Assay nach Kehlenbach wird das Ran zuerst mit radioaktivem GTP beladen. Durch Zugabe hoher Magnesiumchlorid-Konzentrationen wird eine weitere Bindung des GTP verhindert und dessen Hydrolyse begünstigt. Die GAP-Aktivität verschiedener Proteine kann dann anhand des gemessenen freien Phosphats bestimmt werden.

Wie erwartet zeigt Abbildung 43 nur eine geringe intrinsische GAP-Aktivität von Ran. Durch Zugabe von RanGAP1 zeigt sich eine 60%ige Steigerung des freien Phosphats. Wird dagegen MycBP2 zum beladenen Ran dazugegeben, nimmt die Fähigkeit des Ran das GTP zu spalten noch weiter ab. Auch die Zugabe von MycBP2 zu Ran und RanGAP1 hat eine Hemmung der GAP-Aktivität zur Folge.

Damit wurde belegt, dass MycBP2 keine GAP-Aktivität gegenüber Ran besitzt und auch nicht die GAP-Aktivität des RanGAP1 steigert.

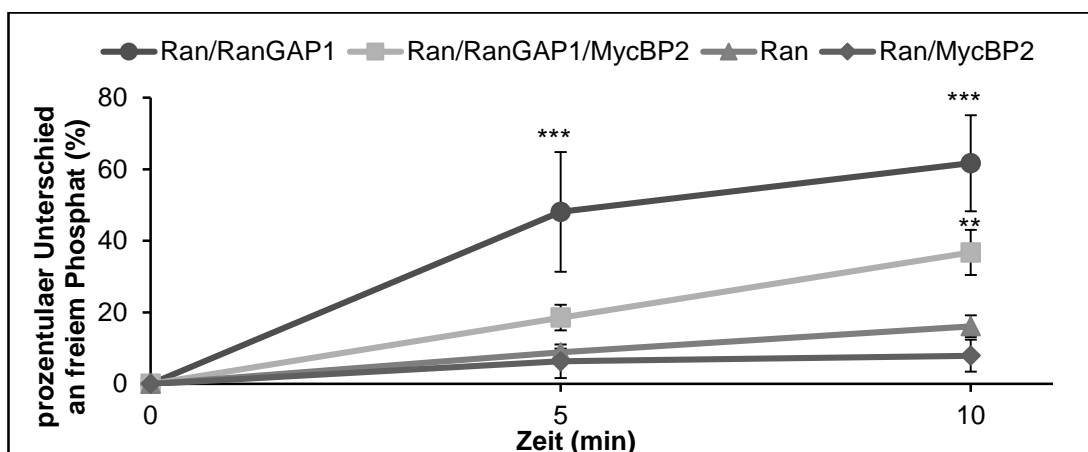


Abbildung 43: Untersuchung der GAP-Aktivität des MycBP2 für Ran

Ein-Zyklus-GAP-Assay nach Kehlenbach zur Untersuchung der Hydrolyse von RanGTP (2  $\mu$ M) in Anwesenheit von RanGAP1 (100 nM) und/oder MycBP2 (35 nM) und in Abhängigkeit von der Zeit (0, 5, 10 min). Es liegt keine MycBP2-abhängige Steigerung der RanGTP-Hydrolyse vor, daher kann eine GAP-Aktivität des MycBP2

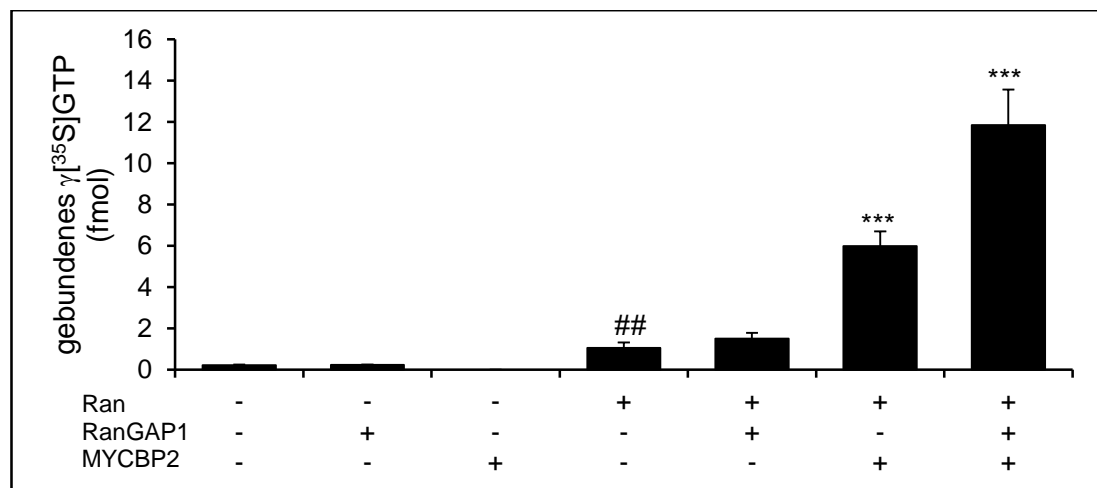
ausgeschlossen werden. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3). Statistische Signifikanzen wurde durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse und anschließendem Bonferoni-Test ermittelt, \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

### $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindeassay

Da bisher ausgeschlossen werden konnte, dass MycBP2 die Hydrolyse von RanGTP begünstigt, ist die letzte Möglichkeit um den stationären GTPase-Assay zu erklären eine GEF-Aktivität des MycBP2.

Um nun die mögliche GEF-Aktivität des MycBP2 zu untersuchen, wurde der  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindeassay herangezogen. In diesem Test wird die Bindung eines radioaktiven nicht-hydrolysierbaren GTP-Analogons an Ran Bestimmt. Auch hier wurde zuerst die Bindung des  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP an Ran ohne weitere Proteine bestimmt. Anschließend wurden RanGAP1, MycBP2 oder beide Proteine dem Reaktionsansatz zugegeben.

Die Zugabe von RanGAP1 hatte erwartungsgemäß keinen signifikanten Effekt auf die  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindung. Wurde dagegen MycBP2 zugegeben verdreifachte sich die Menge an  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-gebundenen Ran. Eine Zugabe beider Proteine (MycBP2 und RanGAP1) steigert die  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindung von Ran sogar um das Sechsfache (siehe Abbildung 44).

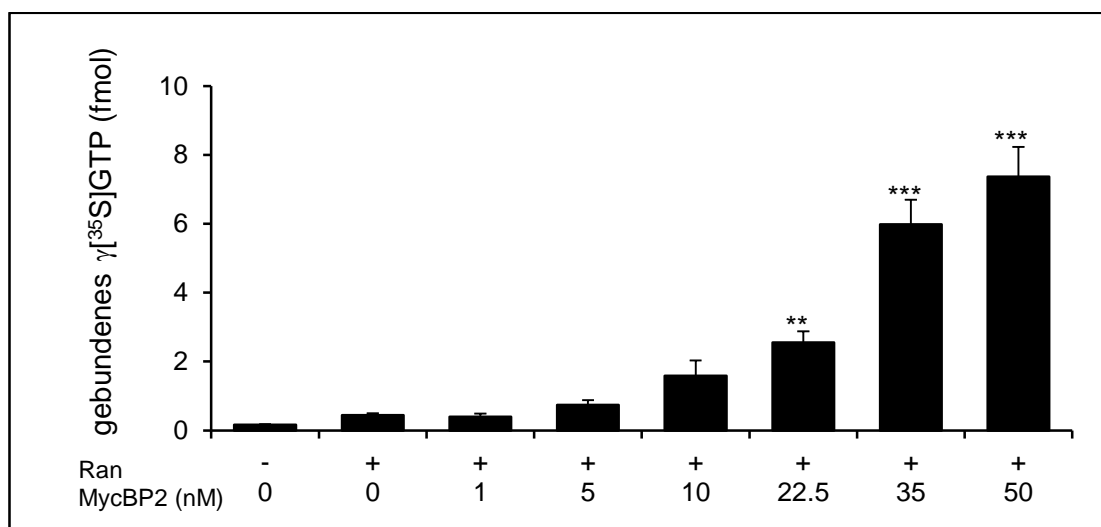


**Abbildung 44: RanGAP1 und MycBP2-abhängige  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindung an Ran**

$\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindeassay zur Untersuchung der GEF-Aktivität von MycBP2 (35 nM) für Ran (2  $\mu\text{M}$ ) in Anwesenheit von RanGAP1 (100 nM). Es zeigt sich eine gegenüber der intrinsischen RanGTP-Bindung um das 6 fache gesteigerte  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindung durch die Zugabe von MycBP2. Die Zugabe von RanGAP1 zu Ran und MycBP2 verstärkt diesen Effekt noch weiter. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3-9). Statistische Signifikanzen wurde durch eine einfaktorielle Varianzanalyse und anschließendem Dunnett-Test ermittelt, ##p < 0,01 gegenüber der Kontrolle ohne Protein; \*\*\*p < 0,001 gegenüber Ran.

Zur näheren Betrachtung der GEF-Aktivität des MycBP2 wurde eine Konzentrationsreihe angefertigt, wobei die MycBP2-Konzentration zwischen 1 nM und 50 nM variiert wurde.

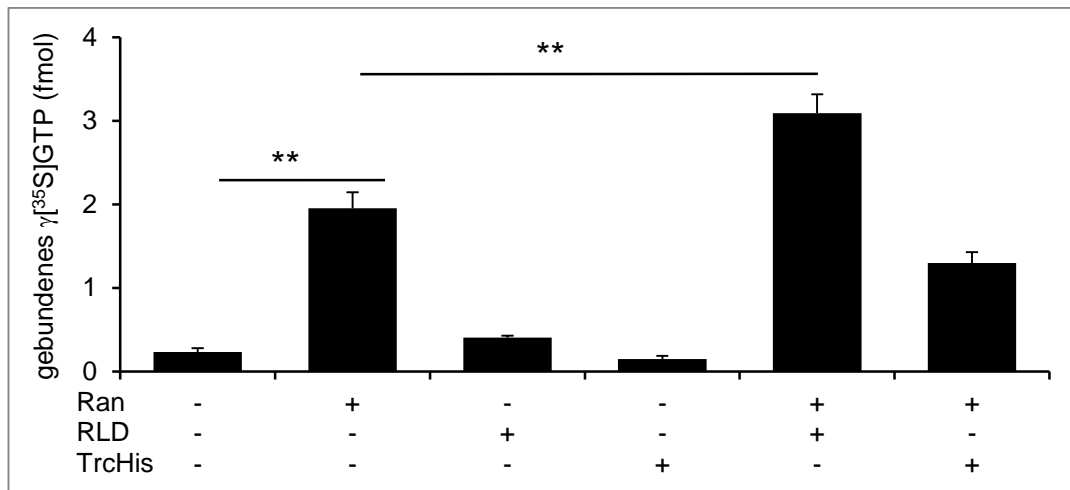
In Abbildung 45 erkennt man, dass in Abhängigkeit von der MycBP2-Konzentration eine steigende  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindung detektiert werden konnte, die ab einer Konzentration von 22,5 nM MycBP2 signifikant gegenüber der  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindung von Ran ist. Auf Grund der enormen Größe des MycBP2 und der daher benötigten Proteinkonzentrationen konnte eine Konzentration, die zu einer maximalen der  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindung führte, nicht erreicht werden.



**Abbildung 45: Konzentrationsverlauf zur MycBP2-abhängigen  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindung von Ran**

$\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindeassay zur Untersuchung der konzentrationsabhängigen GEF-Aktivität von MycBP2 (0-50 nM) für Ran (2  $\mu\text{M}$ ). Mit zunehmender MycBP2-Konzentration steigt auch die Bindung von  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP an Ran. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3-13). Statistische Signifikanzen wurden durch eine einfaktorische Varianzanalyse und anschließend dem Dunnett-Test ermittelt, \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 gegenüber Ran

Nachdem eine GEF-Aktivität von MycBP2 bestätigt werden konnte, wurde im nächsten Schritt untersucht, welche funktionelle Domäne für diese Funktion verantwortlich ist. Da für die RCC1-ähnliche Domäne bereits eine GEF-Aktivität postuliert wurde, wurde sich zuerst auf diese Domäne konzentriert. Da wegen seiner Instabilität nur eine partielle Aufreinigung der rekombinanten RCC1-ähnlichen Domäne möglich war, wurde der  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindungsassay zusätzlich mit einem Kontrolllysat durchgeführt. Während das Kontrolllysat keine Wirkung zeigt, steigt die  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindung durch Zugabe des RCC1-ähnlichen-Domäne-haltigen Lysats signifikant an (siehe Abbildung 46).



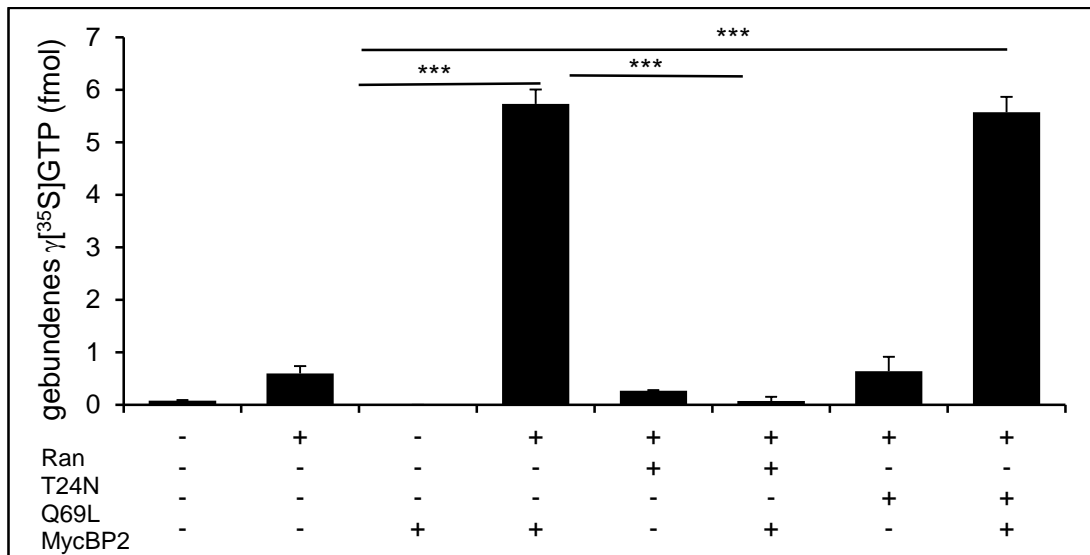
**Abbildung 46: GEF-Aktivität der RCC1-ähnlichen Domäne des MycBP2**

$\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindeassay zur Untersuchung der GEF-Aktivität der RLD des MycBP2 für Ran ( $2\ \mu\text{M}$ ). Als Kontrolle diente Lysat von stimulierten BL21-Zellen mit leerem TrcHis-Vektor. Die RLD zeigt eine signifikante GEF-Aktivität gegenüber Ran, während das Kontrolllysat die  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindung verringert. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt ( $n=3$ ). Statistische Signifikanzen wurde durch eine einfaktoruelle Varianzanalyse und anschließendem Dunnett-Test ermittelt,  $**p < 0,01$ .

Um eine Aussage über die Bindungspräferenz von MycBP2 gegenüber RanGDP bzw. RanGTP treffen zu können, wurde zum einen die konstitutiv inaktive Ran-Mutante T24N und zum anderen die konstitutiv aktive Ran-Mutante Q69L hergestellt. In einem  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindungsassay wurde dann in Anwesenheit der Mutanten die GEF-Aktivität von MycBP2 gegenüber Ran bestimmt.

In Abbildung 47 ist deutlich zu erkennen, dass die GEF-Aktivität von MycBP2 gegenüber Ran in Anwesenheit der inaktiven Mutante T24N signifikant verringert ist, während die aktive Mutante Q69L keinen Effekt zeigt. Daraus lässt sich schließen, dass MycBP2 verstärkt an T24N und damit RanGDP bindet.





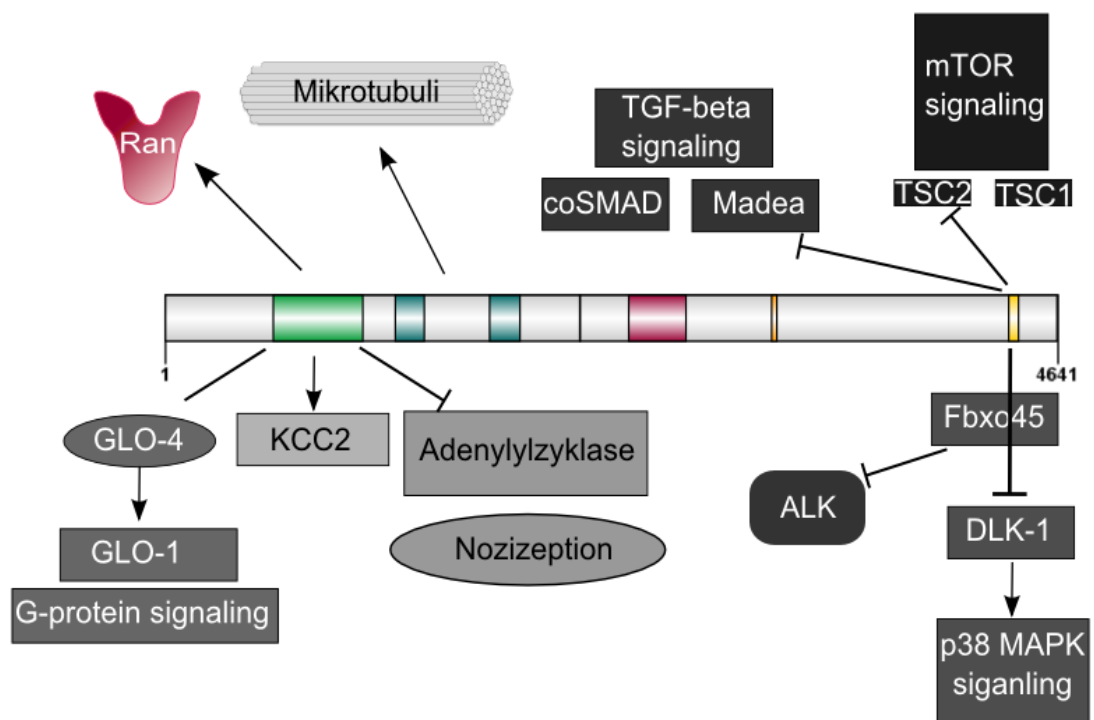
**Abbildung 47: Bindungspräferenz des MycBP2 für die konstitutiv inaktive Ran Mutante**

$\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindeassay zur Untersuchung der Bindungspräferenz des MycBP2 (35 nM) gegenüber den Ran Mutanten T24N und Q69L (6  $\mu\text{M}$ ) in Anwesenheit von Ran (2  $\mu\text{M}$ ). MycBP2 zeigt einen signifikanten Rückgang seiner GEF-Aktivität gegenüber Ran, in Anwesenheit der konstitutiv inaktiven Mutante T24N, während durch Zugabe der konstitutiv aktiven Mutante Q69L die  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindung konstant bleibt. Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=4). Statistische Signifikanzen wurde durch eine einfaktorielle Varianzanalyse und anschließendem Dunnett-Test ermittelt, \*\*\*p < 0,001.

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Daten, dass es sich bei MycBP2 um einen GEF für Ran handelt, wobei MycBP2 bevorzugt RanGDP bindet und die GEF-Aktivität von der RLD des MycBP2 ausgeht.

## 4. Diskussion

MycBP2 ist mit einer molaren Masse von 510 kDa eines der größten Proteine im humanen Genom und kann aufgrund seiner vielseitigen funktionellen Domänen in die verschiedensten Signalwege eingreifen. Besonders hervorzuheben sind zum einen die Zink-RING-Finger-Domäne, die als E3-Ubiquitinligase über den proteosomalen Abbau diverse Prozesse regulieren kann und zum anderen die N-terminale RCC1-ähnliche Domäne, die direkte Protein-Protein-Interaktionen eingeht und so die Funktion der Bindungspartner beeinflusst.



**Abbildung 48: Regulation von Signalkaskaden durch die MycBP2-Orthologe**

Schematische Darstellung des MycBP2 und seiner funktionellen Domänen einschließlich der bereits bekannten Interaktionspartner und die involvierten Signalwege und der neu entdeckten Interaktion mit dem Ran GTPase-Zyklus, modifiziert nach Po et al. [22]

Während die Funktionen der RING-Finger-Domäne bisher ausschließlich auf ihrer Fähigkeit andere Proteine für den proteosomalen Abbau zu markieren beruhen, sind die Funktionen der RCC1-ähnlichen Domäne wesentlich diffuser. Die Hemmung der Adenylylzyklase beruht auf direkter Protein-Protein-Interaktion, genau wie die Aktivierung des KCC2. Daneben gibt es mehrere Indizien, dass MycBP2 über seine RCC1-ähnliche Domäne als GEF für kleine GTPasen, wie Rheb, wirken könnte oder zumindest die GEF-Aktivität anderer Proteine, wie für GLO4 erhöhen kann [18, 54]. Daher lag der Ansatzpunkt dieser Arbeit in der Identifizierung weiterer Interaktionspartner und der Aufdeckung des Interaktionsmechanismus.

#### 4.1. Interaktion mit SUMOyliertem RanGAP1

Als Grundlage für die Identifizierung neuer Interaktionspartner des MycBP2 diente wie bereits erwähnt ein Antikörperarray, der Unterschiede in der Expression von SUMO1 in SNS Cre-negativen und -positiven Mäusen<sup>lox/lox</sup> aufwies. Ein Indiz für die Interaktion von MycBP2 mit einem SUMOylierten Protein liefert das, durch die SUMO-Bindungsmotiv-Erkennungssoftware GPS-SBM 1.0 identifizierte, *high threshold* SUMO-Bindungsmotiv an Position 2157-2160 der MycBP2 Aminosäuresequenz, das eine Bindung von SUMOylierten Proteinen ermöglicht. Die Interaktion des SUMO-Bindungsmotives mit SUMOylierten Proteinen folgt dabei dem gleichen Prinzip wie die nicht kovalente Bindung von ubiquitin-modifizierten Proteinen an Ubiquitin-Bindungsmotive (UBM), wobei bereits 16 UBMs bekannt sind, aber bisher nur eine SBM indentifiziert werden konnte. Das SUMO-Bindungsmotiv weist eine hydrophobe V/I-X -V/I-V/I-Sequenz auf, über die SUMO nicht kovalent gebunden werden kann, während die kovalente Bindung, also die SUMOylierung, über die *SUMOylation site* vermittelt wird [150, 151]. Die Affinität des SBM für SUMO liegt bei 2-3  $\mu$ M und ist damit deutlich höher als die Affinität von UBMs für Ubiquitin [152, 153].

Die Funktion des SUMO-Bindungsmotives ist weit gefächert. Es vermittelt Protein-Protein-Interaktionen, beeinflusst die Lokalisation verschiedener Proteine und ist wahrscheinlich auch an Konformationsänderungen der gebundenen Proteine beteiligt [154]. Während der DNA-Replikation ermöglicht das SUMO-Bindungsmotiv im Ringklemmenprotein PCNA, nach dessen SUMOylierung, die Rekrutierung der DNA-Helicase Srs2, um DNA-Schäden zu reparieren [155-158]. Des Weiteren verhindert das SUMO-Bindungsmotiv der Thymin-DNA-Glycosylase (TDG) Punktmutationen. TDG entfernt falsch platzierte Thymin- und Uracil-Basen aus DNA-Strängen und bindet anschließend in der Lücke. Erst durch SUMO-Bindungsmotiv -abhängige Konformationsänderung kann die TDG dissoziieren und die DNA repariert werden [159-161]. *Promyelocytic leukemia proteins* (PML) können nach SUMOylierung über deren SUMO-Bindungsmotive verschiedene Proteine, wie die TDG oder DAXX, in den Nucleus rekrutieren [162] und stehen im Verdacht anschließend die kovalente SUMO-Modifikation zu vermitteln [163, 164]. So kann auch die Deletion des SUMO-Bindungsmotives in DAXX dessen SUMOylierung verhindern [162].

Die Funktion des SUMO-Bindungsmotives des MycBP2 wurde bisher nicht näher untersucht. Die hier anhand der Immunpräzipitation gefundenen Daten legen aber aufgrund der spezifischen Bindung des SUMOylierten RanGAP1 nahe, dass das SUMO-Bindungsmotiv in diese Bindung involviert ist und sie stabilisiert. Eine ähnliche Interaktion von SUMOyliertem RanGAP1 findet sich auch für das RanBP2. Eine

Bindung findet nur zwischen SUMOyliertem RanGAP1 und RanBP2 statt, wobei das SUMO-Bindungsmotiv für diese SUMO-abhängige Interaktion verantwortlich ist [16, 165].

Interessant ist auch die Rekrutierung von SUMO-Bindungsmotiv -haltigen Proteinen in den Zellkern. MycBP2 wurde durch seine Interaktion mit cMyc im Zellkern entdeckt und trägt ein nukleares Lokalisationssignal, das unter anderem auch für eine SUMOylierung im Zellkern erforderlich ist. Scholich et al. konnten zeigen, dass MycBP2 zellzyklusabhängig zwischen Plasma und Nukleus shuttelt. Während es in der M-Phase ausschließlich im Cytosol vorliegt, können während der G1-Phase auch größere Mengen im Zellkern gefunden werden [21]. Trotzdem ist wenig über den eigentlichen Transportmechanismus bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl in DRG Neuronen als auch in HeLa-Zellen eine SUMOyliertes RanGAP1-abhängige Translokation von MycBP2 in den Nukleus stattfindet. RanGAP1 wird nach SUMOylierung an die Kernmembran rekrutiert. Gleichzeitig führt wahrscheinlich die SBM des MycBP2 nach SUMOylierung von RanGAP1 zu deren Bindung und damit zu einer gemeinsamen Translokation an den Zellkern. Auch für weitere Proteine konnte eine Translokation in den Zellkern in Abhängigkeit von SUMOyliertem RanGAP1 gezeigt werden. Die E3-Ubiquitinligase *Nuclear Tumor Necrosis factor Receptor-associated Factor 6* (TRAF6) vermittelt diverse Signalwege, u.a. den NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionsweg, nachdem es im Zellkern an c-Myb assoziiert ist. Pham et. al. konnten zeigen, dass TRAF6 wie auch MycBP2 ausschließlich mit SUMOyliertem RanGAP1 interagiert. Im Unterschied zu den hier beschriebenen Daten konnte diese Interaktion aber nur in Nuclei-Fractionen festgestellt werden. Anhand von Immunfärbungen wurde dann eine Kolo-kalisation von SUMOyliertem RanGAP1 und TRAF6 an der Kernmembran festgestellt, wodurch die Autoren darauf schließen, dass RanGAP1 am nuklearen Import von TRAF6 beteiligt ist [166].

Auch die Hemmung der E3-Ubiquitin-Ligase Aktivität des MycBP2 durch die Bindung von SUMOyliertem RanGAP1 kann auf das SUMO-Bindungsmotiv zurückzuführen sein. So verringert die SUMO-Bindung an TDG dessen Bindungsaffinität für die Substrat-DNA signifikant. Dies könnte auf eine durch die SUMO-Bindung bedingte Konformationsänderung zurückzuführen sein [160]. Bezieht man dieses Wissen auf die Ergebnisse dieser Arbeit wäre es möglich, dass die Bindung des SUMOylierten RanGAP1 zu einer Konformationsänderung in MycBP2 führt und dadurch die Bindungsaffinität für TSC2 verringert wird, wodurch die Ubiquitylierungsrate sinkt. Außerdem konnte von Mäurer et. al. gezeigt werden, dass zum einen die C-terminale

RING-Finger-Domäne des MycBP2 alleine nicht dazu in der Lage ist TSC2 zu ubiquitinieren und zum anderen, dass mittels Immunpräzipitation gefälltes TSC2 auch nicht von MycBP2 ubiquitiniert werden kann. Eine Ubiquitylierung ist nur durch Zugabe von Zellysat möglich. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass an der Ubiquitylierung von TSC2 außer MycBP2 noch weitere MycBP2-Interaktionsproteine beteiligt sind, die direkt an MycBP2 binden müssen, um eine Ubiquitylierung zu ermöglichen [18]. In Bezug auf die Bindung von SUMOyliertem RanGAP1 und der damit einhergehenden Hemmung der Ubiquitinligase-Aktivität, könnte dies auf die schon angesprochene Konformationsänderung des MycBP2 zurückzuführen sein, wodurch dann die Bindung der Interaktionsproteine verhindert wird. Außerdem wäre eine kompetitive Bindung des RanGAP1 oder der Interaktionsproteine möglich und die Hemmung könnte auch auf allosterischen Effekten beruhen, so dass durch die RanGAP1-Bindung die Interaktionspartner aus sterischen Gründen nicht mehr binden können. Xia et al. zeigen auch, dass die Bindung von Interaktionspartnern zur Kontrolle der E3-Ubiquitinligase-Aktivität weiterer Proteine beiträgt. Die Bindung des *four and a half LIM-only protein* (FHL) 2 an die E3-Ubiquitinligase Arkadia hat eine verringerte Autoubiquitylierung zur Folge und wirkt sich somit auch auf die Ligase-Aktivität aus [167]. Im Fall von Cullin-1 führt die Bindung des *cullin-associated nedd8-dissociated protein1* (CAND1) zur Hemmung der Assoziation des SCF-Ubiquitinligase-Komplexes und damit auch zur Hemmung der Ubiquitinligase-Aktivität [168].

Zellmembran

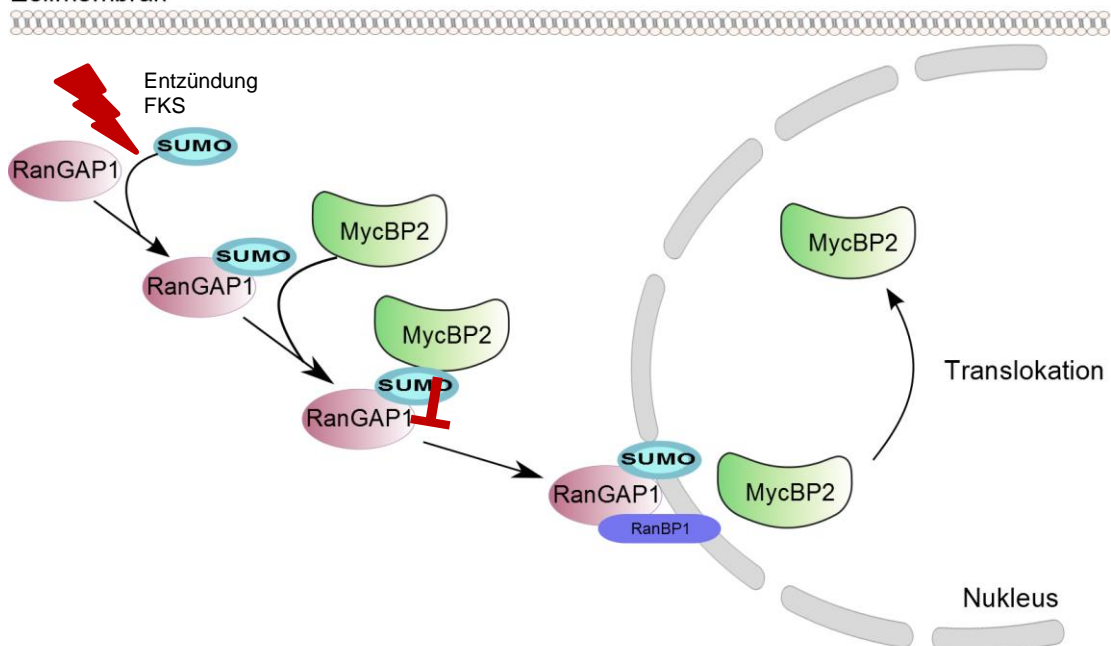


Abbildung 49: RanGAP1 abhängige nukleare Translokation des MycBP2

Stimulus-induziert kommt es zur SUMOylierung von RanGAP1, was wiederum die Rekrutierung von MycBP2 zur Folge hat. Während der Translokation zum NPC wird durch die Bindung die E3-Ubiquitinligase Aktivität des MycBP2 gehemmt. Am NPC interagiert SUMOyliertes RanGAP1 mit RanBP2 während MycBP2 in den Kern transportiert wird.

## 4.2. Interaktion mit Ran

Seit der Entdeckung der RCC1-ähnlichen Domäne und ihrer Homologie zum Ran-GEF RCC1 wird über ihre GEF-Aktivität spekuliert, trotzdem konnte sie bisher noch nicht nachgewiesen werden.

Wie Tabelle 17 zu entnehmen, wurde für verschiedene Proteine der RCC1-Superfamilie eine Interaktion mit kleinen GTPasen nachgewiesen. Eine GEF-Aktivität zeigte sich bisher nur für das neuronale Protein *Amyotrophic lateral sclerosis 2 protein* (ALS2), ein neuronales Protein, das in die amyotrophe Lateralsklerose involviert ist. Im Gegensatz zu den andern Mitgliedern der RCC1-Superfamilie weist dieses Protein gleich mehrere Domänen mit potenzieller GEF-Aktivität, namentlich eine RCC1-ähnliche Domäne, eine *Dbl homology and pleckstrin homology* (DH/PH) Domäne und eine *vacuolar protein sorting 9* (VPS9) Domäne, auf. Durch Untersuchungen mit verschiedenen Mutanten konnte nachgewiesen werden, dass die VPS9-Domäne des ALS2 die endosomale Lokalisierung des Rab5 und die GEF-Aktivität für diese GTPase bedingt, während die RCC1-ähnliche Domäne die Fusion mit den Endosomen verringert [169].

Für die Proteine HERC1, eine Ubiquitinligase, die auch eine RCC1-ähnliche Domäne beinhaltet und PRAF1, eine Protein aus *Arabidopsis thaliana* mit einer pleckstrin homology (PH) Domäne, einer RCC1-ähnlichen-Domäne und einem FYVE-Zink-Finger, konnte bisher eine *Guanosine release factor* (GRF)-Aktivität für ARF-1 und Proteine der Rab-Familie gezeigt werden [170, 171]. Claret, ein Mitglied der RCC1-Superfamilie aus *D. melanogaster*, bindet bevorzugt die nukleotidfreie Form der kleinen GTPase Rab-RP1, wobei die ersten drei Wiederholungen der RCC1-ähnlichen Domäne in diese Interaktion involviert sind. Das einzige Protein für das bisher eine direkte Interaktion mit Ran nachgewiesen werden konnte, ist die Kinase Nercc1, die auch zur RCC1-Familie gehört. Über Versuche mit verschiedenen Mutanten zeigte sich eine verstärkte Interaktion von Nercc1 mit RanGDP [172].

Tabelle 17: Proteine der RCC1-Superfamilie und ihre Interaktion mit kleinen GTPasen

Name	Interaktion mit kleinen GTPasen	Quelle
<b>MycBP2</b>	Vermutlich GEF für Rheb	[18]
<b>Herc1</b>	GRF für ARF1 und Rab-Familie	[171]
<b>ALS2</b>	Rab5 GEF, unabhängig von RLD	[173]

<b>Claret</b>	Bindet an nukleotidfreies Rab-RP1	[174]
<b>Nercc1</b>	Bindet Ran	[172]
<b>PRAF1</b>	GRF für diverse Rabs und ARF1	[170]
<b>Nd6p</b>	Kein Nachweis der GEF-Aktivität	[175]

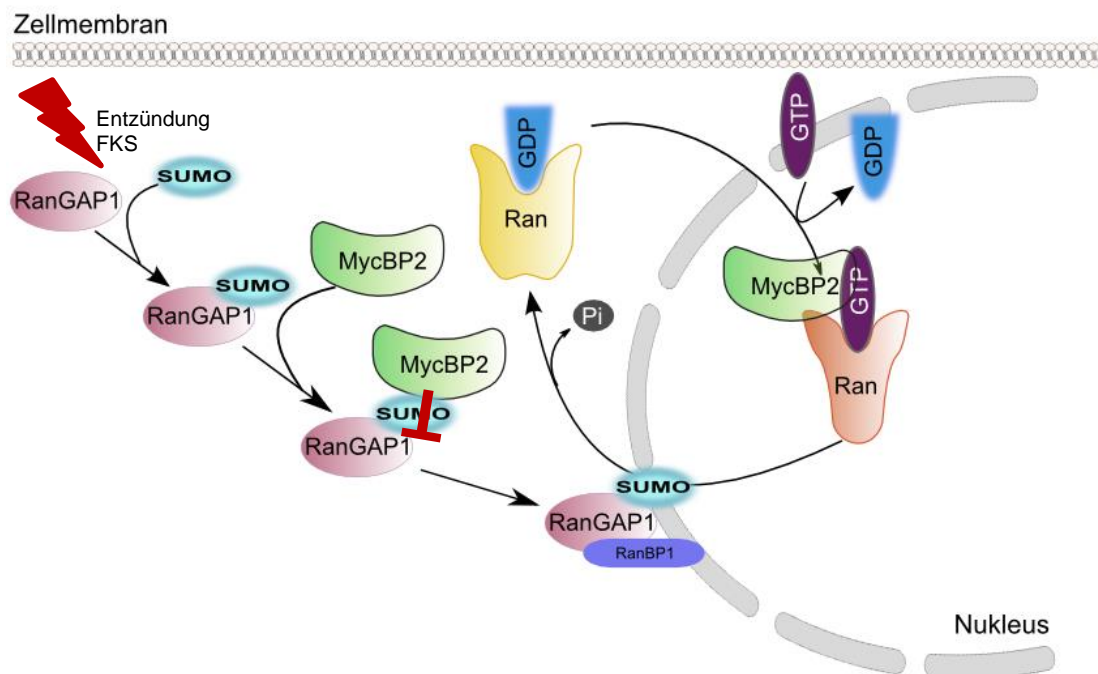
Mäurer et al. untersuchten im Zusammenhang mit der MycBP2-abhängigen Aktivierung des mTOR-Signalweges die GEF-Aktivität des MycBP2 gegenüber Rheb. Dabei zeigte sich, dass der GDP/GTP-Austausch an Rheb in Gegenwart von MycBP2 gesteigert ist, während die Freigabe von GDP von zuvor beladenem Rheb nicht durch MycBP2 induziert werden kann [18]. Damit ist die Interaktion von MycBP2 mit Ran und die daraus resultierende GEF-Aktivität der erste Nachweis für die GEF-Aktivität einer RCC1-ähnlichen Domäne gegenüber Ran.

Neben RCC1 ist bisher nur ein weiterer GEF für Ran bekannt, das Ran-Bindeprotein 10 (RanBP10), dessen GEF-Aktivität aufgrund seiner Homologie mit RhoGEF entdeckt wurde. Schulze et al. konnten zeigen, dass es sich bei RanBP10 um einen Mikrotubuli-bindenden cytoplasmatischen GEF in Megakaryozyten handelt [97]. Megakaryozyten sind große polyploide Blutzellen, die nach ihrer Reifung mikrotubuli-abhängig aus Pseudopodien Blutplättchen bilden [176]. Dieser Vorgang erfordert die Mobilisation von  $\beta$ 1-Tubulin-reichen Mikrotubuli, was vermutlich über die räumlich/zeitlich begrenzte Bildung von RanGTP gesteuert wird. RanBP10 liegt in Megakaryozyten an das  $\beta$ -Tubulin der Mikrotubuli gebunden vor und bindet simultan Ran. Über eine N-terminale Domäne kann RanBP10 dann den Guanosinaustausch an Ran regulieren und so die Freigabe von SAFs steuern, was wiederum die Mikrotubuliorganisation beeinflusst [97].

RanBP10 weist eine hohe Homologie zu RanBP9 auf, wobei vor allem die mutmaßlichen n-terminalen GEF-Domänen sequentiell übereinstimmen. RanBP9 kommt in Neuronen vor und ist dort an der axonalen Zielfindung beteiligt. Es könnte axonale Wegfindungsrezeptoren mit Mikrotubuli verbinden, wodurch Zielfindungssignale direkt an das Cytoskelett weitergegeben werden können. Die Verbindung zwischen RanBP9 und Mikrotubuli wird in der Literatur aber kontrovers diskutiert [144, 177, 178].

Da die Kompartimentierung von MycBP2 zellzyklusabhängig ist, wäre sowohl eine cytosolische als auch nukleare GEF-Aktivität möglich. Dafür spricht auch die Kolokalisation von Ran und MycBP2 sowohl im Nucleus als auch im Cytosol (siehe Abbildung 37). Im Kern scheint die Aufgabe des MycBP2 der des RCC1 zu entsprechen. MycBP2 reguliert den Guanosinaustausch an Ran, um so die Translokation des RanGTP zurück ins Cytosol zu ermöglichen. Die Bedeutung der

GEF-Aktivität im Cytosol ist dagegen schwerer zu erklären. Für sie spricht aber die Hemmung der GAP-Aktivität von RanGAP1 durch MycBP2 im Ein-Zyklus-GAP-Assay. Wie in Abbildung 43 zu erkennen ist, reduziert sich die GAP-Aktivität des RanGAP1 in Anwesenheit von MycBP2 um ca. 50%. Yudin et al. spekulierten bereits über eine Agonist/Antagonist-Beziehung zwischen RanGAP und RanGEF, um den retrograden Transport nach Nervverletzung im axonalen Cytoplasma zu ermöglichen. Die cytosolische Funktion des Ran beruht während des retrograden Transports auf der raumzeitlich begrenzten Generierung von RanGTP im axonalen Cytoplasma. Da aber RanGAP1 im Cytoplasma vorliegt, würde ein Guanosinaustausch direkt die Hydrolyse zur Folge haben. Durch die kurzzeitige Hemmung der GAP-Aktivität durch MycBP2 wäre eine Etablierung von RanGTP im Cytoplasma möglich [144].



**Abbildung 50: Interaktion des MycBP2 mit dem RanGTPase Zyklus**

Stimulus-induziert kommt es zur SUMOylierung von RanGAP1, was wiederum die Rekrutierung von MycBP2 zur Folge hat. Während der Translokation zum NPC wird durch die Bindung die E3-Ubiquitinligase Aktivität des MycBP2 gehemmt. Am NPC interagiert SUMOyliertes RanGAP1 mit RanBP1 während MycBP2 in den Kern transportiert wird. Im Kern bindet MycBP2 an RanGDP und ermöglicht den Guanosinaustausch an Ran.

#### 4.3. Die duale Funktion des MycBP2

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte dem MycBP2 und seiner RCC1-ähnlichen Domäne eindeutig eine GEF-Funktion zugeordnet werden. Damit ist auch die duale Funktion des MycBP2, dessen C-Terminus als E3-Ubiquitinligase Proteine ubiquitiniert und dessen N-Terminus eine GEF-Funktion auf Ran ausübt, belegt.



Neben MycBP2 zeigen zwei Enzyme der HERC-Proteinfamilie einen ähnlichen molekularen Aufbau und beinhalten ebenso einen C-Terminus mit E3-Ubiquitinligase Aktivität und eine RCC1-ähnliche Domäne.

Die Proteinfamilie der HERC-Proteine wird über das Vorhandensein einer **HECT**- und mindestens einer **RCC1**-ähnlichen Domäne definiert. Bisher konnten sechs HERC Gene im humanen Genom identifiziert werden, wobei die exprimierten Proteine nach ihrer Größe in zwei Untergruppen unterteilt werden. Die kleinen HERCs, HERC 3-6, haben eine molekulare Masse von knapp über 100 kDa und bestehen fast nur aus den namensgebenden Domänen. Die großen HERCs 1 und 2 erinnern mit ihrer molekularen Masse von ca. 530 kDa und dem Potential an funktionellen Domänen an das MycBP2 [179].

Die *Homologous to E6AP COOH Terminus* (HECT) Domäne ist eine etwa 350 As lange enzymatisch aktive Domäne, die eine 50%ige Similarität mit der C-terminalen Region des E6AP aufweist. E6AP vermittelt die Assoziation von p53 mit dem Onkoprotein E6, wobei der E6-E6AP-Komplex in der Lage ist, p53 zu ubiquitinieren, was zu dessen proteosomalen Abbau führt [180-182]. Daher wurde über eine Ubiquitinligase-Aktivität der HECT-Domäne spekuliert, die dann auch nachgewiesen werden konnte, wobei HECT-Ubiquitinligasen einen kovalenten Mechanismus nutzen, der auf der Bildung einer Thioester-Bindung zwischen einem hochkonservierten Cystein-Rest im aktiven Zentrum des HECT und dem C-Terminus des Ubiquitin beruht [183, 184].

Vor allem die HERC-Proteine 1 und 2 sind aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit und der Proteingröße in Bezug auf MycBP2 von Interesse [179]. Während über HERC2 und dessen Funktion nur wenig bekannt ist, konnte für HERC1 ebenso wie für MycBP2 eine Ubiquitinligase-Aktivität gegenüber TSC2 nachgewiesen werden, wobei HERC1 mit TSC1 um die Bindung von TCS2 konkurriert [185]. Die genaue Funktion der RCC1-ähnlichen Domäne des HERC1 konnte dagegen noch nicht geklärt werden. Es konnte bisher gezeigt werden, dass die RCC1-ähnliche Domäne 1 die Guanodin-Dissoziation von der Familie der *ADP Ribosylation factors* (ARF) und der Familie der kleinen GTPase Rab katalysieren kann. Damit handelt es sich bei HERC1 eher um einen *Guanosin release factor* GRF statt um einen GEF [171]. Die RLD2 des HERC1 zeigt dagegen weder GRF- noch GEF-Aktivität, sondern ermöglicht direkte Proteininteraktionen, indem es z.B. ARF1 und die schwere Untereinheit des Clathrin bindet [171, 186].

Des Weiteren konnte sowohl für MycBP2 als auch für HERC1 eine Interaktion mit Aktin nachgewiesen werden [187, 188].

**Tabelle 18: Duale Proteine, die Ubiquitinligase-Aktivität und eine RCC1-ähnliche Domäne besitzen, modifiziert nach Hadjebi [17]**

Name	Anzahl As	Größe (kDa)	Funktion	Quelle
<b>MycBP2</b>	4678	510	Ubiquitinligase; Ubiquitiniert TSC2, GEF für Ran	[3-8, 14, 19, 21, 23-26, 28, 29, 32, 35-38, 41, 54, 189, 190]
<b>HERC1</b>	4861	532	Ubiquitinligase; Bindet an die schwere Untereinheit von Clathrin, Phosphoinositide, ARF/Rab und TSC2	[171, 179, 184-187, 191]
<b>HERC2</b>	4834	528	In das murine RJS Syndrom involviert	[192]
<b>HERC3</b>	1050	117	Ubiquitinligase ohne bekanntes Zielprotein	[193]
<b>HERC4</b>	1057	118	Ubiquitinligase ohne bekanntes Zielprotein	[67, 194]
<b>HERC5</b>	1024	117	Vermittelt die ISGylation von natürlichen ISG15 Zielproteinen	[69, 70, 194-197]
<b>HERC6</b>	1022	115	Ubiquitinligase ohne bekanntes Zielprotein	[69, 70, 194, 195, 197]

Interessant ist auch der Gedanke, dass MycBP2 aufgrund seiner dualen Funktion über zwei unterschiedliche Mechanismen den gleichen Effekt erzielen kann. Zum einen ist MycBP2 dazu in der Lage TSC2 zu ubiquitinieren, was durch dessen proteosomalen Abbau zur Aktivierung des mTOR-Signalwegs führt. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass MycBP2 den Guanosinaustausch an Rheb verstärken kann, was ebenfalls zur mTOR-Aktivierung führt [18].

Ein ähnlicher dualer Mechanismus wäre auch bei der Regulation der Mikrotubuliorganisation möglich. Der Phänotyp der Maus-Mutante Magellan, die auf Grund eines frühzeitigen Stopcodons im PHR-1-Gen nicht-funktionelles PHR-1 exprimiert, weist ein anormales Wanderverhalten der Axone auf, was zu deren Akkumulation führt. Zurückzuführen ist dies auf eine anormale Wachstumskegelmorphologie und falsch lokalisierte Wachstumskegelproteine in Motor- und sensorischen Neuronen. Auf zellulärer Ebene zeigt sich eine anormale Mikrotubuliorganisation, wobei die Mikrotubuli den Großteil der Wachstumskegel ausfüllen und Schleifen bilden, statt sich entlang der Achse des Neuritenwachstums zu orientieren. Über Polymerisationsstudien konnte gezeigt werden, dass die Verweildauer des Tubulins der Mikrotubuli im Gleichgewichtszustand verkürzt ist, die normale Mikrotubulistruktur über den Stabilisator Taxol wieder hergestellt werden kann. Mechanistisch wurden diese Effekte bisher wie bereits beschrieben auf den

DLK-Signalweg zurückgeführt. DLK-1 wird in embryonalen Neuronen mit Phr1 koexprimiert, liegt aber in unterschiedlichen Kompartimenten vor. DLK-1 wird primär im Wachstumskegel exprimiert, wo es den dynamischen Ab- und Wiederaufbau von Mikrotubuli organisiert, kann sich aber innerhalb des Neurons ausbreiten. Phr1 liegt im Axon vor, einem Ort mit hoher Mikrotubulistabilität, und begrenzt dort die Ausbreitung von DLK-1 durch seine E3-Ubiquitinligase Aktivität. DLK-1 wird für den proteosomalen Abbau markiert und dadurch in seiner Ausbreitung gehemmt. In Abwesenheit von Phr-1 kommt es dagegen zu einer Akkumulation von DLK-1 im Axon, wo es über p38 die Mikrotubulianordnung moduliert, was die anormale Morphologie und die Schleifenbildung zur Folge hat [32]. Dennoch können nicht alle Effekte durch Phr-1 und DLK-1-knock out behoben werden [33]. Daher liegt der Schluss nahe, dass MycBP2 bzw. Phr-1 noch über weitere Signalwege die Mikrotubuliorganisation regulieren können.

Der beschriebene Phänotyp ist überwiegend auf dynamische statt stabile Mikrotubuli im Axon zurückzuführen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden Mikrotubuli auch über die RanGTP-abhängige Freisetzung von SAFs stabilisiert. Da bekannt ist, dass Phr-1 direkt oder indirekt mit Mikrotubuli assoziiert im Axonschaft von Neuronen vorliegt, ist es möglich, dass die PHR-Proteine eine ähnliche Aufgabe wie RCC1 während dem Aufbau der Mitosespindel erfüllen. RCC1 muss lokal RanGTP generieren, um so die Freigabe der SAFs von Importin zu steuern. So könnte also auch Phr-1 lokal RanGTP generieren und damit die Mikrotubuli in Axonen stabilisieren. Die Abwesenheit von Phr-1 würde dann zu einer verminderten SAF-Freisetzung führen, was wiederum die Destabilisierung der Mikrotubuli zur Folge hätte.

Des Weiteren konnten eine direkte Protein-Protein-Interaktion des *C.elegans* Orthologs RPM-1 mit dem **RNA-Export-Protein** (Rae)-1, aber auch eine Interaktion des murinen Rae-1 mit MycBP2 nachgewiesen werden [198]. Rae-1 wird in postmitotischen Zellen wie Neuronen exprimiert [199] und Studien sowohl in Hefen als auch in Säugetieren zeigten, dass Rae-1 zum einen am Export von mRNA aus dem Zellkern beteiligt ist und zum anderen auch durch die Stabilisierung von Mikrotubuli den mitotischen Spindelaufbau und den Fortschritt des Zellzyklus reguliert [200-205]. Die Stabilisierung der Mikrotubuli erfolgt dabei durch die direkte Interaktion von Rae-1 mit Importin  $\beta$  und die daraus resultierende Freigabe des SAF NuMa [202, 205]. Eine Bindung von MycBP2 an Rae-1 könnte somit die Freigabe von NuMa oder weiteren SAFs verstärken.

So wäre es auch in diesem Fall möglich, dass PHR-Proteine über mehrere verschiedene Mechanismen den gleichen physiologischen Effekt erzielen.

#### 4.4. Physiologische Funktion der Ran/MycBP2-Interaktion

Die physiologischen Funktionen, die die Ran/MYCBP2 Interaktionen beeinflussen könnten, sind sehr weitläufig. Zum einen wäre eine Integration von MycBP2 als cytosolische RanGEF in den retrograden Transport nach Nervverletzung möglich. Als mögliche Kandidaten für diesen retrograden Transport stehen laut Literatur Erk1/2, p38 MAPK, Jun-Kinase (Jnk), Proteinkinase A, Proteinkinase G und die Transkriptionsfaktoren STAT3 und ATF2/3 in Verdacht. Alle genannten Proteine können direkt oder indirekt an Dynein oder Importin binden, wobei diese Bindung erst durch die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP und damit durch die Freigabe des Importin $\alpha$ /cas/Dynein-Komplexes möglich ist. Die Bindung von RanGTP an den Importin  $\alpha$ /cas-Komplex stellt eine Sicherung dar, die den unkontrollierten Transport von Cargoproteinen verhindert. Das heißt, falls MycBP2 eine cytosolische GEF für Ran darstellt, kann es durch die Generierung von RanGTP den unkontrollierten Transport und damit ein unkontrolliertes Neuritenwachstum verhindern und stellt den richtigen Ablauf von neuronalen Funktionen sicher [143].

Zum anderen könnte MycBP2 durch Beeinflussung des nuklearen Import/Export-Mechanismus an diversen Signaltransduktionswegen und darüber an den verschiedensten Krankheiten beteiligt sein. So könnte MycBP2 zum Beispiel den Export von mRNA beeinflussen. Möglich wäre dies zum einen direkt oder aber über die Interaktion mit Rae-1, von dem bereits bekannt ist, dass es den Export von mRNA regulieren kann und direkt mit MycBP2 interagiert. Aber auch über den Export von im Kern generierten Proteinen könnte MycBP2 über eine Interaktion mit CRM-1 Signalwege beeinflussen. Es ist bereits bekannt, dass viele Tumorsuppressoren und Onkoproteine wie p53, BRCA1, Survivin, NPM oder APC über CRM-1 aus dem Zellkern transportiert werden und das ein Ungleichgewicht der cytosolischen Mengen dieser Proteine in den meisten Krebsarten vorliegt. Daher stellt die Inhibition des CRM-1-abhängigen nuklearen Exports ein neues Ziel der Krebsforschung dar [103].

Aber nicht nur Tumorsuppressoren und Onkoproteine werden über CRM-1 transportiert, sondern auch viele weitere Transkriptionsfaktoren und deren Regulatoren. Bei dem *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor für diverse Zytokine in T-Lymphozyten von Wirbeltieren, der nach Calcineurin-abhängiger Dephosphorylierung seiner NLS aktiviert und in den Kern transportiert wird und dort unter anderem die Genexpression von IL-2 reguliert.

Nach der Rephosphorylierung über die *Glykogen Synthase Kinase 3* (GSK3) wandert das inaktivierte NFAT zurück ins Cytosol. Die Hemmung von NFAT spielt aufgrund seiner hohen immunsuppressiven Wirkung eine wichtige Rolle bei Organtransplantationen, wobei die Therapie bisher auf die Blockade der Aktivierung von Calcineurin abzielt [101]. Denkbar wäre aber auch die Transportmechanerie zu beeinflussen.

Der *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha* ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ), wird mit Hilfe von RanGTP und CRM-1 ins Cytoplasma transportiert und hemmt den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B über zwei verschiedene Wege. Zum einen kann es das NLS von NF- $\kappa$ B maskieren, was dazu führt, dass NF- $\kappa$ B in seiner inaktiven Form im Cytosol verweilt und zum anderen kann  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  die Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA blockieren. Im Zusammenhang mit einer Dysregulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges steht unter anderem die Entstehung und der Verlauf verschiedener Krebsarten, die Immunantwort auf Entzündungen, Autoimmunkrankheiten, septischer Schock, virale Infektionen und eine fehlerhafte Immunentwicklung [102].

Allen bisher beschriebenen Mechanismen liegt der CRM-1-abhängige nukleare Export zu Grunde. Eine Bindung von CRM-1 an seine Cargoproteine ist nur in Gegenwart von RanGTP über einen trinären Komplex möglich. Da MycBP2 über seine GEF-Aktivität und seinem temporären nuklearen Vorkommen dazu in der Lage ist im Kern RanGTP zu bilden, könnte MycBP2 zumindest für einen Teil des nuklearen Exports dieser Proteine verantwortlich sein. Wäre es nun möglich nachzuweisen, dass MycBP2 vielleicht speziell oder auch generell in einen der beschriebenen Signalwege involviert ist, wäre ein neuer Therapieansatz über die Hemmung des MycBP2 möglich.

## 5. Zusammenfassung

Das Myc-Bindeprotein 2 (MYCBP2) könnte aufgrund seiner enormen Größe, seiner multiplen funktionalen Domänen und seiner ubiquitären Expression in die verschiedensten Signaltransduktionswege involviert sein. Bisher wurde überwiegend die Funktion der C-terminalen RING-Finger-Domäne untersucht, die die E3-Ubiquitinligase-Aktivität des MycBP2 bedingt. Über die Interaktion mit verschiedenen Signalwegen, wie den p38-Signalweg oder die mTOR-Aktivierung, kann MycBP2 über Ubiquitylierung und anschließendem proteosomalen Abbau diverse Prozesse der Synaptogenese und der spinalen Schmerzverarbeitung, aber auch der peripheren Nozizeption regulieren. Über die Funktionen der N-terminalen RCC1-ähnlichen Domäne ist dagegen weniger bekannt. Bisher konnte eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit dem neuronenspezifischen elektroneutralen Kalium- und Chlorid-Ionen Co-Transporter KCC2 und mit der Adenylylcyclase nachgewiesen werden. Bindet MycBP2 oder seine RCC1-ähnliche Domäne an membranständiges KCC2 führt dies einem verstärkten Transporteraktivität, während die Bindung an die Adenylylcyclase in deren Hemmung resultiert.

In der vorliegenden Arbeit sollten nun auf Basis eines Antikörperarrays neue Interaktionspartner des MycBP2 und deren Funktion bestimmt werden.

Der Antikörperarray vergleicht die Expression diverser Proteine in DRG-Lysat von SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen und weist Unterschiede im Vorkommen von SUMO1 auf. Durch Analyse mittels Western Blot zeigte sich ein verstärktes Signal für ein 85 kDa-Protein. Mittels Immunpräzipitation sowohl aus HeLa-Zellen als auch aus DRG-Neuronen wurde das Protein als SUMOyliertes RanGAP1 identifiziert. Durch CO-Immunpräzipitationen konnte eine direkte Protein-Protein Interaktion nachgewiesen werden, die während einer Zymosan-induzierten Hyperalgesie zu einer MycBP2-abhängig Regulation der RanGAP1 Expression und SUMOylierung führt. Die erhöhte RanGAP1 Menge in Abwesenheit von MycBP2 ist dabei nicht auf eine MycBP2-abhängige Ubiquitinierung des RanGAP1 zurückzuführen. Dagegen konnte eine Hemmung der Ubiquitinligaseaktivität des MycBP2 in Anwesenheit von SUMOyliertem RanGAP1 festgestellt werden, die sowohl bei der Autoubiquitylierung als auch beim proteosomalen Abbau von TSC2 nachgewiesen werden konnte. Weitere Untersuchungen zeigen eine durch SUMOyliertes RanGAP1-vermittelte Translokation des MycBP2 an den Zellkern, die durch Transfektion mit RanGAP1 siRNA sowohl in HeLa-Zellen als auch in primären DRG-Kulturen gehemmt werden kann.

Im nächsten Schritt wurde die mögliche Interaktion von MycBP2 mit Ran untersucht. Es zeigte sich, dass die Ranexpression in DRGs von Cre-positiven MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen im Gegensatz zu Cre-negativen MycBP2<sup>lox/lox</sup> Mäusen signifikant gesteigert ist und auch hier eine MycBP2-abhängige Expressionsregulation während der Zymosan-induzierten Hyperalgesie vorliegt. Ein 3D-Modell von primären DRG-Kulturen nach Immunfärbung weist eine Kollokalisierung von MycBP2 und Ran sowohl im Cytosol als auch im Zellkern auf. Immunfärbungen von DRG-Schnitten zeigten außerdem, dass Ran in Abwesenheit von MycBP2 verstärkt im Zellkern vorliegt, was auf eine direkte Interaktion von MycBP2 mit Ran hindeutet. Auf Grund des stationären GTPase Assays konnte eine Integration des MycBP2 in den RanGTPase Zyklus belegt werden, da die Anwesenheit von MycBP2 zu einer gesteigerten GTP-Hydrolyse führte. Anhand des Ein-Zyklus-GAP-Assay wurde daher der Einfluss des MycBP2 auf die GAP-Aktivität des RanGAP1 überprüft, wodurch sich zeigte, dass MycBP2 die GAP-Aktivität des RanGAP1 hemmt. Damit bedingt die MycBP2/RanGAP1-Interaktion eine gegenseitige Hemmung der Enzymaktivität der beteiligten Proteine. Weitere Untersuchungen durch  $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindeassays deckten eine konzentrationsabhängige GEF-Aktivität des MycBP2 für Ran auf, wobei die GEF-Aktivität von der RCC1-ähnlichen Domäne des MycBP2 vermittelt wird. Des Weiteren zeigte sich anhand von Versuchen mit der konstitutiv aktiven Ran-Mutante Q69L und der inaktiven Ran-Mutante T24N, dass MycBP2 verstärkt die inaktive Form des Ran, also RanGDP bindet.

In dieser Arbeit konnte so zum ersten Mal eine Integration des MycBP2 in den RanGTPase-Zyklus gezeigt werden, die es MycBP2 ermöglicht, sowohl in die nukleare Import/Export-Maschinerie, in den Aufbau der mitotischen Spindel und die Bildung der Kernmembran einzugreifen.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

APC	<b>A</b> denomatous <b>p</b> olyposis <b>c</b> oli
BMP	<i><b>b</b>one <b>m</b>orphogenetic <b>p</b>rotein</i>
BRCA1	<b>B</b> reast <b>C</b> ancer 1
BSA	<b>b</b> ovines <b>S</b> erumalbumin
BTB	<i><b>B</b>ric-a-brac, <b>T</b>ramtrack, and <b>B</b>road-Complex</i>
coSMAD	<i>common-<b>m</b>ediator-<b>SMAD</b></i> (Mischwort: MAD und SMA)
CRM-1	<i><b>c</b>hromosome <b>r</b>egion <b>m</b>aintenance 1</i>
DAPI	4',6- <b>D</b> iamidin-2- <b>p</b> henylindol
DAXX	Death-associated protein 6
DAZL	<i><b>d</b>eleted in <b>a</b>zoospermia <b>l</b>ike</i>
DRG	Dorsalwurzelganglion ( <i><b>d</b>orsal <b>r</b>oot <b>g</b>anglion</i> )
FKS	fetales <b>K</b> älberserum
GAP	<b>G</b> TPase-aktivierendes <b>P</b> rotein
GDP	<b>G</b> uanosindiphosphat
GEF	Guanosin-Austauschfaktor ( <i><b>G</b>uanosine <b>e</b>xchange <b>f</b>actor</i> )
GSK3	<b>G</b> lykogen <b>S</b> ynthase <b>K</b> inase 3
GTP	<b>G</b> uanosintriphosphat
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	bidestilliertes Wasser
HBSS	<i><b>H</b>ank's <b>B</b>alanced <b>S</b>alt <b>S</b>olution</i>
HECT	<i><b>H</b>omologous to the <b>E</b>6-<b>A</b>P <b>C</b>arboxyl <b>T</b>erminus</i>
HeLa	<b>H</b> enrietta <b>L</b> acks
Hiw	<b>H</b> ighwire
IκBα	<i>nuclear factor of <b>k</b>appa light polypeptide gene enhancer in <b>B</b>-cells inhibitor <b>alpha</b></i>



---

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
KCC2	Kalium-Chlorid-Cotransporter 2
MAPKKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum ( <i>microtubule organizing center</i> )
mTOR	<i>mammalian target of Rapamycin</i>
MycBP2	<i>C-Myc-binding Protein 2</i>
Nemo	<i>NF-kappa-B essential modulator</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NLS	Nukleares Lokalisationssignal
NPC	Nuklearer Porenkomplex ( <i>nuclear pore complex</i> )
NPM	Nucleophosmin
PAM	<i>Protein associated with Myc</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PFA	Paraformaldehyd
PHR	PAM-Highwire-RPM-1
PML	<i>Promyelocytic leukemia protein</i>
Rae-1	RNA Export Protein-1
Ran	Ras-related nuclear protein
RanGAP1	Ran-GTPase-aktivierendes Protein 1
RCC1	Regulator der Chromosomenkondensation 1 ( <i>regulator of chromosome condensation 1</i> )
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
RING	<i>Really interesting new gene</i>

---

RLD	RCC1-ähnliche Domäne ( <i>RCC1-like domain</i> )
RPM-1	<i>Regulator of presynaptic morphology-1</i>
RT	Raumtemperatur
SAF	Spindelassemblierungsfaktor
SBM	SUMO-Bindungsmotiv
SCF	<i>Skp, Cullin, F-box containing complex</i>
SDS PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese ( <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SUMO1	<i>Small Ubiquitin-related modifier 1</i>
TDG	Thymin-DNA-Glycosylase
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TNT	Tris-Natriumchlorid-Tween
TN	Tris-Natriumchlorid
Traf6	<i>Nuclear Tumor Necrosis factor Receptor-associated Factor 6</i>
TSC	<i>Tuberous Sklerosis Complex</i>

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktionelle Domänen des MycBP2.....	2
Abbildung 2: Neuronale Funktionen der MycBP2-Orthologe.....	3
Abbildung 3: Schematischer Aufbau der Propellerstruktur der RCC1-ähnlichen Domäne....	10
Abbildung 4: Der RanGTPase Zyklus.....	11
Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung des nuklearen Imports.....	14
Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung des Mitosespindelaufbaus.....	16
Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung des Wiederaufbaus der Kernmembran.....	17
Abbildung 8: RanGTP-gesteuerter axonaler retrograder Transport nach Nervverletzung.....	19
Abbildung 9: Antikörperarrayassay.....	20
Abbildung 10: Coomassie-Gel zum Verlauf der nativen MycBP2-Aufreinigung.....	36
Abbildung 11: Coomassie-Gel zum Verlauf der RLD-Aufreinigung.....	37
Abbildung 12: Coomassie-Gel zum Verlauf der His-Ran T24N und Q69L-Aufreinigung.....	38
Abbildung 13: Coomassie-Gel zum Verlauf der RanGAP1-Aufreinigung.....	40
Abbildung 14: Coomassie-Gel zum Verlauf der Ran-Aufreinigung.....	41
Abbildung 15: MycBP2 Expression in DRGS von SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2 <sup>lox/lox</sup> Mäusen.....	50
Abbildung 16: Western Blot Analyse auf Unterschiede in der SUMOylierung verschiedener Proteine.....	51
Abbildung 18: Western Blot Analyse der Laufhöhe von RanGAP1 in verschiedenen Zelllysaten.....	52
Abbildung 19: Identifikation des p85-Proteins als SUMOyliertes RanGAP1.....	53
Abbildung 20: RanGAP1-Expression und SUMOylierung in DRGs von SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2 <sup>lox/lox</sup> Mäusen.....	54
Abbildung 23: Signifikanter Anstieg der RanGAP1-SUMOylierung nach Zymosanbehandlung in der Abwesenheit von MycBP2.....	55
Abbildung 24: Signifikanter Anstieg der RanGAP1-Expression nach Zymosanbehandlung in der Abwesenheit von MycBP2.....	56
Abbildung 21: Co-Immunpräzipitation von MycBP2 mit SUMOyliertem RanGAP1 A) in DRGs, B) in HeLa-Zellen.....	57
Abbildung 22: Co-Immunpräzipitation von MycBP2 mit SUMOyliertem RanGAP1 aus HeLa-Cytosol und Nuklei-Lysat.....	58
Abbildung 25: Ubiquitylierung mit nativem RanGAP1 und MycBP2.....	59
Abbildung 26: SUMOylierung von RanGAP1.....	60
Abbildung 27: Ubiquitylierung mit SUMOyliertem RanGAP1 und MycBP2.....	61
Abbildung 28: MycBP2-abhängige Ubiquitylierung des TSC2 in Anwesenheit von SUMOyliertem RanGAP1.....	63

Abbildung 29: Nachweis der Expression von RanGAP1 und MycBP2 am bzw. im Kern von DRG-Neuronen.....	64
Abbildung 30: RanGAP1 Expression und SUMOylierung nach FKS-Stimulation in DRGs...	65
Abbildung 31: Translokation des RanGAP1 und MycBP2 in DRG-Neuronen nach FKS-Stimulation.....	66
Abbildung 32: RanGAP1 Expression nach Transfektion mit muriner RanGAP1 siRNA .....	67
Abbildung 33: MycBP2 Translokation nach FKS-Stimulation in siRNA transfizierten Zellen..	69
Abbildung 34: Zeitverlauf zur SUMOylierung und Expression von RanGAP1 nach FKS-Stimulation .....	70
Abbildung 35: Translokation des RanGAP1 und MycBP2 an bzw. in den Zellkern von HeLa-Zellen nach FKS-Stimulation.....	71
Abbildung 36: RanGAP1-Expression und SUMOylierung nach der Transfektion mit RanGAP1- bzw. Non-Target-siRNA.....	72
Abbildung 37: MycBP2-Translokation nach FKS-Stimulation in transfizierten HeLa-Zellen...	73
Abbildung 38: Kolokalisation des MycBP2 und Ran im Zellkern und Cytosol von DRG-Neuronen.....	74
Abbildung 39: Ran-Expression in DRGs von SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2 <sup>lox/lox</sup> Mäusen.....	75
Abbildung 40: Ran-Expression in SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2 <sup>lox/lox</sup> Mäusen nach Zymosan-Behandlung.....	76
Abbildung 41: Ran Lokalisation in SNS-Cre positiven und SNS-Cre-negativen MycBP2 <sup>lox/lox</sup> Mäusen nach Zymosanbehandlung.....	77
Abbildung 42: GTP-Hydrolyse in Abhängigkeit von Ran, RanGAP1 und MycBP2 .....	79
Abbildung 43: GTP-Hydrolyse in Abhängigkeit von Ran, SUMOyliertem RanGAP1 und MycBP2 .....	79
Abbildung 44: Untersuchung der GAP-Aktivität des MycBP2 für Ran.....	80
Abbildung 45: RanGAP1 und MycBP2-abhängige $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindung an Ran.....	81
Abbildung 46: Konzentrationsverlauf zur MycBP2-abhängigen $\gamma^{35}\text{S}$ -GTP-Bindung von Ran.	82
Abbildung 47: GEF-Aktivität der RCC1-ähnlichen Domäne des MycBP2 .....	83
Abbildung 48: Bindungspräferenz des MycBP2 für die konstitutiv inaktive Ran Mutante .....	84
Abbildung 49: Regulation von Signalkaskaden durch die MycBP2-Orthologe.....	85
Abbildung 50: RanGAP1 abhängige nukleare Translokation des MycBP2 .....	88
Abbildung 51: Interaktion des MycBP2 mit dem RanGTPase Zyklus.....	91

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mitglieder der PHR-Protein-Familie.....	1
Tabelle 2: Ran-Bindeproteine und deren Funktion.....	12
Tabelle 3: Anderweitig bezogene Chemikalien und Kits .....	21
Tabelle 4: Verwendete Antikörper, Verdünnungen und entsprechende Sekundärantikörper	21
Tabelle 5: Zusammensetzung der Medien und Puffer für molekulargenetische Methoden ...	22
Tabelle 6: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden .....	22
Tabelle 7: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden	22
Tabelle 8: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für immunologische Methoden .....	23
Tabelle 9: Allgemeiner Reaktionsansatz für Restriktionen .....	27
Tabelle 10: verwendete DNA-Konstrukte und Restriktionsenzyme .....	27
Tabelle 11: Parameter für die rekombinante Überexpression der verwendeten Proteine .....	28
Tabelle 12: Sequenzen der zur Genotypisierung verwendeten Primer .....	30
Tabelle 13: Allgemeiner PCR-Ansatz für die Genotypisierung .....	30
Tabelle 14: Zu erwartende Fragmentgrößen zur Genotypisierung .....	31
Tabelle 15: Verwendete Kulturschalen mit Verwendungszweck und eingesetzte Zellzahl ....	31
Tabelle 16: Verschiedene Stimuli zur Induktion der MycBP2-Translokation in den Zellkern .	65
Tabelle 17: Proteine der RCC1-Superfamilie und ihre Interaktion mit kleinen GTPasen .....	89
Tabelle 18: Duale Proteine, die Ubiquitinligase-Aktivität und eine RCC1-ähnliche Domäne besitzen, modifiziert nach Hadjebi [17] .....	93

## 9. Literaturverzeichnis

1. Holland, S. and K. Scholich, *Regulation of neuronal functions by the E3-ubiquitinligase protein associated with MYC (MYCBP2)*. Communicative & Integrative biology, 2011. **4**(5): p. 513 - 515.
2. Li, H., G. Kulkarni, and W.G. Wadsworth, *RPM-1, a Caenorhabditis elegans Protein That Functions in Presynaptic Differentiation, Negatively Regulates Axon Outgrowth by Controlling SAX-3/robo and UNC-5/UNC5 Activity*. The Journal of Neuroscience, 2008. **28**(14): p. 3595 - 3603.
3. Schaefer, A.M., G.D. Hadwiger, and M.L. Nonet, *rpm-1, A Conserved Neuronal Gene that Regulates Targeting and Synaptogenesis in C. elegans*. Neuron, 2000. **26**: p. 345 - 356.
4. Wan, H.I., et al., *Highwire Regulates Synaptic Growth in Drosophila*. Neuron, 2000(26): p. 313 - 329.
5. Zhen, M., et al., *Regulation of Presynaptic Terminal Organization by C. elegans RPM-1, a Putative Guanine Nucleotide Exchanger with a RING-H2 Finger Domain*. Neuron, 2000. **26**: p. 331 - 343.
6. Guo, Q., et al., *Identification of a large Myc-binding protein that contains RCC1-like repeats*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998. **95**: p. 9172 - 9177.
7. Burgess, R.W., et al., *Evidence for a Conserved Function in Synapse Formation Reveals Phr1 as a Candidate Gene for Respiratory Failure in Newborn Mice*. Molecular and Cellular Biology, 2004. **24**(3): p. 1096 - 1105.
8. D'Souza, J., et al., *Formation of the retinotectal projection requires Esrom, an ortholog of PAM (protein associated with Myc)*. Development, 2005. **132**: p. 247 - 256.
9. Lovering, R., et al., *Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger*. PNAS, 1993. **90**(6): p. 2112 - 2116.
10. Potuschak, T., et al., *PRT1 of Arabidopsis thaliana encodes a component of the plant N-end rule pathway*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998. **95**: p. 7904 - 7908.
11. Deshaies, R.J. and C.A.P. Joazeiro, *RING Domain E3 Ubiquitin Ligases*. Annu. Rev. Biochem., 2009. **78**: p. 399 - 434.
12. Han, S., et al., *Pam (Protein associated with Myc) functions as an E3 Ubiquitin ligase and regulates TSC/mTOR signaling*. Cell Signal, 2008. **20**(6): p. 1084 - 1091.
13. Saiga, T., et al., *Fbxo45 Forms a Novel Ubiquitin Ligase Complex and Is Required for Neuronal Development*. Molecular and cellular Biology, 2009. **29**(13): p. 3529 - 3543.
14. Abrams, B., et al., *Cellular and Molecular Determinants Targeting the Caenorhabditis elegans PHR Protein RPM-1 to Perisynaptic Regions*. Developmental Dynamics, 2008. **237**: p. 630 - 639.
15. Görlich, D., et al., *Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import*. Cell, 1994. **79**(5): p. 767-778.
16. Song, J., et al., *Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) Recognition of a SUMO Binding Motif: A REVERSAL OF THE BOUND ORIENTATION*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(48): p. 40122-40129.
17. Hadjebi, O., et al., *The RCC1 superfamily: From genes, to function, to disease*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2008. **1783**(8): p. 1467-1479.
18. Maeurer, C., et al., *Sphingosine-1-phosphate induced mTOR-activation is mediated by the E3-ubiquitin ligase PAM* Cellular Signaling, 2009. **21**: p. 293 - 300.
19. Gao, X. and T.B. Patel, *Histidine Residues 912 and 913 in Protein Associated with Myc Are Necessary for the Inhibition of Adenylyl Cyclase Activity*. Molecular Pharmacology, 2005. **67**(42 - 49).
20. Garbarini, N. and E. Delpire, *The RCC1 Domain of Protein Associated with Myc (PAM) Interacts with and Regulates KCC2*. Cell Physiol Biochem, 2008. **22**: p. 31 - 44.

21. Scholich, K., S. Pierre, and T.B. Patel, *Protein Associated with Myc (PAM) Is a Potent Inhibitor of Adenylyl Cyclases*. The Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(50): p. 47583 - 47589.
22. Po, M.D., C. Hwang, and M. Zhen, *PHRs: bridging axon guidance, outgrowth and synapse development*. Current Opinion in Neurobiology, 2010. **20**: p. 100 - 107.
23. Wu, C., et al., *Highwire function at the Drosophila neuromuscular junction: spatial, structural, and temporal requirements*. The Journal of Neuroscience, 2005. **25**(42): p. 9557 - 9566.
24. Yang, H., et al., *Developmental expression of PAM (protein associated with MYC) in the rodent brain*. Developmental Brain Research, 2002. **136**: p. 35 - 42.
25. Ehnert, C., et al., *Protein associated with Myc (PAM) is involved in spinal nociceptive processing*. Journal of Neurochemistry, 2004. **88**: p. 948 - 957.
26. Santos, T.M., et al., *Alternative Splicing in Protein Associated With Myc (Pam) Influences Its Binding to c-Myc*. Journal of Neuroscience Research, 2006. **83**: p. 222 - 232.
27. Gao, M.X., et al., *The SCFFSN-1 ubiquitin ligase controls germline apoptosis through CEP-1/p53 in C. elegans*. Cell Death Differ, 2008. **15**(6): p. 1054-1062.
28. Jiao, X., P. Trifillis, and M. Kiledjian, *Identification of Target Messenger RNA Substrates for the Murine Deleted in Azoospermia-Like RNA-Binding Protein*. Biology of Reproduction, 2002. **66**(2).
29. LeGuyader, S., J. Maier, and S. Jesuthasan, *Esrom, an ortholog of PAM (protein associated with c-myc), regulates pteridine synthesis in the zebrafish*. Developmental Biology, 2005. **277**: p. 378 - 386.
30. Hammarlund, M., et al., *Axon Regeneration Requires a Conserved MAP Kinase Pathway*. Science, 2009. **323**(5915): p. 802-806.
31. Karlstrom, R.O., et al., *Zebrafish mutations affecting retinotectal axon pathfinding*. Development, 1996. **123**: p. 427 - 438.
32. Lewcock, J.W., et al., *The Ubiquitin Ligase Phr1 Regulates Axon Outgrowth through Modulation of Microtubule Dynamics*. Neuron, 2007. **56**: p. 604 - 620.
33. Bloom, A.J., et al., *The requirement for Phr1 in CNS axon tract formation reveals the corticostriatal boundary as a choice point for cortical axons*. Genes and Development, 2007. **21**: p. 2593 - 2606.
34. Hendricks, M. and S. Jesuthasan, *PHR Regulates Growth Cone Pausing at Intermediate Targets through Microtubule Disassembly*. The Journal of Neuroscience, 2009. **29**(20): p. 6593 - 6598.
35. Nakata, K., et al., *Regulation of a DLK-1 and p38 MAP Kinase Pathway by the Ubiquitin Ligase RPM-1 Is Required for Presynaptic Development*. Cell, 2005. **120**: p. 407 - 420.
36. Wu, C., R.W. Daniels, and A. DiAntonio, *DFsn collaborates with Highwire to down-regulate the Wallenda/DLK kinase and restrain synaptic terminal growth*. Neural Development, 2007. **2**(16).
37. Murthy, V., et al., *Pam and Its Ortholog Highwire Interact with and May Negatively Regulate the TSC1/TSC2 Complex*. The Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(2): p. 1351 - 1358.
38. McCabe, B.D., et al., *Highwire Regulates Presynaptic BMP Signaling Essential for Synaptic Growth*. Neuron, 2004. **41**: p. 891 - 905.
39. Merino, C., et al., *Nemo kinase interacts with Mad to coordinate synaptic growth at the Drosophila neuromuscular junction*. J Cell Biol., 2009. **185**(4): p. 713 - 725.
40. Sonddek, J., et al., *Crystal structure of a GA protein [beta][gamma]dimer at 2.1 Å resolution*. Nature, 1996. **379**(6563): p. 369-374.
41. Pierre, S.C., et al., *PAM mediates sustained inhibition of cAMP signaling by sphingosine-1-phosphate*. The EMBO Journal, 2004. **23**: p. 3301 - 3040.
42. Ferreira, S.H. and M. Nakamura, *I - Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca<sup>2+</sup> dependent process*. Prostaglandins, 1979. **18**(2): p. 179-190.
43. Blaesse, P., et al., *Cation-Chloride Cotransporters and Neuronal Function*. Neuron, 2009. **61**(6): p. 820-838.

44. Delpire, E., *Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication*. Physiology, 2000. **15**(6): p. 309-312.
45. Ganguly, K., et al., *GABA Itself Promotes the Developmental Switch of Neuronal GABAergic Responses from Excitation to Inhibition*. Cell, 2001. **105**(4): p. 521-532.
46. Rivera, C., et al., *The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation*. Nature, 1999. **397**(6716): p. 251-255.
47. Vinay, L. and C. Jean-Xavier, *Plasticity of spinal cord locomotor networks and contribution of cation-chloride cotransporters*. Brain Research Reviews, 2008. **57**(1): p. 103-110.
48. Báldi, R., C. Varga, and G. Tamás, *Differential distribution of KCC2 along the axo-somato-dendritic axis of hippocampal principal cells*. European Journal of Neuroscience, 2010. **32**(8): p. 1319-1325.
49. Payne, J.A., *Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> regulation*. American Journal of Physiology - Cell Physiology, 1997. **273**(5): p. C1516-C1525.
50. Thompson, S.M., R.A. Deisz, and D.A. Prince, *Outward chloride/cation co-transport in mammalian cortical neurons*. Neuroscience Letters, 1988. **89**(1): p. 49-54.
51. Gauvain, G., et al., *The neuronal K-Cl cotransporter KCC2 influences postsynaptic AMPA receptor content and lateral diffusion in dendritic spines*. PNAS, 2011. **108**(37): p. 15474 - 15479.
52. Gulyás, A.I., et al., *The KCl cotransporter, KCC2, is highly expressed in the vicinity of excitatory synapses in the rat hippocampus*. European Journal of Neuroscience, 2001. **13**(12): p. 2205-2217.
53. Watanabe, M., et al., *Clustering of Neuronal K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> Cotransporters in Lipid Rafts by Tyrosine Phosphorylation*. J. Biol. Chem., 2009. **284**(41): p. 27980 - 27988.
54. Grill, B., et al., *C. elegans RPM-1 Regulates Axon Termination and Synaptogenesis through the Rab GEF GLO-4 and the Rab GTPase GLO-1*. Neuron, 2007. **55**: p. 587 - 601.
55. Ohtsubo, M., et al., *Isolation and characterization of the active cDNA of the human cell cycle gene (RCC1) involved in the regulation of onset of chromosome condensation*. Genes & Development, 1987. **1**(6): p. 585-593.
56. Bateman, A., et al., *The Pfam Protein Families Database*. Nucleic Acids Research, 2002. **30**(1): p. 276-280.
57. Stevens, T.J. and M. Paoli, *RCC1-like repeat proteins: A pangenomic, structurally diverse new superfamily of  $\beta$ -propeller domains*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2008. **70**(2): p. 378-387.
58. Renault, L., et al., *The 1.7 Å crystal structure of the regulator of chromosome condensation (RCC1) reveals a seven-bladed propeller*. NATURE, 1998. **392**(6671): p. 97 - 101.
59. Askjaer, P., et al., *Ran GTPase cycle and importins alpha and beta are essential for spindle formation and nuclear envelope assembly in living Caenorhabditis elegans embryos*. Mol. Biol. Cell, 2002. **13**(12): p. 4355 - 4370.
60. Bamba, C., et al., *The GTPase Ran Regulates Chromosome Positioning and Nuclear Envelope Assembly In Vivo*. Current Biology, 2002. **12**(6): p. 503-507.
61. Chen, T., et al., *N-terminal [alpha]-methylation of RCC1 is necessary for stable chromatin association and normal mitosis*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(5): p. 596-603.
62. Nemergut, M.E., et al., *Chromatin Docking and Exchange Activity Enhancement of RCC1 by Histones H2A and H2B*. Science, 2001. **292**(5521): p. 1540-1543.
63. Ohtsubo, M., H. Okazaki, and T. Nishimoto, *The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA*. The Journal of Cell Biology, 1989. **109**: p. 1389 - 1397.
64. Riddick, G. and I.G. Macara, *A systems analysis of importin- $\alpha$ - $\beta$  mediated nuclear protein import*. The Journal of Cell Biology, 2005. **168**(7): p. 1027-1038.
65. Seino, H., et al., *DNA-binding domain of RCC1 protein is not essential for coupling mitosis with DNA replication*. Journal of Cell Science, 1992. **102**: p. 393 - 400.



66. Mollinari, C., et al., *The Mammalian Passenger Protein TD-60 Is an RCC1 Family Member with an Essential Role in Prometaphase to Metaphase Progression*. *Developmental Cell*, 2003. **5**(2): p. 295-307.
67. Rodriguez, C.I. and C.L. Stewart, *Disruption of the ubiquitin ligase HERC4 causes defects in spermatozoon maturation and impaired fertility*. *Developmental Biology*, 2007. **312**(2): p. 501-508.
68. Rosasco-Nitcher, S.E., et al., *Centromeric Aurora-B Activation Requires TD-60, Microtubules, and Substrate Priming Phosphorylation*. *Science*, 2008. **319**(5862): p. 469-472.
69. Dastur, A., et al., *Herc5, an Interferon-induced HECT E3 Enzyme, Is Required for Conjugation of ISG15 in Human Cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(7): p. 4334-4338.
70. Wong, J.J.Y., et al., *HERC5 is an IFN-induced HECT-type E3 protein ligase that mediates type I IFN-induced ISGylation of protein targets*. *PNAS*, 2006. **103**(28): p. 10735 - 10740.
71. Richards, S.A., K.M. Lounsbury, and I.G. Macara, *The C Terminus of the Nuclear RAN/TC4 GTPase Stabilizes the GDP-bound State and Mediates Interactions with RCC1, RAN-GAP, and HTF9A/RANBP1*. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. **270**(24): p. 14405-14411.
72. Bischoff, F.R. and H. Ponstingl, *Catalysis of guanine nucleotide exchange on ran by the mitotic regulator RCC1*. *Nature*, 1991. **354**: p. 80 - 82.
73. Nagai, M. and Y. Yoneda, *Small GTPase Ran and Ran-binding proteins*. *BioMol Concepts*, 2012. **3**: p. 307 - 318.
74. Moore, M.S., *Ran and Nuclear Transport*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(36): p. 22857 - 22860.
75. Seki, T., N. Hayashi, and T. Nishimoto, *RCC1 in the Ran Pathway*. *Journal of Biochemistry*, 1996. **120**(2): p. 207-214.
76. Klebe, C., et al., *Interaction of the Nuclear GTP-Binding Protein Ran with Its Regulatory Proteins RCC1 and RanGAP1*. *Biochemistry*, 1995. **34**: p. 639 - 647.
77. Bischoff, F.R., et al., *Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1*. *The EMBO Journal*, 1995. **14**(4): p. 705 - 715.
78. Hayashi, N., et al., *RanBP1, a Ras-like nuclear G protein binding to Ran/TC4, inhibits RCC1 via Ran/TC4*. *Molecular and General Genetics MGG*, 1995. **247**(6): p. 661-669.
79. Gareau, J.R., D. Reverter, and C.D. Lima, *Determinants of SUMO1 specificity, E3 ligase and SUMO-RanGAP1 binding activities of the nucleoporin RanBP2*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012. **287**(February 10 (7)): p. 4740 - 4751.
80. Kirsh, O., et al., *The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase*. *The EMBO Journal*, 2002. **21**(11): p. 2682-2691.
81. Pichler, A., et al., *The Nucleoporin RanBP2 Has SUMO1 E3 Ligase Activity*. *Cell*, 2002. **108**(1): p. 109-120.
82. Pichler, A., et al., *The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type*. *Nat Struct Mol Biol*, 2004. **11**(10): p. 984-991.
83. Reverter, D. and C.D. Lima, *Insights into E3 ligase activity revealed by a SSUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex*. *nature letters*, 2005. **435**(June 2): p. 687 - 692.
84. Englmeier, L., et al., *RanBP3 influences interactions between CRM1 and its nuclear protein export substrates*. *EMBO reports*, 2001. **2**(10): p. 926-932.
85. Lindsay, M.E., et al., *Ran-Binding Protein 3 Is a Cofactor for Crm1-Mediated Nuclear Protein Export*. *The Journal of Cell Biology*, 2001. **153**(7): p. 1391-1402.
86. Mueller, L., et al., *Human RanBP3, a group of nuclear RanGTP binding proteins*. *FEBS Letters*, 1998. **427**(3): p. 330-336.
87. Nemergut, M.E., et al., *Ran-binding Protein 3 Links Crm1 to the Ran Guanine Nucleotide Exchange Factor*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(20): p. 17385-17388.
88. Jäkel, S., et al., *Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains*. *The EMBO Journal*, 2002. **21**(3): p. 377-386.

89. Jäkel, S. and D. Görlich, *Importin  $\beta$ , transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells*. The EMBO Journal, 1998. **17**(15): p. 4491-4502.
90. Fassati, A., et al., *Nuclear import of HIV -1 intracellular reverse transcription complexes is mediated by importin 7*. The EMBO Journal, 2003. **22**(14): p. 3675-3685.
91. Jäkel, S., et al., *The importin  $\beta$ /importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1*. The EMBO Journal, 1999. **18**(9): p. 2411-2423.
92. Dean, K.A., et al., *Signal recognition particle protein 19 is imported into the nucleus by importin 8 (RanBP8) and transportin*. Journal of Cell Science, 2001. **114**(19): p. 3479-3485.
93. Görlich, D., et al., *A Novel Class of RanGTP Binding Proteins*. The Journal of Cell Biology, 1997. **138**(1): p. 65-80.
94. Kramer, S., et al., *Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells*. Oncogene, 2004. **24**(5): p. 938-944.
95. Rao, M.A., et al., *RanBPM, a Nuclear Protein That Interacts with and Regulates Transcriptional Activity of Androgen Receptor and Glucocorticoid Receptor*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(50): p. 48020-48027.
96. Wang, D., et al., *Activation of Ras/Erk Pathway by a Novel MET-interacting Protein RanBPM*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(39): p. 36216-36222.
97. Schulze, H., et al., *RanBP10 is a cytoplasmic Guanine Nucleotide Exchange Factor that modulates noncentrosomal Microtubules*. The Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(20): p. 14109 - 14119.
98. Plafker, S.M. and I.G. Macara, *Importin -11, a nuclear import receptor for the ubiquitin conjugating enzyme, UbcM2*. The EMBO Journal, 2000. **19**(20): p. 5502-5513.
99. Askjaer, P., et al., *RanGTP-Regulated Interactions of CRM1 with Nucleoporins and a Shuttling DEAD-Box Helicase*. Molecular and Cellular Biology, 1999. **19**(9): p. 6276 - 6285.
100. Hutten, S. and R.H. Kehlenbach, *CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond*. Trends in Cell Biology, 2007. **17**(4): p. 193-201.
101. Kehlenbach, R.H., A. Dickmanns, and L. Gerace, *Nucleocytoplasmic Shuttling Factors Including Ran and CRM1 Mediate Nuclear Export of NFAT In Vitro*. The Journal of Cell Biology, 1998. **141**(4): p. 863-874.
102. Lee, S.-H. and M. Hannink, *The N-terminal Nuclear Export Sequence of I $\kappa$ B $\alpha$  Is Required for RanGTP-dependent Binding to CRM1*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(26): p. 23599-23606.
103. Nguyen, K.T., M.P. Holloway, and R.A. Altura, *The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease*. Int J. Biochem Mol Biol., 2012. **3**(2): p. 137-151.
104. Görlich, D. and U. Kutay, *TRANSPORT BETWEEN THE CELL NUCLEUS AND THE CYTOPLASM*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 1999. **15**(1): p. 607-660.
105. Imamoto, N., et al., *In vivo evidence for involvement of a 58 kDa component of nuclear pore-targeting complex in nuclear protein import*. The EMBO Journal, 1995. **14**(15): p. 3617 - 3626.
106. Weis, K., I.W. Mattaj, and A.I. Lamond, *Identification of hSRP1 alpha as a functional receptor for nuclear localization sequences*. Science, 1995. **268**(5213): p. 1049-1053.
107. Stewart, M., *Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(3): p. 195-208.
108. Moroianu, J., G. Blobel, and A. Radu, *The binding site of karyopherin alpha for karyopherin beta overlaps with a nuclear localization sequence*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(13): p. 6572-6576.

109. Chi, N.C., E.J. Adam, and S.A. Adam, *Sequence and characterization of cytoplasmic nuclear protein import factor p97*. The Journal of Cell Biology, 1995. **130**(2): p. 265-274.
110. Görlich, D., et al., *Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope*. Current biology : CB, 1995. **5**(4): p. 383-392.
111. Imamoto, N., et al., *The nuclear pore-targeting complex binds to nuclear pores after association with a karyophile*. FEBS Letters, 1995. **368**(3): p. 415-419.
112. Moroianu, J., G. Blobel, and A. Radu, *Previously identified protein of uncertain function is karyopherin alpha and together with karyopherin beta docks import substrate at nuclear pore complexes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(6): p. 2008-2011.
113. Carazo-Salas, R.E., et al., *Ran-GTP coordinates regulation of microtubule nucleation and dynamics during mitotic-spindle assembly*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(3): p. 228-234.
114. Kalab, P., R.T. Pu, and M. Dasso, *The Ran GTPase regulates mitotic spindle assembly*. Current Biology, 1999. **9**: p. 481 - 484.
115. Ohba, T., et al., *Self-Organization of Microtubule Asters Induced in Xenopus Egg Extracts by GTP-Bound Ran*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1356-1358.
116. Wilde, A. and Y. Zheng, *Stimulation of Microtubule Aster Formation and Spindle Assembly by the Small GTPase Ran*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1359-1362.
117. Zhang, C., M. Hughes, and P.R. Clarke, *Ran-GTP stabilises microtubule asters and inhibits nuclear assembly in Xenopus egg extracts*. Journal of Cell Science, 1999. **112**(14): p. 2453-2461.
118. Clarke, P.R. and C. Zhang, *Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(6): p. 464-477.
119. Kalab, P. and R. Heald, *The RanGTP gradient – a GPS for the mitotic spindle*. Journal of Cell Science, 2008. **121**(10): p. 1577-1586.
120. Kalab, P., et al., *Analysis of a RanGTP-regulated gradient in mitotic somatic cells*. NATURE, 2006. **440**(7084): p. 697 - 701.
121. Kalab, P., K. Weis, and R. Heald, *Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic Xenopus egg extracts*. Science, 2002. **295**(5564): p. 2452 - 2456.
122. Gruss, O.J., et al., *Ran Induces Spindle Assembly by Reversing the Inhibitory Effect of Importin  $\alpha$  on TPX2 Activity*. Cell, 2001. **104**(1): p. 83-93.
123. Nachury, M.V., et al., *Importin  $\beta$  Is a Mitotic Target of the Small GTPase Ran in Spindle Assembly*. Cell, 2001. **104**(1): p. 95-106.
124. Trieselmann, N., et al., *Ran modulates spindle assembly by regulating a subset of TPX2 and Kid activities including Aurora A activation*. Journal of Cell Science, 2003. **116**(23): p. 4791-4798.
125. Tsai, M.-Y., et al., *A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(3): p. 242-248.
126. Wiese, C., et al., *Role of Importin- $\beta$  in Coupling Ran to Downstream Targets in Microtubule Assembly*. Science, 2001. **291**(5504): p. 653-656.
127. Wittmann, T., et al., *Tpx2, a Novel Xenopus Map Involved in Spindle Pole Organization*. The Journal of Cell Biology, 2000. **149**(7): p. 1405-1418.
128. Hetzer, M., et al., *GTP hydrolysis by Ran is required for nuclear envelope assembly*. Mol Cell., 2000. **5**(6): p. 1013 - 1024.
129. Ryan, K.J., J.M. McCaffery, and S.R. Wentz, *The Ran GTPase cycle is required for yeast nuclear pore complex assembly*. The Journal of Cell Biology, 2003. **160**(7): p. 1041-1053.
130. Walther, T.C., et al., *RanGTP mediates nuclear pore complex assembly*. Nature, 2003. **424**(6949): p. 689-694.
131. Zhang, C. and P.R. Clarke, *Chromatin-Independent Nuclear Envelope Assembly Induced by Ran GTPase in Xenopus Egg Extracts*. Science, 2000. **288**(5470): p. 1429-1432.

132. Zhang, C., et al., *Concentration of Ran on chromatin induces decondensation, nuclear envelope formation and nuclear pore complex assembly*. Eur. J. Cell Biol., 2002. **81**(11): p. 623 - 633.
133. Fu, J., Q. Jiang, and C. Zhang, *Coordination of Cell Cycle Events by Ran GTPase*. Nature Education, 2010. **3**(9): p. 32.
134. Ibáñez, C.F., *Message in a bottle: long-range retrograde signaling in the nervous system*. Trends in Cell Biology, 2007. **17**(11): p. 519-528.
135. Hanz, S. and M. Fainzilber, *Integration of Retrograde Axonal and Nuclear Transport Mechanisms in Neurons: Implications for Therapeutics*. The Neuroscientist, 2004. **10**(5): p. 404-408.
136. Otis, K.O., K.R. Thompson, and K.C. Martin, *Importin-mediated nuclear transport in neurons*. Current Opinion in Neurobiology, 2006. **16**(3): p. 329-335.
137. Hippenmeyer, S., I. Kramer, and S. Arber, *Control of neuronal phenotype: what targets tell the cell bodies*. Trends in Neurosciences, 2004. **27**(8): p. 482-488.
138. Abe, N. and V. Cavalli, *Nerve injury signaling*. Current Opinion in Neurobiology, 2008. **18**(3): p. 276-283.
139. Hanz, S. and M. Fainzilber, *Retrograde signaling in injured nerve – the axon reaction revisited*. Journal of Neurochemistry, 2006. **99**(1): p. 13-19.
140. Perlson, E., et al., *From snails to sciatic nerve: Retrograde injury signaling from axon to soma in lesioned neurons*. Journal of Neurobiology, 2004. **58**(2): p. 287-294.
141. Ambron, R. and E. Walters, *Priming events and retrograde injury signals*. Molecular Neurobiology, 1996. **13**(1): p. 61-79.
142. Hanz, S., et al., *Axoplasmic Importins Enable Retrograde Injury Signaling in Lesioned Nerve*. Neuron, 2003. **40**(6): p. 1095-1104.
143. Yudin, D., et al., *Localized Regulation of Axonal RanGTPase Controls Retrograde Injury Signaling in Peripheral Nerve*. Neuron, 2008. **59**(July 31): p. 241 - 252.
144. Yudin, D. and M. Fainzilber, *Ran on tracks - cytoplasmic roles for a nuclear regulator*. Journal of Cell Science, 2009. **122**: p. 587 - 593.
145. Hanahan, D., in *DNA Cloning Techniques: A practical Approach*, D. Glover, Editor. 1985, IRL Press: Oxford. p. 109.
146. Ausubel, F.M., et al., *Transform Competent Cells*, in *Current Protocols in Molecular Biology*, V. Benson Chanda, Editor. 1987, John Wiley & Sons, Inc. p. 1.8.2.
147. Ausubel, F.M., et al., *Alkaline Lysis Miniprep*, in *Current Protocols in Molecular Biology*, V. Benson Chanda, Editor. 1987, John Wiley & Sons, Inc. p. 1.6.1.
148. Ausubel, F.M., et al., *Immunoprecipitation with antibody-conjugated beads*, in *Current Protocols in Molecular Biology*, V. Benson Chanda, Editor. 1987, John Wiley & Sons, Inc. p. 10.16.4.
149. Holland, S., et al., *The Ubiquitin Ligase MYCBP2 Regulates Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor 1 (TRPV1)-Internalization Through Inhibition of p38 MAPK Signaling*. Journal of biological Chemistry, 2011.
150. Kerscher, O., *SUMO junction—what's your function?* EMBO Reports, ed. O. Kerscher. Vol. 8. 2007. 550-555.
151. Song, J., et al., *Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(40): p. 14373-14378.
152. Hecker, C.-M., et al., *Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting Motifs*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(23): p. 16117-16127.
153. Hicke, L., H.L. Schubert, and C.P. Hill, *Ubiquitin-binding domains*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(8): p. 610-621.
154. Minty, A., et al., *Covalent Modification of p73 $\alpha$  by SUMO-1: TWO-HYBRID SCREENING WITH p73 IDENTIFIES NOVEL SUMO-1-INTERACTING PROTEINS AND A SUMO-1 INTERACTION MOTIF*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(46): p. 36316-36323.
155. Krejci, L., et al., *DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 305-309.

156. Papouli, E., et al., *Crosstalk between SUMO and Ubiquitin on PCNA Is Mediated by Recruitment of the Helicase Srs2p*. *Molecular Cell*, 2005. **19**(1): p. 123-133.
157. Pfander, B., et al., *SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase*. *Nature*, 2005. **436**(7049): p. 428-433.
158. Veaute, X., et al., *The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments*. *Nature*, 2003. **423**(6937): p. 309-312.
159. Baba, D., et al., *Crystal Structure of SUMO-3-modified Thymine-DNA Glycosylase*. *Journal of Molecular Biology*, 2006. **359**(1): p. 137-147.
160. Hardeland, U., et al., *Modification of the human thymine DNA glycosylase by ubiquitin like proteins facilitates enzymatic turnover*. *The EMBO Journal*, 2002. **21**(6): p. 1456-1464.
161. Steinacher, R. and P. Schär, *Functionality of Human Thymine DNA Glycosylase Requires SUMO-Regulated Changes in Protein Conformation*. *Current Biology*, 2005. **15**(7): p. 616-623.
162. Lin, D.-Y., et al., *Role of SUMO-Interacting Motif in Daxx SUMO Modification, Subnuclear Localization, and Repression of Sumoylated Transcription Factors*. *Molecular Cell*, 2006. **24**(3): p. 341-354.
163. Quimby, B.B., et al., *The promyelocytic leukemia protein stimulates SUMO conjugation in yeast*. *Oncogene*, 2006. **25**(21): p. 2999-3005.
164. Shen, T.H., et al., *The Mechanisms of PML-Nuclear Body Formation*. *Molecular Cell*, 2006. **24**(3): p. 331-339.
165. Saitoh, H., et al., *RanBP2 associates with Ubc9p and a modified form of RanGAP1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. **94**(8): p. 3736-3741.
166. Pham, L.V., et al., *Nuclear Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 6 in Lymphoid Cells Negatively Regulates c-Myb-mediated Transactivation through Small Ubiquitin-related Modifier-1 Modification*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008. **283**(8): p. 5081 - 5089.
167. Xia, T., et al., *The Four and a Half LIM-only Protein 2 (FHL2) Activates Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Signaling by Regulating Ubiquitination of the E3 Ligase Arkadia*. *Journal of Biological Chemistry*, 2013. **288**(3): p. 1785-1794.
168. Zheng, J., et al., *CAND1 Binds to Unneddylated CUL1 and Regulates the Formation of SCF Ubiquitin E3 Ligase Complex*. *Molecular Cell*, 2002. **10**(6): p. 1519-1526.
169. Otomo, A., et al., *ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics*. *Human Molecular Genetics*, 2003. **12**(14): p. 1671-1687.
170. Jensen, R.B., et al., *FYVE zinc-finger proteins in the plant model Arabidopsis thaliana: identification of PtdIns3P-binding residues by comparison of classic and variant FYVE domains*. *Biochem J.*, 2001. **359**(Pt 1): p. 165 - 173.
171. Rosa, J.L., et al., *p619, a giant protein related to the chromosome condensation regulator RCC1, stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins*. *The EMBO Journal*, 1996. **15**(16): p. 4262 - 4273.
172. Roig, J., et al., *Nercc1, a mammalian NIMA-family kinase, binds the Ran GTPase and regulates mitotic progression*. *Genes & Development*, 2002. **16**(13): p. 1640-1658.
173. Topp, J.D., et al., *Alsin Is a Rab5 and Rac1 Guanine Nucleotide Exchange Factor*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(23): p. 24612-24623.
174. Ma, J., et al., *Lightoid and Claret: A rab GTPase and its putative guanine nucleotide exchange factor in biogenesis of Drosophila eye pigment granules*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(32): p. 11652-11657.
175. Gogendeau, D., et al., *Nd6p, a Novel Protein with RCC1-Like Domains Involved in Exocytosis in Paramecium tetraurelia*. *Eukaryotic Cell*, 2005. **4**(12): p. 2129-2139.
176. Patel, S.R., J.H. Hartwig, and J.E. Italiano, Jr., *The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2005. **115**(12): p. 3348-3354.

177. Nakamura, M., et al., *When Overexpressed, a Novel Centrosomal Protein, RanBPM, Causes Ectopic Microtubule Nucleation Similar to  $\gamma$ -Tubulin*. The Journal of Cell Biology, 1998. **143**(4): p. 1041-1052.
178. Nishitani, H., et al., *Full-sized RanBPM cDNA encodes a protein possessing a long stretch of proline and glutamine within the N-terminal region, comprising a large protein complex*. Gene, 2001. **272**(1–2): p. 25-33.
179. Garcia-Gonzalo, F.R. and J.L. Rosa, *The HERC proteins: functional and evolutionary insights*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2005. **62**(16): p. 1826-1838.
180. Huibregtse, J.M., M. Scheffner, and P.M. Howley, *A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18*. The EMBO Journal, 1991. **10**(13): p. 4129–4135.
181. Huibregtse, J.M., M. Scheffner, and P.M. Howley, *Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53*. Molecular and Cellular Biology, 1993. **13**(2): p. 775-784.
182. Scheffner, M., et al., *The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53*. Cell, 1993. **75**(3): p. 495-505.
183. Huibregtse, J.M., et al., *A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(11): p. 5249.
184. Schwarz, S.E., J.L. Rosa, and M. Scheffner, *Characterization of Human hect Domain Family Members and Their Interaction with Ubch5 and Ubch7*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(20): p. 12148-12154.
185. Chong-Kopera, H., et al., *TSC1 Stabilizes TSC2 by Inhibiting the Interaction between TSC2 and the HERC1 Ubiquitin Ligase*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(13): p. 8313-8316.
186. Rosa, J.L. and M. Barbacid, *A giant protein that stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins forms a cytosolic ternary complex with clathrin and Hsp70*. Oncogene, 1997. **15**(1): p. 1-6.
187. Garcia-Gonzalo, F.R., et al., *The giant protein HERC1 is recruited to aluminum fluoride-induced actin-rich surface protrusions in HeLa cells*. FEBS Letters, 2004. **559**(1–3): p. 77-83.
188. Pierre, S., et al., *Toponomics Analysis of Functional Interactions of the Ubiquitin Ligase PAM (Protein Associated with Myc) during Spinal Nociceptive Processing*. Molecular & Cellular Proteomics, 2008. **7**(12): p. 2475 - 2485.
189. Collins, C.A., et al., *Highwire Restrains Synaptic Growth by Attenuating a MAP Kinase Signal*. Neuron, 2006. **51**: p. 57 - 69.
190. Liao, E.H., et al., *An SCF-like ubiquitin ligase complex that controls presynaptic differentiation*. NATURE 2004. **430**: p. 345 - 350.
191. Garcia-Gonzalo, F.R., et al., *Requirement of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate for HERC1-mediated guanine nucleotide release from ARF proteins*. FEBS Letters, 2005. **579**(2): p. 343-348.
192. Lehman, A.L., et al., *A very large protein with diverse functional motifs is deficient in rjs (runty, jerky, sterile) mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(16): p. 9436-9441.
193. Cruz, C., et al., *HERC3 binding to and regulation by ubiquitin*. FEBS Letters, 2001. **488**(1–2): p. 74-80.
194. Hochrainer, K., et al., *The human HERC family of ubiquitin ligases: novel members, genomic organization, expression profiling, and evolutionary aspects*. Genomics, 2005. **85**(2): p. 153-164.
195. Kroismayr, R., et al., *HERC5, a HECT E3 ubiquitin ligase tightly regulated in LPS activated endothelial cells*. Journal of Cell Science, 2004. **117**(20): p. 4749-4756.
196. Mitsui, K., et al., *A Novel Human Gene Encoding HECT Domain and RCC1-like Repeats Interacts with Cyclins and Is Potentially Regulated by the Tumor Suppressor Proteins*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999. **266**(1): p. 115-122.

197. Takeuchi, T., S. Inoue, and H. Yokosawa, *Identification and Herc5-mediated ISGylation of novel target proteins*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006. **348**(2): p. 473-477.
198. Grill, B., et al., *RAE-1, a novel PHR binding protein, is required for axon termination and synapse formation in Caenorhabditis elegans*. The Journal of Neuroscience, 2012. **32**(8): p. 2628 - 2636.
199. Kraemer, D., T. Dresbach, and D. Drenckhahn, *Mrnp41 (Rae1p) associates with microtubules in HeLa cells and in neurons*. European Journal of Cell Biology, 2001. **80**(12): p. 733-740.
200. Babu, J.R., et al., *Rae1 is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation*. The Journal of Cell Biology, 2003. **160**(3): p. 341-353.
201. Blevins, M.B., et al., *Complex Formation among the RNA Export Proteins Nup98, Rae1/Gle2, and TAP*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(23): p. 20979-20988.
202. Blower, M.D., et al., *A Rae1-Containing Ribonucleoprotein Complex Is Required for Mitotic Spindle Assembly*. Cell, 2005. **121**(2): p. 223-234.
203. Jeganathan, K.B., L. Malureanu, and J.M. van Deursen, *The Rae1-Nup98 complex prevents aneuploidy by inhibiting securin degradation*. Nature, 2005. **438**(7070): p. 1036-1039.
204. Sitterlin, D., *Characterization of the Drosophila Rae1 protein as a G1 phase regulator of the cell cycle*. Gene, 2004. **326**(0): p. 107-116.
205. Wong, R.W., G. Blobel, and E. Coutavas, *Rae1 interaction with NuMA is required for bipolar spindle formation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(52): p. 19783-19787.

## 10. Anhang

### 10.1. Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Klinische Pharmakologie der medizinischen Fakultät der Johann Wolfgang Goethe-Universität erstellt. Herrn Prof. Dr. Dr. Geißlinger möchte ich daher für die Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut und für seine Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Ein besonderer Dank geht auch an Prof. Dr. Klaus Scholich für die engagierte Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Marschalek möchte ich für die Begutachtung dieser Arbeit und im Besonderen für die inspirierenden Jahresgespräche danken.

Dongdong Zhang, Jing Suo und Judith Fuchs möchte ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche danken.

Für technische und beratende Unterstützung bedanke ich mich bei Herrn Kai Altenrath, Herrn Stephan Hohmann, Frau Dr. Sabrina Holland, Frau Dr. Bona Linke, Frau Dr. Sandra Pierre, Herrn Dr. Claus Schuh, Herrn Dr. Marco Sissignano, Frau Elsa-Marie Treutlein und Herrn Sebastian Zinn. Ein Besonderer Dank geht an Marina Henke.

Für private Unterstützung danke ich herzlichst meinen Eltern, dem Rest meiner Familie und besonders Christian Persohn.



---

## 10.2. Veröffentlichungen

### Peer-reviewed Publikationen

---

Angela Dörr, Sandra Pierre, Dongdong Zhang, Marina Henke, Sabrina Holland, Klaus Scholich

*MYCBP2 is a guanosine exchange factor for Ran and determines its localization in dorsal root ganglia*

Science Signaling, under revision

### Posterpräsentationen

---

A. Dörr, S. Pierre, D. D. Zhang, M. Henke, S. Holland, K. Scholich

*RanGAP1 mediates translocation of MYCBP2 to the nucleus*

EMBL Conference: Chemical Biology 2014

### 10.3. Lebenslauf

#### Persönliche Daten

---

Angela Dörr  
Am Leiterberg 24  
67806 Rockenhausen  
Germany

Geboren am 30.07.1985



#### Ausbildung

---

Seit 12/2010 **Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main**

- Naturwissenschaftliche Promotion am Institut für klinische Pharmakologie, *pharmazentrum frankfurt/ZAFES*
- Thema: Integration des MycBP2 in den Ran-GTPase Zyklus
- Betreuer: Prof. Dr. Klaus Scholich

02/2010 – 09/2010 **Technische Universität Kaiserslautern**

#### Fachbereich Lebensmittelchemie und Toxikologie

- Diplomarbeit: Beeinflussung der CYP1 Aktivität durch Dioxine und dioxinähnliche PCBs
- Betreuer: Prof. Dr. Dieter Schrenk

03/2009 – 06/2009 **Universität Glasgow**

- Auslandspraktikum
- Bericht: *Determination of the activity of PanK depending on Pantothenate and its analogues*
- Betreuer: Dr. Adrian Laphorne

07/2008 – 08/2008 **Technische Universität Kaiserslautern**

- Wissenschaftliche Hilfskraft im Bereich Anorganische Chemie/Katalyse
- Betreuer: Dr. Andreas Reis

09/2005 – 09/2010 **Technische Universität Kaiserslautern**

- Studium der Chemie  
Vertiefungsrichtung: Life science und Toxikologie  
Abschluss: Diplom