

Hovedfagsoppgave i Molekylær biovitenskap

Studieretning Biokjemi

Sumoylering av onkoproteinet c-Myb

Bruk av c-Myb-SUMO fusjoner til å analysere funksjon

Ole Stian Bockelie

Institutt for molekylær biovitenskap
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
UNIVERSITETET I OSLO Mars 2007



Forord

Oppgaven presentert her ble utført ved Institutt for molekylær biovitenskap ved Universitetet i Oslo.

Først vil jeg rette en stor takk til min veilder Odd Stokke Gabrielsen for god veiledning gjennom prosjektet. Jeg vil også takke Marit for viktig og god hjelp under det praktiske arbeidet på laben, Thomas for flott hjelp med tolking av datamateriale, samt retting av oppgaven, og en stor takk rettes til Anne Hege for arbeidet med immunofluorescense og konfokalmikroskopieringen. Jeg vil også takke resten av Myb-gruppa som jeg ønsker lykke til videre med forskningen, samt medstudenter og venner ellers for oppmuntring og mye morro gjennom disse årene.

Tilslutt vil jeg takke familien for veldig god støtte gjennom denne perioden.

Oslo 29. mars 2007

Ole Stian Bockelie

Sammendrag

c-Myb er en transkripsjonsfaktor som er involvert i proliferasjon, differensiering og apoptose, hovedsakelig av hematopoetiske celler. Den transkripsjonelle aktiviteten av c-Myb har vist seg å være avhengig av forskjellige posttranslasjonelle modifikasjoner.

”Small ubiquitin-like modifiers” (SUMO) er en familie av proteiner som de seneste årene er blitt viet mye forskning. SUMO proteinene har det til felles med ubiquitin at de kan konjugeres til andre proteiner posttranslasjonelt, og en rekke forskjellige transkripsjonsfaktorer har vist seg å bli sumoylert. SUMO er tidligere vist å konjugeres til c-Myb på 2 forskjellige lysin residuer og mutasjon av disse konjugeringssetene (c-Myb-2KR) er vist å føre til at den transkripsjonelle aktiviteten til c-Myb øker.

En utfordring man står overfor når man vil studere hvilken effekt SUMO-konjugering av c-Myb har på c-Myb avhengig transkripsjon, er at sumoylering er en reversibel prosess og bare en liten andel av en transkripsjonsfaktor i en celle vil til enhver tid være sumoylert. Det er enkelt via mutanter å skape en ikke-sumoylert faktor, men mindre opplagt hvordan man kan studere egenskapene til en fullt og alltid sumoylert form. I dette prosjektet er det nettopp det siste vi har prøvd å få til, for dermed sikrere å kunne studere effekten som sumoylering av c-Myb har på faktorens transkripsjonelle egenskaper når den foreligger i konjugert form.

Vi valgte i en strategi hvor vi lagde fusjoner mellom c-Myb og SUMO som ikke kunne brytes av SUMO-proteaser for deretter å prøve å studere hvilken effekt SUMO-konjugering har på c-Mybs transkripsjonelle aktivitet. Det ble også benyttet immunofluorescense og konfokalmikroskopi for å studere om den subcellulære lokalisasjonen til c-Myb ble forandret når c-Myb var sumoylert sammenliknet med fritt c-Myb.

Det viste seg ved å benytte reporteraktiveringsassay at aktiviteten til c-Myb-2KR-SUMO fusjonskonstruktene var markant lavere enn c-Myb-2KR og at SUMO-konjugering av c-Myb derfor fører til en reduksjon i c-Mybs transkripsjonelle aktivitet.

Ved å sammenlikne våre fusjonsproteiner med c-Myb proteiner som mangler det negative regulatoriske domenet (NRD) ønsket vi videre å se om SUMO-konjugering av c-Myb kan

forklare NRDs negative regulatoriske effekt på c-Mybs transkripsjonelle aktivitet. Effekten av å fjerne NRD (c-Myb-[1-443]) ble i stor grad oppveiet ved en SUMO fusjon (c-Myb-[1-443]-SUMO), men vi kan likevel ikke utelukke at det er andre aktiviteter knyttet til NRD som ikke fanges opp av vårt reporteraktiveringsassay.

Ved hjelp av immunofluorescense og konfokalmikroskopi undersøkte vi om den subcellulære lokalisasjonen til c-Myb ble forandret ved SUMO-konjugering. Vi fant ikke bevis for at den subcellulære lokalisasjonen til c-Myb forandres ved SUMO-konjugering, tvert imot ser den subcellulære lokalisasjon til c-Myb å være uforandret ved SUMO-konjugering sammenliknet med fritt c-Myb. Det kan se ut til at andre faktorer er viktigere for c-Mybs lokalisasjon enn SUMO siden c-Mybs lokalisasjon forandres fra celle til celle.

Innhold

FORORD

SAMMENDRAG

1	INTRODUKSJON	1
1.1	Transkripsjon	3
1.1.1	Transkripsjonsapparatet	3
1.2	Posttranslasjonell modifisering	5
1.3	Small ubiquitin-like modifier (SUMO)	6
1.3.1	SUMO familien	6
1.3.2	SUMO-konjugering	7
1.3.3	SUMO prosessering og dekonjugering	9
1.3.4	Generelt om sumoylering.	10
1.3.5	Sumoylering av transkripsjonsfaktorer	11
1.3.6	SUMO paradokset	13
1.4	Myb-familien av transkripsjonsfaktorer	15
1.4.1	Uttrykk av c-Myb og c-Mybs funksjoner	18
1.4.2	c-Myb som regulator av transkripsjon	19
1.4.3	c-Mybs målgener	20
2	METODIKK	22
2.1	DNA Metoder	22
2.1.1	Isolering av plasmid DNA	22
2.1.2	DNA konsentrasjonsmålinger	22
2.1.3	Rensing av plasmid	23
2.1.4	Restriksjonskutting	23
2.1.5	Ligering	23
2.1.6	Motseleksjon av religert vektor	23
2.1.7	Agarose gelelektroforese	24
2.1.8	Transformasjon av kompetente DH5 α	24
2.1.9	Stamkulturer	24
2.1.10	Sekvensering	24
2.1.11	PCR	25
2.2	Cellelab/mammalske celler:	26
2.2.1	Beskrivelse av cellelinjen	26
2.2.2	Fortynninger	26
2.2.3	Transfeksjon	27
2.3	Proteinteknikker	30
2.3.1	SDS PAGE	30
2.3.2	Westernimmunoblotting	30
2.3.3	Reporteraktiveringsassay	32
2.3.4	Immunofluorescense og konfokalmikroskopi	34
3	MÅL FOR OPPGAVEN	35

4	RESULTATER	37
4.1	Plasmidkonstruksjon	37
4.1.1	Proteinoversikt	39
4.1.2	Konstruksjon av pCIneo-SUMO-hcM-HA	40
4.1.3	Konstruksjon av pCIneo-SUMO-hcM-[1-443]-HA	41
4.1.4	Konstruksjon av pCIneo-SUMO-hcM-2KR	42
4.1.5	Konstruksjon av pCIneo-hcM-SUMO	42
4.1.6	Konstruksjon av pCIneo-hcM-2KR-SUMO	45
4.1.7	Konstruksjon av pCIneo-hcM-[1-443]-SUMO	45
4.1.8	Konstrukter benyttet til Immunofluorescence og konfokalmikroskopi analyse	47
4.2	Westernimmunoblotting for kontroll av ekspresjonsplasmidenes produkt	49
4.2.1	Westernimmunoblotting av proteinene benyttet til immunofluorescence og konfokalmikroskopi	51
4.3	Reporteraktiveringsassay	53
4.3.1	Er effekten av SUMO-konjugering avhengig av hvor på c-Myb SUMO konjugeres?	53
4.3.2	Sammenlikning av NRD og SUMO-konjugering med hensyn på c-Mybs negative regulatoriske effekt	55
4.3.3	SUMO-konjugering av c-Myb	56
4.3.4	Reporteraktiveringsassay med 3xMRE-MYC som promoter	58
4.3.5	c-Myb-SUMO - svekket aktivator eller aktiv repressor?	59
4.4	Immunofluorescence og konfokalmikroskopi	61
4.4.1	Subcellulær lokalisering av c-Myb villtype og c-Myb-SUMO	62
4.4.2	Subcellulær lokalisering av c-Myb-2KR og c-Myb villtype	63
4.4.3	Subcellulær lokalisering av sumoyleringsdød mutant (c-Myb-2KR) og konstitutivt sumoylert c-Myb (c-Myb-SUMO)	64
5	DISKUSJON	65
5.1	Diskusjon av problemstillingene	65
5.1.1	SUMO og represjon av transkripsjon - Problemstilling 1a og 1b	65
5.1.2	SUMO-konjugering og NRD's regulatoriske effekt - Problemstilling 1c	66
5.1.3	c-Myb-SUMO, en dominant negativ? - Problemstilling 1d	68
5.1.4	SUMO og subcellulær lokalisasjon - Problemstilling 2a	69
5.2	Diskusjon rundt oppgaven	70
5.2.1	Styrker og svakheter ved valg av fusjonsstrategien	70
5.2.2	Tanker om videre arbeid som bør gjøres på dette prosjektet.	71
6	VEDLEGG	72
6.1	Forkortelser	72
6.2	Oppskrifter	75
6.3	Materialer	78
6.4	Oligosekevenser	79
6.5	Plasmidkart	80
7	REFERANSELISTE	85

1 Introduksjon

Denne oppgaven dreier seg om problemstillinger innen transkripsjon og kontroll av genekspressjon, og fokuserer på hvordan en type posttranslasjonelle modifikasjoner påvirker transkripsjonsregulatoren c-Myb. For å sette dette inn i en mer generell kontekst, kan det være på sin plass med noen generelle betraktninger innledningsvis.

Det humane genom består av 20-25000 proteinkodende gener (Little, 2005), et tall som er overraskende lavt i forhold til estimater gjort før sekvenseringen av det humane genom. Dette tallet er også lavt sammenliknet med mange andre organismer som er sekvensert. Rundormen *Caenorhabditis elegans* inneholder til sammenlikning ca. 20000 gener. Antall gener som finnes i en organisme ser med andre ord ikke ut til å være avgjørende for organismens kompleksitet. Det forholdsvis lave tallet proteinkodende gener som den komplekse organismen mennesket består av, kan i stedet forklares gjennom hvordan uttrykk av gener reguleres og gjennom hvordan mRNA-molekyler spleises sammen. Gener består av kodende områder og ikke-kodende områder. Etter at et gen er transkribert til RNA, fjernes de ikke-kodende områdene og de kodende delene av genet spleises sammen til et ferdig mRNA-molekyl. Alternativ spleising medfører at de kodende delene av genet kobles sammen på alternative måter og derfor danner ulike mRNA-molekyler som koder for proteiner med potensielt ulike egenskaper. I tillegg kan svært mange proteiner endres gjennom posttranslasjonelle modifikasjoner som fosforylering, glycosylering, acetylering. Alt dette bidrar til et vesentlig større antall protein varianter enn antallet proteinkodende gener.

Selv om alle cellene i en organisme inneholder den samme genetiske informasjonen uttrykkes forskjellige gener forskjellig avhengig av celletype, av hvilken fase cellen er i og av ytre stimuli. Dermed uttrykkes langt ifra alle genene samtidig og det kan oppnåes høy spesifisitet og kompleksitet. Hvilke gener som til en hver tid blir uttrykt i cellen, styres av et komplekst samspill av transkripsjonsfaktorer, kofaktorer, kromatinremodelleringsfaktorer, histoner og DNA modifiseringer. Hvordan forskjellige faktorer virker sammen for å regulere uttrykk av forskjellige gener er dermed meget viktig å finne ut av for å forstå hvordan organismer fungerer. Forskjellige cellers evne til å programmere sitt eget genom og bestemme hvilke gener som til enhver tid blir uttrykt under forskjellig ytre stimuli, er sentralt for

celledifferensiering, utvikling av organer og generelt for en organismes utvikling (Emerson, 2002).

Forståelsen av genregulering er også meget viktig for å kunne forstå en rekke sykdommer. Kreft er et eksempel på dette hvor celledeling er ute av kontroll. To typer gener har særlig betydning for utvikling av kreft: proto-onkogener og tumorsuppressorgener. Proto-onkogener koder for proteiner som er involvert i celledeling og vekst og er kompleks regulert i vanlige celler. Ved skader på proto-onkogene kan de tilsvarende onko-proteinene stimulere celledeling unormalt sterkt slik at celledelingen kommer ut av kontroll. Den andre typen gener kalt tumorsuppressorgener har den egenskapen at de hemmer celledeling og vekst. Ved skader på disse genene kan funksjonen som bremser celledeling gå tapt, noe som vil være et steg i retning av kreftutvikling.

I denne oppgaven studeres hvordan egenskapene til transkripsjonsfaktoren c-Myb, som er et produkt av et proto-onkogen, endres som følge av fusjon med et annet protein, ”small ubiquitin-related modifier” (SUMO) som i cellen benyttes til å posttranslasjonelt modifisere en rekke proteiner. I introduksjonsdelen blir det først kort fortalt om transkripsjon og posttranslasjonell proteinmodifisering. SUMO proteinfamilien blir så beskrevet videre, da spesielt SUMO-1 som blir benyttet i denne oppgaven, og tilslutt blir Myb familien av proteiner beskrevet med hovedvekt på c-Myb.

1.1 Transkripsjon

Proteinkodene gener utgjør under 2 % av det totale humane genom. Sammenliknet med dette kan det se ut som over 30 % av genomet er med på å kontrollere bl.a. replikasjon og genekspressjon. Generelt ser det ut til at 5-10 % av den totale kodende kapasiteten til multicellulære organismer går med til å uttrykke proteiner som regulerer transkripsjon. (Levine and Tjian, 2003). Disse proteinene deles inn i forskjellige klasser, som sekvens-spesifikke DNA-bundene proteiner som enten er aktivatorer av transkripsjon eller repressorer. I tillegg er det proteiner som inngår som komponenter i det store RNA polymerase II maskineriet som kreves for promotor gjenkjenning og katalyse av RNA syntese. Tilslutt utgjør kromatin remodelerende og modifierende proteiner en siste klasse av transkripsjonsregulerende proteiner. I gjær finnes det ca. 300 forskjellige transkripsjonsfaktorer. Til sammenlikning er det i størrelsesorden ca. 1000 forskjellige transkripsjonsfaktorer i *C. elegans* og 2-3000 transkripsjonsfaktorer i mennesket. Det kan se ut til at både ratioen av transkripsjonsfaktorer pr. genom og den totale mengden transkripsjonsfaktorer i en organisme korrelerer med en organismes kompleksitet. Mens gjær inneholder en transkripsjonsfaktor pr. 20 gener er det tilsvarende tallet for mennesker en transkripsjonsfaktor pr. ti gener. (Levine and Tjian, 2003)

1.1.1 Transkripsjonsapparatet

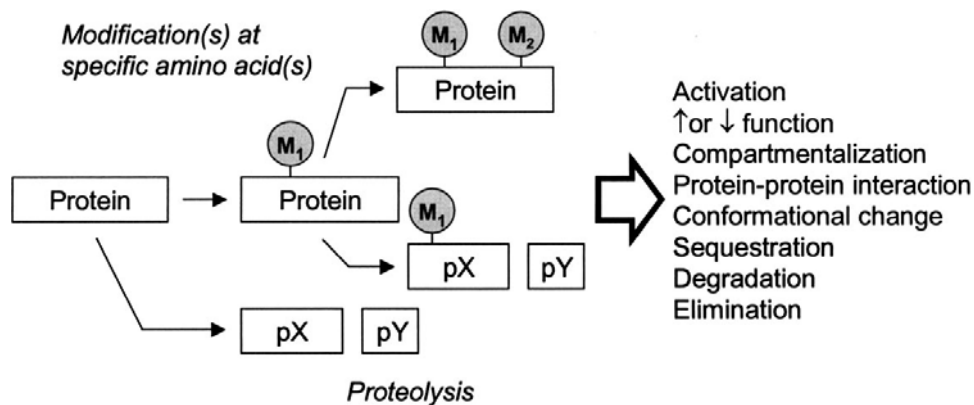
For å starte eukaryot transkripsjon inngår en rekke faktorer som spesifikke transkripsjonsfaktorer, generelle transkripsjonsfaktorer (GTF), RNA polymerase II, forskjellige kofaktorer og kromatinremodeleringsfaktorer. All eukaryot transkripsjon starter med at det trinnvis dannes et preinitiation complex (PIC) bestående av RNA polymerase II og GTF og et DNA templat på "core" promoteren. PIC komplekset som dannes varierer med ulike promotere det dannes på. For mer detaljer om dannelsen av, og detaljer om PIC se (Woychik and Hampsey, 2002) og (Reese, 2003). "Core" promoteren defineres som den korteste DNA sekvensen som er nok for direkte initiering av transkripsjon med RNA polymerase II. Dette DNA området kan bestå av elementer som TATA boksen, initiator (Inr), TFIIB gjenkjennings element (BRE) og nedstrøms "core" promoter element (DPE), for mer informasjon om "core" promoteren og promoter elementene se (Butler and Kadonaga, 2002).

Spesifikke transkripsjonsfaktorer er sekvensspesifikke DNA bindende proteiner. Disse transkripsjonsfaktorene er spesifikke for bestemte gener eller genfamilier og er funksjonelt aktive i transkripsjonell aktivering eller represjon. De inneholder minimum 2 domener: et DNA bindingsdomene og et domene som kan aktivere transkripsjon. Disse transkripsjonsfaktorene ligger normalt inaktivert i cellene og aktiveres ved ekstracellulære signaler (Brivanlou and Darnell, 2002). De spesifikke transkripsjonsfaktorene regulerer transkripsjon hovedsakelig ved å rekruttere koaktivatorer og proteiner til RNA polymerase II komplekset.

I tillegg til disse faktorene inngår en rekke kofaktorer og kromatinremodelleringsfaktorer i transkripsjonsapparatet som er nødvendige for kommunikasjon mellom spesifikke transkripsjonsfaktorer og RNA polymerase II maskineriet. Disse transkripsjonelle kofaktorene kan inndeles i fem klasser: (1) Kofaktorer som er assosiert med elementer i komplekset som dannes på "core" promoteren. (2) Kofaktorer som binder sekvensspesifikke transkripsjonsfaktorer. (3) En gruppe av faktorer som er beslektet og inneholder store multi-subenheter. Noen interagerer med RNA polymerase II og eller aktivatorer, mens andre har enzymatisk funksjon. (4) Kromatinremodelleringsfaktorer som kovalent modifierer nukleosomer som for eksempel HDAC-1. (5) Kromatinremodelleringsfaktorer som er ATP-avhengige. For mer detaljer om kofaktorer og kromatinremodelleringsfaktorer henvises til (Lemon and Tjian, 2000).

1.2 Posttranslasjonell modifisering

En annen faktor som er med på å øke kompleksiteten i den humane organismes proteom betraktelig er posttranslasjonell modifisering. Det er funnet over 300 forskjellige posttranslasjonelle modifiseringer (PTMs) (Clark et al., 2005). Noen eksempler på PTMs er proteolyse, fosforylering, acetylering, metylering, ubiquitinerings og sumoylering. PTMs forandrer proteiner fysiske karakteristikk avhengig av hvilken modifikasjon som skjer med det enkelte protein, og forhold som størrelse, ladning, struktur og proteinets konformasjon. Som følge av disse forandringene kan proteiners kjemiske egenskaper forandres som f.eks. enzymaktivitet, bindingsaffinitet, og et proteins hydrofobisitet. PTMs kan også indirekte forandre et proteins funksjon, ved at en gitt PTM forandrer proteinets subcellulære lokalisasjon, eller at proteinet blir merket for degradering via ubiquitinerings. PTMs av transkripsjonsfaktorer er en mekanisme som cellen benytter til å regulere transkripsjon, ved at PTM av en transkripsjonsfaktor kan føre til at transkripsjonsfaktorens transkripsjonelle aktivitet forandres.



Figur 1.1: Oversikt over forskjellige posttranslasjonelle modifiseringer. Proteiner kan for eksempel modifiseres via proteolyse, eller bli modifisert med andre proteiner. PTM resulterer i forandring av masse/ladning og konformasjon, og dette kan medføre forandringer i proteinets funksjon, interaksjon med andre proteiner, merking for degradering etc. (Clark et al., 2005).

1.3 **Small ubiquitin-like modifier (SUMO)**

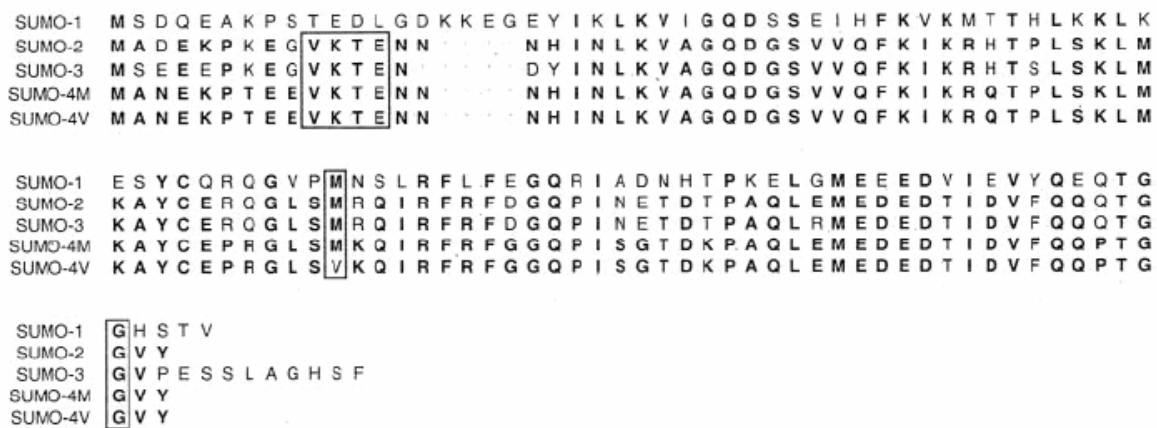
Hvis ikke annet er oppgitt er informasjonen i dette avsnittet hentet fra SUMO review artiklene til (Hay, 2005) og (Dohmen, 2004). Small ubiquitin-like modifiers (SUMO) er en familie av proteiner som strukturelt likner på ubiquitin, men som bare har ca. 20 % sekvenslikhet. SUMO protein familien har det til felles med ubiquitin at de konjugeres til andre proteiner posttranslasjonelt. Som for ubiquitin konjugeres SUMO til proteiner kovalent via isopeptid bindinger som dannes mellom det C-terminal glysin residuet på SUMO og ϵ -amino gruppen på lysin residue på target proteinet. Dette kalles gjerne sumoylering. Enzymene som er involvert i den reversible konjugeringen av SUMO, likner på enzymene som inngår i ubiquitinkonjugering. Siden SUMO ble oppdaget i 1996, hvor det ble funnet kovalent bundet til det GTPase aktiverende proteinet RanGAP1, har denne protein familien blitt viet mye forskning og oppmerksomhet fordi SUMO-konjugering har vist seg å ha viktige biologiske funksjoner og pga. SUMO familienes substratproteiner hvor en rekke sentrale biomedisinske proteiner inngår som f.eks. tumor supressoren p53, c-jun, PML og huntingtin (Gostissa et al., 1999) (Muller et al., 2000) (Steffan et al., 2004).

Posttranslasjonell modifisering som er beskrevet over er en mekanisme som celler benytter til å kontrollere proteiners funksjon ved å regulere deres aktivitet, subcellulær lokalisasjon, stabilitet eller deres interaksjon med andre proteiner. Posttranslasjonell proteinmodifisering er også viktig for å raskt kunne regulere proteinfunksjon som respons overfor forandringer i cellens tilstand eller ytre miljø. Ubiquitin-related protein modifiers (Ubls) blir posttranslasjonelt koblet til substratproteiner ved enzymatisk reaksjon tilsvarende som for ubiquitin konjugering. SUMO proteinfamilien er en undergruppe av Ubls. Selv om SUMO har mange likheter med ubiquitin når det kommer til struktur og mekanismen for konjugering, har det vist seg at SUMO-konjugering kan ha funksjoner som er vidt forskjellige fra ubiquitinering. De funksjonelle effektene av SUMO-konjugering blir beskrevet nærmere nedenfor.

1.3.1 **SUMO familien**

I gjær er det identifisert bare et gen i denne familien, nemlig SMT3 (Suppressor of Mif Two 3) som koder for SUMO homologen Smt3p. Fire forskjellige SUMO varianter har blitt detektert i mammalske celler, og de er gitt navn SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3 og SUMO-4.

SUMO-2 og SUMO-3 har nesten identisk sekvens og sees gjerne på som en egen subfamilie av SUMO proteiner, ofte kalt SUMO-2/3. SUMO-1 som har ca. 50 % sekvenslikhet med SUMO-2/3, ser ut til å være den SUMO varianten som oftest konjugeres til proteiner under normale forhold, mens SUMO-2/3 normalt blir konjugert til proteiner under stress. SUMO-4 som ble identifisert først i 2004 kodes for av en sekvens som ligger i et intron av det humane TAB2 gen. Uttrykket av dette genet er størst i nyre celler. SUMO-2, SUMO-3 og SUMO-4 deler et felles SUMO-konjugeringssete (markert i Figur 1.2), dette sete eksisterer ikke for SUMO-1. Et slikt sete gjør det mulig å videre konjugere SUMO til SUMO-2/-3 eller -4. Det har vist seg at SUMO-2, SUMO-3 og SUMO-4 kan danne poly-SUMO kjeder både in vitro og in vivo, noe SUMO-1 ikke kan.



Figur 1.2: Flersekvenssammenstilling med SUMO 1-4. Boksene i figuren viser følgende: VKTE motivet er sumoyleringssetene som finnes alle SUMO variantene unntatt SUMO-1. Den neste boksen viser aminosyren som er forskjellig mellom SUMO-4M og V. Den siste boksen omkranser det C-terminael glysinet som må eksponeres for å muliggjøre SUMO-konjugering til andre proteiner. (Bohren et al., 2004)

I modellplanten *Arabidopsis thaliana* er det funnet åtte ulike SUMO gener. I denne oppgaven benyttes utelukkende human SUMO-1 i forsøkene utført. Human SUMO-1 vil i oppgaven hovedsakelig omtales bare SUMO.

1.3.2 SUMO-konjugering

Analyser av en rekke SUMO target proteiner har ført til identifisering av en konsensussekvens på target proteinet hvor SUMO konjugeres. SUMO konjugeres til lysin residuer, og lysin residuet ligger i de fleste tilfeller i konsensussekvensen Ψ KXE, hvor Ψ er en alifatisk

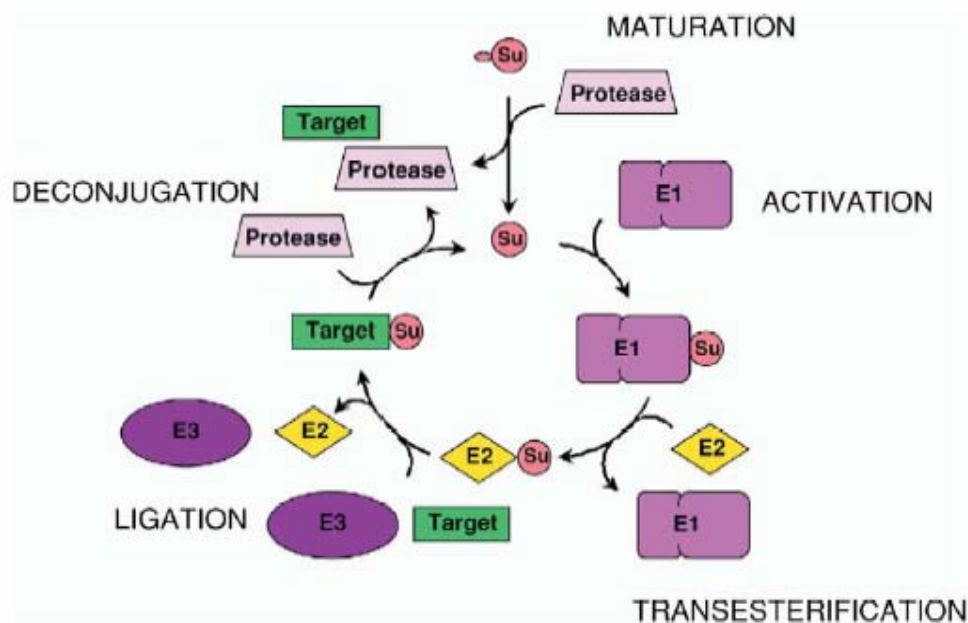
residue, normalt L,I eller V, og X kan være et hvilket som helst residue. Selv om de fleste substrat proteiner blir modifisert med SUMO innenfor denne konsensus sekvensen har det vist seg at enkelte SUMO substrat proteiner blir modifisert på lysin residuer hvor sekvensen rundt ikke stemmer overens med denne konsensus sekvensen. Det kan også nevnes at en rekke proteiner som inneholder denne konsensus sekvensen ikke blir modifisert med SUMO. Dette tyder på andre faktorer spiller inn, som subcellulær lokalisasjon og/eller lokalisasjon og tilgjengelighet av sekvensen på substrat proteinet.

Felles for alle Ubls er at de blir konjugert til target proteiner via tre ulike enzymer; Ubl aktiverende enzym (E1), Ubl konjugerende enzym (E2) og en Ubl protein ligase (E3). SUMO-konjugering involverer de samme enzymatiske trinnene, hvor det SUMO aktiverende enzymet (E1) er en heterodimer som består av subenhetene SAE1 og SAE2 (kjent som Aos1 og Uba2 i gjær).

SUMO blir syntetisert i en forløperform med en C-terminal ende som først må bli spaltet for å få det C-terminale glysin residuet eksponert. For å starte SUMO modifiseringsreaksjonen videre, katalyserer SAE1/SAE2 dannelsen av adenylert SUMO hvor den C-terminale karboksylgruppen av SUMO blir kovalent bundet til AMP. SUMO-AMP bindingen brytes så og det dannes et kovalent intermediat hvor den C-terminale karboksyl gruppen på SUMO danner en tioester binding med en sulphydryl gruppe på cystein residue i SAE2 (C173). I steg 2 av reaksjonen blir SUMO transesterifisert fra SAE2 til cystein 93 i SUMO-konjugerings enzymet Ubc9. En av egenskapene til Ubc9 som er forskjellig fra andre Ubls konjugeringsenzymer, er dets evne til å direkte gjenkjenne substrat proteiner. Ubc9-SUMO tioester kan dermed videre katalysere dannelsen av isopeptid binding mellom den C-terminale karboksylgruppen på SUMO og ϵ -amino av lysin på substratproteinet. I nærvær av bare Ubc9 og SAE1/2 kan SUMO bli konjugert til substrat inneholdende Ψ KXE sekvensen, men med unntak av RanGAP1 er SUMO-modifisering av substrat proteiner ineffektivt, og andre komponenter må rekrutteres for å få katalysert reaksjonen.

I ubiquitin systemet blir gjenkjenning av substrat protein katalysert av en familie av E3 protein ligaser. Oppdagelsen av proteiner som øker effektiviteten til SUMO-konjugering, har ført til identifisering av egne E3 enzymer for SUMO modifisering. Tre forskjellige typer SUMO E3 enzymer har blitt identifisert. Den første typen er Protein inhibitor of activated STAT (PIAS). PIAS enzymer binder direkte til Ubc9 og spesifikke SUMO targets.

Mammalske celler inneholder minst fem forskjellige PIAS proteiner, PIAS1, PIAS3, PIAS α , PIAS β og PIAS γ . PIAS proteinene lokaliseres hovedsakelig til cellekjernen. RanBP2 er en annen type SUMO E3 ligase og er lokalisert i det nukleære porekomplekset. RanBP2 bindes til Ubc9 men ikke til noen SUMO targets. Den siste kjente varianten av SUMO E3 ligase er Pc2 som er en komponent av polycomb protein komplekset. Pc2 har SUMO E3 ligase aktivitet for bla. korepressorene CtBP1 og CtBP2.



Figur 1.3: SUMO blir først gjort aktivt ved at det blir prosessert med en SUMO spesifikk protease som gjør det C-terminale glycin residuet tilgjengelig. Glycin residuet blir så aktivert av E1 enzym. Etter transesterifisering av SUMO over til E2 enzymet Ubc9 blir SUMO substrat valgt og SUMO blir ligert til substratet. SUMO kan bli dekonjugert ved hjelp av SUMO spesifikke proteaser (Hay, 2005).

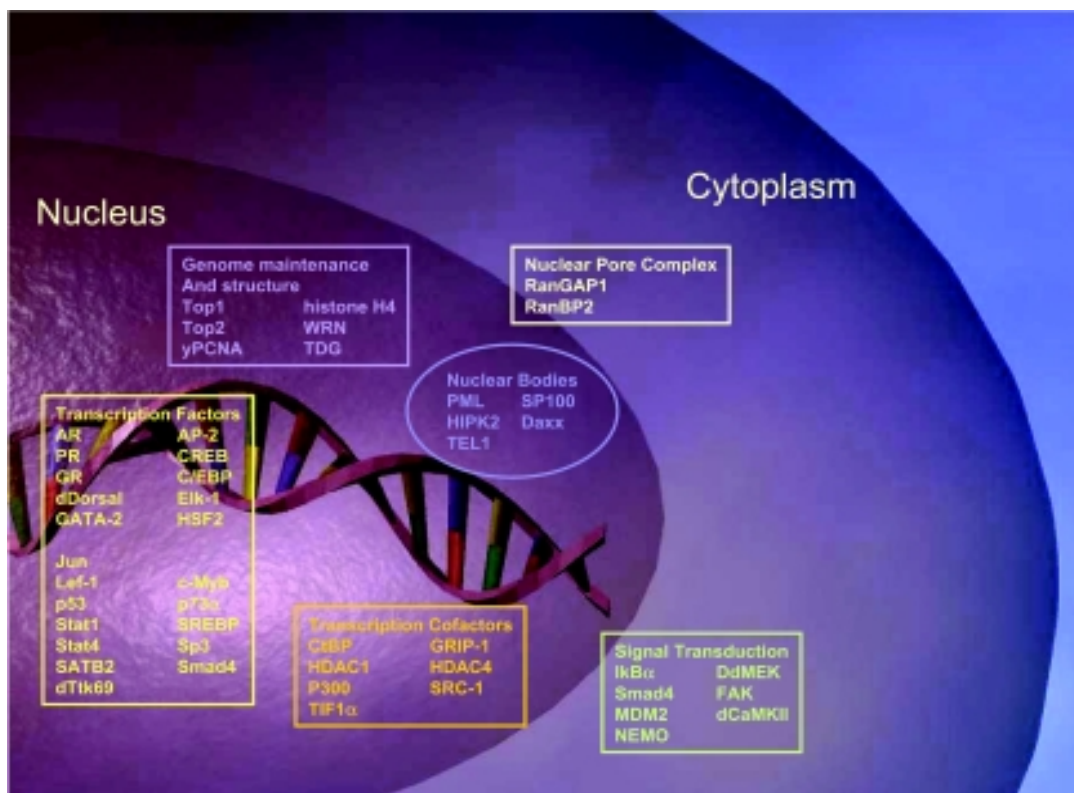
1.3.3 SUMO prosessering og dekonjugering

SUMO blir syntetisert i en forløper form med en C-terminal ende som først må bli prosessert for å få det C-terminale glysin residuet eksponert. Det er dette residuet som blir linket til lysin residuet på target proteiner. Tilsvarende som for ubiquitinsystemet blir dette steget utført av enzymer med to forskjellige funksjoner, enzymene opptrer både som proteaser på forløper varianten og som isopeptidaser. Isopeptidasefunksjonen er ansvarlig for SUMO dekonjugeringstrinnet i SUMO-konjugeringssyklusen (Figur 1.3). To "ubiquitin-like modifier proteaser", Ulp1 og Ulp2 har blitt påvist i *S. cerevisiae*, og har blitt funnet i nukleære porer og

i nukleoplasma. Seks forskjellige SUMO-spesifikke proteaser (SENPs) delt inn i tre forskjellige familier har blitt rapportert for mammalske systemer. Hver av disse SUMO proteasene ser ut til å ha distinkt subcellulær lokalisasjon. SENP1 er en nukleær protease som dekonjugerer en rekke for forskjellige sumoylerte proteiner (Gong et al., 2000). SENP2 er en protease assosiert med kjernemembranen og som overekspresert har en aktivitet som tilsvarer SENP1 (Gong et al., 2000). Det eksisterer også en spleiset isoform av mus SENP2 navngitt SuPr1 som forandrer lokalisasjonen av nukleær "potential oncogenic domains" (POD)-assosierte proteiner som CBP og Daxx. SENP3 og SENP4 tilhører en familie av nukleolære SENPs som har preferanse for SUMO2/3 (Gong and Yeh, 2006). Den tredje familien av SENP's består av SENP6 og SENP7, to nukleære proteaser med uklar funksjon.

1.3.4 Generelt om sumoylering

En rekke proteiner har vist seg å bli sumoylert, og SUMO-konjugeringen har vist seg å kunne gi forskjellige effekter avhengig av hvilket protein som blir modifisert. Sumoylering ser ut til å være viktig for celledyklusen. Det er for eksempel vist at mutasjoner i SUMO E1 og E2 i *S. cerevisiae* arresterer i celledyklus ved overgangen mellom G2/M (Johnson and Blobel, 1997).



Figur 1.4: Oversikt over en rekke forskjellige proteiner som er vist å bli modifisert med SUMO. (Cheng et al., 2006).

Det har også vist seg at komponenter som inngår i sumoyleringen er viktige for reparasjon av DNA. I *S.pombe* $Pmt3^{-/-}$ ($Pmt3$ er en SUMO homolog) er det vist at cellene bl.a. blir mer sensitive for DNA-skade induserende agens sammenliknet med normale $Pmt3$ celler (Tanaka et al., 1999).

Sumoylering ser også ut til å kunne være viktig for subcellulær transport. RanGAP1 som kan bli SUMO-konjugert, er for eksempel ikke konjugert til SUMO i cytoplasma mens det lokaliseres til cellekjernen når det er sumoylert (Joseph et al., 2002). Den transkripsjonelle korepressoren CtBP er normalt lokaliseres til cellekjernen, men ved å mutere SUMO-konjugeringssete lokaliseres CtBP til cytoplasma, og represjon av CtBP-avhengig transkripsjon opphører (Lin et al., 2003).

Proteiner kan som beskrevet tidligere bli med SUMO-konjugert på lysin residuer. Ved siden av å være konjugeringsseter for SUMO kan lysin residuer også modifiseres med andre UbIs, de kan også bli metylert og acetylert. Det er derfor en mulighet for at SUMO-konjugering kan blokkere andre lysin avhengige modifikasjoner som ubiquitinerings. Denne blokkeringen har blitt rapportert i flere tilfeller. Transkripsjonsfaktoren NF- κ B blir normalt holdt inaktiv i ustimulerte celler ved hjelp av I κ B inhibitor proteiner. Ved respons på aktiveringssignaler blir I κ B proteinene polyubiquitinert på lysin 21 og 22 og blir merket for proteasomal degradering. Dette fører til at NF- κ B proteinene blir frigjort i en aktiv form. Inhibitor proteinene I κ B som beveger seg mellom cytoplasma og cellekjernen kan også bli modifisert med SUMO på lysin 21 som blokkerer muligheten for ubiquitinerings og stabiliserer proteinet. Dette medfører at SUMO-konjugering av I κ B inhibitorproteiner inhiberer NF- κ Bavhengig transkripsjon (Desterro et al., 1998).

1.3.5 Sumoylering av transkripsjonsfaktorer

Et viktig prinsipp ved kontroll av genekspressjon er at transkripsjonsspesifisiteten styres gjennom dannelsen av unike kombinasjoner av transkripsjonsfaktorer på promotere. Disse transkripsjonsfaktorene rekrutterer så en rekke enzymer som er ansvarlig for kromatinremodellering og posttranslasjonell modifikasjon av histoner. Sumoylering av transkripsjonsfaktorer kan være en faktor som er med på å bestemme spesifisiteten av

kombinasjoner av transkripsjonsfaktorer på promotere og hvilke kromatinmodifiserende enzymer som blir rekruttert.

SUMO-konjugering av transkripsjonsfaktorer kan føre til aktivering av transkripsjon, men fører normalt til transkripsjonell represjon. Et eksempel på det første her er SUMO-konjugering av transkripsjonsfaktorene HSF1 og HSF2 som fører til økt DNA bindings aktivitet, og hvor mutasjon av konjugeringssetet førte til lavere HSF1 transkripsjonell aktivitet (Goodson et al., 2001), (Hong et al., 2001). De aller fleste SUMO-konjugeringssetene på transkripsjonsfaktorer blir imidlertid funnet i domener som tidligere har blitt vist å ha repressiv effekt på transkripsjon, og for de fleste transkripsjonsfaktorer som har blitt undersøkt har mutasjon av lysinresiduet på konjugeringssetet ført til aktivering av transkripsjon.

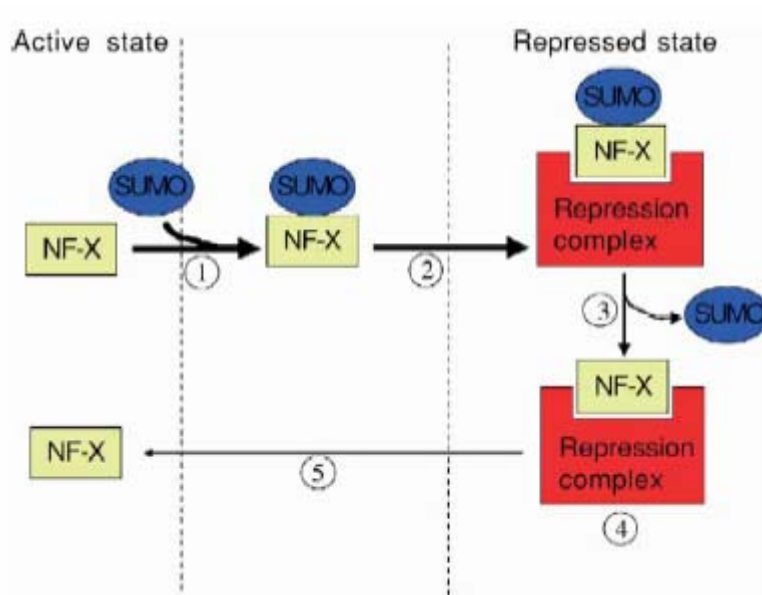
To forskjellige modeller kan forklare SUMO avhengig transkripsjonell represjon. Sumoylerte transkripsjonsfaktorer kan rekruttere korepressor molekyler til promotere og indusere forandringer i kromatin strukturer som er assosiert med represjon. Alternativt kan sumoylerte transkripsjonsfaktorer bli rekruttert til repressive områder i spesifikke subnukleære domener. Et eksempel på den første modellen har kommet fra et studie rundt den transkripsjonelle regulatoren p300. p300 avhengig transkripsjonell represjon viste seg å være avhengig av SUMO modifisering på to seter i p300. Domenet i p300 som inneholder SUMO konjugeringssetene viste seg å binde histon deacetylase 6 (HDAC6) når dette domenet var konjugert til SUMO-1 (Girdwood et al., 2003). p300-avhengig transkripsjonell represjon opphørte ved stimulering med histon deacetylase inhibitoren trichostatin A. For p300 fører SUMO-1 konjugering til rekruttering av HDAC til kromatin bundet p300. Rekrutteringen av HDAC'er medfører deacetylering av histoner, som gjennom en kjede av reaksjoner kan føre til forandringer i kromatin slik at det deacetylte området holdes transkripsjonelt repressivt.

En alternativ modell for å forklare den repressive effekten av SUMO på transkripsjonsfaktorer er at SUMO-konjugerte transkripsjonsfaktorer blir rekruttert til repressive miljøer i spesifikke subnukleære domener. Det best kjente domenet her er promyelocytic leukemia (PML) nuclear body (PML-NB's) (Zhong et al., 2000). I normale celler blir PML proteiner funnet i distinkte subnukleære punkter eller nuclear bodies (NB's). SUMO-konjugering ble satt i sammenheng med PML-NB's fordi både PML og en rekke PML-NB's komponenter som HIPK2, Daxx og Sp100 har vist seg å bli modifisert med SUMO (Duprez et al., 1999). Det har dermed blitt

foreslått at PML-NB's er områder for oppbevaring av sumoylerte substrater. Disse SUMO-konjugerte substratene kan så danne repressive komplekser inne i disse NB's. Dette betyr at en i utgangspunktet transkripsjonell aktiv faktor blir modifisert med SUMO, og pga. SUMO-konjugeringen blir fraktet inn i et repressivt miljø i kjernen hvor faktoren blir en del av et represjonskompleks. Det har også vist seg at SUMO-avhengig transkripsjonell represjon av p300, Sp100 og Elk-1 opphører ved tilsats av SUMO-spesifikke proteaser som SSP3/SuPr-1 (Girdwood et al., 2003) (Ross et al., 2002) (Yang et al., 2003). Dette bekrefter den repressive funksjonen SUMO-konjugering har på disse transkripsjonsfaktorene.

1.3.6 SUMO paradokset

I de fleste tilfeller er andelen av en spesifikk transkripsjonsfaktor som er SUMO-konjugert liten i forhold til den totale mengden av transkripsjonsfaktoren. Likevel ser det ut til at transkripsjonsfaktoren er maksimalt repressert. Mutasjon av konjugeringssetet fører som oftest til en langt større endring i aktivitet enn det den SUMO-konjugerte andelen av transkripsjonsfaktoren skulle tilsi (Dahle et al., 2003). En modell har blitt foreslått for å forklare disse observasjonene, hvor det antas at en transkripsjonsfaktor først blir konjugert til SUMO. SUMO-konjugeringen medfører at faktoren blir inkorporert i et represjonskompleks hvor det inngår faktorer som kan binde SUMO. I nærvær av SUMO-spesifikke proteaser vil SUMO kunne bli dekonjugert, men transkripsjonsfaktoren vil bli værende i represjonskomplekset uten å være SUMO-modifisert. I denne modellen kreves SUMO for å starte represjonen, men SUMO er her ikke nødvendig for å opprettholde represjonen. Kolokalisering av enzymer som er involvert i SUMO-konjugering og dekonjugering i cellekjernen tyder på at SUMO-konjugering og dekonjugering kan være del av en dynamisk prosess, hvor substrater blir raskt sumoylert for så å raskt bli dekonjugert igjen. En mulig forklaring på hvordan sumoylerte proteiner kan bli inkorporert i represjonskomplekser er at SUMO-konjugerte proteiner kan interagere med chaperoner som setter det sumoylerte proteinet inn i et stabilt kompleks. Når komplekset er satt sammen kan SUMO bli dekonjugert og det sumoylerte proteinet blir sittende inne i komplekset i en repressert tilstand. Denne modellen baserer seg dermed på at SUMO-konjugeringen rekrutterer andre faktorer som er med på å danne makromolekylkomplekser. I denne modellen fungerer SUMO som en "assembly factor" (Hay, 2004)



Figur 1.5: Modell for å forklare SUMO-avhengig transkripsjonell represjon. En transkripsjonsfaktor blir modifisert med SUMO(1) og inkorporert i et represjonskompleks (2) som blir satt sammen med SUMO-spesifikke faktorer (ikke vist på figuren). Når represjonskomplekset har blitt dannet dissosierer faktorene og SUMO kan dekonjugeres (3) ved hjelp av SUMO spesifikke proteaser. Transkripsjonsfaktoren holdes repressert uavhengig av SUMO (4). Dissosiering av komplekset kan skje sakte (5) gjennom cellens liv eller induisert av posttranslasjonell modifisering av komplekset (Hay, 2005).

1.4 *Myb-familien av transkripsjonsfaktorer*

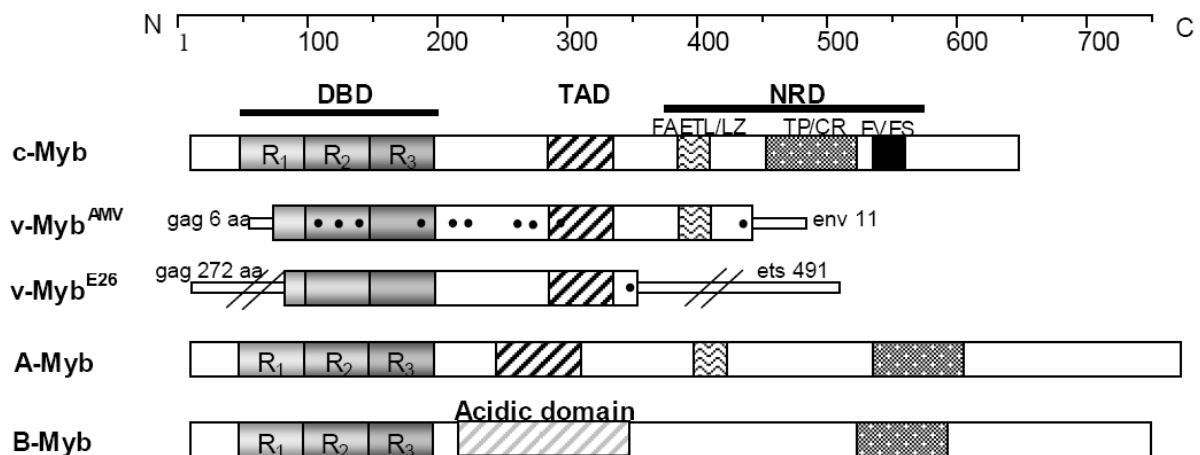
Informasjonen som er gitt i dette avsnittet som omhandler transkripsjonsfaktor familien Myb er hovedsaklig hentet fra oversiktsartiklene til (Oh and Reddy, 1999) og (Ness, 1996) hvis ikke annet er oppgitt. Transkripsjonsfaktorfamilien Myb har fått navnet sitt fra kreftformen Myeloblastisk leukemi. Myb ble først identifisert i kylling og da i form av *v-myb* som er et kylling onkogen som er ansvarlig for utviklingen av akutt myeloblastisk leukemi. To varianter av *v-myb* er karakterisert fra to forskjellige virus som begge er involvert i utviklingen av leukemi hos kylling, ”avian acute myeloblastosis virus” (AMV) og ”erythroleukemia virus” (E26). Produktet av onkogenet *v-myb*^{AMV} er et 45 kDa stort protein og *v-myb*^{E26} koder for et 135 kDa stort protein som er et Gag-Myb-Ets fusjonsprotein. Disse virusgenenes cellulære forløper ble senere identifisert som *c-myb* som er et proto-onkogen, produktet av *c-myb* er det 75 kDa store proteinet c-Myb.

Det er så langt ikke funnet bevis for at c-Myb opptrer som onkoprotein ved leukemi hos mennesker. c-Myb proteinet antas likevel å ha betydning for kreft hos mennesker siden ekspresjonsnivået av c-Myb er forandret både ved human leukemi og i andre typer kreftceller som f.eks. brystkreft, tykktarmskreft og kreft i bukspyttkjertelen (Ganter and Lipsick, 1999).

Alle proteinene i Myb-familien hos dyr er transkripsjonsfaktorer, dette vil si at de bindes til DNA og er med på å regulere genuttrykk. Proteinene i Myb-familien har en strukturell høy likhet. De har det felles at de inneholder et N-terminalt DNA bindingsdomene (DBD), et sentralt transaktiveringsdomene (TAD) og et C-terminalt regulatorisk domene. Felles for A-Myb og c-Myb er at det C-terminale domenet har en negativ regulatorisk effekt og er derfor navngitt negativt regulatorisk domene (NRD), mens det i B-Myb ser ut til å ha en positiv regulatorisk effekt og er navngitt (regulatorisk domene) RD. I vertebrater består Myb familien av tre paraloge gener som koder for 3 funksjonelt forskjellige Myb proteiner, hhv. A, B og c-Myb. A-Myb er hovedsakelig involvert i transkripsjonell aktivering. B-Myb er vist å spille en viktig rolle i celleproliferasjon, mens c-Myb normalt er en transkripsjonell aktivator involvert i regulering av proliferasjon, differensiering og apoptose av hematopoetiske celler. I denne oppgaven blir proteinet c-Myb benyttet i forsøkene.

Det translasjonelle produktet av humant *c-myb* er et 75 kDa stort kjerneprotein bestående av 640 aminosyrer som blir ekspressert i det meste av hematopoetisk vev. *A-myb* og *B-myb*

koder for proteiner som er hhv. 95 kDa og 93kDa store og som består av 751 og 704 aminosyrer. Det finnes også en spleisevariant av *c-myb* med et ekstra ekson lokalisert mellom ekson 9 og 10. Dette eksonet kalles 9A og gir et større c-Myb protein (89kDa) med 121 ekstra aminosyrer. Dette alternative c-Myb proteinet utgjør kun en liten del av den totale mengde c-Myb i undersøkte celler. Varianter som likner på ekson 9A produktet er funnet både i A-Myb og B-myb, men ikke i AMV og E26 Myb-proteinet.



Figur 1.6: Oversikt over de forskjellige Myb variantene i vertebrater. A-, B- og c-Myb i tillegg til virus Myb-proteinene v-Myb^{AMV} og v-Myb^{E26}. Punktmutasjoner i v-Myb er markert med svarte punkter. Talllinjen viser aminosyrelengde og posisjoner fra N- til C-terminal ende (Berge, 2003).

Mybs N-terminale del består av tre repetisjoner navngitt R1, R2, R3. Disse repetisjonene danner Mybs DNA bindende domene (DBD). Hver av disse repetisjonene består av 51-53 aminosyrer. R2 og R3 har vist seg å være tilstrekkelig for sekvensspesifikk binding av Myb til DNA. Selv om R1 ikke er nødvendig for binding til DNA, kan det se ut til at R1 øker Mybs affinitet til DNA og har en stabiliserende effekt på protein-DNA komplekset (Dini and Lipsick, 1993; Ording et al., 1994; Tanikawa et al., 1993). R1 er deletert i de onkogene formene av Myb, men er høyt konservert i de normale Myb variantene. Strukturelt foldes hvert av de tre repetisjonsdomene i tre helikser der andre og det tredje heliks i hvert domene danner en heliks-turn-heliks struktur (Gabrielsen et al., 1991). Den siste heliksen i hver av disse domene danner spesifikk kontakt med DNA, og denne strukturen er høyt konservert gjennom evolusjonen.

Transaktiveringsdomenet (TAD) til Myb ble først identifisert i kylling c- og v-Myb (Sakura et al., 1989; Weston and Bishop, 1989). Dette domenet ligger C-terminalt for DBD-domenet i c-

Myb og er lokalisert sentralt i proteinet. Domenet inneholder en region med høyt innhold av sure aminosyrer og regionen er hydrofil som er typisk for transaktiveringsdomener funnet hos andre transkripsjonsfaktorer. Denne regionen er meget høyt konserverte mellom A- og c-Myb. B-Myb har også et surt transaktiveringsdomene, men dette domenet har liten sekvenslikhet med A- og c-Mybs TAD.

Det negative regulatoriske domenet (NRD) som er lokalisert C-terminalt i c-Myb har fått sitt navn etter den negative effekten dette domenet har på c-Myb avhengig transkripsjon.

Tidligere har det blitt vist at trunkerte versjoner av c-Myb som ikke inneholder NRD fører til økt transkripsjonell aktivisering av reporter gener inneholdende Myb-bindingssteder. Domenet inneholder flere subdomener som kan hemme transaktivering uavhengig av hverandre. De forskjellige domeneene er et leucinrikt domene inneholdende et FAETL motiv, et høyt konserverte Treonin og Prolin-rik region (TP domenet) og et EVES domenet. Mutering av de forskjellige domeneene uavhengig av hverandre kan øke den transkripsjonelle aktiviteten til c-Myb.

Det leucinrike domenet FAETL inneholder et område med et leucin zipper lignende motiv. Det er ikke fastslått sikkert hvordan dette leucinrike området er med på regulere c-Myb negativt, men en mulighet er dannelsen av Myb-Myb dimere som ikke kan binde DNA (Nomura et al., 1993). En annen mulighet er at leuzin zipper motiver er involvert i protein-protein interaksjoner som inhiberer c-Myb funksjonelt. Det har tidligere blitt vist at en intakt leucin zipper struktur ikke er nødvendig for å opprettholde en negativ regulering av c-Myb, men at en sekvens inneholdende de 10 aminosyrene EFAETLQLID er tilstrekkelig for negativ regulering. Dette er også grunnen til at domenet er blitt navngitt FAETL (Fu and Lipsick, 1996).

C-terminalt for FAETL i NRD ligger det et serin-, treonin- og prolin rikt området. Dette domenet er det høyest konserverte området etter DBD i Myb og inneholder den konserverte sekvensen TPTPFK som er funnet i alle vertebrate A-, B- og c-Myb proteiner. Området ser ut til å ha en rolle i negativ regulering av Myb, men utover det vet man lite om funksjonen til domenet. Imidlertid er det vist at mange av residuene rundt TPTPFK sekvensen kan bli acetyleret, og at acetylering av c-Myb generelt fører til en økning i transkripsjonell aktivitet (Sano and Ishii, 2001; Tomita et al., 2000).

Et tredje subdomene i NRD som ser ut til å ha en rolle i negativ regulering av Myb og som ligger C-terminalt for TP er EVES domenet. Dette domenet er funnet konservert i alle vertebrate c-Myb proteiner og inneholder et fosforyleringssete som er vist å være involvert i negativ regulering av c-Myb, domenet forekommer ikke i A- og B-Myb proteiner. Det har tidligere blitt indikert gjennom *in vitro* bindingsstudier, at EVES kan interagere med c-Mybs DBD, slik at proteinet foldes tilbake og dermed hemmer aktiviteten til c-Myb (Dash et al., 1996). Denne "foldback" teorien er fortsatt kontroversiell. EVES domenet inneholder også to sumoyleringsseter (I₅₀₂KQE og I₅₂₆KQE) hvor SUMO kan bindes kovalent til c-Myb på to lysinresiduer. Det er effekten av konjugering mellom SUMO og c-Myb som blir studert i denne oppgaven. Mutasjon av sumoyleringssetene har tidligere blitt vist å gi økning i c-Myb avhengig transkripsjon (Dahle et al., 2003)

1.4.1 Uttrykk av c-Myb og c-Mybs funksjoner

Den regulatoriske transkripsjonsfaktoren c-Myb blir uttrykt høyt i immature hematopoetiske (bloddannende) celler, og det er tidligere vist at c-Myb er involvert i proliferasjon, differensiering og apoptose av hematopoetiske celler. Ved terminal differensiering av cellene blir c-Myb nedregulert. Blodceller blir utviklet fra stamceller i benmargen. I T-celle systemet utvikles cellene i tymus. Stamceller har den spesielle egenskapen at de kan foreta en celledeling hvor en dattercelle forblir stamcelle, mens den andre cellen differensierer, dette kalles asymmetrisk celledeling. Under differensiering blir cellene gradvis mer spesialisert, og denne spesialiseringen blir styrt av vekstfaktorer som aktiverer et nettverk av ulike faktorer. En slik faktor er c-Myb, og c-Myb har vist seg å være viktig for dannelsen og modning av blodceller (Ganter and Lipsick, 1999). c-Myb ser ut til å være viktig for opprettholdelsen av stamcellestadiet for blodcellene, og overuttrykk av c-Myb har vist seg å blokkere differensiering av forskjellige hematopoetiske cellelinjer (Clarke et al., 1988; Todokoro et al., 1988).

Det har også vist seg at c-Myb ikke bare spiller en viktig rolle ved differensiering av hematopoetiske celler, men også er en viktig faktor ved cellesykluskontroll og da spesifikt ved overgang til S-fase hvor tilstedeværelsen av c-Myb er kritisk. Homozygote *c-myb* null mus har tidligere blitt vist å utvikles normalt til dag 13 i fosterutviklingen, for så å dø ved dag 15 pga. av defekt hematopoiesis (Mucenski et al., 1991).

c-Myb aktivitet har gjennom nyere forskning vist seg å være nødvendig ved tre spesifikke stadier av utviklingen av T celler (Bender et al., 2004). For B-celle utvikling har det blitt vist at mangel på c-Myb aktivitet fører til delvis blokkering av B-celle utvikling i overgangen mellom pro-B og pre-B celler (Thomas et al., 2005).

c-Myb har i tillegg vist seg å kunne beskytte celler mot apoptose. Dette gjennom å regulere uttrykk av *Bcl-2* som tidligere er kjent som en beskyttende faktor mot apoptose (Frampton et al., 1996; Taylor et al., 1996). Overekspressjon av c-Myb har også vist å beskytte CTLL-2 celler mot apoptose (Salomoni et al., 1997), mens det i noen myeloide cellelinjer har blitt observert det motsatte (Bies et al., 1995; Sala et al., 1996; Selvakumaran et al., 1994).

1.4.2 c-Myb som regulator av transkripsjon

Som beskrevet i avsnittet over har mengden av c-Myb en effekt på vekst og differensiering av hematopoetiske celler. c-Mybs egen aktivitet blir regulert ved flere forskjellige måter, c-Myb proteinet interagerer med andre proteiner og det kan bli posttranslasjonelt modifisert. Disse interaksjonene og modifiseringene kan alene eller i kombinasjoner være med på å bestemme c-Mybs funksjon, som DNA-binding, protein stabilitet, subnukleær lokalisering og transkripsjonell aktivitet. En spesifikk modifikasjon kan for eksempel endre konformasjonen av proteinet slik at noen domener blir tilgjengelig for interaksjon, mens en annen modifikasjon gjør domenet utilgjengelig (Ganter and Lipsick, 1999).

Flere forskjellige molekylære modifiseringer av c-Myb har hittil blitt rapportert, som fosforylering, redox regulering, acetylering, ubiquinering og sumoylering. c-Myb har vist seg å bli fosforylert N-terminalt med casein kinase 2 (CK2) både *in vitro* og *in vivo* (Luscher et al., 1990). For c-Myb varianter som mangler NRD kan CK2 øke proteinets DNA bindingsegenskaper (Ramsay et al., 1995), mens *in vitro* forsøk har vist at CK2 ikke har effekt på DNA-bindingsegenskapene til DNA bindingsdomene isolert. Dette kan tyde på at reguleringen av aktiviteten til c-Myb som skjer via fosforylering med CK2 skyldes interaksjoner mellom DBD og andre deler av proteinet. Ser116 i c-Mybs DBD kan også bli fosforylert av syklisk AMP-avhengig protein kinase A (PKA). Denne modifisering har vist seg å inhibere c-Mybs DNA binding *in vitro* og motvirker c-Myb avhengig aktivering av kromosomale target gener (Andersson et al., 2003). C-terminalt i c-Myb er det også funnet

fosforyleringssteder. Det er tidligere blitt vist at hyperfosforylering av NRD i c-Myb kan merke proteinet for degradering via ubiquitinering (Bies et al., 2001).

c-Myb kan også modifiseres ved oksidasjon av Cys130 i R2 i DBD, og oksidasjon av dette residuet har vist seg å redusere c-Mybs DNA binding *in vitro* (Brendeford et al., 1997; Guehmann et al., 1992; Myrset et al., 1993).

c-Myb kan også bli acetylert på flere forskjellige lysinresiduer lokalisert C-terminalt på proteinet av koaktivator proteinene p300 og CBP (Sano and Ishii, 2001; Tomita et al., 2000). En hypotese er at acetylering av c-Myb med CBP fører til sterkere binding mellom c-Myb og CPB (Sano and Ishii, 2001). NRD domenet av c-Myb kan også bli ubiquitinert. c-Myb merket med ubiquitin blir raskt degradert (Bies and Wolff, 1997; Feikova et al., 2000).

c-Myb har vist seg å bli sumoylert på to forskjellige lysin residuer (K503, K527) lokalisert i EVES området av NRD (Bies et al., 2002), hvor begge lysin residuene er lokalisert på sekvenser som stemmer over ens med den tidligere viste generelle SUMO konsensus sekvensen ψ KXE. Mutanter av c-Myb hvor disse lysin residuene er mutert gir en kraftig økning i c-Myb avhengig transkripsjon (Bies et al., 2002; Dahle et al., 2003). Mekanismene for sumoyleringen er forklart i SUMO delen av introduksjon, men det kan nevnes at c-Myb interagerer med SUMO E2 ligasen Ubc9 (Dahle et al., 2003). Den eneste kjente SUMO E3 ligasen for c-Myb foreløpig er PIASy.

1.4.3 c-Mybs målgener

En rekke gener har de siste årene vist seg å bli regulert av c-Myb. I dette prosjektet har ikke undertegnede jobbet direkte med problemstillinger rundt Mybs målgener, men noen er blitt brukt som promotere i reporteraktiveringsassay. Dette avsnittet vil derfor bare kort belyse enkelte målgener som er blitt rapportert for c-Myb med vekt på de som er benyttet i oppgaven.

mim-1

Det første identifiserte Myb målgenet som ble funnet er *mim-1*. *mim-1* er sett på som et viktig Myb målgen bl.a. fordi det har vist seg at *mim-1* ekspresjon blir deregulert av den onkogene transkripsjonsfaktoren v-Myb i myelomonocytiske celler (Chayka et al., 2005).

Geneproduktet har forskjellige funksjoner, bl.a. acetyltransferase aktivitet (Allen and Hebbes, 2003).

Bcl2

c-Myb har vist seg å regulere *Bcl-2* uttrykk, og således beskytte celler mot apoptose (Frampton et al., 1996; Taylor et al., 1996).

Rag2

c-Myb har vist seg å være viktig for T-celle utvikling, ved at *Rag2* genet kan reguleres av c-Myb i T-celler (Wang et al., 2000). *RAG2* genet koder for en komponent av V(J)D rekombinase, som er nødvendig for dannelsen av antigen reseptorer i B- og T-lymfosyter. En rekke andre gener involvert i T-celle utviklingen har blitt rapportert å være Myb responsive, som CD4, TCR δ og γ .

TRHR

Thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor (*TRHR*) har en viktig rolle i hypofyse forlappen, hvor den kontrollerer syntese og sekresjon av hormonene TSH (thyroid-stimulating hormone) og prolaktin. *TRHR* er funnet både i sentralnervet systemet samt i tymus. *TRHR* promoteren inneholder 11 mulige c-Myb responselementer (MRE), og den viser god respons i transfeksjonsassay. Analyse av Myb binding til de mulige responselementer viste at særlig ett sete spiller en viktig rolle for aktivering. (se figur 2.2, metodedelen) (Matre et al., 2003).

MYC

Det har blitt vist at c-Myb kan regulere promoteren til endogen, kromosomal *MYC* (Schmidt et al., 2000). c-Myc er en transkripsjonsfaktor som er en viktig regulator for proliferasjon. Det har vist seg at overekspressjon av *MYC*-gener kan føre til at proliferasjon kan komme ut av kontroll og føre til mange av aspektene som sees ved tumor celle fenotyper. c-Myc proteinet regulerer et stort antall mammalske gener gjennom å rekruttere histon modifierende og kromatin remodellerende enzymer. Gener som reguleres av c-Myc er blant annet gener som er involvert i celledyklus regulering og protein biosyntese (Adhikary and Eilers, 2005).

2 Metodikk

2.1 DNA Metoder

Å klonere menes her flytting av DNA fragmenter mellom plasmider, og videre transformasjon av plasmidet inn i bakterieceller slik at DNAet replikeres sammen med bakteriens eget kromosomale DNA. Dermed kan man preparere opp store mengder av et spesifikt plasmid.

2.1.1 Isolering av plasmid DNA

Det ble benyttet kommersielle kit både for isolering i liten og større skala. "GFX™ Micro Plasmid Prep Kit" fra Amersham Biosciences ble benyttet for isolering fra 3 ml bakteriekultur (miniprep). For isolering i større skala (200 ml) ble "Genopure Plasmid Maxi Kit" fra Roche applied sciences benyttet (maxiprep).

De to kitene baserer seg på samme teknikk. Cellene gjennomgår alkalisk lysing i nærvær av EDTA og RNaseI etterfulgt av denaturering av proteiner og kromosomalt DNA. Cellelysate blir så satt på en kolonne med glassfibermatrix med affinitet for DNA og vaskes. DNAet elueres deretter i en buffer med lav ionestyrke, i denne oppgaven har TE-buffer blitt benyttet. Se protokoll som følger med kitene for en mer detaljert beskrivelse.

2.1.2 DNA konsentrasjonsmålinger

For å bestemme DNA konsentrasjon manuelt kan man måle OD ved 260 nm og benytte følgende formel når en bruker en kuvette på 1 cm.

$$\text{DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{Absorbans } (\text{OD}_{260}) \times 0,050 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times \text{fortynningsfaktor}$$

Ved å måle ratioen av absorbans: A_{260}/A_{280} kan man sjekke renheten av prøven, ratioen bør ligge mellom 1,8 og 2,0.

I denne oppgaven ble måling av DNA-konsentrasjon med NanoDrop som måler OD ved 260 nm og gir DNA konsentrasjonen direkte.

2.1.3 Rensing av plasmid

For å rense plasmidene fra gel ble det kommersielle kitet "GFX™ PCR DNA and Gel Band purification kit" fra Amersham Biosciences benyttet. En buffer som løser opp agarosen tilsettes først. DNAet bindes så til glassfibrermatrix med stor affinitet for DNA. DNAet elueres så med en buffer med lav saltkonsentrasjon eller vann. Se protokoll som følger med kitet for detaljert protokoll.

2.1.4 Restriksjonskutting

Restriksjonskutting baserer seg på at bestemte enzymer gjenkjenner og kutter DNA ved spesifikke DNA sekvenser. Det er viktig at enzymene får virke under optimale betingelser for å få en effektiv og fullstendig kutting. Betingelsene som innvirker er saltkonsentrasjon, DNA konsentrasjon, BSA konsentrasjon, enzymmengde, temperatur og reaksjonstid. Enzymene kan vanligvis inaktiveres ved høy temperatur eller ved å tilsette en løsning med EDTA som for eksempel agarose gelelektroforese loading buffer. EDTA vil inaktivere enzymet. Se protokoll (New England Biolabs, 2004) for nærmere informasjon om optimale betingelser for de enkelte enzymene. For mer informasjon om restriksjonskutting, se (Maniatis et al., 1989).

2.1.5 Ligering

DNA fragmenter kuttet med restriksjonsenzymmer kan limes sammen ved hjelp av en ligase. Ligasen som ble benyttet i oppgaven er bakteriofag T4 DNA ligase fra New England Biolabs. Ligasen katalyserer dannelsen av fosfordiesterbinding mellom nærliggende 3'-hydroksyl og 5'-fosfat ender i DNA og kan koble både butte og overhengende ender sammen. Prinsipp og prosedyre er beskrevet i (Maniatis et al., 1989).

2.1.6 Motseleksjon av religert vektor

I noen tilfeller kan det oppstå problemer med religering av vektoren ved ligering. For å hindre religering av vektoren kan det tilsettes et restriksjonsenzym som bare kutter i vektoren og ikke

i ligeringsproduktet. Religert vektor vil da bli ødelagt og vil ikke kunne replikeres med bakteriens DNA.

2.1.7 Agarose gelelektroforese

DNA fragmenter kan separeres, identifiseres og renses ved hjelp av agarose gelelektroforese. Metoden baserer seg på at ladede molekyler (i dette tilfellet DNA som er negativt ladet) vil vandre i et elektrisk felt. DNAet i gelen kan visualiseres ved å tilsette etidiumbromid (EtBr) i agarosegelen. EtBr vil interkalere mellom basene i dobbeltrådet DNA slik at DNA kan detekteres i UV lys. Se (Maniatis et al., 1989) for protokoll.

2.1.8 Transformasjon av kompetente DH5α

DH5α er en *E.coli* stamme som kan benyttes til å amplifisere opp plasmider. Dette ble gjort etter ligering av plasmider og ved bl.a. maxiprep. Den nye vektoren blir kopiert opp for å kunne benyttes videre og for å kunne verifiseres. Vektoren transformeres først inn i bakteriecellen. For at cellene skal kunne ta opp plasmid må de først gjøres kompetente. Dette gjøres ved at de behandles med kalsiumklorid etterfulgt av dimetylsulfoksid. Frysekompetente celler oppbevares ved -70 °C. Fremgangsmåten for å gjøre DH5α celler kompetente er beskrevet i (Inoue et al., 1990). Prosedyren for transformasjon av plasmid DNA er beskrevet (Maniatis et al., 1989). Celler som har tatt opp plasmid selekteres på LB skåler tilsatt antibiotika. Fordi plasmidet inneholder resistensen for et spesifikt antibiotikum, i denne oppgaven ampicillin, vil bare celler som har tatt opp plasmidet overleve.

2.1.9 Stamkulturer

Stamkulturer er bakteriekulturer tilsatt glyserol slik at de kan lagres ved -70 °C. For prosedyre se (Maniatis et al., 1989).

2.1.10 Sekvensering

Alle plasmidprodukter hvor PCR har inngått ble verifisert ved sekvensering. Sekvenseringen ble foretatt ved UiO, institutt for molekylærbiovitenskap (MegaBace-laben).

Sekevenseringsmetoden som benyttes bygger på kjedetermineringsmetoden som ble utviklet

av (Sanger et al., 1977). Denne metoden baserer seg på kontrollert syntese av DNA med DNA polermase I. Ved å benytte dNTP sammen med en liten mengde kjedetermineringsnukleotider ddNTP (dideoksynukleosid trifosfat) fåes det fragmenter som stopper langs ulike punkter på templatet pga av at ddNTP noen ganger vil inkorporeres istedenfor dNTP. ddNTP vil fordi de ikke inneholder 3'-OH- ende, føre til at DNA syntesen stopper. Fragmentene separeres ved polyakrylamid gelelektroforese.

I moderne sekvenseringsverktøy gjøres sekvenseringen automatisert, ved at hver av de fire forskjellige ddNTP'ene merkes med forskjellig fluorescense. Båndene som dannes på gelen blir registrert av en detektor og videre overført til en PC. (Brown, 1999).

2.1.11 PCR

"Polymerase chain reaction" er en metode som brukes til å kopiere opp små områder av DNA som ligger mellom to områder med kjent sekvens. To oligonukleotider blir brukt som primere for en serie av syntetiske reaksjoner som blir katalysert av DNA polymerase. Templat DNA blir først denaturert ved oppvarming (94 °C) i nærvær av et stort overskudd av de to oligonukleotidene, de fire dNTP'ene og DNA polymerase. Ved denaureringen skilles de to DNA trådene fra hverandre. Reaksjonsblandingen avkjøles så slik at oligonukleotidene kan feste seg "anneales" til sine komplementære sekvenser på DNA templatet. Reaksjonsblanding varmes så opp til 72 °C hvor de annealede primererne blir forlenget av DNA polymerase som katalysator, slik at segmentet mellom primerne blir fylt ut. Dette fører til at en får en dobling av mengden DNA for hver gang denne prosessen gjentas. Prosessen gjentas et antall ganger til man har ønsket DNA mengde, ca. 25 sykluser. I denne oppgaven ble VENT DNA polymerase benyttet i PCR-reaksjonen. Se (Maniatis et al., 1989) for detaljer.

2.2 Cellelab/mammalske celler

Siden mammalske cellelinjer er mer fysiologisk relevant enn bakterieceller for uttrykking av humane proteiner, ble det i denne oppgaven benyttet mammalske cellelinjer til uttrykking av proteiner. Cellelinjen CV1 samt cellelinjen HeLa ble benyttet. Cellelinjene CV-1 ble brukt til transfeksjon, westernimmunoblotting og reportaktiveringsassay. Til immunofluorescence og konfokalmikroskopi analysedelen, utført av Anne Hege Alm-Kristiansen ble det benyttet HeLa celler og CV1-celler.

2.2.1 Beskrivelse av cellelinjen

CV1 cellelinjen ble utviklet fra nyren til en voksen hann av afrikansk grønn ape i 1964. Cellelinjen er adherent, det vil si at cellene fester seg til skålen de dyrkes i. Cellene dyrkes i Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) medium tilsatt 4,5 g/L glukose, 1 % L-glutamin, 1 % antibiotika (penicillin og streptomycin) og 10 % fetalt bovint serum (FBS). Ved å fortynne cellene ca. 3 x pr. uke i et forhold 1:5 – 1:10 oppnår cellene optimal tetthet. Siden cellene er adherente må de løses fra skålen før de kan splittes, dette gjøres ved at cellene trypsineres (se neste kapittel). Lysat fra transfekterte CV-1 celler ble benyttet både til Westernimmunoblot analyser (se kapittel 4.2) og til reporteraktiveringsassay (se kapittel 4.3).

HeLa cellelinjen er opprinnelig tatt fra livmorhalsen til en 31 år gammel kreftsyk kvinne. Cellelinjen er adherent. Cellene håndteres på samme måte som CV1. HeLa cellelinjen ble benyttet i immunofluorescence og konfokalmikroskopi forsøkene (se kapittel 4.4).

2.2.2 Fortynninger

Splitting av adherente celler som har blitt benyttet i denne oppgaven krever at cellene først løsnes fra skålen.

1. Gammelt medium fjernes ved pipette/uthelling
2. Cellene vaskes med 5ml 1 × PBS to ganger.
3. Det tilsettes 2,5 ml trypsin og cellene inkuberes ved 37 °C i 2-3 minutter i en CO₂ inkubator.

4. Cellene sees på i lysmikroskop, hvis ikke alle cellene har løsnet kan man dunke lett på flasken.
5. 7,5 ml ferskt medium tilsettes, og cellene resuspenderes ved pippetering.
6. En del overføres til en ny skål og det fylles opp med ferskt medium. (Fortynning mellom 1:5-1:10).
7. Hvis et bestemt antall celler skal såes ut, som for eksempel til transfeksjon, kan cellene telles i et tellekammer under mikroskop. Appliser 2 dråper celleduspensjon på et Improved Neubauer tellekammer. Tell celler i lysmikroskop (tell minst 100 celler eller minst 4 hovedruter). Konsentrasjonen av celler regnes da ut etter følgende formel.

$$\text{Antall celler/ant. hovedruter} = \text{antall celler} \times 10^4.$$

2.2.3 Transfeksjon

Transfeksjon er en metode som benyttes til å få DNA inn i mammalske celler. For å kunne få proteinet en ønsker uttrykt, må genet som koder for proteinet man ønsker å uttrykke være klonet inn i en vektor med promotor for ekspresjon i mammalske celler. I denne oppgaven ble pCIneo fra Promega benyttet som ekspresjonsvektor. pCIneo vektoren inneholder CMV (cytomegalovirus) promotor for konstitutiv uttrykking i mammalske celler og et resistensgen for kloning i *E.coli* (Se vedlegg 5 for plasmidkart).

Transfeksjonene ble utført med Fugene 6 Transfection reagent (Roche). Mekanismen er ikke kjent i detalj, men baserer seg på at et lipidbasert reagens pakker DNA inn i micellelignende strukturer som diffunderer gjennom membraner. Protokoll følger med kitet.

I denne oppgaven ble det benyttet både 6 brønners brett og 24 brønners brett. Brønnene i et 6 brønners brett har ca. 5 ganger arealet til brønnene i et 24 brønners brett. Prosedyren optimaliseres for hver celletype.

Transfeksjon av CV1 celler med Fugene (6 brønners brett):

1. Dag 1: $1,2 \times 10^5$ celler såes ut pr. brønn med totalvolum 2 ml.
2. Dag 2: Det lages ferdig løsninger av 3 μg total DNA i konsentrasjon 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

3. Transfeksjonsmix lages av 94 μl DMEM uten FBS og antibiotika sammen med 6 μl Fugene pr. transfeksjon. Inkuber i romtemperatur i 5 min.
4. Det pippeteres ut $3 \times 100 \mu\text{l}$ mastermix i eppendorfrør.
5. DNA-løsningen tilsettes dråpevis til utpippetert transfeksjonsmix og det tappes forsiktig på løsningen.
6. Inkuberes i 15 min ved romtemperatur.
7. DMEM/Fugene/DNA miksen tilsettes forsiktig til hver enkelt brønn med celler.
8. Cellene inkuberes i CO_2 -inkubator ved 37°C i 24 timer.

Transfeksjon av CV1 celler med Fugene (24 brønners brett)

1. Dag 1: $0,2 \times 10^5$ celler såes ut pr. brønn med totalvolum 0,5 ml.
2. Dag 2: Det lages ferdig løsninger av 0,75 μg Total DNA i konsentrasjon 0,10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
3. Transfeksjonsmix lages av 98,5 μl DMEM uten FBS og antibiotika sammen med 6 μl Fugene pr. transfeksjon. Inkuber i romtemperatur i 5 min.
4. Pippeterer ut $3 \times 100 \mu\text{l}$ mastermix i eppendorfrør.
5. DNA-løsningen tilsettes dråpevis til utpippetert transfeksjonsmix og det tappes forsiktig på løsningen.
6. Inkuberes i 15 min ved romtemperatur.
7. DMEM/Fugene/DNA miksen tilsettes forsiktig til hver enkelt brønn med celler.
8. Cellene inkuberes i CO_2 -inkubator ved 37°C i 24 timer.

Høsting av celler:

Lysering av celler for bruk til reporteraktiveringsassay 6 brønners brett.

1. Cellene inspiseres i mikroskop.
2. Mediumet i brønnene suges av.
3. Brønnene skylles 2 ganger med $1 \times \text{PBS}$ (phosphate buffered saline).
4. Det tilsettes 300 μl lyseringsbuffer pr brønn.
5. Cellene inkuberes 10 min på vippbrett ved romtemperatur.

6. Cellelysate overføres til eppendorfrør, spennes ned ved 16000 rcf i 2 min og benyttes videre til reporteraktiveringsassay direkte (Kapittel 2.3.3).

Lysering av celler for bruk til Reporteraktiveringsassay 24 brønners brett.

1. Cellene inspiseres i mikroskop.
2. Mediumet i brønnene suges av.
3. Brønnene skylles 2 ganger med $1 \times$ PBS.
4. Det tilsettes 80 μ l lyseringsbuffer pr. brønn.
5. Cellene inkuberes 10 min på vippbrett ved romtemperatur.
6. Cellelysate overføres til eppendorfrør, spennes ned ved 16000 rcf i 2 min og benyttes videre til reporteraktiveringsassay direkte (Kapittel 2.3.3).

Lysering av celler for bruk til westernimmunoblotting 6 brønners brett.

1. Cellene inspiseres i mikroskop.
2. Mediumet i brønnene suges av.
3. Brønnene skylles 2 ganger med $1 \times$ PBS.
4. Det tilsettes 800 μ l PBS og cellene skrapes fra skålen med en celleskrape.
5. Cellelysate overføres til eppendorfrør og spennes ned ved RT, 5 min, 1.000 rcf.
6. PBS pipetteres av og det settes til 300 μ l $3 \times$ SDS-PAGE loading buffer.
7. Sonikeres i 2-3 sek (syklus: 0,5, amplitude: 60). Forsøk å unngå skumming.
8. Prøvene oppbevares ved -80°C .

2.3 **Proteinteknikker**

2.3.1 **SDS PAGE**

For å separere proteiner etter størrelse, ble det i denne oppgaven benyttet Sodium dodecyl sulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE). Teknikken ble benyttet til western blotting. Gelelektroforese baserer seg på vandring av ladete molekyler (i dette tilfellet proteiner) i et elektrisk felt. SDS som er et sterkt denaturerende reagens binder opp proteinene og gjør at de denatureres. Vandringslengden for proteiner ved SDS-page er hovedsakelig bestemt av molekylvekt på proteinene og porestørrelsen i gelen. En polyakrylamidgel lages ved en fri radikal industert polymerisering av akrylamid og N, N`-metylbisakrylamid ved hjelp av TEMED og APS. TEMED katalyserer omdannelsen av ammoniumpersulfat til et fritt radikal, som igjen starter polymeriseringen. Andelen akrylamid avgjør hvor stor porestørrelsen blir, lite akrylamid gir store porer.

2.3.2 **Westernimmunoblotting**

Westernimmunoblotting er en metode for å påvise bestemte proteiner. Metoden baserer seg på at et bestemt antistoff gjenkjenner et spesifikt antigen i proteinet en ønsker å påvise, samt et sekundært antistoffs evne til å gjenkjenne immunoglobuliner på det primære antistoffet. Ved hjelp av blotting overføres først proteinene fra SDS gel til en membran. Membranen inkuberes så med antistoffene. Det sekundære antistoffet er konjugert med pepperrot peroksidase, som ved tilsetning av sitt substrat gir en lysreaksjon, slik at proteinene kan detekteres på film.

SDS-PAGE

Det kjøres først en standard SDS page for å separere proteinene. Som markør benyttes Prestained Precision Protein Standard fra Bioraid. Elektroforesen pågår til markøren har vandret ca. 2/3 av gel lengden. En 10 % gel ble benyttet.

Blotting

Proteinene på gelen overføres så til membranen (Hybond-P fra Amersham) ved blotting. Prosedyren er som følger: Gelen klippes til slik at bare den delen av gelen

som ønskes blottet over på membranen blir værende igjen. Membranen og 6 stk 6MM papir klippes til slik at den samsvarer med gelen. Membranen fuktes i metanol, deretter legges membranen og 3 stk 6MM papir i pluss buffer, samtidig som 3 stk 6MM papir legges i minus buffer. I følgende rekkefølge legges så membran og papir i blotteapparatet:

3 stk 6MM-papir (pluss buffer)

membran

gel

3 stk 6MM-papir (minus buffer)

Luftbobler fjernes så før blotteapparatet lukkes. Ved blottingen benyttes en strømstyrke på $1\text{mA}/\text{cm}^2$ i 1 time. Etter at blottingen er utført legges membranen i metanol 2 minutter for fiksering av proteinene til membranen.

Inkubering med antistoff

Membranen blokkeres med $1 \times$ TBS-T m/melk i 30 minutter for å hindre uspesifikk binding av antistoffene.

Det inkuberes deretter med det primære antistoffet fortynnet i $1 \times$ TBS-T m/melkepulver 2 timer ved romtemperatur eller over natt ved 4°C (fortynningen optimaliseres for hvert enkelt antistoff).

Membranen vaskes så 3×20 minutter med $1 \times$ TBS-T m/melk for å fjerne ubundet antistoff.

Membranen inkuberes 1 time ved romtemperatur med sekundært antistoff konjugert med et pepperrotperoksidase enzym (HRP – Horseradish peroxidase) fortynnet i $1 \times$ TBS-T m/melk (Fortynningsgraden optimaliseres).

Membranen skylles så 6 ganger med $1 \times$ TBS-T og vaskes med $1 \times$ TBS-T i 20 minutter. Membranen skylles med $1 \times$ PBS og er deretter klar for deteksjon.

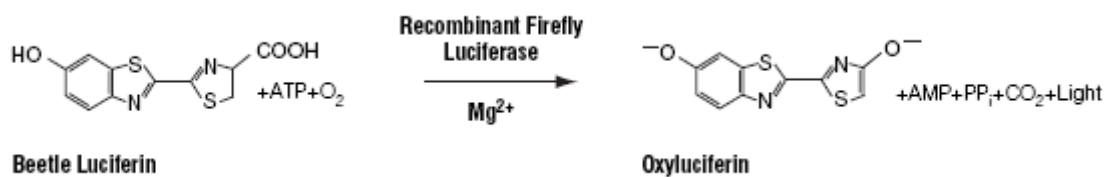
Deteksjon

Proteinene på membranen visualiseres ved enzymaktivitet knyttet til det sekundære antistoffet. Når pepperrotperoksidasen tilsettes substrat katalyserer enzymet en

reaksjon hvor det avgis lys. Dette lyset kan detekteres på en lysømfintelig film. For deteksjon ble kitet "ELC Plus Western Blotting Detection System" fra GE Healthcare benyttet. Protokoll følger med kitet.

2.3.3 Reporteraktiveringsassay

Reporteraktiveringsassay er en metode som kan brukes til å studere genekspressjon og regulering. Ved å transfektere celler med et effektorgen og et reporter-gen kan en bestemme aktiviteten til effektoren ved å måle reporterproteinet. Lysat fra transfekterte celler benyttes. Reporter-genet inneholder et promoterområde som transaktiveres av effektorproteinet. Promotorsekvensen etterfølges av en sekvens som uttrykker et protein som det er enkelt å kvantifisere. I denne oppgaven benyttes luciferase. Luciferase proteinet har den egenskapen at det vil utvikles lys som kan fanges opp av et luminometer når proteinet kommer i kontakt med sitt substrat i nærvær av O_2 .



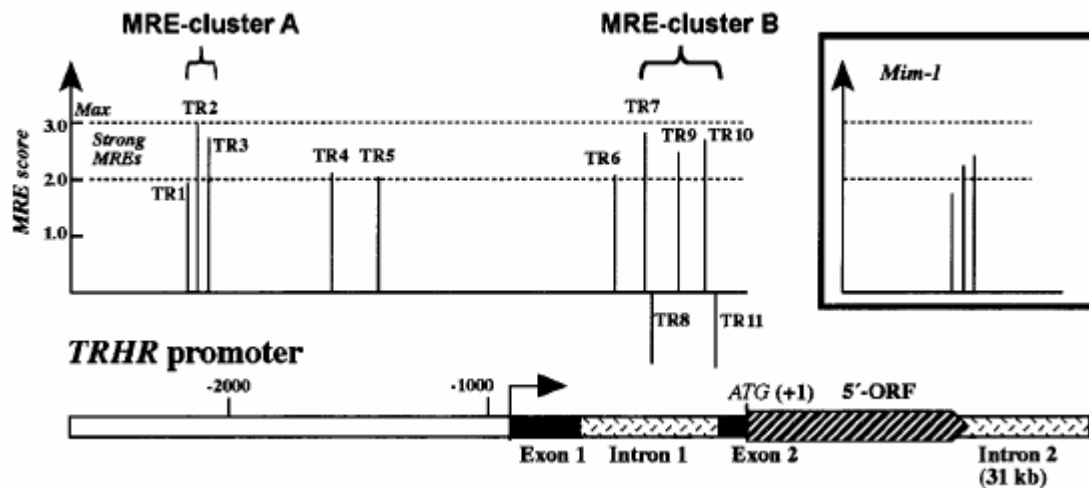
Figur 2.1: Luciferasereaksjonen slik den foregår i ildflue. Luciferaseenzymet katalyserer reaksjonen hvor det dannes lys i nærvær av O_2 , Mg^{2+} og luciferin. Reaksjonen er ATP-avhengig.

Målingene i luminometeret gjenspeiler mengden uttrykt luciferase som igjen gjenspeiler aktiviteten til effektoren. Luciferase-enzymet som brukes i reporteraktiveringsassay er ofte hentet fra ildflue (*Photinus pyralis*).

I denne oppgaven ble det benyttet 2 forskjellige c-Myb responsive reportergener, TRHR-luc og 3×-MRE-MYC-luc.

TRHR

Thyrotrophin-releasing hormone receptor (*TRHR*) er et kjent målgen for c-Myb. Promotersekvensen til *TRHR* inneholder 11 mulige myb responselementer (MRE) for c-Myb (Matre et al., 2003).



Figur 2.2: Oversikt over hele TRHR promoteren. I denne oppgaven ble delen kalt TRHR1 benyttet som inneholder sekvensen fra -1250 til 1. Figuren er hentet fra artikkel til (Matre et al., 2003).

I denne oppgaven ble det benyttet TRHR1-luciferase som effektor. TRHR1 inneholder sekvensen i TRHR promoteren fra bp 1250 til 1. TRHR1 ble valgt fordi den har vist seg å inneholde den viktigste MRE i TRHR promoteren. Reportergenet inneholder TRHR1 promoteren som etterfølges av luciferase gen.

3×MRE-MYC

3×MRE-MYC reporteren er tidligere utviklet fra promoteren til c-Myb målgenet MYC (se kapittel 1.4.3) på forskningsgruppa av Ann-Kristin Molværsmyr. 3×-MRE-MYC promoteren er designet slik at tre Myb-resonselementer (MRE) er koblet oppstrøms for MYCs "core" sekvens, med ti baser mellom de to første MRE og 15 baser mellom de to siste. Hele reportergenet består av 3×MRE-MYC promoteren som etterfølges av luciferase gen.

Metodikk

Lyseringsteknikken benyttet til reporteraktiveringsforsøkene er beskrevet i transfeksjonsdelen av metodekapittelet (kapittel 2.2.3)

1. 50 µl romtemperert substrat ("luciferase assay system") og 50 µl cellelysat blandes.
2. Lysmengden måles direkte i luminometeret. Se protokoll for detaljert beskrivelse (Promega)

2.3.4 Immunofluorescense og konfokalmikroskopi

Sumoylering har vist seg å forandre den subcellulære lokalisasjonen av en rekke protiner (Janssen et al., 2006; Ross et al., 2002). For å se om lokalisasjonen av c-Myb forandres i cellekjernen avhengig av om c-Myb er sumoylert eller ikke, ble immunofluorescense og konfokal mikroskopi benyttet. Et stort antall kjerneproteiner har blitt lokalisert ved å benytte immunofluorescense og konfokalmikroskopi. Proteinene er funnet i alle deler av kjernen inkludert kjernemembranen, nukleær lamina, nukleolus, kromatinassosiert, assosiert med RNA metabolisme og ulike typer kjernelegemer (Zimmer et al., 2004).

Transfeksjon

Dekkglass legges i brønnene før celler sås ut. $0,2 \times 10^5$ CV-1-celler sås ut per brønn i et 24-brønnsbrett og inkuberes til neste dag. Cellene transfekteres med fugene og inkuberes til neste dag. Cellene vaskes i PBS.

Fiksering

Inkuberes i 4 % PFA i 10 minutter, og deretter i iskald metanol i 2 minutter.

Dekkglassene vaskes 3×5 minutter med 0,1 % Tween 20 i PBS. Inkuberes med 2 % BSA i 0,1 % Tween 20 i PBS i 30 minutter.

Inkubering med antistoff

Primært antistoff fortynnes 1:50 i 0,1 % Tween 20 i PBS med 2 % BSA. 30 μ l dryppes på dekkglasset og inkuberes i 1 time ved romtemperatur. Vaskes 3×5 minutter med 0,1 % Tween 20 i PBS. Sekundært antistoff fortynnes 1:100 i 0,1 % Tween 20 i PBS. 30 μ l dryppes på dekkglasset og inkuberes i 30 minutter ved romtemperatur. Vaskes 3×5 minutter med 0,1 % Tween 20 i PBS. Inkuber med Hochst fortynnet 1:50 10-20 min. Vaskes 3×5 minutter med 0,1 % Tween 20 i PBS og deretter en gang i PBS. En dråpe mounting media dryppes på hvert objektglass. Dekkglassene dyppes i destillert vann (la overskuddet av vann suges av ved å holde dekkglassene inntil et filterpapir) og legges med celledelen ned i olja. La de ligge til tork (beskyttet mot lys). Prøvene oppbevares ved -20°C til de skal undersøkes med konfokalt laserskanning mikroskopi.

3 Mål for oppgaven

c-Myb er som beskrevet i introduksjonsdelen en transkripsjonsfaktor som er involvert i proliferasjon, differensiering og apoptose, hovedsakelig av hematopoetiske celler. c-Myb har tidligere blitt vist å konjugeres til proteinet SUMO. SUMO blir også konjugert til en rekke andre transkripsjonsfaktorer, og normalt fører en konjugering til at den enkelte transkripsjonsfaktors transkripsjonelle aktivitet avtar. Det har tidligere blitt vist at mutasjon av konjugeringssetene for SUMO fører til aktivering av c-Myb avhengig transkripsjon (Dahle et al., 2003). Konjugeringssetene for SUMO er lokalisert i c-Mybs NRD domene. Mens man altså har studert effekten av SUMO-konjugering ved å fjerne modifikasjonen ved hjelp av mutasjoner, har man ikke studert konstitutivt SUMO-konjugert c-Myb. Det siste ville være en vel så direkte måte å studere effekten av SUMO-konjugering på c-Myb. En mutasjonsstrategi står alltid i fare for å se på effekten av andre modifikasjoner enn bare SUMO, fordi lysin kan modifiseres på andre måter. En av utfordringene ved å studere hvilken effekt SUMO-konjugering til c-Myb har på c-Mybs transkripsjonelle aktivitet er at under normale biologiske betingelser er sumoyleringsreaksjonen en reversibel prosess og til enhver tid er bare en liten del av den enkelte transkripsjonsfaktor i en celle sumoylert. Dette gjør det vanskelig å se effekten av sumoyleringen direkte. I dette prosjektet er det nettopp effekten som sumoylering av c-Myb har på c-Myb avhengig transkripsjon, vi ønsker å studere. Vi har i prosjektet valgt en strategi hvor vi benytter oss av forskjellige c-Myb-SUMO fusjonskonstrukturer for å prøve å studere denne effekten. Slike fusjonskonstrukturer vil etterligne en konstitutivt SUMO-konjugert c-Myb, selv om fusjonene (c-Myb-2KR-SUMO og SUMO-c-Myb-2KR) ikke vil være en fullgod modell i og med at de mangler den forgrenede strukturen som naturlig SUMO-konjugering gir. Ved å sammenlikne konstruktene hvor SUMO er fusjonert til Myb og ikke kan bli dekonjugert, vil det være mulig å kunne se direkte effekten SUMO-konjugering av c-Myb har på c-Myb avhengig transkripsjon.

Det har tidligere blitt vist at c-Myb varianter som mangler NRD området, som for eksempel c-Myb-[1-443], er vesentlig mer transkripsjonelt aktive enn normal c-Myb. Siden SUMO-konjugeringssetene i c-Myb er lokalisert i NRD har vi også ønsket å se om effekten av SUMO-konjugeringen kan forklare NRD's negative regulatoriske effekt. Strategien for dette har vært en SUMO-fusjon med en c-Myb variant uten NRD.

Hvis SUMO-konjugert c-Myb viste seg å repressere c-Myb avhengig transkripsjon ønsket vi også å se om c-Myb-SUMO fusjonen bare var en svekket aktivator eller faktisk opererte som en aktiv repressor. Det vil si at økende mengde av c-Myb-SUMO fusjonen fører til en gradvis aktivitetssenkning av c-Myb avhengig transkripsjon i et system som i utgangspunktet inneholder ikke-sumoylert c-Myb, og at c-Myb-SUMO oppfører seg som en dominant negativ. For mer informasjon om dominant negativ, se (Herskowitz, 1987).

En av forklaringene på hvorfor SUMO-konjugering av transkripsjonsfaktorer fører til en transkripsjonell represjon, er at den subcellulære lokaliseringen av enkelte transkripsjonsfaktorer forandres ved SUMO-konjugering. Vi ønsket å undersøke om dette også gjelder ved sumoylering av c-Myb ved hjelp av fusjonsstrategien.

Vi har på bakgrunn av dette satt opp følgende mål og problemstillinger for prosjektet:

1. Ved hjelp av en SUMO-fusjonsstrategi å studere effekten SUMO-konjugering har på c-Myb avhengig transkripsjon:
 - a. Fører SUMO-konjugering av c-Myb til at c-Myb avhengig transkripsjon represseres?
 - b. Er denne effekten i tilfelle avhengig av hvor på c-Myb SUMO kobles til?
 - c. Kan i så fall SUMO-konjugering forklare NRD's negative regulatoriske effekt?
 - d. Hvis c-Myb-SUMO viser seg å repressere c-Myb avhengig transkripsjon, opptrer fusjonen da bare som en svekket aktivator eller som aktiv repressor/dominant negativ?

2. Undersøke den subcellulære lokalisasjonen av c-Myb:
 - a. Forandres c-Mybs subcellulære lokalisasjon avhengig av om c-Myb er sumoylert eller ikke?

4 Resultater

Resultatdelen er delt i fire deler, hvor del 1 (kapittel 4.1) går med til å vise hvordan de forskjellige nye plasmidene som er benyttet i oppgaven ble konstruert. Uttrykk av de forventede proteinene fra disse plasmidene visualisert ved Westernimmunoblotting er vist i del 2 (kapittel 4.2). I del 3 (kapittel 4.3) beskrives reporteraktiverings-forsøkene som ble utført for å se hvilken effekt SUMO-konjugering har på c-Myb avhengig transkripsjon og hvordan dette slår ut med ulike c-Myb varianter i fusjon. I del 4 (kapittel 4.4) av resultatdelen fremlegges resultatene fra immunofluorescense mikroskopi som ble utført for å se hvilken effekt SUMO-konjugering av c-Myb har på c-Mybs subcellulære lokalisasjon. Selve immunofluorescense mikroskopieringen ble utført av Anne Hege Alm-Kristiansen, men med plasmider konstruert av undertegnede til formålet. I denne oppgaven har human c-Myb blitt benyttet, men vil bare bli omtalt som c-Myb videre i oppgaven.

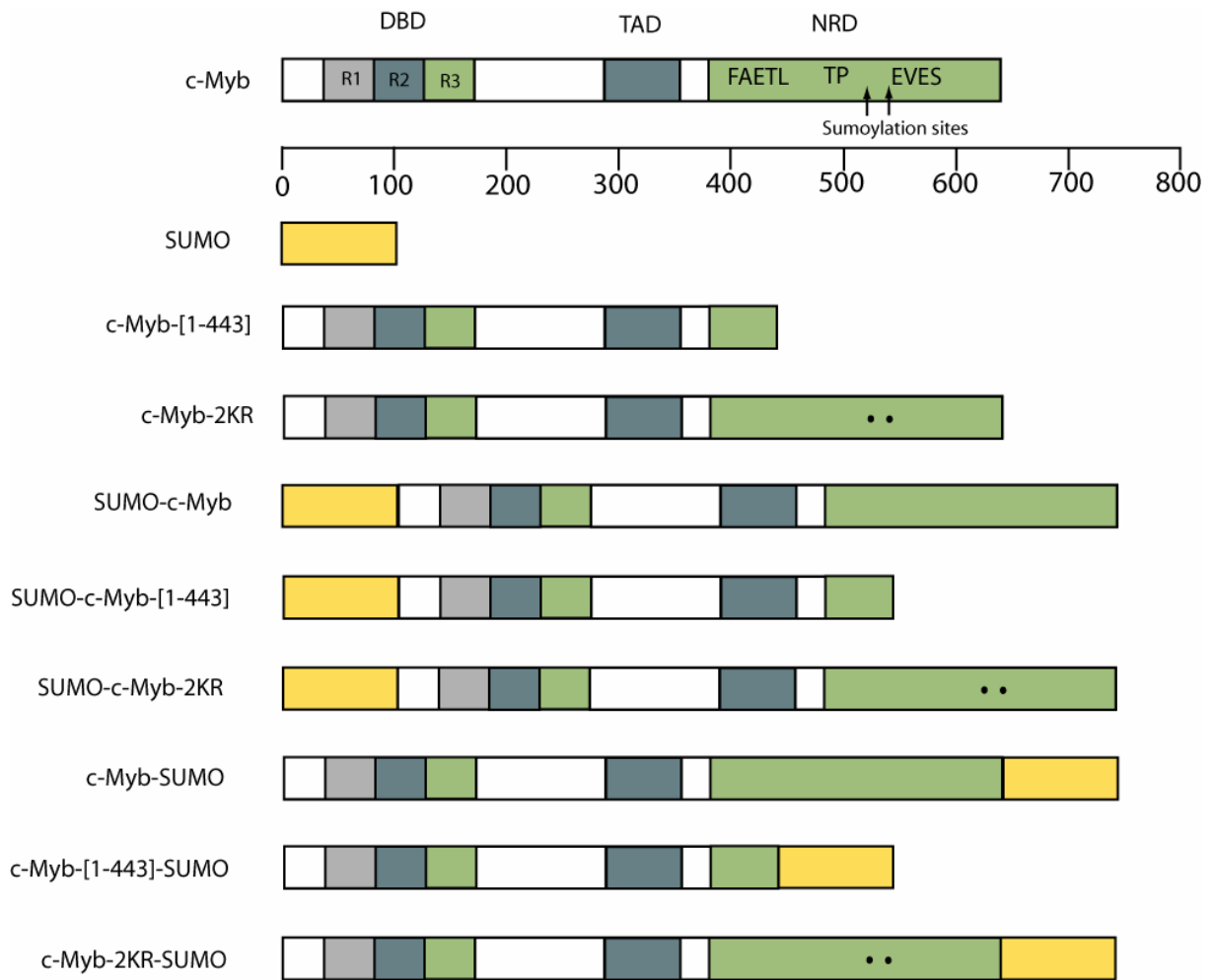
4.1 Plasmidkonstruksjon

For å studere effekten som SUMO-konjugering av c-Myb har på c-Myb avhengig transkripsjon, valgte vi en strategi hvor vi konstruerte og benyttet oss av en rekke SUMO-c-Myb fusjonskonstrukt, samt konstrukt med muterte konjugeringssete for SUMO-1. SUMO-c-Myb fusjonskonstruktene er konstruert på en slik måte at de ikke gjenkjennes av SUMO proteaser, noe som fører til at SUMO ikke kan dekonjugeres i disse konstruktene. Hvordan dette har blitt gjort blir forklart senere i dette kapitlet. Ved å ha disse konstruktene tilgjengelig kunne vi studere effekten av SUMO-konjugering direkte ved å sammenlikne fusjonskonstruktene med villtype c-Myb og varianter som ikke kan konjugeres til SUMO, som mutanten c-Myb-2KR. Fusjonsstrategien ga oss dermed et verktøy hvor vi enkelt og direkte kunne studere effekten av SUMO-konjugering. SUMO er konstant konjugert til c-Myb når det uttrykkes fra SUMO-c-Myb fusjonskonstruktene, mens c-Myb konstant er fri for SUMO når man benytter c-Myb-2KR mutanten eller varianten som mangler NRD; c-Myb-[1-443]-HA. SUMO-c-Myb fusjonskonstruktene som har blitt laget må likevel sees på som etterlikninger av proteinkomplekset som blir dannet ved naturlig sumoylering. Som beskrevet i introduksjonsdelen kan c-Myb bli konjugert til SUMO på to lysin residuer i NRD. Denne fusjonen som skapes blir altså en strukturelt forgrenet fusjon med tre grener, hvor to SUMO proteiner utgjør to av grenene og det C-terminale c-Myb den tredje. Etterlikningene som vi

har konstruert blir et sammenhengende protein som ikke er forgrenet, hvor SUMO enten er fusjonert C-terminalt eller N-terminalt for c-Myb. Vi ser på de C-terminale variantene som de biologisk mest relevante, siden SUMO her er fusjonert nærmest konjugeringssetene for naturlig sumoylert c-Myb.

Seks forskjellige plasmider ble konstruert i denne oppgaven hvor det ble tatt utgangspunkt i tre forskjellige eksisterende plasmider: pCIneo-c-Myb-HA, pCIneo-c-Myb-[1-443] og pCIneo-c-Myb-2KR. Plasmidet pCIneo-c-Myb-[1-443] uttrykker en variant som mangler den C-terminale delen av Myb hvor NRD-domenet befinner seg. Konjugeringssetene for sumoylering som befinner seg i NRD-domenet er følgelig fjernet i dette konstruktet. I pCIneo-c-Myb-2KR er det foretatt to punktmutasjoner i konjugeringssetene for SUMO-1, hvor aminosyren K (lysin) er mutert til R (arginin) i posisjonene 503 og 527. Pga av denne dobbelt-mutasjonen kan ikke proteinet konjugeres til SUMO. Følgende plasmider ble konstruert på basis av disse (Merk at vi har valgt en notasjon med SUMO foran c-Myb, der hvor fusjonen er gjort N-terminalt for c-Myb, og SUMO bak c-Myb der fusjonen er gjort C-terminalt i):

4.1.1 Proteinoversikt



Figur 4.1: Figuren viser en oversikt over de forskjellige c-Myb-SUMO fusjonsproduktene som ble konstruert i denne oppgaven samt utgangskonstruktene. De to punktmutasjonene hvor K er mutert til R i de to SUMO-konjugeringssetene på c-Myb er merket med svarte prikker.

4.1.2 Konstruksjon av pCIneo-SUMO-hcM-HA

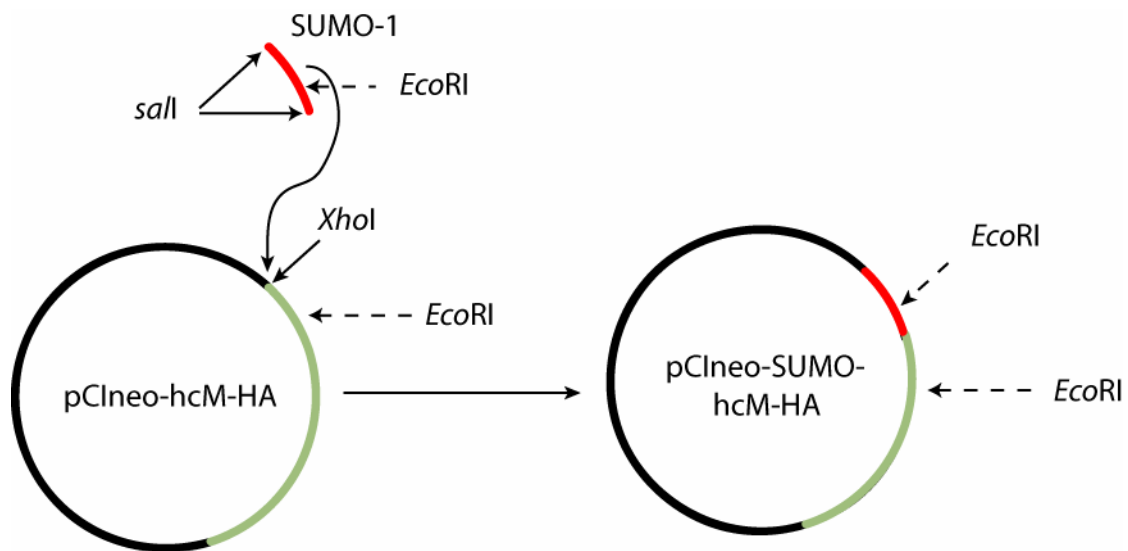
pCIneo-hcM-HA som benyttes som utgangskonstrukt, ble først kuttet med restriksjonsenzymet *XhoI*.

Human SUMO-1 cDNA (image klon) som her benyttes som innskudd modifiseres med PCR ved amplifisering med to primere, SUMO-myb F1(I058) og SUMO-myb R1 (I059) (se vedlegg for sekvenser). Begge disse primerene inneholder kuttseter for *SalI* slik at det blir dannet *SalI* kuttseter opp- og nedstrøms for det SUMO-kodende området. *SalI* har samme overheng som *XhoI*. Innskuddet kuttet så med *SalI*. Naturlig sumoylering skjer ved at det dannes en isopeptid binding mellom glycin residue lokalisert på C-terminal ende i SUMO og lysin residue på c-Myb. For konstruktene som ble designet i denne oppgaven og da spesielt for konstruktene hvor SUMO er fusjonert til c-Myb N-terminalt, det vil si at C-terminal ende av SUMO ligger nærmest c-Myb, er det viktig at SUMO proteaser ikke gjenkjenner og bryter SUMO-c-Myb fusjonen. R1 primeren (se vedlegg 6.4) er derfor designet slik at SUMO blir trunkert C-terminalt og at det innføres en overgangssekvens mellom SUMO og c-Myb i disse konstruktene slik at SUMO-c-Myb fusjonen ikke gjenkjennes og dermed ikke kan brytes av SUMO proteaser. Disse krever en dobbel Glycin (GG) for å spalte, og konstruktene ble derfor laget med en enkel Glycin.

Siden *SalI* og *XhoI* har samme overheng kan innskuddet klones inn i vektoren.

Ligeringsreaksjonen tilsettes i neste trinn *XhoI* for å hindre religering av vektoren. *XhoI* vil kutte religert vektor, men samtidig ikke kunne kutte det nye plasmidet siden det ikke eksisterer *XhoI* kuttseter i dette. DH5 α celler ble så transformert med ligeringsmiksen, samt en kontroll med bare vektor behandlet på samme måte som ligeringsmiksen og dyrket på LB-skåler inneholdende ampicillin. Seks kloner vokste opp her sammenliknet med fire kloner på kontrollskålen. Disse seks klonene på skålen ble videre dyrket opp og rensset ved miniprep metoden. Klonene ble verifisert ved kontrollkutting. Siden SUMO-1 inneholder et kuttsete for *EcoRI* og vektoren også inneholder et slikt kuttsete, vil positive kloner kunne vises ved at det dukker opp to bånd på en agarosegel ved kutting med *EcoRI*. Fragmentene vil ha en størrelse på 7049 bp og 680 bp. Tre av de seks klonene viste seg å gi to bånd etter kutting med *EcoRI*. To av disse visste seg å gi bånd størrelse for på ca. 800 bp for båndet med lengst vandringslengde mens en klon viste båndstørrelse som samsvarte med teorien. Siden SUMO-1 har samme kuttseter i begge ender er det en mulighet for at innskuddet kan bli satt inn

motsatt vei noe som skal gi to bånd ved kutting med *EcoRI* der det minste båndet vil tilsvare 800 bp som tilsvarer resultatet fra to av klonene. Den ene klonen som ble verifisert som positiv ble sendt videre til verifisering ved sekvensering med primerene C126/S082 (se vedlegg 6.4 for sekvens). Sekvensens stemte overens med teori og klonen ble tatt vare på som stamkultur.



Figur 4.2: PCR-produktet av SUMO-1 inneholdene *Sall* kuttsetene ble ligert inn i *XhoI* sete pCIneo-hcM-HA. *Sall* og *XhoI* har samme overheng. Sluttproduktet ble pCIneo-SUMO-hcM-HA

4.1.3 Konstruksjon av pCIneo-SUMO-hcM-[1-443]-HA

Her ble pCIneo-hcM-[1-443]-HA benyttet som utgangskonstrukt. Dette var tidligere blitt konstruert av Grete Hasvold på forskningsgruppa.

Kloningsstrategien for dette plasmidet var identisk med strategien for pCIneo-SUMO-hcM-HA og samme innskudd ble benyttet. Det viste seg at det ble ca. hundre kloner både på celledisken transformert med ligeringsmix og kontrollskålen. Dette resultatet tyder på at vektoren har religert. I utgangspunktet skulle ikke dette være mulig fordi ligeringsmiksen ble tilsatt *XhoI* nettopp for å forhindre religering. Et problem ved å tilsette *XhoI* til ligeringsmiksen direkte er at *XhoI* enzymet ikke får virke under optimale betingelser både når det gjelder temperatur og buffer. T4 DNA ligase buffer ble benyttet under ligeringen. En ny strategi ble valgt hvor ligeringen foregikk uten *XhoI* tilstede. Etter ligeringsreaksjonen var ferdig og ligeringsenzymet varmeinaktivert ble det utført kutting med *XhoI* ved optimale

betingelser. Det ble talt ca. førti kloner på skålen med cellene som var transformert med ligeringsmiksen mot syv kloner på kontrollskålen. Et utvalg på ti av disse førti klonene ble dyrket og rensset videre med miniprep. Disse ti ble så testet ved sjekkutting med *EcoRI*. Vellykkede kloninger skal gi to bånd med størrelse 6467/680 bp. Tre av prøvene ga to bånd, mens bare en av de tre ga riktig båndstørrelse. Av de ti klonene testet ble en av klonene testet som vellykket. Klonen ble sendt til sekvensering for videre verifisering (Primere C126/S082). Prøven viste seg å bli verifisert som korrekt og klonen ble tatt vare på som stamkultur.

4.1.4 Konstruksjon av pCIneo-SUMO-hcM-2KR

Her ble pCIneo-hcM-2KR benyttet som utgangskonstrukt som tidligere har blitt konstruert av Øyvind Dahle (Dahle et al., 2003).

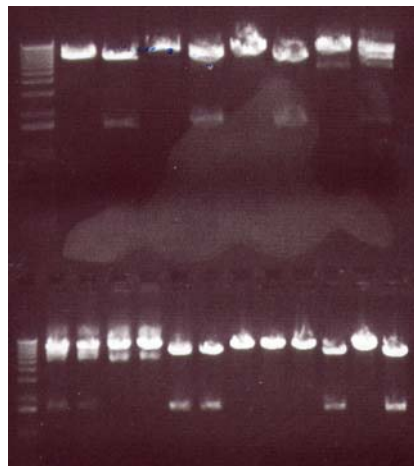
Kloningsstrategien for dette plasmidet er videre identisk med strategien for pCIneo-SUMO-hcM-[1-443]-HA og samme innskudd ble benyttet. Kuttet også her med *XhoI* etter ligeringsreaksjonen. LB-skålen med celler transformert med ligeringsmix resulterte i overkant av hundre kolonier mot ca tretti kolonier på kontrollskålen. Et utvalg på tolv kloner ble dyrket og rensset med miniprep. Ved sjekkutting av de tolv prøvene med *EcoRI*, viste det seg at tre av disse så positive ut. De tre prøvene ble sendt til sekvensering for verifikasjon (primere S082/C126). Alle tre prøvene ble verifisert som positive. En av disse klonene ble tatt vare på som stamkultur.

4.1.5 Konstruksjon av pCIneo-hcM-SUMO

Human SUMO-1 (image klon) ble modifisert med PCR ved amplifisering med to primere, SUMO-Myb F2 (I060) og SUMO-myb R2 (I061) (se vedlegg 6.4 for sekvens). F2 er designet for å passe med kuttsete for *PshAI* (halve sete ligger på enden), mens R2 inneholder kuttsete for *SalI*. PCR produktet ble så kuttet med *SalI*. Vi fant det ikke nødvendig å lage en overgangsekvens mellom c-Myb og SUMO der hvor SUMO fusjoneres c-terminalt for c-Myb grunnet at fusjonen da vil skje på N-terminal ende av SUMO. I strukturen er N-terminalen av SUMO relativt utstrakt og lite strukturert.

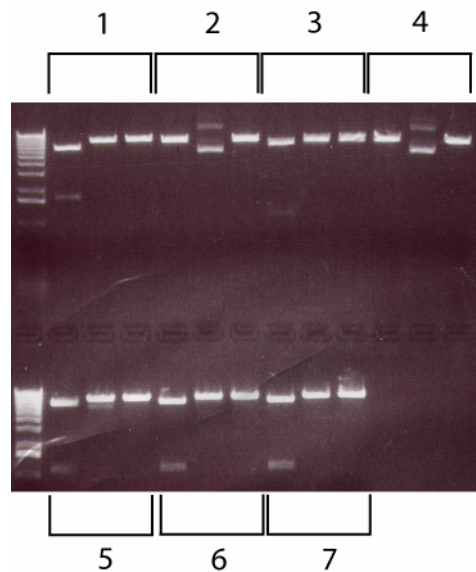
Plasmidet pCIneo-hcM-HA ble først kuttet med restriksjonsenzymene *PshAI* og *SalI* i to trinn. I første trinn kuttet det med *PshAI* med bufferen NEB2 og 50 mM NaCl. I neste trinn

kuttet det med *SalI* ved å tilsette løsningen 100 mM NaCl for at enzymene skal kunne virke under optimale betingelser. Kuttsetene for disse enzymene ligger i C-terminal ende av c-Myb-HA og medfører at HA-taggen forsvinner. Siden *PshAI* gir ”blunt end” kan innskuddet klones direkte inn i vektoren ved at PCR produktet som benyttes som innskudd inneholder halve *PshAI* sete på den ene enden. Både *PshAI* setet og *SalI* setene vil da gjenskapes i det nye konstruktet. Transformasjon av *E. coli* celler med konstruktene resulterte i en koloni, noe det også gjorde på kontrollskålen. Dette ble gjentatt en gang til, noe som ga samme resultat. Siden det har vist seg at *SalI* kan kutte tregt hvis kuttsete ligger nærme enden av sekvensen (se New England Biolabs, Catalog and technical reference for detaljer), ble det forsøkt å kutte med enzymene over natt, resten av strategien forble den samme. Celleskålen transformert med ligeringsmiksen resulterte i over hundre kolonier, mens det ble talt et tilsvarende tall for skålen med vektor. Selv om dette resultatet kunne tyde på religert vektor, gjorde det store antallet kolonier et håp om noen vellykkede kloner. Tjue kolonier ble valgt ut og testkuttet etter at de ble dyrket opp og rensset ved miniprep. Alle koloniene ble først testkuttet med *EcoRI*, noe som skulle gi to bånd på hhv. 1535 bp og 6131 bp. 10 av de 20 så positive ut.



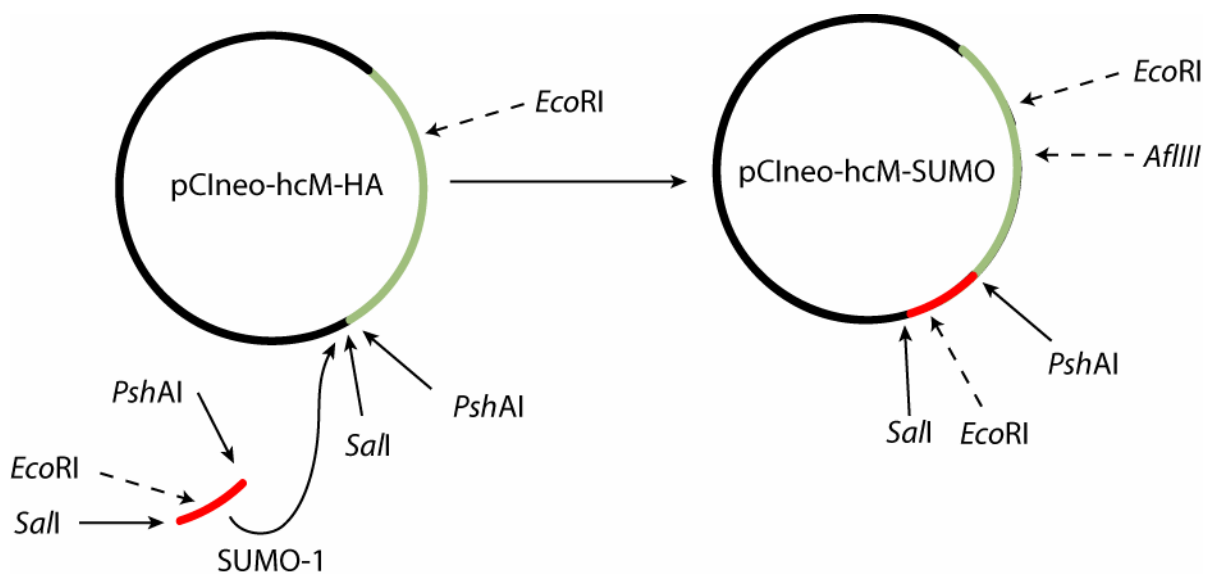
Figur 4.3 Testkutting av 20 potensielle *pCIneo-hcM-SUMO* kolonier med restriksjonsenzymet *EcoRI*. 10 av 20 prøver viste seg å vandre som forventet.

I neste trinn ble prøvene som ble testet positivt med *EcoRI* sjekkuttet med *PshAI* og *AflIII* for å se om *PshAI* setet som ligger på den ene enden av innskuddet var intakt. Kutting med *PshAI* og *AflIII* skulle gi to bånd på hhv. 6557 bp/1113 bp. Kutting med bare ett av enzymene skulle gi ett bånd på ca 7500 bp. Fem av de ti prøvene ga riktig båndstørrelse (se figur 4.4).



Figur 4.4 Bilder viser testkutting av 7 av de 10 potensielle pCIneo-hcM-SUMO koloniene med restriksjonsenzymet PshAI og AflIII. Gelbildet er delt i 7 deler hvor hver enkelt prøve er kuttet med både PshAI og AflIII i den venstre kolonnen, mens de er kuttet med PshAI i kolonnen i midten og med bare AflIII i høyre kolonne. 5 av prøvene viste seg å vandre som forventet.

To av disse ble valgt ut og sendt til sekvensering for verifisering med reversprimeren S068. (hele innskuddet m/lig. Seter). Begge prøvene ble verifisert som positive og en av disse to klonene ble valgt ut og tatt vare på som stamkultur.



Figur 4.5: PCR produktet av SUMO-1 inneholdene PshAI og Sall sete ble ligert inn i pCIneo-c-Myb-HA som var kuttet med PshAI og Sall. PshAI sete har blitt ende mens Sall setet har overheng. Sluttproduktet blir pCIneo-hcM-SUMO

4.1.6 Konstruksjon av pCIneo-hcM-2KR-SUMO

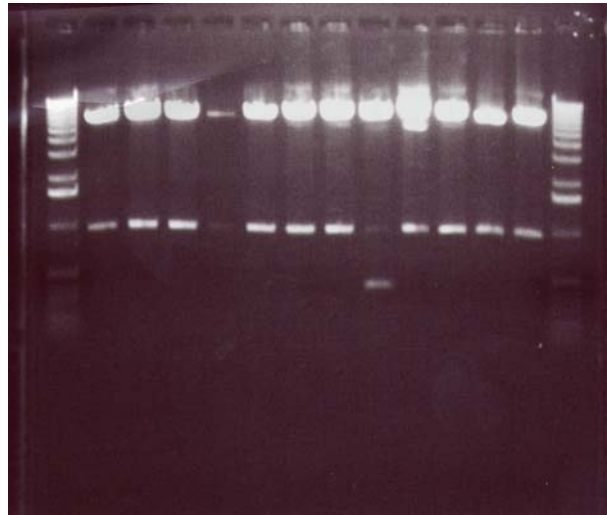
Her ble samme strategi som for konstruksjonen av pCIneo-hcM-SUMO valgt.

pCIneo-hcM-2KR ble brukt som utgangskonstrukt og kuttet med *PshAI* og *SalI*. Innskuddet benyttet er det samme kuttete PCR produktet som ble brukt for pCIneo-hcM-SUMO og endte også her opp med å kutte over natt. Celler transformert med ligeringsmiksen ga to-tre hundre kolonier mot ca. to hundre kolonier på kontroll skålen. Tjuefire kolonier ble valgt ut og dyrket opp og rensset med miniprep. Prøvene ble sjekkuttet med *EcoRI* hvor det skulle gi to bånd på 1535 og 6137 bp. Ti av de tjuefire viste de ønskede båndstørrelsene. De ti prøvene ble i neste trinn testkuttet med *PshAI* og *AflIII*. Kutting med begge enzymene skulle gi to bånd på hhv 6598 og 1113 bp, mens kutting med enzymene hver for seg skulle gi et bånd på ca. 7500 bp. To av prøvene viste seg å gi de ønskede båndstørrelsene. De to prøvene ble sendt til sekvensering med primeren S068 og ble verifisert som korrekte. En av de to positive klonene ble valgt ut og tatt vare på som stamkultur.

4.1.7 Konstruksjon av pCIneo-hcM-[1-443]-SUMO

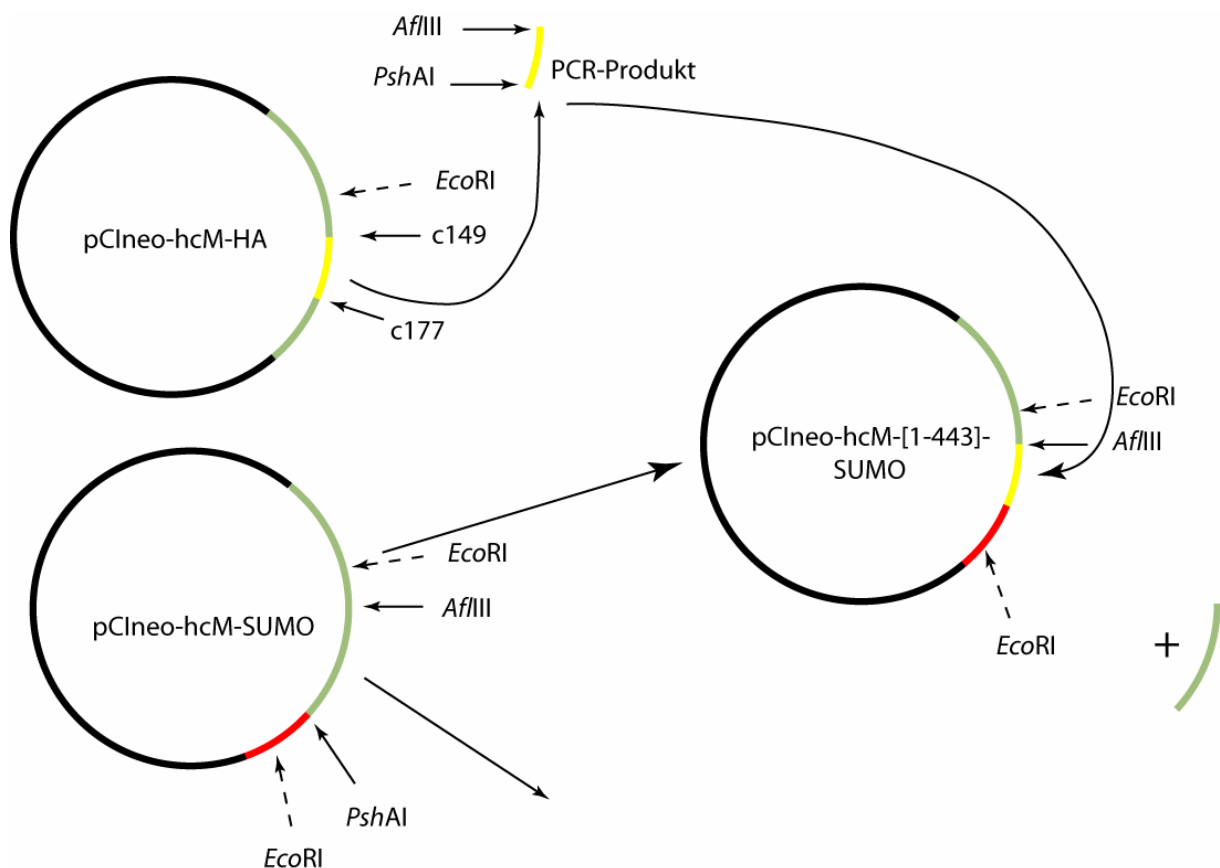
1. Først ble pCIneo-hcM-SUMO kuttet med restriksjonsenzymene *AflIII* og *PshAI*. Enzymene ble benyttet samtidig ved å bruke bufferen NEB2 hvor enzymene er 75 % effektive.
2. *AflIII* sete befinner seg oppstrøms for kodonet som koder for aminosyre 443 i c-Myb slik at dette området må fylles inn på nytt. Ved å kjøre PCR på pCIneo-hcM-HA med primerene C149 og C177 og kutte PCR produktet med *AflIII*, fåes en sekvens på 556 bp som er identisk med det manglende området.
3. Det kuttete PCR produktet og den kuttete vektoren ble så ligert sammen.

DH5 α celler transformert med ligeringsmiksen ga i overkant av hundre kolonier mens det på kontrollskålen ble talt ca. hundre. Tolv av koloniene ble valgt ut for å testkuttet med *EcoRI*. Hvis innskuddet er satt inn vellykket skal det gis to bånd på hhv 6131 og 953 bp, mot to bånd på hhv. Ca. 6000 og 500 bp hvis innskuddet ikke har blitt satt inn. Ti av tolv prøver så positive ut ved kutting med *EcoRI*.



Figur 4.6 Testkutting av 12 potensielle pCIneo-hcM-[1-443]-SUMO kolonier med restriksjonsenzymet EcoRI. 10 av 12 prøver vandret som forventet sammenliknet med den teoretiske størrelsen.

To av prøvene ble valgt ut og sendt til sekvensering med primerne C177 og C149. Begge prøvene viste seg å gi ønsket sekvens, og en av de to ble tatt vare på som stamkultur.



Figur 4.7: Konstruksjon av pCIneo-hcM-[1-443]-SUMO. Først blir pCIneo-hcM-SUMO kuttet med AflIII og PshAI, og et fragment inneholdende NRD domenet i c-Myb blir fjernet fra vektoren. Fragmentet som ligger mellom AflIII og aminosyren 443 i c-Myb blir amplifisert opp med PCR og klonet inn i den kuttete vektoren.

4.1.8 Konstrukter benyttet til Immunofluorescence og konfokalmikroskopi analyse

Immunofluorescence og konfokalmikroskopi er en metode for å visualisere proteiner i cellen. Denne metoden kan benyttes til å se på subcellulær lokalisering av proteiner (mer info om immunofluorescence og konfokalmikroskopi i metoddelen). I utgangspunktet var det meningen å benytte de allerede konstruerte plasmidene i oppgaven til dette direkte, men fordi alle plasmidene ikke inneholder tag ble det valgt en strategi der et utvalg av plasmidene først ble flyttet over i en ny vektor. Vektoren pCIneoB-3×Flag ble benyttet til dette. Plasmidene får da 3×Flag-taggen N-terminalt. Dermed ble det også mulig å sammenlikne to plasmider direkte ved immunofluorescence og konfokalmikroskopi ved at noen har HA-tag, mens andre har 3×Flag-tag.

I alt ble det konstruert fire forskjellige konstrukter hvor følgende kloningsstrategi ble benyttet for alle konstruktene: Innskuddet som varierer i forhold til hvilket plasmid som skal konstrueres (tabell 4.1) ble kuttet med restriksjonsenzymene *NotI* og *XhoI* i bufferen NEB3 fra New England Biolabs og BSA ved 37 °C i 1,5 time. Restriksjonsenzymene er 100 % effektive i bufferen. Vektoren pCIneoB-3×Flag ble kuttet med *NotI* og *XhoI*. Vektor og innskudd ble videre ligert ved å benytte T4 DNA ligase, og DH5α celler ble transformert med ligeringsmiksen på LB-skåler med ampicillin. I tillegg ble DH5α celler transformert med vektor uten innskudd ellers behandlet likt som ligeringsmiksen, benyttet som kontroll.

Plasmid	Innskudd (<i>XhoI-NotI</i> fragment fra):
pCIneoB-3×Flag-hcM-SUMO	pCIneo-hcM-SUMO
pCIneoB-3×Flag-hcM	pCIneo-hcM
pCIneoB-3×Flag-hcM-2KR-SUMO	pCIneo-hcM-2KR-SUMO
pCIneoB-3×Flag-hcM-2KR	pCIneo-hcM-2KR

Tabell 4.1 Tabellen viser en oversikt over hvilke innskudd som er benyttet til å konstruere de forskjellige 3×Flag-Myb fusjonsproduktene.

På alle de fire skålene med DH5α celler transformert med ligeringsmiksen ble det notert et betydelig antall flere kolonier enn på kontrollskålene. Seks kolonier ble valgt ut fra hver av de fire skålene for verifisering. Koloniene som ble valgt ut, ble dyrket opp og rensset ved miniprep metoden og sjekket ved kontrollkutting. For å verifisere at *NotI/XhoI* kuttsetene ble gjendannet, ble det kuttet med de respektive restriksjonsenzymene. Hvis setene er gjendannet skulle det dannes to bånd. SUMO-1 tagen ble verifisert ved kontrollkutting med *EcoRI*. Hvis

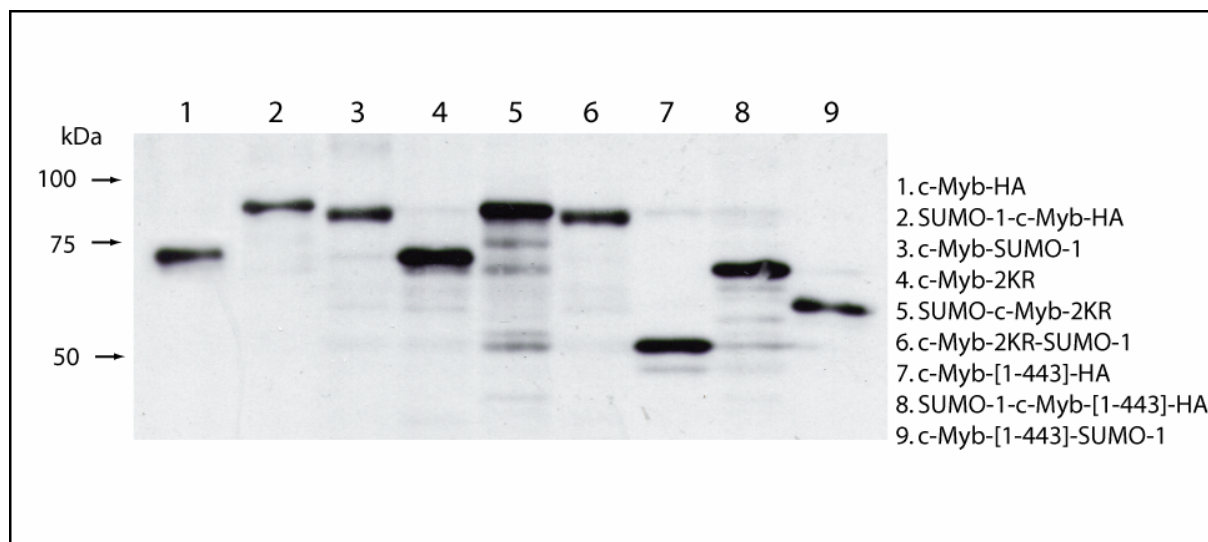
plasmidet inneholdt SUMO-1 skulle det observeres to bånd, og bare et bånd hvis plasmidet ikke inneholdt SUMO-1. For å verifisere at plasmidene virkelig inneholdt 3×Flag-tagen ble det kontrollkuttet med *Bam*HI noe som skal gi tre bånd hvis 3×Flag-tagen var tilstede sammenliknet med to bånd hvis plasmidet ikke inneholdt 3×Flag. Minimum en prøve av hver av de fire plasmidene viste seg positive for alle kontrollkuttingene og ble tatt vare på som stamkultur.

4.2 Westernimmunoblotting for kontroll av ekspresjonsplasmidenes produkt

Alle de seks SUMO-myb fusjonskonstruktene ble som tidligere beskrevet verifisert ved restriksjonskutting og ved sekvensering. Videre ble konstruktene verifisert på protein nivå ved å benytte Westernimmunoblotting for å detektere proteinene c-Myb-HA, c-Myb-[1-443] og c-Myb-2KR, med og uten SUMO-fusjon. CV-1 celler ble transfektert i 6 brønners brett med de forskjellige plasmidene. Høsting av cellene ble gjort ved å benytte skrapemetoden beskrevet i metodedelene (For mer detaljer se kapittel 2.2.3). Det ikke kommersielle antistoffet anti-myb (5E11) ble benyttet som primært antistoff. Som sekundært antistoff ble det benyttet ECLTM Anti-mouse IgG, HRP fra Amersham-biosciences. Forventet størrelse på proteinene er som følger:

Protein	Antall aminosyrer (aa)	Størrelse (kDa)
c-Myb-HA	654	73,8
c-Myb-[1-443]-HA	460	52,3
c-Myb-2KR	641	72,4
SUMO-c-Myb-HA	756	85,5
c-Myb-SUMO	736	83,3
SUMO-c-Myb-2KR	743	84,1
c-Myb-2KR-SUMO	736	83,3
SUMO-c-Myb-[1-443]-HA	562	64,0
c-Myb-[1-443]-SUMO-1	542	61,8

Tabell 4.2 Oversikt over forventet størrelse på c-Myb proteinene med og uten SUMO-fusjon. Forventet proteinstørrelse er beregnet med programmet DNA strider.



Figur 4.8 Western oversikt av de forskjellige fusjonsproteinene samt utgangsproteinene. Anti-myb (5E11) ble benyttet som primært antistoff i fortyning 1:200. Som sekundært antistoff ble det benyttet ECLTM Anti-mouse IgG, HRP fra Amersham-biosciences i fortyning 1:10000.

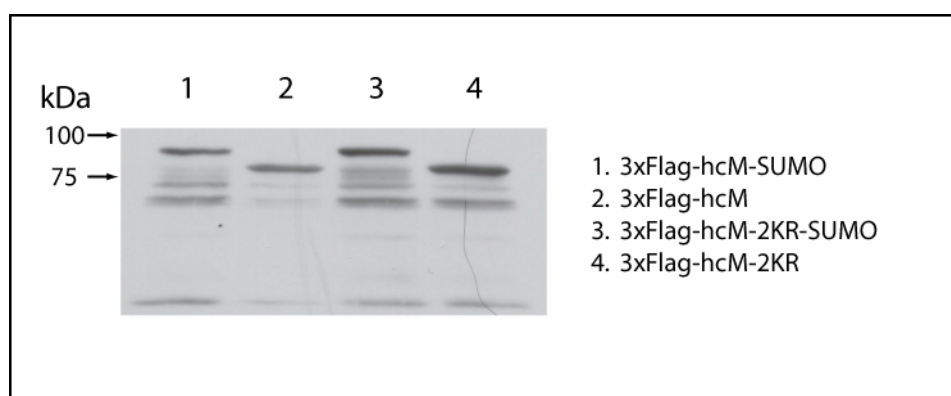
Alle proteinene gir bånd ved å benytte 5E11 som antistoff. Proteinene ser også ut til å vandre som forventet med unntak av SUMO-1-c-Myb-[1-443]-HA i lane 8 hvor det dukker opp et hovedbånd med tilsynelatende kortere vandringslengde enn forventet (figur 4.8). Dette fikk oss til å mistenke at noe kunne være galt med dette konstruert uttrykt som protein. Noe av forskjellen en ser mellom lane 8 og 9 kan forklares ved at c-Myb-[1-443]-SUMO ikke inneholder HA-tag sammenliknet med SUMO-c-Myb-[1-443]-HA som inneholder HA-tag. Likevel synes forskjellen i vandring mellom lane 8 og 9 å være så stor at det trolig ikke kan forklares bare med HA-taggen alene. SUMO-c-Myb-[1-443]-HA skal bare være 2,2 kDa større en c-Myb-[1-443]-SUMO (data fra tabell 4.2). En mer kvantitativ analyse viser at hovedbåndene i lane 8 og lane 9 begge to avviker ca 5 % fra forventet verdi, men i hver sin retning (dvs lane 8 tyder på et for stort protein (+5 %) mens lane 9 på et for lite protein (-5 %)). Samlet gir dette et visuelt inntrykk av ca 10 % avvik og at noe kan være feil. Det er også en liten forskjell i vandringslengde mellom båndene i lane 2 og 3. Denne vandringsforskjellen kan forklares ved at SUMO-c-Myb-HA inneholder HA-tag mens HA-taggen er fjernet under konstruksjonen av c-Myb-SUMO. Siden vi tolket data slik at SUMO-c-Myb-[1-443]-HA proteinet syntes å vandre for kort og dermed ikke kunne sies å være fullgodt verifisert uttrykt som protein, valgte vi å ikke benytte dette proteinet videre i forsøkene. I forhold til problemstillingene i oppgaven er også dette proteinet det minst nødvendige av de forskjellige variantene som ble konstruert. En endelig konklusjon her burde vært basert på MS-bestemmelse av proteinene.

4.2.1 Westernimmunoblotting av proteinene benyttet til immunofluorescense og konfokalmikroskopi

Det ble utført Westernimmunoblotting på konstruktene som ble benyttet til immunofluorescense og konfokalmikroskopi. Dette ble gjort for å verifisere produktene på proteinnivå og kontrollere at Flag-tagene fungerte. CV-1 celler ble transfektert i 6 brønners brett med de fire plasmidene fra kapittel 4.1.8. Plasmidene uttrykker proteiner med 3xflag-tag. Høsting av cellene ble gjort ved å benytte skrapemetoden som er beskrevet i metoddelen. Anti-Flag® M2 fra Sigma ble benyttet som primært antistoff. ECL™ Anti-mouse IgG, HRP fra Amersham-biosciences ble benyttet som sekundært antistoff (se kapittel 2.3.2 for detaljert informasjon om westernimmunoblotting). Den forventede størrelsen på de fire 3×Flag fusjonsproteinene er som følger:

Fusjonsprotein	Antall aminosyrer (aa)	Størrelse i kDa
3×Flag-c-Myb-SUMO	768	87,1
3×Flag-c-Myb	686	77,5
3×Flag-c-Myb-2KR-SUMO	768	87,0
3×Flag-c-Myb-2KR	673	76,1

Tabell 4.3 Oversikt over forventet størrelse på 3×Flag fusjonsproteinene. Forventet protein størrelse er beregnet med programmet DNA strider.



Figur 4.9 Oversikt over 3×Flag-tagede proteiner konstruert til bruk for Immunofluorescense mikroskopi. Anti-Flag® M2 fra Sigma ble benyttet som primært antistoff i fortyning 1:10000. ECL™ Anti-mouse IgG, HRP fra Amersham-biosciences ble benyttet som sekundært antistoff i fortyning 1:10000.

Ved å benytte anti-Flag som primært antistoff dukker det opp bånd for alle de fire proteinene med forventet vandringslengde (figur 4.9). Dette tyder på at proteinene er korrekt uttrykt.

Noen svakere bånd med lengre vandringslengde dukker også opp, noe som tyder på at det foregår en viss degradering.

4.3 Reporteraktiveringsassay

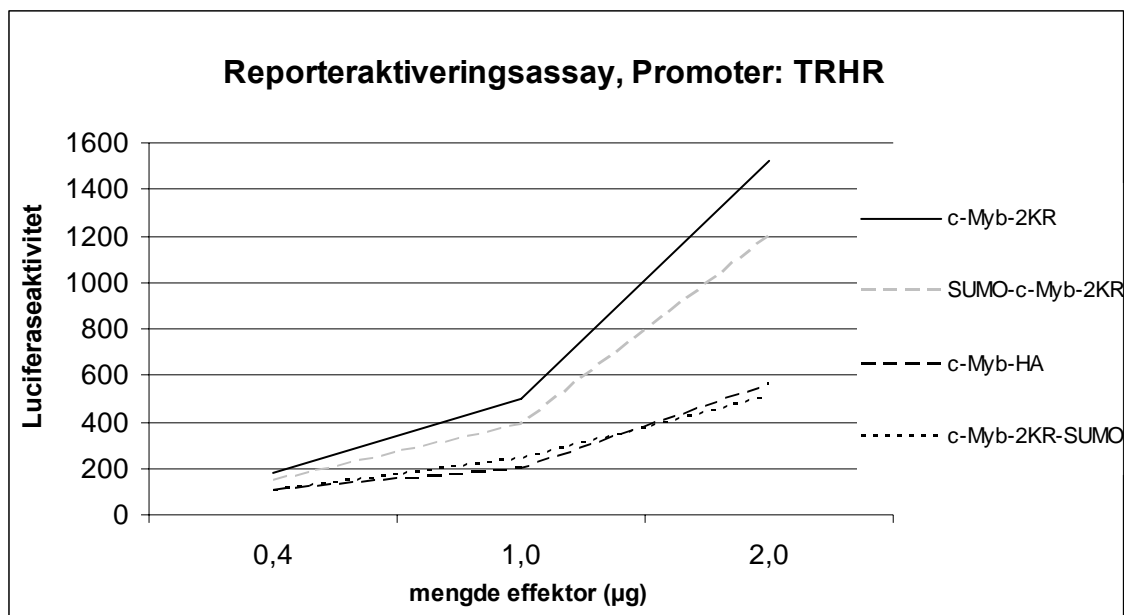
For å studere effekten SUMO-konjugering har på c-Myb avhengig transkripsjon valgte vi å benytte reporteraktiveringsassay. Ved å benytte denne metoden kan en sammenlikne aktiviteten til en transkripsjonsfaktor, i dette tilfellet er c-Myb og diverse modifiserte varianter som SUMO fusjonene, ved å måle uttrykket av et bestemt gen som er responsivt på transkripsjonsfaktoren. For å kunne uttrykke disse effektor-konstruktene som proteiner må c-DNAet være en del av en ekspresjonsvektor som kan uttrykkes i den spesifikke celletypen benyttet. pCIneo ble i denne oppgaven benyttet som ekspresjonsvektor og er beskrevet i metodedelene. Effektor-reporter forsøkene ble utført med to forskjellige Myb-responsive promotere for å kunne ekskludere eventuelle spesifikke effekter på det enkelte målggen.

Til reporteraktiveringsmålingene ble det benyttet lysat fra cellelinjen CV-1 transfektert med kombinasjoner av effektor- og reporter-konstrukt (se metodikkdelen for beskrivelse av cellelinjen og detaljert om dyrking/høsting av cellelinjen). Dataene vist baserer seg på målinger dels utført fra celler dyrket i 6 brønners og dels i 24 brønners brett. De første forsøkene i dette prosjektet ble utført med 6 brønners brett, men på grunn av at gruppa skiftet standard og begynte å benytte 24 brønners brett til reporteraktiveringsassay, ble dette benyttet i de senere forsøkene. Dataene fremlagt i figurene i reporteraktiverings delen er et snitt av minimum 3 separate forsøk utført i triplikat. Cellene i 6 brønners brett ble transfektert med 0,4, 1,0 og 2,0 ug effektor DNA, samtidig som de ble transfektert med 1,0 ug reporter DNA. I forsøkene hvor det ble benyttet celler fra 24 brønners brett var mengden effektor tilsvarende 0,08, 0,2 og 0,4 ug samt 0,2 ug reporter (fordi det er en faktor fem i forskjell mellom de to oppsettene). Den c-Myb-responsive promoteren til Thyrotropin-releasing hormone receptor genet (*TRHR*) (Matre et al., 2003) ble benyttet som reporter i forsøkene. Noen av forsøkene ble også gjentatt ved å benytte den hcM-FL responsive promoteren 3xMRE-MYC som reporter for å se om resultatene er uavhengig av hvilken promoter som ble benyttet.

4.3.1 Er effekten av SUMO-konjugering avhengig av hvor på c-Myb SUMO konjugeres?

Vi ønsket i denne oppgaven å bruke fusjonsstrategien til å besvare hvorvidt SUMO-konjugering av c-Myb fører til at c-Myb avhengig transkripsjon represseres, og om denne effekten i tilfelle var avhengig av hvor på c-Myb SUMO kobles til? For å besvare dette ble det

foretatt et reporteraktiveringsassay hvor aktiviteten til c-Myb-SUMO ble sammenliknet med mutanten c-Myb-2KR hvor SUMO-konjugeringssetene er mutert. c-Myb-2KR uttrykker c-Myb uten SUMO og kan ikke konjugeres til SUMO. c-Myb-2KR ble også sammenliknet med tilsvarende proteiner hvor SUMO er konstant fusjonert til c-Myb. Disse fusjonsproteinene var de to variantene som uttrykker c-Myb med SUMO fusjonert hhv. C-terminalt og N-terminalt: c-Myb-2KR-SUMO og SUMO-c-Myb-2KR. Vi benyttet både C-terminale og N-terminale fusjonskonstrukter for å kunne besvare posisjonsspørsmålet. Ved å sammenlikne disse fire konstruktene direkte i et oppsett vil en kunne få et innblikk i om SUMO-konjugering har en repressiv effekt, samtidig som det undersøkes om SUMO-konjugerings effekten er avhengig av lokalisasjonen på c-Myb. Siden den naturlige sumoyleringen av c-Myb skjer i NRD som er lokalisert C-terminalt i c-Myb, ble det antatt at fusjonen hvor SUMO er lokalisert C-terminalt var den som liknet mest på den naturlige varianten. Lysat fra celler transfektert med økende mengder av de nevnte plasmider ble benyttet i dette forsøket. *TRHR* ble brukt som promoter. Resultatet er vist i Figur 4.10.



Figur 4.10: Reporteraktiverings resultater med økende mengde av effektorene c-Myb-HA, c-Myb-2KR, c-Myb-2KR-SUMO og SUMO-c-Myb-2KR. 1,0 µg *TRHR* er her benyttet som promoter. Cellene ble dyrket i 6 brønners brett.

Som vist i figur 4.10 gir den muterte utgaven hcM-2KR mellom 2 og 3 ganger økning i aktivitet sammenliknet med aktivitetsmålingen for c-Myb-HA. Mutanten hvor SUMO-1 er fusjonert C-terminalt gir derimot aktivitet på samme nivå som for c-Myb-HA. Varianten hvor

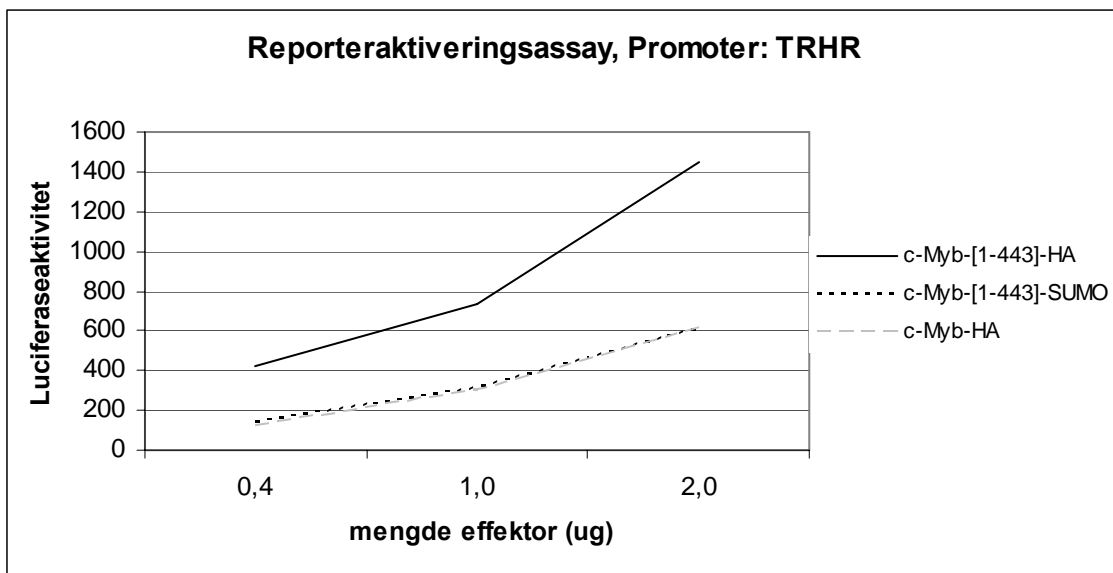
SUMO er fusjonert N-terminalt for c-Myb-2KR gir bare litt lavere målinger enn for c-Myb-2KR og klart høyere aktivitet (ca. 2 ganger) enn aktiviteten til c-Myb villtype. Forsøket indikerer med andre ord følgende: Når SUMO ikke kan konjugeres til c-Myb (c-Myb-2KR) øker c-Myb avhengig transkripsjon markant. Når så c-Myb blir konstant sumoylert (c-Myb-2KR-SUMO) represseres c-Myb avhengig transkripsjon til et nivå som tilsvarer naturlig c-Myb. Dette tyder på at sumoylering av c-Myb har en repressiv effekt på c-Myb avhengig transkripsjon. Denne represjonseffekten observeres dog ikke i like stor grad i tilfellet hvor SUMO er lokalisert N-terminalt for c-Myb (SUMO-c-Myb-2KR), og effekten av sumoyleringen kan dermed se ut til å være avhengig av hvor i c-Myb proteinet SUMO plasseres. En sannsynlig forklaring på denne observasjonen er at konstruktet hvor SUMO er konjugert C-terminalt for c-Myb er det som likner mest på naturlig sumoylert c-Myb, og at effekten/tilgjengeligheten av SUMO i dette proteinkomplekset dermed er bedre bevart enn der hvor SUMO sitter N-terminalt i proteinet, nær DBD domenet.

4.3.2 Sammenlikning av NRD og SUMO-konjugering med hensyn på c-Mybs negative regulatoriske effekt

Et annet spørsmål vi stilte var om SUMO-konjugering kunne svare for det meste av NRD's negative regulatoriske effekt. Vi ønsket derfor å se hvilken effekt fjerning av NRD i c-Myb hadde på c-Myb avhengig transkripsjon i vårt reporteraktiveringsassay, og i hvilken grad denne effekten kunne bli opphevet av å lage en variant hvor SUMO ble fusjonert til c-Myb konstruktet uten NRD, med andre ord om en C-terminal SUMO-fusjon kunne "erstatte" hele det deleterte NRD. Aktiviteten av c-Myb-FL ble sammenliknet med konstruktet c-Myb-[1-443] og en variant hvor SUMO er fusjonert C-terminalt, c-Myb-[1-443]-SUMO. Lysat fra celler transfektert med økende mengder av de nevnte plasmider ble benyttet. *TRHR* ble brukt som promoter. c-Myb-[1-443] mangler det negativt regulatoriske domenet og inneholder heller ikke konjugeringssetene for SUMO og kan følgelig ikke konjugere SUMO-1 tilsvarende som for mutanten c-Myb-2KR

Som vist i figur 4.11 viser aktivitetsmålingene at c-Myb-[1-443] gir mellom to og tre ganger aktiviteten av c-Myb-FL. Ved å se på målingene av konstruktet hvor SUMO er fusjonert til c-Myb-[1-443] gir det aktivitetsmålinger på ca. samme nivå som for c-Myb-FL. Dette forsøket viser at fjerning av NRD i c-Myb fører til en markant økning i aktivering sammenliknet med c-Myb. Denne aktivitetsøkningen ser ut til å forsvinne når SUMO fusjoneres til det samme

konstruktet. Effekten som observeres ved å fjerne NRD i c-Myb oppveies i dette forsøket ved å fusjonere konstruktet med SUMO. En annen indikasjon på at effekten av fjerning av NRD oppveies av sumoylering sees ved å sammenlikne dette forsøket med det foregående hvor effekten av å mutere SUMO-konjugeringssetene i c-Myb gjorde et ca. like stort utslag (2-3 ganger aktivering sammenliknet c-Myb).

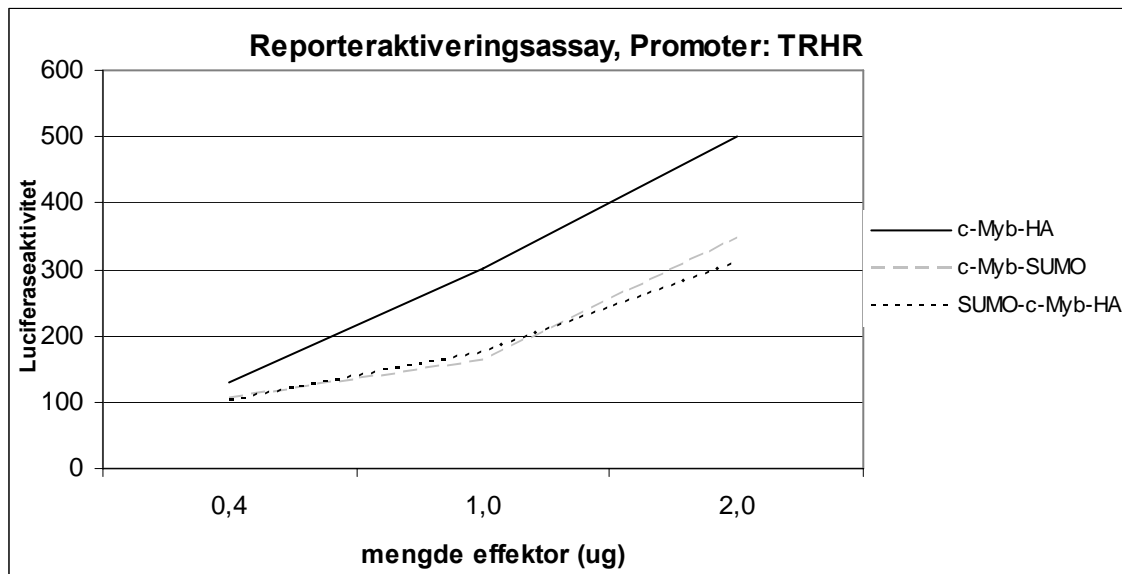


Figur 4.11 Reporteraktiverings resultater med økende mengde av effektorene c-Myb-HA, c-Myb-[1-443] og c-Myb-[1-443]-SUMO. 1,0 µg TRHR er her benyttet som promoter. Cellene ble dyrket i 6 brønners brett.

4.3.3 SUMO-konjugering av c-Myb

I de to foregående forsøkene ble det benyttet konstrukt som i utgangspunktet ikke er identiske med c-Myb, når en ser bort ifra SUMO modifisering. Konstruktene som ble benyttet inneholdt i tillegg til å uttrykke c-Myb modifisert med SUMO C- eller N-terminalt, enten punktmutasjoner (2KR) eller delesjoner ([1-443]). Det var derfor ønskelig å sammenlikne c-Myb varianter som var fusjonert til SUMO direkte med normal c-Myb for dermed bedre å kunne se effekten av sumoylering på c-Myb som blir sumoylert reversibelt i cellen. Det har tidligere blitt vist i flere forsøk at effekten sumoylering har på en spesifikk transkripsjonsfaktor er på et maksimum, selv om bare en liten del av den totale mengden transkripsjonsfaktor til enhver tid er sumoylert (Se introduksjonsdelen). For å studere dette for c-Myb og for å sammenlikne de forskjellige konstruktene, ble det utført reporteraktiveringsmålinger hvor c-Myb-HA ble sammenliknet med de tilsvarende SUMO

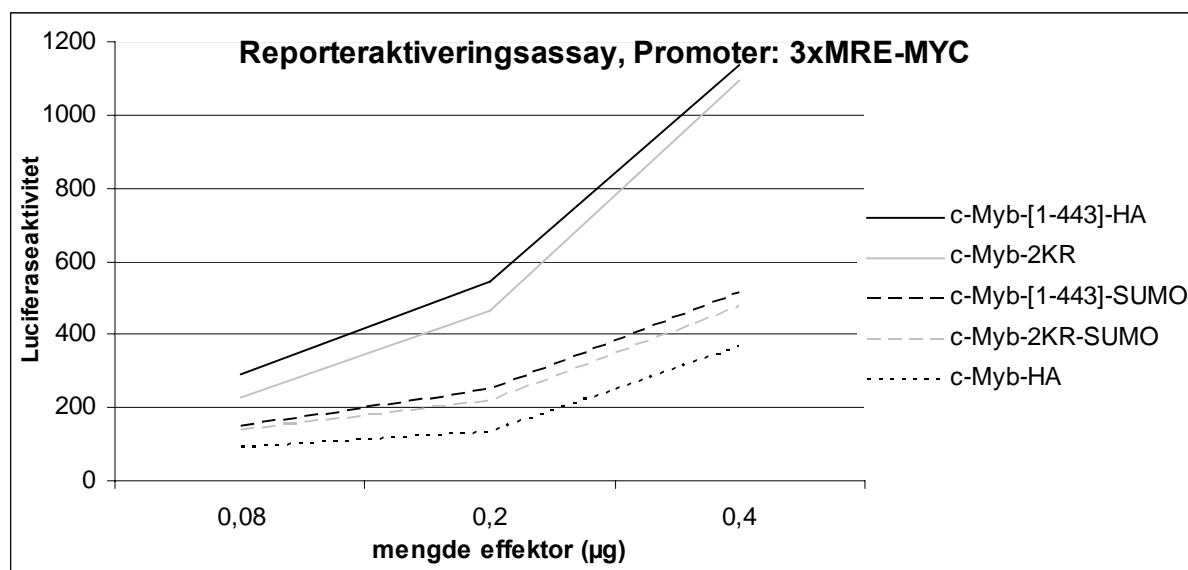
fusjonskonstruktene, SUMO-c-Myb-HA og c-Myb-SUMO. Forsøkene ble utført ved å benytte lysat fra celler transfektert med de tre konstruktene i økende mengde.



Figur 4.12 Reporteraktiverings resultater med økende mengde av effektorene c-Myb-HA, c-Myb-SUMO og SUMO-c-Myb-HA. 1,0 μ g TRHR er her benyttet som promoter. Cellene ble dyrket i 6 brønners Brett.

Ved å sammenlikne aktiviteten fra figur 4.12 ser det ut til at konstruktene hvor SUMO er fusjonert til c-Myb-HA gir ca. 1/3 lavere aktivitet enn c-Myb-HA uavhengig om SUMO er fusjonert N eller C-terminalt for c-Myb. Disse observasjonene viser at konjugering av SUMO til c-Myb ser ut til å ha en repressiv effekt i dette systemet hvor TRHR ble brukt som promoter. Sammenliknet med naturlig c-Myb som både kan opptre konjugert til SUMO og i en fri form, gir konstruktene hvor SUMO er fusjonert til c-Myb altså en noe lavere aktivitet. Denne represjonen er likevel ganske liten (c-Myb gir 50 % høyere aktivitet enn c-Myb-SUMO fusjonskonstruktene) sammenliknet med aktivitetsøkningen som observeres for konstruktene som ikke kan sumoyleres (200-300 % økning i aktivitet sammenliknet med c-Myb). Det skal også være nevnt at naturlig sumoylering av c-Myb skjer på to lysinresiduer, slik at c-Myb kan konjugeres til to SUMO proteiner. For de to konstruktene hvor SUMO allerede er fusjonert til c-Myb kan disse konstruktene konjugeres til maksimalt tre SUMO proteiner medregnet SUMO-fusjonen. I dette forsøket ble det ikke observert noen forskjeller i aktivitet mellom de to konstruktene hvor SUMO er fusjonert til c-Myb enten C- eller N-terminalt. Dermed tyder dette forsøket på at den repressive effekten SUMO-konjugering av c-Myb villtype har, er uavhengig av plassen i proteinet.

4.3.4 Reporteraktiveringsassay med 3xMRE-MYC som promoter



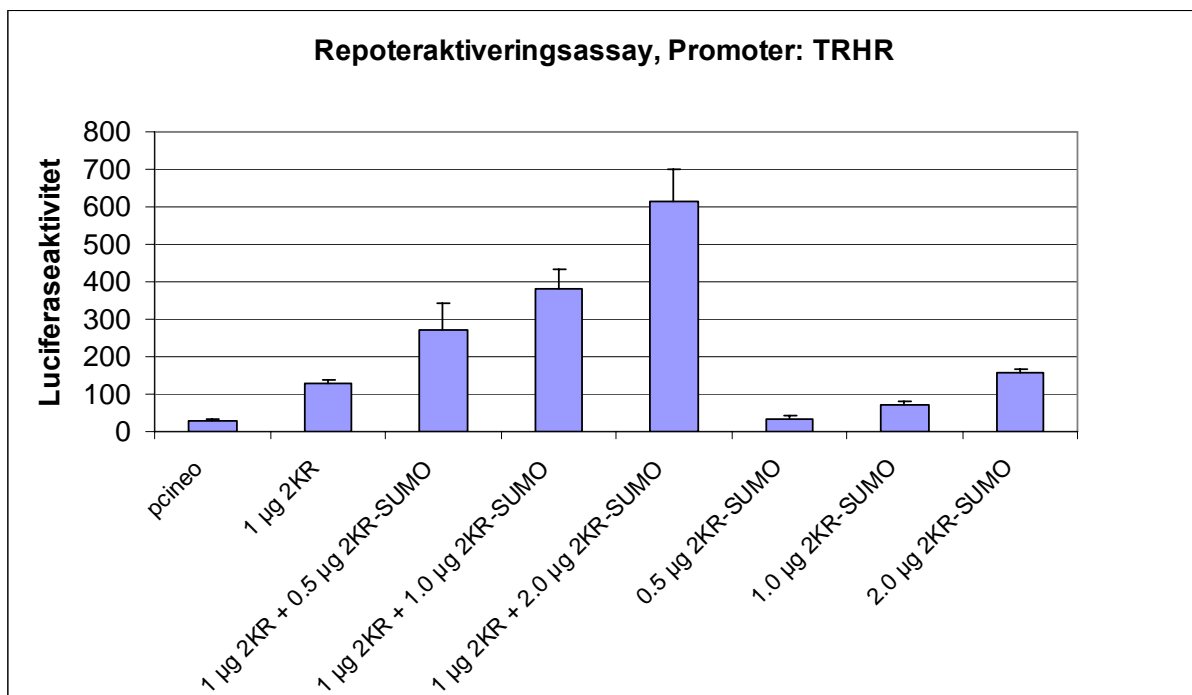
Figur 4.13: Reporteraktiverings resultater med økende mengde av effektorene c-Myb-HA, c-Myb-[1-443]-HA, c-Myb-2KR, c-Myb-2KR-SUMO og c-Myb-[1-443]-SUMO. 0,2 µg 3xMRE-MYC er her benyttet som promoter. Celler dyrket i 24 brønners Brett.

I de foregående forsøkene ble den c-Myb responsive promoteren *TRHR* benyttet som promoter foran Luciferase-reportergenet. For å undersøke om de foregående dataene kunne bli reproduisert med et annet c-Myb-responsivt gen ble promoteren 3xMRE-MYC benyttet (se metodedel for detaljer om promoterene).

I dette forsøket sammenlignes aktiviteten av c-Myb-HA med c-Myb-[1-443], c-Myb-2KR, c-Myb-[1-443]-SUMO og c-Myb-2KR-SUMO. Lysat fra celler transfektert med de 5 konstruktene i økende mengder ble benyttet. c-Myb-[1-443]-HA og c-Myb-2KR ga ca. 2-3 ganger aktiviteten til c-Myb-HA, hvor c-Myb-[1-443]-HA ga en noe høyere aktivitet enn c-Myb-2KR. De to konstruktene hvor SUMO er konjugert C-terminalt, c-Myb-2KR-SUMO og [1-443]-SUMO ga en noe høyere aktivitet sammenliknet med c-Myb-HA, men ca 40 % av aktiviteten til c-Myb-2KR og c-Myb-[1-443]. Disse dataene tyder på at sumoylering av c-Myb-2KR og c-Myb-[1-443]-HA har en repressiv effekt når 3xMRE-MYC benyttes som promoter. Disse observasjonene viser den samme trenden som ved å benytte *TRHR* som promoter. Med andre ord ser effekten av å sumoylere c-Myb ut til å være uavhengig av hvilken c-Myb responsiv promoter som benyttes, og det tyder videre på at effekten av å konjugere c-Myb til SUMO som observeres i disse forsøkene antagelig kan overføres til all c-Myb avhengig transkripsjon.

4.3.5 c-Myb-SUMO - svekket aktivator eller aktiv repressor?

Et spørsmål vi stilte oss var om c-Myb-SUMO fusjonen bare var en svekket aktivator eller faktisk opererte som en aktiv repressor. Vi designet derfor et forsøk for å se hva som skjedde når celler transfektert med en fast mengde c-Myb-2KR (aktivator) ble kotransfektet med økende mengde c-Myb-2KR-SUMO (repressor?). Dette for å sjekke om c-Myb-2KR-SUMO oppfører seg som et dominant negativt protein, det vil si at effekten av c-Myb-2KR-SUMO ville overskygge effekten av c-Myb-2KR noe som ville resultere i en gradvis aktivitetssenkning ved økende mengde c-Myb-2KR-SUMO. For mer informasjon om dominant negativ henvises til (Herskowitz, 1987). Resultatene vist i figuren under er basert på luciferase assay målinger med lysat fra CV-1 celler kotransfektet med 1 µg c-Myb-2KR og varierende mengde c-Myb-2KR-SUMO, samt celler transfektet med bare c-Myb-2KR og celler transfektet med bare c-Myb-2KR-SUMO i mengder 0,5 1,0 og 2,0 µg. Promoteren *TRHR* ble her benyttet som reporter.



Figur 4.14: Reporteraktiverings resultater med økende mengde av effectoren c-Myb-2KR-SUMO, enten alene eller fra celler kotransfektet med 1,0 µg c-Myb-2KR. 1,0 µg TRHR er her benyttet som promoter. Cellene ble dyrket i 6 brønners brett.

I dette oppsettet observerte vi det stikk motsatte av hva vi forventet. Vi fant at aktiviteten øker ved økende mengde c-Myb-2KR-SUMO tilsatt celler transfektet med c-Myb-2KR.

Aktivitetøkningen ser også ut til å være betydelig større enn en ren addisjonseffekt. Celler

kotransfektet med de to konstruktene ser ut til å gi ca. $2 \times$ aktiviteten til summen av de to konstruktene transfektet separat med *TRHR* som promotor. Forsøket ble gjentatt med samme utfall. Fordi vi mener at uventede observasjoner kan være interessante døråpnere, har vi inkludert det i oppgaven. Dessverre tillot ikke tiden å forfølge disse observasjonene nærmere.

4.4 Immunofluorescence og konfokalmikroskopi

I tillegg til å måle den transkripsjonelle aktiviteten av c-Myb ved hjelp av reporteraktiveringsassay ble det valgt en strategi for å se på eventuelle forandringer i subcellulær lokalisering basert på om c-Myb var konjugert til SUMO eller ikke. Til dette ble det valgt å benytte immunofluorescence og konfokalmikroskopi. Dette er en metode som brukes til å visualisere proteiner i en celle, og en kan således få et bilde av den subcellulære lokaliseringen til proteiner. Ved konfokalmikroskopi ser man på et lag i cellen og filtrerer bort ”støy” over og under dette planet. c-Myb villtype ble her sammenliknet med c-Myb-SUMO, samt mutanten c-Myb-2KR som ikke kan sumoyleres. Immunofluorescence og konfokalmikroskopi forsøkene ble utført av A. H. Alm-Kristiansen med konstrukter laget av undertegnede.

Sumoyling av en rekke proteiner har vist seg å forandre deres subcellulære lokalisering, som for eksempel Sp3 (Ross et al., 2002). Det har tidligere blitt vist at c-Myb kolokaliserer med PML kjernelegemer (PML nuclear bodies, PML NB's) (Dahle et al., 2004) samtidig som også mange andre proteiner som er vist å lokaliseres til PML kjernelegemer også kan bli konjugert til SUMO. Derfor ønsket vi å se om c-Mybs subcellulære lokalisering er avhengig av SUMO, og om sumoylert og ikke-sumoylert c-Myb eventuelt lokaliseres til samme eller ulike kjernelegemer (NB's).

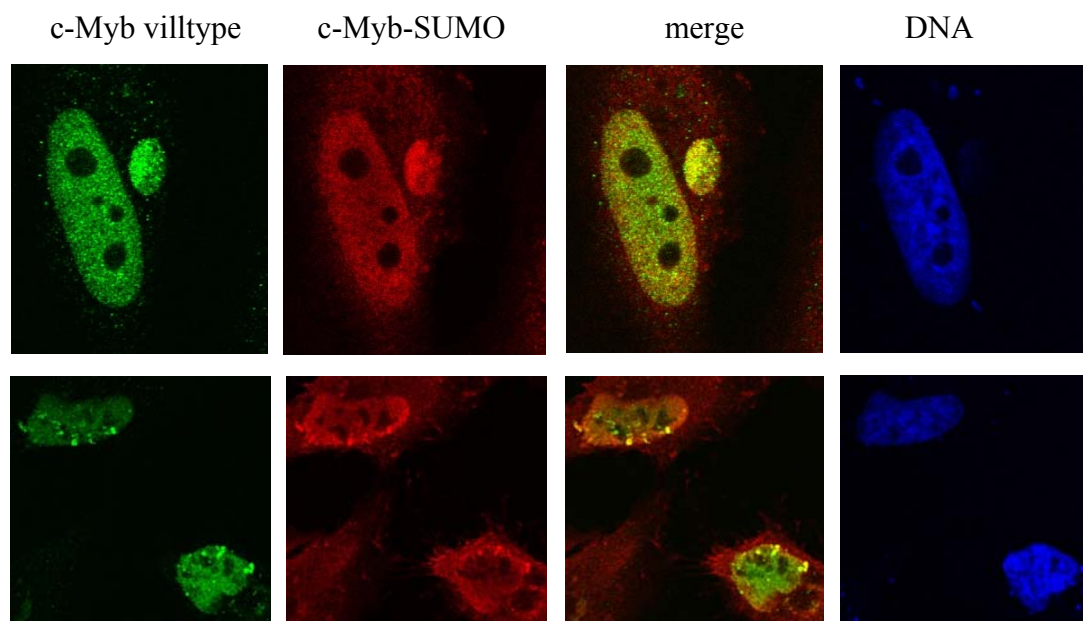
For å kunne studere den subcellulære lokaliseringen av transfektert c-Myb ved hjelp av Immunofluorescence og konfokalmikroskopi er det en fordel med egnede merkelapper på proteinene man vil visualisere. Ved å ha ulik merkelapp på for eksempel c-Myb villtype og 2KR mutanten kan disse studeres i samme celle. En del av konstruktene som er benyttet tidligere i oppgaven ble flyttet over i en ny vektor inneholdene en 3×Flag-tag som ble lokalisert oppstrøms for c-Myb-genet. Se metoddelen for strategi. Ved å benytte to sett av konstrukter der det ene settet inneholder 3×Flag-tag og det andre inneholder en HA-tag ble det mulig å sammenlikne lokaliseringen av to typer Myb-proteiner direkte ved å benytte antistoff mot de to merkelappene, og sekundære antistoffer konjugert med ulike fluoroforer.

Et konstrukt hvor SUMO konstant er bundet til c-Myb (pCIneo-3×Flag-c-Myb-SUMO), et konstrukt hvor c-Myb ikke kan binde SUMO (pCIneo-c-Myb-2KR-HA), samt c-Myb villtype (pCIneo-c-Myb-HA eller pCIneo-3×Flag-c-Myb), ble sammenliknet med hverandre for å se

om det kunne observeres en forandring i subcellulær lokalisering av c-Myb med og uten SUMO. Ville for eksempel SUMO fusjonen føre til at c-Myb lokaliseres jevnt over kjernen samtidig som c-Myb-2KR ville lokaliseres til kjernelegemer, mens c-Myb villtype ville lokaliseres som en mellomting av disse to? Eller ville c-Myb-SUMO eventuelt lokaliseres til andre kjernelegemer enn 2KR?

I Immunofluorescense og konfokalmikroskopi forsøkene ble HeLa celler transfektert med de aktuelle plasmidene. Til forsøkene ble kanin anti-HA og mus anti-Flag benyttet som primære antistoff i fortynningen 1:50. Alexa Fluor 633 esel anti-mus IgG (H+L) og Alexa Fluor 488 esel anti-kanin IgG (H+L) ble benyttet som sekundære antistoff i fortynningen 1:100. Hoechst ble brukt etter tilsetning av sekundært antistoff for å farge DNA/kjernen. Bildene vist i forsøkene under er forstørret 200×.

4.4.1 Subcellulær lokalisering av c-Myb villtype og c-Myb-SUMO

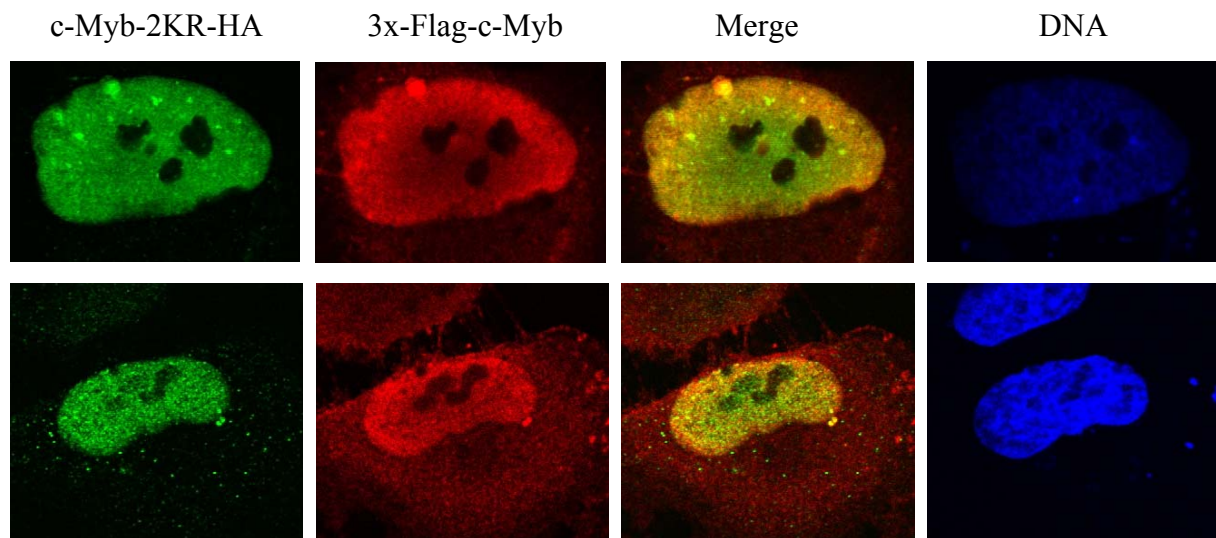


Figur 4.15 HeLa celler kotransfektet med 3×Flag-c-Myb-SUMO og c-Myb-HA. Grønn farge viser c-Myb-HA mens rød viser 3×Flag-c-Myb-SUMO. Kolonne tre er et merge bilde av kolonne 1 og 2. Lane 4 viser farging av cellekjernen (DNA).

For å kunne sammenlikne subcellulær lokalisering av villtype c-Myb og c-Myb-SUMO ble celler kotransfektet med c-Myb-HA og 3×Flag-c-Myb-SUMO. Fra bildene (figur 4.15) ser det ut til at både villtype c-Myb og c-Myb-SUMO lokaliseres til nukleoplasma og

kjernelegemer, men ikke nukleoli som sees som sorte hull i cellekjernen. Det kan se ut som om c-Myb-HA danner noe sterkere punktstruktur enn 3×Flag-c-Myb-SUMO gjør. Imidlertid observeres det her at lokaliseringen av både c-Myb-HA og 3×Flag-c-Myb-SUMO varierer strekt fra celle til celle. Det observeres også at 3×Flag-c-Myb-SUMO og c-Myb-HA kolokaliserer i cellene hvor det dannes punktstrukturer, som er tydeligst i cellen fra figur 4.15 nedre rad. Dette kan tyde på at andre faktorer enn selve sumoyleringen av c-Myb virker inn på c-Mybs lokalisasjon i cellekjernen.

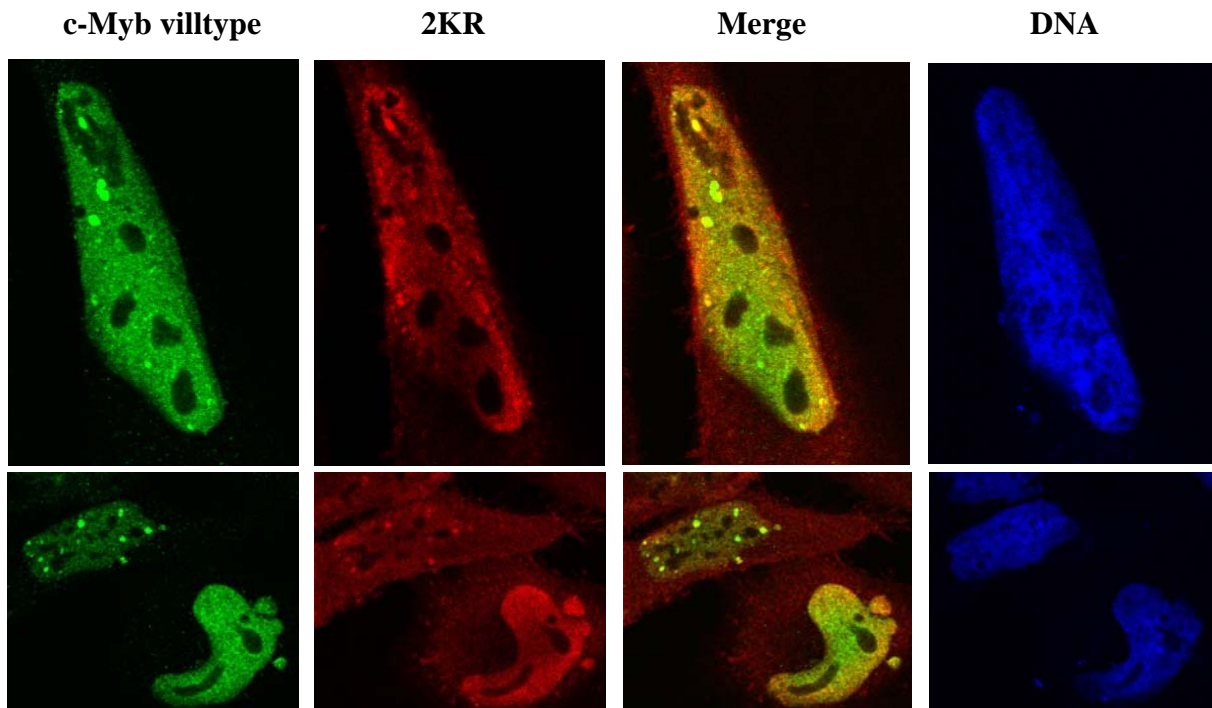
4.4.2 Subcellulær lokalisering av c-Myb-2KR og c-Myb villtype



Figur 4.16: HeLa celler kotransfektet med c-Myb-2KR-HA og 3×Flag-c-Myb. Grønn farge viser c-Myb-2KR-HA, mens rød viser 3×Flag-c-Myb. Kolonne tre er et merge bilde av kolonne 1 og 2. Kolonne 4 viser farging av cellekjernen (DNA).

Deretter ønsket vi å sammenlikne subcellulær lokalisering av den sumoyleringsdøde mutanten 2KR med villtype c-Myb. HeLa celler ble kotransfektet med c-Myb-2KR-HA og 3×Flag-c-Myb. Tilsvarende som i forrige forsøk lokaliseres begge proteinene til nukleoplasma og i kjernelegemer, men ikke til nukleoli. Det kan fra disse bildene (figur 4.16) tyde på at c-Myb-2KR-HA danner noe sterkere punktstruktur enn det 3×Flag-c-Myb gjør. Imidlertid ser c-Myb-2KR-HA og 3×Flag-c-Myb ut til å kolokalisere der det dannes punktstrukturer.

4.4.3 Subcellulær lokalisering av sumoyleringsdød mutant (c-Myb-2KR) og konstitutivt sumoylert c-Myb (c-Myb-SUMO)



Figur 4.17 HeLa celler kotransfektet med $3\times$ Flag-c-Myb-SUMO og c-Myb-2KR-HA. Grønn farge viser c-Myb-2KR-HA, mens rød viser $3\times$ Flag-c-Myb-SUMO. Kolonne tre er et merge bilde av kolonne 1 og 2. Kolonne 4 viser farging av cellekjernen (DNA).

Villtype c-Myb kolokaliserer både med 2KR og med c-Myb-SUMO. For å sammenlikne de to tilstandene og for å se om 2KR og c-Myb-SUMO lokaliserte til de samme kjernelegemene, ble HeLA celler kotransfektet med $3\times$ Flag-c-Myb-SUMO og c-Myb-2KR-HA. Fra disse bildene ser det ut til at c-Myb-2KR-HA har en tendens til å danne noe sterkere punktstruktur enn $3\times$ Flag-c-Myb-SUMO, dette varierer dog litt fra celle til celle og er ikke fullstendig entydig. Selv om c-Myb-2KR-HA ser ut til å danne noe sterkere punktstrukturer enn $3\times$ Flag-c-Myb-SUMO ser det ut til at de kolokaliserer i stor grad der det dannes punktstrukturer. En annen observasjon er at graden av punktstruktur dannelse varierer sterkt fra celle til celle. I figur 4.17, nedre rad er dette spesielt tydelig, hvor både $3\times$ Flag-c-Myb-SUMO og c-Myb-2KR-HA danner klare punktstrukturer i den ene cellen, mens de i den andre cellen fordeles jevnt utover kjernen. Disse dataene tyder med andre ord på at det er andre faktorer enn selve sumoyleringen av c-Myb som innvirker på c-Mybs subcellulære lokalisasjon.

5 Diskusjon

I diskusjonsdelen blir først problemstillingene som er fremlagt i kapittelet ”mål for oppgaven” prøvd besvart på bakgrunn av resultatdelen. Videre vil det bli fremlagt noen hypoteser på bakgrunn av oppgaven og det vil bli diskutert styrker og svakheter rundt valg av metoder. Tilslutt blir det fremlagt noen tanker rundt videre arbeid vi mener bør gjøres.

5.1 Diskusjon av problemstillingene

5.1.1 SUMO og represjon av transkripsjon - Problemstilling 1a og 1b

De to første spørsmålene vi ønsket å besvare ved hjelp av fusjonsstrategien var:

- 1a. Fører SUMO-konjugering av c-Myb til at c-Myb-avhengig transkripsjon represseres?
- 1b. Er denne effekten i tilfelle avhengig av hvor på c-Myb sumoyleringen skjer?

I denne oppgaven er det utført reporteraktiveringsassay for å se hvilken innvirkning SUMO-konjugering av c-Myb har på c-Myb avhengig transkripsjon. Resultatene fra oppgaven tyder på at sumoylering av c-Myb fører til en nedregulering av c-Myb avhengig transkripsjon når det sammenliknes med c-Myb villtype og c-Myb varianter som ikke kan konjugeres til SUMO. c-Myb varianter som ikke kan konjugeres til SUMO har gjennomgående 2 til 3 ganger høyere aktivitet en normal c-Myb. Når disse aktive formene fusjoneres til SUMO faller aktiviteten tilbake til samme nivå som villtype c-Myb. Det oppnåes en ytterligere represjon ved å fusjonere normal c-Myb med SUMO. Disse resultatene ser også ut til å være uavhengig av hvilken c-Myb-responsiv promoter som blir benyttet, da trendene fra resultatene som ble oppnådd ved å benytte *TRHR* ble reproduisert med 3×MRE-MYC promoteren.

Når det gjelder spørsmålet om den repressive effekten av SUMO-konjugering er uavhengig av hvor på c-Myb SUMO blir konjugert, tyder dataene fra c-Myb-2KR forsøkene i kapittel 5.3.1 på følgende: c-Myb-2KR-SUMO ser ut til å gi en betydelig klarere represjon sammenliknet med SUMO-c-Myb-2KR. Det ser med andre ord ut til fra dette forsøket at effekten av sumoylering av c-Myb er avhengig av hvor på c-Myb sumoyleringen skjer. Imidlertid observeres det i forsøket i kapittel 5.3.3, hvor c-Myb villtype sammenliknes med varianter hvor SUMO er fusjonert enten N- eller C-terminalt at effekten av å fusjonere SUMO til c-

Myb N- terminalt gir en ca. like stor repressiv effekt som for den C-terminale varianten. Dette peker i retning av en posisjonsuavhengig repressiv SUMO-effekt. En viktig forskjell i de to nevnte forsøkene er likevel at 2KR variantene ikke kan konjugere SUMO i utgangspunktet, slik at dette forsøket bare ser på effekten av en enkel SUMO-fusjonering til c-Myb. For forsøket i kapittel 4.3.3 er det viktig å merke seg at både c-Myb og c-Myb-SUMO fusjonskonstruktene også kan konjugeres til SUMO på de to lysin residuene i det negativt regulatoriske domenet, slik at det ligger mer usikkerhet rundt dette forsøket når det gjelder å konkludere med hva de observerte effektene skyldes. SUMO-c-Myb og c-Myb-SUMO kan i dette oppsettet for eksempel føre til at c-Myb konjugeres til tre forskjellige SUMO, mens det for naturlig sumoylert c-Myb maksimalt er to.

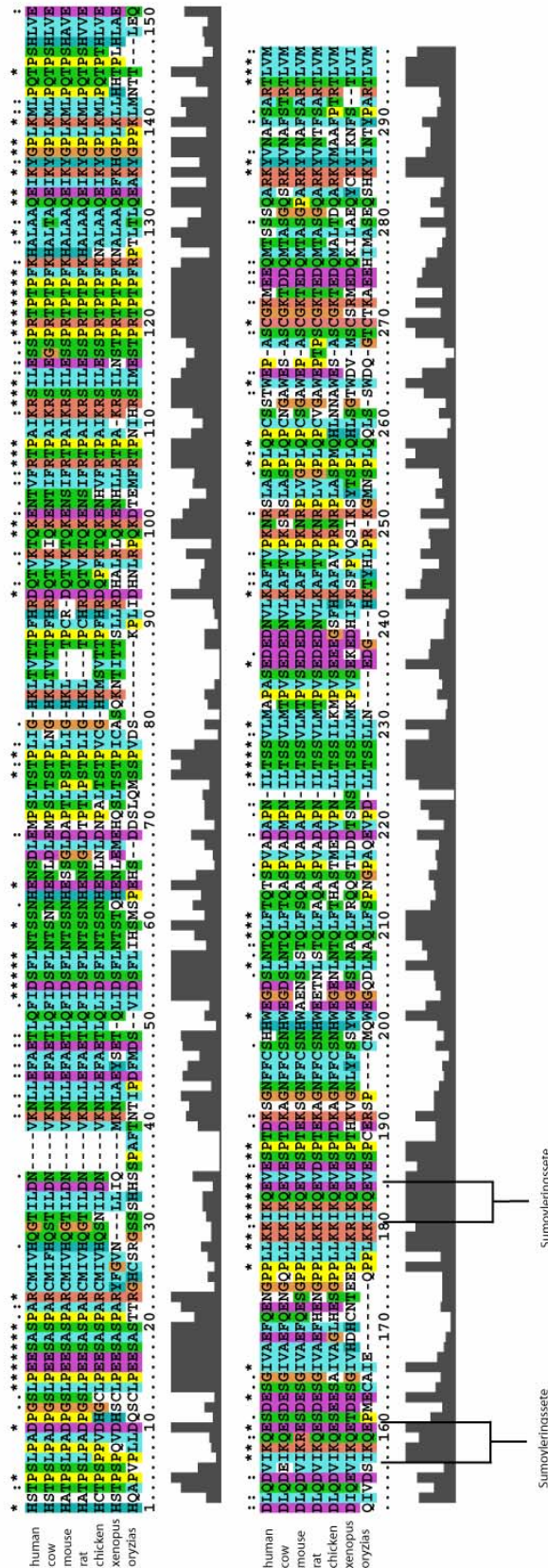
5.1.2 SUMO-konjugering og NRD's regulatoriske effekt - Problemstilling 1c

Denne ble formulert som følger: Kan SUMO-konjugering forklare NRD's negative regulatoriske effekt?

Det negative regulatoriske domenet (NRD) har fått sitt navn fra effekten domenet har på Myb-avhengig transkripsjon. Ved å deletere c-Mybs NRD viste det seg at aktiviteten av c-Myb avhengig transkripsjon øker i vårt system (Fig 4.11). Som vist i denne oppgaven ser SUMO ut til å ha en liknende effekt som NRD på c-Myb-avhengig transkripsjon. Dette er interessant fordi sumoyleringen av c-Myb er lokalisert på NRD. Vi stilte oss dermed spørsmålet om SUMO-konjugering kan forklare NRD's negative regulatoriske effekt. c-Myb-[1-443]-HA konstruktet som mangler store deler av NRD inkludert SUMO-konjugeringssetene ble sammenliknet med c-Myb-[1-443] SUMO fusjonsvarianter og c-Myb-HA. Fra dette forsøket viser det seg at effekten som observeres ved å deletere c-Mybs NRD oppveies ved å fusjonere det til SUMO. I reporteraktiveringsassay forsøket hvor SUMO fusjonskonstrukt med både c-Myb-2KR og c-Myb-[1-443] er benyttet, samsvarer effekten av å deletere NRD med effekten av å mutere SUMO-konjugeringssetene (2KR) i c-Myb. Denne effekten viser seg å oppveies ved å fusjonere SUMO C-terminalt både for c-Myb-2KR og c-Myb-[1-443]. Fra disse målingene ser det dermed ut til at den represserende effekten NRD domenet observeres å ha i c-Myb kan skyldes sumoylering alene. Dette støttes bare delvis av sekvenssammenligning mellom evolusjonært fjernliggende c-Myb proteiner (se fig 5.1 neste side). I denne figuren er det gjort en sammenligning av NRD sekvensen i c-Myb i forskjellige arter. *Oryzias* (Ricefish) er den arten som evolusjonært sett er lengst unna mennesket i denne

sammenligningen. I figuren ser en at NRD i disse to artene er høyst divergente, med noen konserverte områder. To av de konserverte områdene er de to sumoyleringssetene som er markert på figuren.

Sekevnssammenstilling av forskjellige arters c-Mybs NRD



Figur 5.1 Flørsekvenssammenstilling av forskjellige arters c-Mybs NRD. Sumoyleringssetene er markert på figuren. c-Myb's NRD er her definert som aminosyrene fra 351-640 for human c-Myb. Figuren er laget på bakgrunn av flørsekvenssammenstillinger i programmet Clustal X

At disse to områdene er så godt konserverte tyder på at sumoyleringen er meget viktig for NRD's funksjon, men også andre områder på NRD er høyt konserverte. En kan derfor ikke utelukke at andre mekanismer enn sumoylering kan være vel så viktig for NRD's funksjon. Vi kan med andre ord ikke se bort fra at det er andre aktiviteter knyttet til NRD som ikke fanges opp av vårt reporteraktiveringsassay. For å undersøke om NRD har andre vesentlige funksjoner enn som bærer av SUMO-konjugerings seter bør våre konstrukter testes i flere systemer.

5.1.3 c-Myb-SUMO, en dominant negativ? - Problemstilling 1d

Denne problemstillingen ble formulert som følger: Hvis c-Myb-SUMO viser seg å repressere c-Myb avhengig transkripsjon, opptrer fusjonen da bare som en svekket aktivator eller som aktiv repressor/dominant negativ?

Ut i fra hva som er kjent i litteraturen har vi ikke grunn for å anta at DNA-binding endres via sumoylering. Hvis denne antakelsen er korrekt burde c-Myb-2KR-SUMO og c-Myb-2KR konkurrere likeverdig om samme MREs. Om det er c-Myb-SUMO eller c-Myb-2KR som bindes til promoterene burde da bestemmes av mengdeforholdet mellom de to, såfremt det skjer en dynamisk on/off prosess på promoteren. Når c-Myb sitter der, burde denne aktivere. Når c-Myb-2KR-SUMO sitter der burde den i hvert fall aktivere mindre, eventuelt repressere. Vi forventet derfor at ved å tilsette c-Myb-2KR-SUMO i økende mengde skulle dette senke reporter aktiveringen i et system hvor c-Myb-2KR allerede var tilstede.

Et element som kan gi ulike scenarioer er om MREs er fullt okkupert eller ikke. Hvis alle MREs på promoteren er fullt okkupert skulle det skje en gradvis utskifting av c-Myb-2KR med c-Myb-2KR-SUMO og det skulle observeres en gradvis aktivitetssenkning. Hvis det finnes uokkuperte MRE, vil det forventes en addisjonseffekt ved tilsetting av c-Myb-2KR-SUMO.

Som vist på figur 4.14 observerte vi ingen av disse scenarioene. Det vi derimot så, var en mer enn additiv økning som følge av tilsatt c-Myb-2KR-SUMO. En mulig forklaring på dette er at det kunne være et synergistisk forhold mellom Myb-2KR og Myb-2KR-SUMO. Vi vet fra annet arbeid utført på gruppa av Ann-Kristin Molværsmyr at SUMO-fusjonen svekker synergien observert på multiple MRE, og dette er derfor lite sannsynlig.

Noen god forklaring på disse dataene har vi faktisk ikke, men vi mener likevel observasjonene er interessante. En mulig fortsettelse av dette prosjektet hadde vært å se hva som skjer hvis det utføres reporteraktiveringsassay i et oppsett med fast mengde c-Myb-2KR-SUMO tilsatt økende mengder av c-Myb-2KR.

5.1.4 SUMO og subcellulær lokalisasjon - Problemstilling 2a

Forandres den subcellulære lokalisasjonen av c-Myb i cellen avhengig om c-Myb er sumoylert eller ikke?

Basert på resultatene i kapittel 5.4 ser det ikke ut til at lokalisering av c-Myb i cellen er avhengig av om c-Myb er sumoylert eller ikke. Både 3×Flag-c-Myb-SUMO og c-Myb-2KR-HA danner punktstrukturer i noen celler mens de fordeles jevnt utover nukleoplasma i andre celler. Riktignok kan det se ut til at c-Myb-2KR-HA danner noe sterkere punktstrukturer enn 3×Flag-c-Myb og at c-Myb-HA danner noe sterkere punktstrukturer enn 3×Flag-c-Myb-SUMO. Likevel kan disse forskjellen muligens forklares ved at det benyttes forskjellig type antistoff mot de to tagene. En annen observasjon som understøtter dette er at i de cellene hvor det dannes punktstrukturer kolokaliserer også de forskjellige c-Myb variantene. Det ser med andre ord ut til at c-Myb lokaliseres til samme kjernelegemene uavhengig av om c-Myb er sumoylert eller ikke. Andre faktorer enn sumoylering ser ut til å styre den subcellulære lokalisasjonen av c-Myb. Disse faktorene kan kanskje være avhengig av celledyklus og forklare celle til celle variasjonen.

Strategien vi har benyttet i disse forsøkene er å lage en etterlikning av naturlig sumoylert c-Myb. c-myb-SUMO er som forklart tidligere ikke 100 % lik naturlig sumoylert c-Myb som blant annet har tre "haler", mens vårt fusjonerte c-Myb-2KR-SUMO protein er lineært. En annen angrepsvinkel ville være å sammenlikne c-Myb villtype og c-Myb-2KR kotransfektet med PIASy. PIASy øker sumoyleringen av c-Myb (Dahle et al., 2003) men har ingen effekt på c-Myb-2KR. Vi ville da kunne se på lokaliseringen av villtype c-Myb, hvor en stor andel av c-myb sannsynligvis ville være sumoylert og sammenlikne denne med lokaliseringen av 2KR. Ville de fremdeles være samlokalisert?

Et annet interessant forsøk ville være å lage c-Myb-SUMO fusjonsproteiner med ulike tagger som for eksempel GFP, YFP, RFP og CFP og se på lokaliseringen gjennom celledyklus over tid. Vil for eksempel c-Myb gå inn og ut av kjernelegemer?

I tillegg til at c-Myb inneholder to sumoyleringssteder, har forskningsgruppa ved hjelp av bioinformatiske verktøy basert på informasjon om potensielle SUMO bindingsmotiv (SBM) (Hecker et al., 2006) kommet frem til at c-Myb også inneholder to potensielle SUMO bindingssteder, det vil si to steder hvor SUMO kan bindes til c-Myb ikke-kovalent. Data presentert i Linn Troye Pettersen's sin masteroppgave tyder på at minst et av disse er funksjonelle. Det er tidligere vist at lokalisering av den transkripsjonelle korepressoren Daxx til PML kjernelegemer er avhengig av at et SUMO-bindingsmotiv på Daxx er intakt (Lin et al., 2006). På bakgrunn av dette kan det være interessant å se hvilken effekt en mutasjon av disse potensielle SMB har på den subcellulære lokaliseringen av c-Myb. Må både SUMO konjugeringssetene og SUMO bindingssetene muteres for at det skal observeres en forandring sammenliknet med c-Myb villtype? Siden den sumoyleringsdøde mutanten c-Myb-2KR kan binde SUMO ikke-kovalent er det fortsatt en mulighet for at SUMO-bindingen er nok for SUMO-avhengig lokalisering i cellen. Kanskje må både SUMO-konjugeringssetene og SBM i c-Myb muteres for at c-Myb skal være totalt fri for SUMO-interaksjon før det observeres en forandring i subcellulær lokalisasjon.

5.2 Diskusjon rundt oppgaven

5.2.1 Styrker og svakheter ved valg av fusjonsstrategien

Siden sumoylering er en dynamisk reversibel prosess valgte vi å benytte en fusjonsstrategi hvor SUMO er konstant fusjonert til c-Myb uten mulighet for SUMO spesifikke proteaser å dekonjugere SUMO-c-Myb fusjonen. Dette ga oss muligheten til å studere effekten av konstitutivt sumoylert c-Myb. Ved å ha tilgang til de forskjellige fusjonskonstruktene hadde vi et sett av verktøy hvor vi enkelt kunne sammenlikne c-Myb konstrukter som vi visste var konjugert med SUMO med c-Myb konstrukter som ikke kunne bli SUMO konjugert.

Det en likevel må ta i betraktning ved å benytte en slik strategi er at fusjonskonstruktene vi benytter ikke er identisk med naturlig sumoylert c-Myb. Det nye proteinet er bare en mimic, det vil si at det ikke er det samme som naturlig c-Myb. Det er derfor ikke sikkert at aktivitetsforandringene som observeres skyldes SUMO alene, siden SUMO fusjoneres til c-Myb et annet sted på c-Myb enn der hvor c-Myb naturlig blir sumoylert. c-Myb-2KR-SUMO fusjonskonstruktene er også lineære mot normalt konjugert SUMO som kan ha 3 "haler".

Fra en nylig utgitt artikkel (Jakobs et al., 2007) er det valgt en annen metode for å studere effekter av sumoylering av forskjellige substratproteiner kalt Ubc9 fusion-directed SUMOylation (UFDS). Angrepsmetoden går i detalj ut på å lage en fusjon av substratproteinene og E2 enzymet Ubc9 for dermed å øke sumoyleringen av substratproteinene betraktelig i cellen. Ved å benytte denne metoden vil man altså ha muligheten til å studere effekter av sumoylering som er nesten identisk til naturlig sumoylerte substratproteiner, siden metoden øker sumoyleringen av de naturlige akseptor-lysinene. Substratproteinene vil likevel være fusjonert til Ubc9, så heller ikke med denne metoden vil man få et produkt som er 100 % identisk med det naturlig sumoylerte proteinet. Dette er en metode som gruppa for øyeblikket vurderer å benytte seg av til å analysere effekter av sumoylering på c-Myb.

5.2.2 Tanker om videre arbeid som bør gjøres på dette prosjektet.

For å videre studere hvilke effekter sumoylering av c-Myb har, kan det være interessant å prøve ut metoder som går ut på å øke sumoyleringen i en celle uten å benytte seg av å fusjonere SUMO til c-Myb. UFDS metoden ser lovende selv om det gjenstår å se om den vil fungere for c-Myb.

For å sette prosjektet i et litt større perspektiv hadde det vært meget interessant å konjugere SUMO til kylling v-myb via en genfusjon, og så teste om det modifiserte oncogenet fremdeles inducerer leukemi i kylling eller om det var blitt mindre potent som onkogen. Det foreligger en del ulike observasjoner som tyder på at SUMO kan fungere som en tumor-suppressor og et slikt forsøk ville kunne være en direkte test på dette i Myb-systemet.

6 Vedlegg

6.1 Forkortelser

<i>c-MYB</i>	Genet som koder for det humane proteinet c-Myb
<i>c-Myb</i>	Genet som koder for proteinet c-Myb
AMV	“Avian myeloblastosis virus”
dNTP	Deoksyribonukleotidtrifosfat
BSA	Bovint serumalbumin
GTF	Generell transkripsjonsfaktor
PIC	Preinitsierings kompleks
TFIIB	Transkripsjonfaktor IIB
Inr	Initiator
DPE	Nedstrøms promoter element
HDAC	Histon deacetylase
ATP	Adenosintrifosfat
PTM	Posttranslasjonelle proteinmodifiseringer
c-Jun	Komponent i de transkripsjonelle komplekset AP-1 (Activator Protein-1)
PML	“Promyelocytic leukaemia”
SMT3	“Suppressor of Mif Two 3”
Ubl	Ubiquitin liknende
Aos1	Komponent i sentrin aktiverende enzymkompleks
Uba2	Komponent i sentrin aktiverende enzymkompleks
SAE1/2	“SUMO-1 activating enzyme subunit 1/2AMP”
Ubc9	“Ubiquitin Conjugating Enzyme 9”
RanGAP1	“Ran GTPase activating protein 1”
STAT	“Signal transducer and activator of transcription”
PIAS	“Protein inhibitor of activated STAT’s Pc2”
CtBP	“C-terminal Binding Protein”
SENP	“SUMO-specific Proteases”
Daxx	“Death domain-associated protein”
FBS	Fetal bovint serum
IκB	“Inhibitor of (NFκB) Nuclear Factor-κB”

NB	“Nuclear Body”
HSF1/HSF2	“Heat shock factor-1/2”
<i>v-myb</i>	Genet som koder for det virale proteinet v-Myb
HIPK2	“Homeodomain-interacting protein kinase 2”
TAD	Transaktiverende domene
<i>A-myb</i>	Genet som koder for A-Myb
<i>B-myb</i>	Genet som koder for B-Myb
DBD	DNA-bindingsdomene
EVES	Motiv i det negative regulatoriske domenet til c-Myb
FAETL	Motiv i det negative regulatoriske domenet til c-Myb
NRD	Negativt regulatorisk domene
TP	Motiv i det negative regulatoriske domenet
Bcl-2	”B-cell lymphoma protein 2”
CK2	Kasein kinase 2
AMP	Adenosinmonofosfat
CBP	“CREB binding protein”
Rag2	“Recombination activating gene 2”
mim-1	“Myb induced myeloid protein-1”
<i>TRHR</i>	“Thyrotropin-releasing hormone receptor”
R1, R2, R3	Repetisjoner i Mybs DBD
ddNTP	Dideoksyribonukleosidtrifosfat
mM	Millimolar
TEMED	Tetrametyletylendiamin
Oligo	Oligonukleotid
CV-1	Cellelinje fra <i>Cercopithecus actiops</i>
C-terminal	Karboksyterminal
N-terminal	Aminoterminal
APS	Ammoniumpersulfat
NaCl	Natriumklorid
NaOH	Natriumhydroksid
SDS	“Sodiumdodecylsulfat”
hcM	Humant c-Myb
HA	Hemagglutinin
FLAG	Kommersiell tag

GFX	Glass Fiber Matrix
PAGE	Polyakrylamidgelelektroforese
PFA	paraformaldehyd
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
RNAPII	RNA polymerase II
kD	Kilodalton
kb	Kilobaser
Rcf	“Relative centrifugal force”

Forkortelser for aminosyrer

A = Alanin = Alanin
C = Cys = Cystein
D = Asp = Asparagin syre
E = Glu = Glutamin syre
F = Phe = Fenylalanin
G = Gly = Glysin
H = His = Histidin
I = Ile = Isoleucin
K = Lys = Lysin
L = Leu = Leucin
M = Met = Metionin
N = Asn = Asparagin
P = Pro = Prolin
Q = Gln = Glutamin
R = Arg = Arginin
S = Ser = Serin
T = Thr = Treonin
Y = Tyr = Tyrosin
V = Val = Valin
W = Trp = Tryptofan

Forkortelser for basene i DNA

A = Adenin
C = Cytosin
G = Guanin
T = Tymin
Y = C eller T (pyrimidin)
R = A eller G (purin)
K = G eller T
W = A eller T
S = C eller G
B = C, G eller T

D = A, G eller T
H = A, C eller T
V = A, C eller G
N = A, C, G eller T

6.2 Oppskrifter

Agarosegel

Agarose løses i 1xTAE til ønsket prosent

LB-medium

10 g trypton
5 g Gjærekstrakt
10 g NaCl
H₂O til 1000 ml
pH justeres til 7,2 med 250-300 ml 10 M NaOH
Autoklaveres
Tilsett evt. antibiotika når mediumet er under 50 °C
-Ampicillin, 100 mg/ml (1 ml 100 mg/ml til 1 l medium)
-Kloramfenikol, 25 mg/ml (1 ml 25 mg/ml til 1 l medium)

LB-skåler

400 ml LB-medium (uten antibiotika)
6,0 g agar
Autoklaveres og avkjøles til ca. 50 °C
Tilsett evt. antibiotika (se under LB-medium)

Minusbuffer (til blotting)

500 ml Plussbuffer
2,62 g e-Amino-n-Caproic Acid (Sigma)

4 % paraformaldehyd (PFA)

Vei opp 2 g i avtrekk
Tilsett 50 ml PBS
For å løse alt, tilsett 2-3 NaOH pellets
Juster pH tilbake til 7,5-8

Pluss buffer (til blotting)

3 g Tris
20% metanol
dH₂O til 1 liter

10% SDS

5 g SDS (Sodiumdodecylsulfat)
dH₂O til 500 ml
Blandes ved risting eller ved magnetrører

SDS-appliseringsbuffer (3x)

6,0 ml 10% SDS (Sodiumdodecylsulfat)

1,0 ml kons. β -mercaptoetanol
5,0 ml 85% Glyserol
0,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (Øvre Buffer)
Noen korn bromfenolblått
Lagres i kjøleskap

SDS polyakrylamidgel (SDS PAGE)

Liten gel (dobles for stor gel):

10% Separerende gel:

4 ml 40% akrylamid, C=2,7 %
4 ml Nedrebuffer
8 ml dH₂O
160 μ l 10% SDS
50 μ l 10% APS
10 μ l TEMED

Konsentrerende gel:

1,25 ml 40% akrylamid, C=2,7 %
2,5 ml øvrebuffer
6,25 ml dH₂O
100 μ l 10% SDS
30 μ l APS
10 μ l TEMED

10x TBS-T

50 ml 1M Tris-HCl pH 8 (100 ml)
150 ml 5M NaCl (1,5 M)
2,5 ml Tween 20 (0,5%)
dH₂O til 500 ml

1xTBS-T m/melk

50 ml 10x TBS-T
25 g melkepulver
dH₂O til 500 ml

5 mM dNTP

5 μ l av hver a de fire dNTP (100 mM hver)
80 μ l TE

Nedre Buffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)

90,83 g Tris base (MW 121,1 g/mol)
H₂O til 400 ml
Juster pH til 8,8 med kons. HCl
Juster volumet til 500ml med H₂O
Autoklaveres

Øvre buffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)

30,28 g Tris base (MW 121,1 g/mol)
Løses i H₂O til 400 ml

pH justeres til 6,8 med konsentrerende HCl
Volumet justeres til 500 ml med H₂O
Autoklaveres

TE-Buffer

5 mL 1 M Tris-HCl pH 8,0
1 mL 0,5 M EDTA
dH₂O til 500 mL
Autoklaveres
(Fortynnes 1:10 før bruk)

Medium til dyrking av CV1 celler

1 flaske DMEM (500 ml)
Fjern 50 ml av mediet
Tilsett 50 ml FBS ("fetal bovine serum") og 5 ml penicillin

50% Glyserol (200 ml)

115 ml 87% Glyserol
dH₂O til 200 ml

5 M NaCl (250 ml)

Løs 73,05 g NaCl i 200 ml H₂O
Tilpass til 250 ml
Autoklaver

6.3 Materialer

Enzymer

DNA polymerase I Klenow-fragment, New England Biolabs

Restriksjonsenzymer

AflIII

EcoRI

XhoI

SalI

PshAI

NotI

BamHI

T4 DNA-ligase, New England Biolabs

Buffer

NEBbuffer EcoRI, New England Biolabs

NEBbuffer2, New England Biolabs

NEBbuffer3, New England Biolabs

NEBbuffer4, New England Biolabs

T4 DNA-ligase buffer, New England Biolabs

Kit

FuGENE6 Transfection Reagent, Roche Applied Sciences

Genopure Plasmid Maxi Kit, Roche Applied Science

GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Pharmacia

Luciferase Assay System, Promega

Micro Plasmid Prep Kit, Amersham Biosciences

ELC Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare

Diverse

1kb ladder, Invitrogen

3 MM papir, Whatman

6 MM papir, Whatman

Antibiotika:

Ampicillin, Sigma

Kloramfenikol, Sigma

Penicillin, Invitrogen

BSA, New England Biolabs

DMEM, Invitrogen

dNTP, Amersham Pharmacia Biotech

FBS, BioWest

High DNA Mass Ladder, Invitrogen

MicroSpin G-25 Columns, Amersham Pharmacia Biotech

Precision Plus ProteinTM Dual Color Standard, BioRad

Hyperfilm, GE Healthcare

6.4 Oligosekvenser

Plasmidkonstruksjon

c126

5'- cggcgtggatcctgcagttatcaAGGGTTTAGTACTTTCTGCCATCG - 3'

SUMO-myb F1 (I058)

5'- tcaaccttGTCGACgaagccaccgcatcATGTCTGA – 3'

SUMO-myb R1 (I059)

5'- acttaaggagtcgactCCCCGTTTGTTTCCTGATAAACTTC – 3'

SUMO-myb F2 (I060)

5'- tggtcATGTCTGACCAGGAGGCAAAACCT - 3'

SUMO-myb R2 (I061)

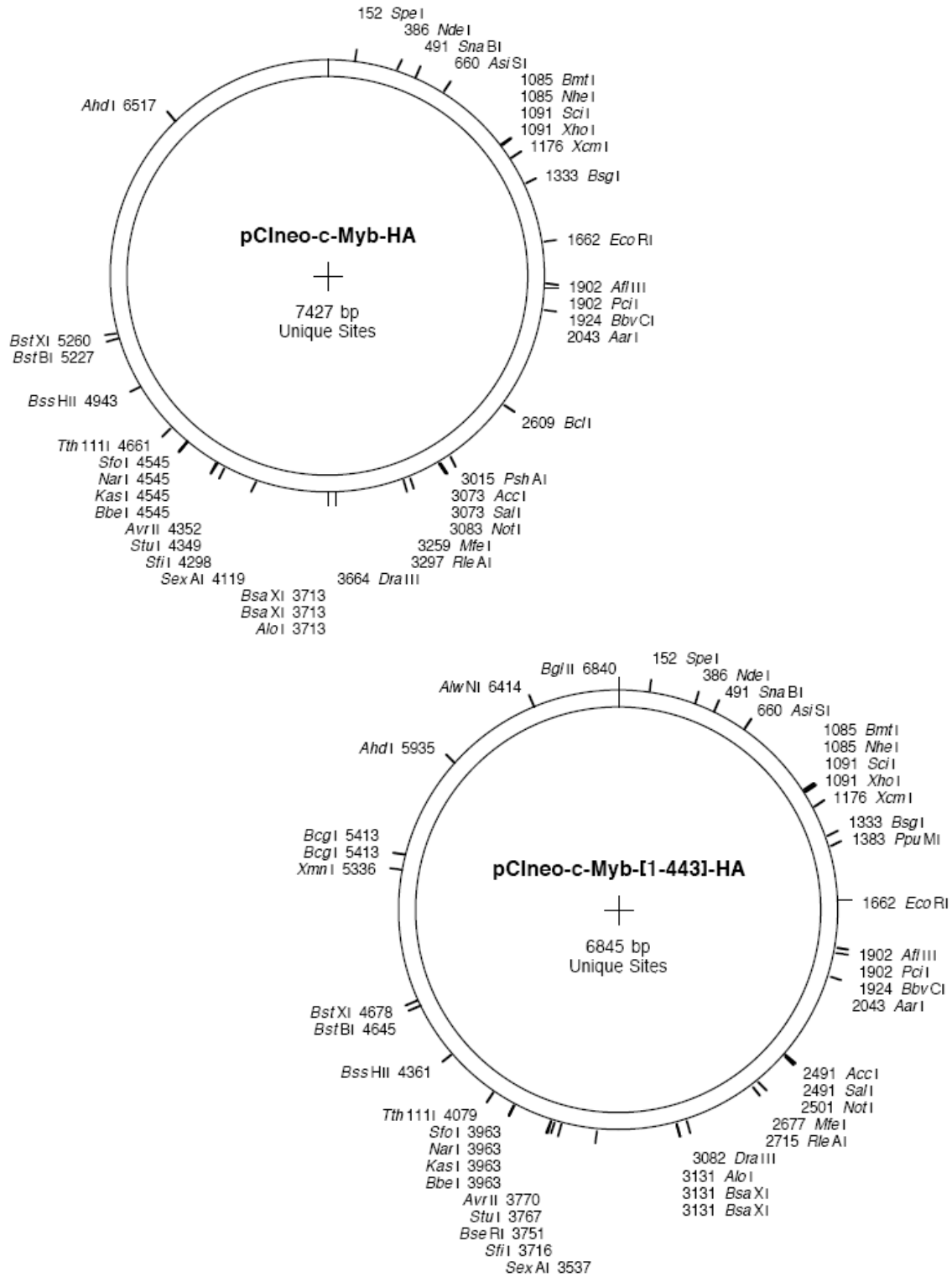
5'- agaacttaaggagtcgactctattaCCCCGTTTGTTTCCTGATAAACTTC – 3'

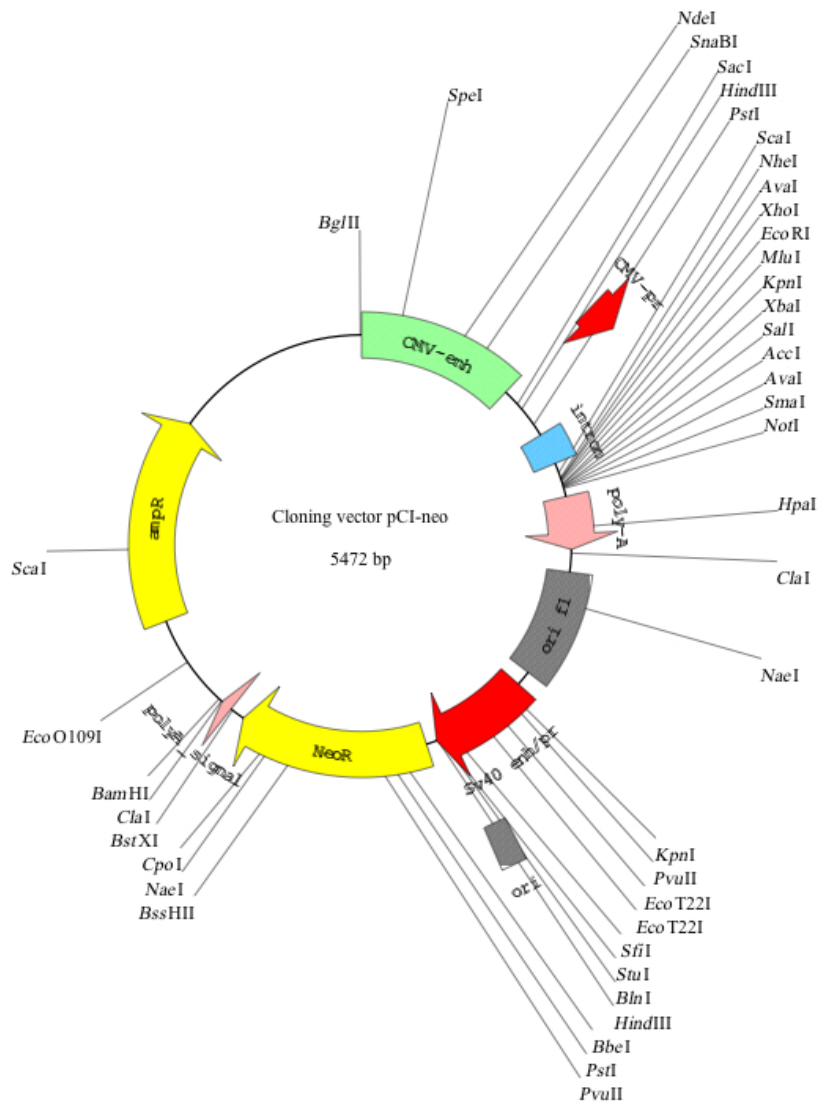
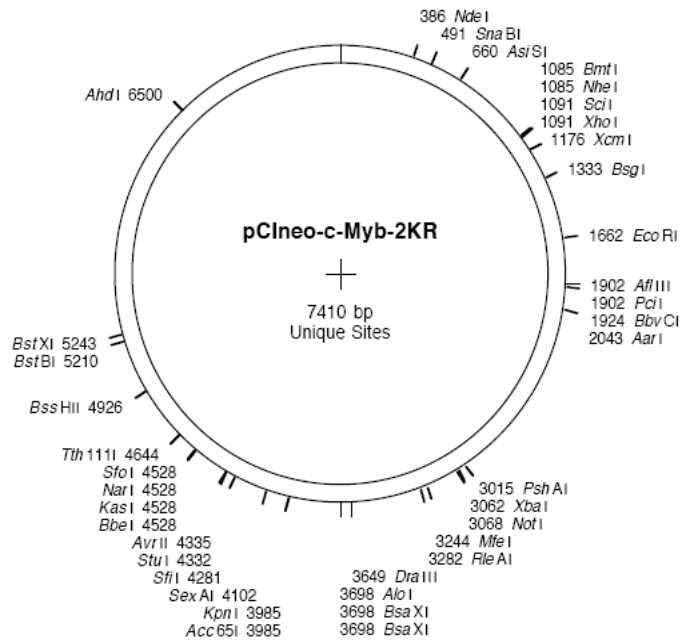
S082

5'- GACATCCACTTTGCCTTTCTCTCC – 3'

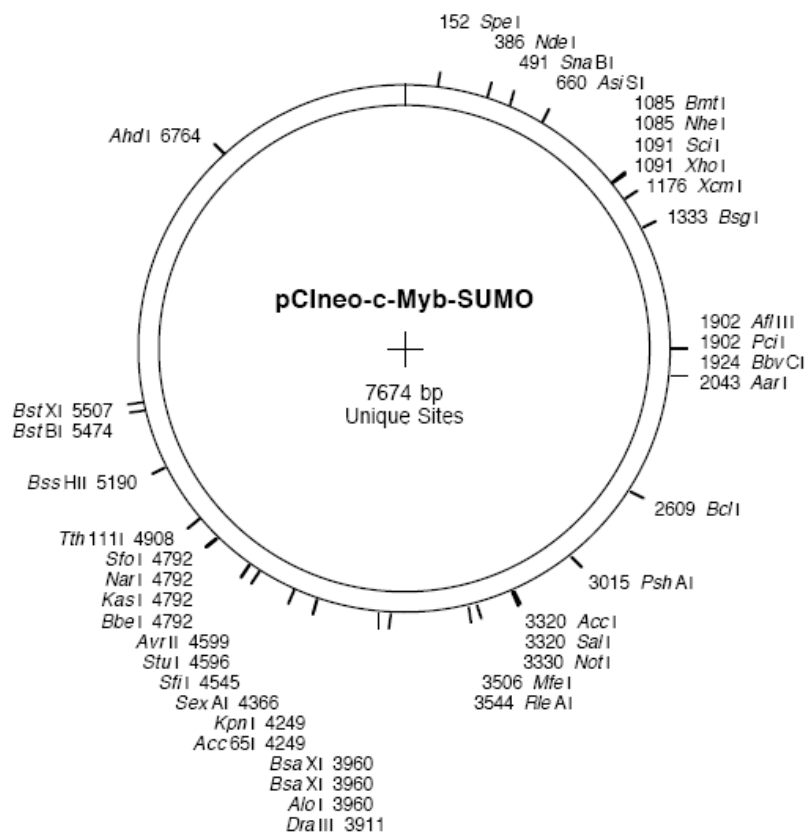
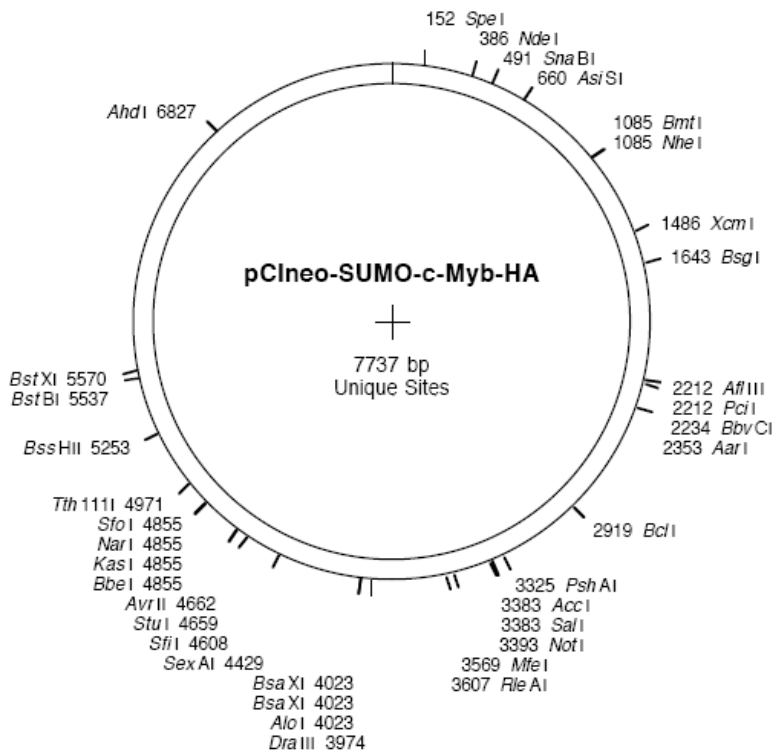
6.5 Plasmidkart

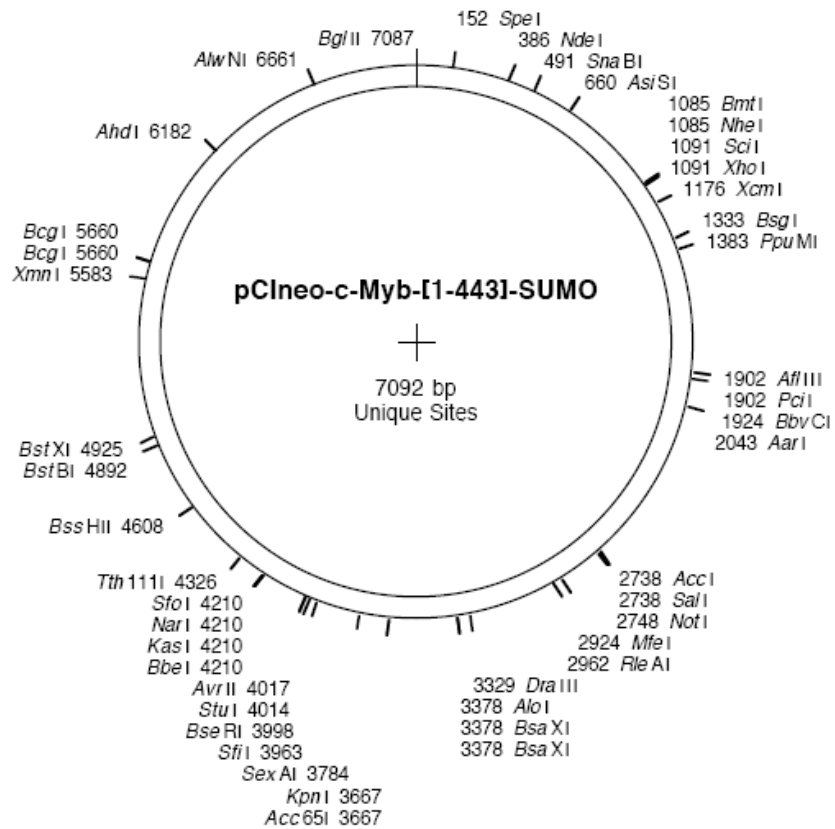
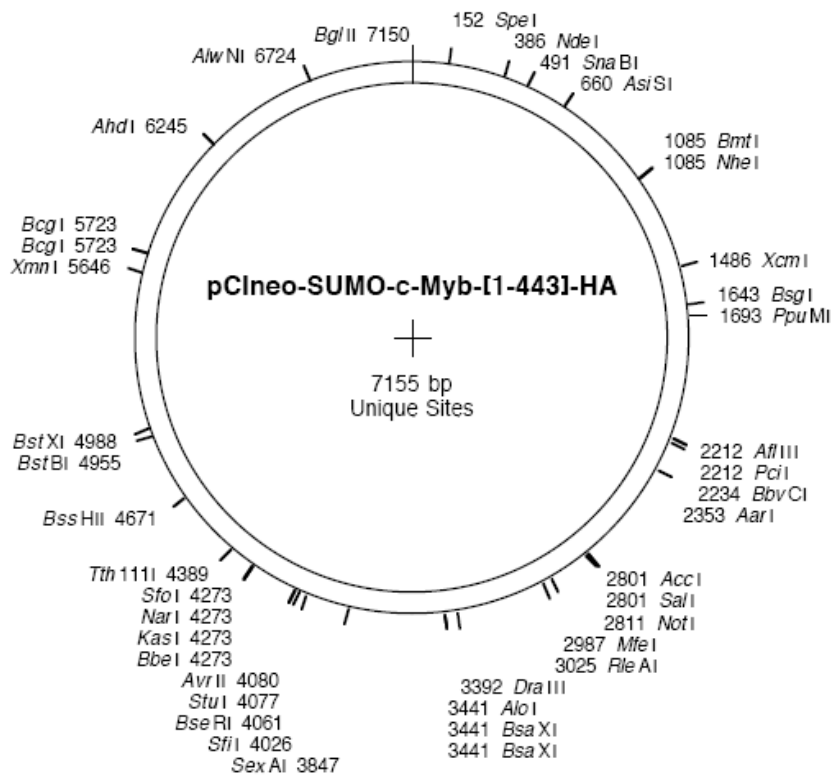
Plasmidene under er tidligere konstruert av andre og er benyttet i dette prosjektet. Plasmidkartene er konstruert i programmet ”DNA Strider”.

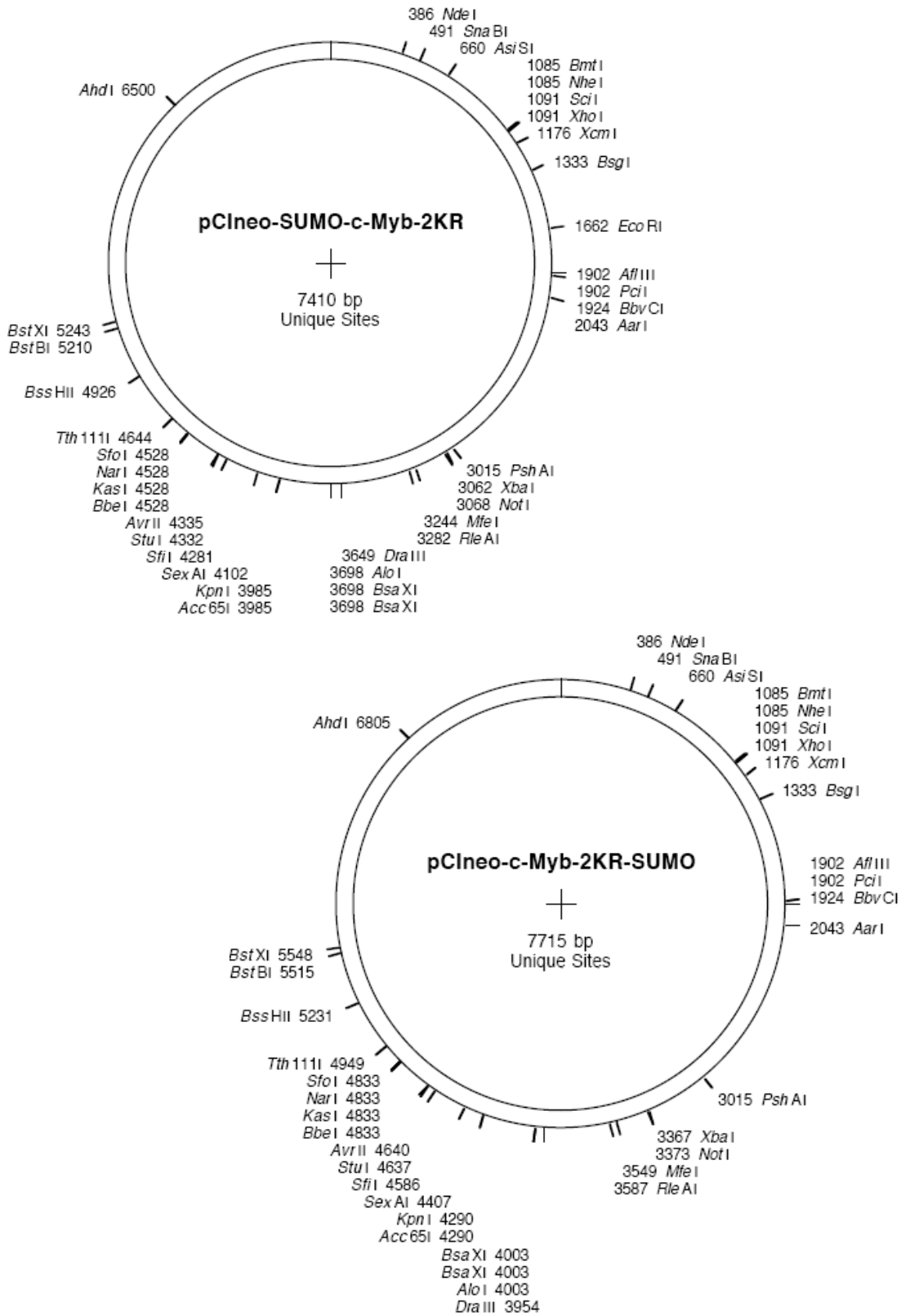




Plasmidene under er alle konstruert i dette prosjektet. Plasmidkartene er konstruert i programmet "DNA Strider".







7 Referanseliste

Adhikary, S., and Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nature reviews* 6, 635-645.

Allen, S.C., and Hebbes, T.R. (2003). Myb induced myeloid protein 1 (Mim-1) is an acetyltransferase. *FEBS letters* 534, 119-124.

Andersson, K.B., Kowenz-Leutz, E., Brendeford, E.M., Tygset, A.H., Leutz, A., and Gabrielsen, O.S. (2003). Phosphorylation-dependent down-regulation of c-Myb DNA binding is abrogated by a point mutation in the v-myb oncogene. *The Journal of biological chemistry* 278, 3816-3824.

Bender, T.P., Kremer, C.S., Kraus, M., Buch, T., and Rajewsky, K. (2004). Critical functions for c-Myb at three checkpoints during thymocyte development. *Nature immunology* 5, 721-729.

Berge, T. (2003). The transcription factor c-Myb meets chromatin - definition of response elements, occupancy of promoters and interaction with a remodelling co-factor (Unipub AS).

Bies, J., Feikova, S., Markus, J., and Wolff, L. (2001). Phosphorylation-dependent conformation and proteolytic stability of c-Myb. *Blood cells, molecules & diseases* 27, 422-428.

Bies, J., Markus, J., and Wolff, L. (2002). Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity. *The Journal of biological chemistry* 277, 8999-9009.

Bies, J., Mukhopadhyaya, R., Pierce, J., and Wolff, L. (1995). Only late, nonmitotic stages of granulocyte differentiation in 32Dcl3 cells are blocked by ectopic expression of murine c-myb and its truncated forms. *Cell Growth Differ* 6, 59-68.

Bies, J., and Wolff, L. (1997). Oncogenic activation of c-Myb by carboxyl-terminal truncation leads to decreased proteolysis by the ubiquitin-26S proteasome pathway. *Oncogene* 14, 203-212.

Bohren, K.M., Nadkarni, V., Song, J.H., Gabbay, K.H., and Owerbach, D. (2004). A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *The Journal of biological chemistry* 279, 27233-27238.

Brendeford, E.M., Myrset, A.H., Hegvold, A.B., Lundin, M., and Gabrielsen, O.S. (1997). Oncogenic point mutations induce altered conformation, redox sensitivity, and DNA binding in the minimal DNA binding domain of avian myeloblastosis virus v-Myb. *The Journal of biological chemistry* 272, 4436-4443.

Brivanlou, A.H., and Darnell, J.E., Jr. (2002). Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295, 813-818.

- Brown, T.A. (1999). *Genomes* (John Wiley & Sons, Ltd).
- Butler, J.E., and Kadonaga, J.T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes & development* *16*, 2583-2592.
- Chayka, O., Kintscher, J., Braas, D., and Klempnauer, K.H. (2005). v-Myb mediates cooperation of a cell-specific enhancer with the mim-1 promoter. *Molecular and cellular biology* *25*, 499-511.
- Cheng, J., Bawa, T., Lee, P., Gong, L., and Yeh, E.T. (2006). Role of desumoylation in the development of prostate cancer. *Neoplasia* (New York, N.Y. *8*, 667-676.
- Clark, R.S., Bayir, H., and Jenkins, L.W. (2005). Posttranslational protein modifications. *Critical care medicine* *33*, S407-409.
- Clarke, M.F., Kukowska-Latallo, J.F., Westin, E., Smith, M., and Prochownik, E.V. (1988). Constitutive expression of a c-myb cDNA blocks Friend murine erythroleukemia cell differentiation. *Molecular and cellular biology* *8*, 884-892.
- Dahle, O., Andersen, T.O., Nordgard, O., Matre, V., Del Sal, G., and Gabrielsen, O.S. (2003). Transactivation properties of c-Myb are critically dependent on two SUMO-1 acceptor sites that are conjugated in a PIASy enhanced manner. *European journal of biochemistry / FEBS* *270*, 1338-1348.
- Dahle, O., Bakke, O., and Gabrielsen, O.S. (2004). c-Myb associates with PML in nuclear bodies in hematopoietic cells. *Experimental cell research* *297*, 118-126.
- Dash, A.B., Orrico, F.C., and Ness, S.A. (1996). The EVES motif mediates both intermolecular and intramolecular regulation of c-Myb. *Genes & development* *10*, 1858-1869.
- Desterro, J.M., Rodriguez, M.S., and Hay, R.T. (1998). SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Molecular cell* *2*, 233-239.
- Dini, P.W., and Lipsick, J.S. (1993). Oncogenic truncation of the first repeat of c-Myb decreases DNA binding in vitro and in vivo. *Molecular and cellular biology* *13*, 7334-7348.
- Dohmen, R.J. (2004). SUMO protein modification. *Biochimica et biophysica acta* *1695*, 113-131.
- Duprez, E., Saurin, A.J., Desterro, J.M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M.N., Solomon, E., de The, H., Hay, R.T., and Freemont, P.S. (1999). SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *Journal of cell science* *112* (Pt 3), 381-393.
- Emerson, B.M. (2002). Specificity of gene regulation. *Cell* *109*, 267-270.
- Feikova, S., Wolff, L., and Bies, J. (2000). Constitutive ubiquitination and degradation of c-myb by the 26S proteasome during proliferation and differentiation of myeloid cells. *Neoplasia* *47*, 212-218.
- Frampton, J., Ramqvist, T., and Graf, T. (1996). v-Myb of E26 leukemia virus up-regulates bcl-2 and suppresses apoptosis in myeloid cells. *Genes & development* *10*, 2720-2731.

- Fu, S.L., and Lipsick, J.S. (1996). FAETL motif required for leukemic transformation by v-Myb. *Journal of virology* 70, 5600-5610.
- Gabrielsen, O.S., Sentenac, A., and Fromageot, P. (1991). Specific DNA binding by c-Myb: evidence for a double helix-turn-helix-related motif. *Science* 253, 1140-1143.
- Ganter, B., and Lipsick, J.S. (1999). Myb and oncogenesis. *Advances in cancer research* 76, 21-60.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O.A., Thain, A., Anderson, L.A., Snowden, A.W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N.D., and Hay, R.T. (2003). P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Molecular cell* 11, 1043-1054.
- Gong, L., Millas, S., Maul, G.G., and Yeh, E.T. (2000). Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease. *The Journal of biological chemistry* 275, 3355-3359.
- Gong, L., and Yeh, E.T. (2006). Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *The Journal of biological chemistry* 281, 15869-15877.
- Goodson, M.L., Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M.J., Park-Sarge, O.K., and Sarge, K.D. (2001). Sumo-1 modification regulates the DNA binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor. *The Journal of biological chemistry* 276, 18513-18518.
- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S.E., Scheffner, M., and Del Sal, G. (1999). Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *The EMBO journal* 18, 6462-6471.
- Guehmann, S., Vorbrueggen, G., Kalkbrenner, F., and Moelling, K. (1992). Reduction of a conserved Cys is essential for Myb DNA-binding. *Nucleic acids research* 20, 2279-2286.
- Hay, R.T. (2004). Modifying NEMO. *Nature cell biology* 6, 89-91.
- Hay, R.T. (2005). SUMO: a history of modification. *Molecular cell* 18, 1-12.
- Hecker, C.M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P., and Dikic, I. (2006). Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *The Journal of biological chemistry* 281, 16117-16127.
- Herskowitz, I. (1987). Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* 329, 219-222.
- Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M.J., Mayhew, C.N., Goodson, M.L., Park-Sarge, O.K., and Sarge, K.D. (2001). Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *The Journal of biological chemistry* 276, 40263-40267.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.

- Jakobs, A., Koehnke, J., Himstedt, F., Funk, M., Korn, B., Gaestel, M., and Niedenthal, R. (2007). Ubc9 fusion-directed SUMOylation (UFDS): a method to analyze function of protein SUMOylation. *Nat Methods*.
- Janssen, K., Hofmann, T.G., Jans, D.A., Hay, R.T., Schulze-Osthoff, K., and Fischer, U. (2006). Apoptin is modified by SUMO conjugation and targeted to promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Oncogene*.
- Johnson, E.S., and Blobel, G. (1997). Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *The Journal of biological chemistry* 272, 26799-26802.
- Joseph, J., Tan, S.H., Karpova, T.S., McNally, J.G., and Dasso, M. (2002). SUMO-1 targets RanGAP1 to kinetochores and mitotic spindles. *The Journal of cell biology* 156, 595-602.
- Lemon, B., and Tjian, R. (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes & development* 14, 2551-2569.
- Levine, M., and Tjian, R. (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424, 147-151.
- Lin, D.Y., Huang, Y.S., Jeng, J.C., Kuo, H.Y., Chang, C.C., Chao, T.T., Ho, C.C., Chen, Y.C., Lin, T.P., Fang, H.I., *et al.* (2006). Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Molecular cell* 24, 341-354.
- Lin, X., Sun, B., Liang, M., Liang, Y.Y., Gast, A., Hildebrand, J., Brunnicardi, F.C., Melchior, F., and Feng, X.H. (2003). Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. *Molecular cell* 11, 1389-1396.
- Little, P.F. (2005). Structure and function of the human genome. *Genome research* 15, 1759-1766.
- Luscher, B., Christenson, E., Litchfield, D.W., Krebs, E.G., and Eisenman, R.N. (1990). Myb DNA binding inhibited by phosphorylation at a site deleted during oncogenic activation. *Nature* 344, 517-522.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual*, Vol Vol I, II, III, 2nd edition edn (Long Island, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Matre, V., Hovring, P.I., Fjeldheim, A.K., Helgeland, L., Orvain, C., Andersson, K.B., Gautvik, K.M., and Gabrielsen, O.S. (2003). The human neuroendocrine thyrotropin-releasing hormone receptor promoter is activated by the haematopoietic transcription factor c-Myb. *The Biochemical journal* 372, 851-859.
- Mucenski, M.L., McLain, K., Kier, A.B., Swerdlow, S.H., Schreiner, C.M., Miller, T.A., Pietryga, D.W., Scott, W.J., Jr., and Potter, S.S. (1991). A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* 65, 677-689.
- Muller, S., Berger, M., Lehembre, F., Seeler, J.S., Haupt, Y., and Dejean, A. (2000). c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *The Journal of biological chemistry* 275, 13321-13329.

- Myrset, A.H., Bostad, A., Jamin, N., Lirsac, P.N., Toma, F., and Gabrielsen, O.S. (1993). DNA and redox state induced conformational changes in the DNA-binding domain of the Myb oncoprotein. *The EMBO journal* *12*, 4625-4633.
- Ness, S.A. (1996). The Myb oncoprotein: regulating a regulator. *Biochimica et biophysica acta* *1288*, F123-139.
- New England Biolabs, I. (2004). 2005-06 Catalog & Technical Reference (New England Biolabs, Inc).
- Nomura, T., Sakai, N., Sarai, A., Sudo, T., Kanei-Ishii, C., Ramsay, R.G., Favier, D., Gonda, T.J., and Ishii, S. (1993). Negative autoregulation of c-Myb activity by homodimer formation through the leucine zipper. *The Journal of biological chemistry* *268*, 21914-21923.
- Oh, I.H., and Reddy, E.P. (1999). The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene* *18*, 3017-3033.
- Ording, E., Kvavik, W., Bostad, A., and Gabrielsen, O.S. (1994). Two functionally distinct half sites in the DNA-recognition sequence of the Myb oncoprotein. *European journal of biochemistry / FEBS* *222*, 113-120.
- Ramsay, R.G., Morrice, N., Van Eeden, P., Kanagasundaram, V., Nomura, T., De Blaquiére, J., Ishii, S., and Wettenhall, R. (1995). Regulation of c-Myb through protein phosphorylation and leucine zipper interactions. *Oncogene* *11*, 2113-2120.
- Reese, J.C. (2003). Basal transcription factors. *Current opinion in genetics & development* *13*, 114-118.
- Ross, S., Best, J.L., Zon, L.I., and Gill, G. (2002). SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Molecular cell* *10*, 831-842.
- Sakura, H., Kanei-Ishii, C., Nagase, T., Nakagoshi, H., Gonda, T.J., and Ishii, S. (1989). Delineation of three functional domains of the transcriptional activator encoded by the c-myb protooncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *86*, 5758-5762.
- Sala, A., Casella, I., Grasso, L., Bellon, T., Reed, J.C., Miyashita, T., and Peschle, C. (1996). Apoptotic response to oncogenic stimuli: cooperative and antagonistic interactions between c-myb and the growth suppressor p53. *Cancer research* *56*, 1991-1996.
- Salomoni, P., Perrotti, D., Martinez, R., Franceschi, C., and Calabretta, B. (1997). Resistance to apoptosis in CTLL-2 cells constitutively expressing c-Myb is associated with induction of BCL-2 expression and Myb-dependent regulation of bcl-2 promoter activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 3296-3301.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *74*, 5463-5467.
- Sano, Y., and Ishii, S. (2001). Increased affinity of c-Myb for CREB-binding protein (CBP) after CBP-induced acetylation. *The Journal of biological chemistry* *276*, 3674-3682.

- Schmidt, M., Nazarov, V., Stevens, L., Watson, R., and Wolff, L. (2000). Regulation of the resident chromosomal copy of c-myc by c-Myb is involved in myeloid leukemogenesis. *Molecular and cellular biology* 20, 1970-1981.
- Selvakumaran, M., Lin, H.K., Sjin, R.T., Reed, J.C., Liebermann, D.A., and Hoffman, B. (1994). The novel primary response gene MyD118 and the proto-oncogenes myb, myc, and bcl-2 modulate transforming growth factor beta 1-induced apoptosis of myeloid leukemia cells. *Molecular and cellular biology* 14, 2352-2360.
- Steffan, J.S., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E., Trotman, L.C., Slepko, N., Illes, K., Lukacsovich, T., Zhu, Y.Z., Cattaneo, E., *et al.* (2004). SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* 304, 100-104.
- Tanaka, K., Nishide, J., Okazaki, K., Kato, H., Niwa, O., Nakagawa, T., Matsuda, H., Kawamukai, M., and Murakami, Y. (1999). Characterization of a fission yeast SUMO-1 homologue, pmt3p, required for multiple nuclear events, including the control of telomere length and chromosome segregation. *Molecular and cellular biology* 19, 8660-8672.
- Tanikawa, J., Yasukawa, T., Enari, M., Ogata, K., Nishimura, Y., Ishii, S., and Sarai, A. (1993). Recognition of specific DNA sequences by the c-myb protooncogene product: role of three repeat units in the DNA-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 9320-9324.
- Taylor, D., Badiani, P., and Weston, K. (1996). A dominant interfering Myb mutant causes apoptosis in T cells. *Genes & development* 10, 2732-2744.
- Thomas, M.D., Kremer, C.S., Ravichandran, K.S., Rajewsky, K., and Bender, T.P. (2005). c-Myb is critical for B cell development and maintenance of follicular B cells. *Immunity* 23, 275-286.
- Todokoro, K., Watson, R.J., Higo, H., Amanuma, H., Kuramochi, S., Yanagisawa, H., and Ikawa, Y. (1988). Down-regulation of c-myb gene expression is a prerequisite for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 8900-8904.
- Tomita, A., Towatari, M., Tsuzuki, S., Hayakawa, F., Kosugi, H., Tamai, K., Miyazaki, T., Kinoshita, T., and Saito, H. (2000). c-Myb acetylation at the carboxyl-terminal conserved domain by transcriptional co-activator p300. *Oncogene* 19, 444-451.
- Wang, Q.F., Lauring, J., and Schlissel, M.S. (2000). c-Myb binds to a sequence in the proximal region of the RAG-2 promoter and is essential for promoter activity in T-lineage cells. *Molecular and cellular biology* 20, 9203-9211.
- Weston, K., and Bishop, J.M. (1989). Transcriptional activation by the v-myb oncogene and its cellular progenitor, c-myb. *Cell* 58, 85-93.
- Woychik, N.A., and Hampsey, M. (2002). The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* 108, 453-463.
- Yang, S.H., Jaffray, E., Hay, R.T., and Sharrocks, A.D. (2003). Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Molecular cell* 12, 63-74.

Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P.S., Dejean, A., and Pandolfi, P.P. (2000). Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* 95, 2748-2752.

Zimber, A., Nguyen, Q.D., and Gespach, C. (2004). Nuclear bodies and compartments: functional roles and cellular signalling in health and disease. *Cellular signalling* 16, 1085-1104.