



Doctoral Thesis

Nuclear envelope targeting and functional analysis of mammalian SUN proteins

Author(s):

Turgay, Yagmur

Publication Date:

2011

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006415770> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss.ETH.No.: 19468

Nuclear Envelope Targeting and Functional Analysis of mammalian SUN proteins

A dissertation submitted to the

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

Yagmur Turgay

Dipl. Biochem.

(Johann Wolfgang Goethe-University, Frankfurt a. M., Germany)

born 10.07.1979

Wiesbaden, Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ulrike Kutay, examiner

Prof. Dr. Daniel Gerlich, co-examiner

Dr. Gabor Csucs, co-examiner

2011

Summary

The nuclear envelope (NE) constitutes the border between nucleoplasm and cytoplasm and controls the communication between both compartments. This crosstalk is mediated by NE components such as nuclear pore complexes (NPCs) and integral membrane proteins of the inner nuclear membrane (INM) and the outer nuclear membrane (ONM). NPCs form channels in the NE that allow the passive exchange of small molecules and facilitate the controlled transport of proteins and RNA. INM and ONM proteins establish a physical conjunction across the NE, connecting chromatin and the nuclear lamina to cytoskeletal components in the cytoplasm. These connections contribute to the regulated movement and anchorage of the nucleus within the cell, necessary for cell polarization and differentiation.

To fulfill their functions, membrane proteins of the INM need to be targeted to the NE after insertion into the ER membrane system. In this study, we analyzed the targeting mechanism of the human INM proteins SUN1 and SUN2. We could demonstrate that both proteins require different elements within their nucleoplasmic domains to ensure NE localization. We have identified a nuclear localization signal (NLS) and an Arg-based ER-retrieval motif within the nucleoplasmic domain of SUN2, both contributing to INM localization. The NLS interacts with the heterodimeric import receptor Importin- α /Importin- β (Imp α /Imp β) and can mediate nuclear import of a heterologous protein. The ER-retrieval motif constitutes a coat protein I (COPI) binding site. Mutation of the NLS and the ER-retrieval motif prevents binding of Imp α /Imp β and COPI, respectively, and impairs NE localization. Furthermore, we could show that the C-terminal, luminal SUN-domain supports NE enrichment of SUN2. Hence, we demonstrate for the first time that an INM protein employs its luminal domain for NE targeting.

Some INM proteins have well-established functions in interphase, but only little is known about the involvement of human SUN proteins in dynamic processes such as the reorganization of the NE during the cell cycle. We made use of RNAi to characterize the requirements of SUN proteins in mitosis. Our investigations showed that simultaneous depletion of SUN1 and SUN2 slows cell proliferation. Further analysis suggests that this could be based on perturbations of mitotic progression. Quantification of mitotic timing revealed a delay between nuclear envelope breakdown (NEBD) and chromatin separation, which was most prominent upon co-depletion of SUN1 and SUN2. Moreover, microscopic investigation of the mitotic spindle provided evidence for a putative role of SUN proteins in spindle assembly and stabilization.

Zusammenfassung

Die Kernhülle bildet die Grenze zwischen Nukleoplasma und Zytoplasma und kontrolliert die Kommunikation zwischen beiden Kompartimenten. Diese gegenseitige Verständigung wird von Komponenten der Kernhülle vermittelt, wie beispielsweise Kernporenkomplexen und integralen Membranproteinen der inneren und der äusseren Kernmembran. Kernporenkomplexe formen Kanäle in der Kernhülle, die den passiven Austausch von kleinen Molekülen erlauben, und den kontrollierten Transport von Proteinen und RNA ermöglichen. Die Proteine der inneren und der äusseren Kernmembran bilden eine physikalische Verbindung quer durch die Kernhülle und verknüpfen Chromatin und die nukleäre Lamina mit Komponenten des Zytoskeletts im Zytoplasma. Diese Verbindungen tragen zur regulierten Bewegung und Verankerung des Zellkerns in der Zelle bei, was notwendig für die Zellpolarisierung und Differenzierung ist.

Um ihre Funktionen auszuüben, müssen die Proteine der inneren Kernmembran zur Kernhülle transportiert werden. In dieser Studie analysierten wir den Transportmechanismus der menschlichen inneren Kernmembranproteine SUN1 und SUN2. Wir konnten demonstrieren, dass beide Proteine verschiedene Elemente in ihren nukleoplasmatischen Domänen benötigen, um die Lokalisation in der Kernhülle zu garantieren. Wir haben ein nukleäres Lokalisationssignal und ein auf Argininen basierendes ER-Zubringermotiv in der nukleoplasmatischen Domäne von SUN2 identifiziert, die beide zur Lokalisation in der inneren Kernmembran beitragen. Das nukleäre Lokalisationssignal interagiert mit dem heterodimeren Importrezeptor $\text{Imp}\alpha/\text{Imp}\beta$ und kann den nukleären Import eines heterologen Proteins vermitteln. Das ER-Zubringermotiv stellt eine COPI-Bindungsstelle dar. Die Mutation des nukleären Lokalisationssignals und des ER-Zubringermotivs verhindert jeweils die Interaktion mit $\text{Imp}\alpha/\text{Imp}\beta$ und COPI, und beeinträchtigt somit die Lokalisation in der Kernhülle. Darüberhinaus konnten wir zeigen, dass die C-terminale, luminale SUN-Domäne die Anreicherung von SUN2 in der Kernhülle unterstützt. Somit demonstrieren wir erstmals, dass ein Protein aus der inneren Kernmembran seine luminale Domäne zur Beförderung in die Kernhülle gebraucht.

Einige Proteine der inneren Kernmembran haben etablierte Funktionen in der Interphase, es ist jedoch nur wenig über die Beteiligung von SUN Proteinen an dynamischen Prozessen, wie beispielsweise der Reorganisation der Kernhülle während der Mitose, bekannt. Wir haben mittels RNAi den Bedarf an SUN Proteinen für die Mitose charakterisiert. Unsere Untersuchungen zeigten, dass die simultane Depletion von SUN1 und SUN2 die Zellproliferation verlangsamt. Weitere Analysen lassen vermuten, dass dies auf Störeinflüssen während des Ablaufs der Mitose basiert. Die Quantifizierung des zeitlichen

Ablauf der Mitose lässt eine Verzögerung zwischen der Disassemblierung der Kernmembran und der Trennung von Chromatin erkennen, was sich am prominentesten nach der Co-Depletion von SUN1 und SUN2 zeigte. Darüberhinaus haben wir mittels mikroskopischer Untersuchungen der mitotischen Spindel Nachweise erbracht, die auf eine mögliche Rolle von SUN Proteinen in der Assemblierung und Stabilisierung der Spindel hindeuten.