

***RAD6*-abhängige DNA-Reparatur wird  
durch Ubiquitin- und SUMO-  
Modifikation von PCNA reguliert**

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

2. 9. 2002

vorgelegt von  
Diplom Biologe Carsten Höge  
aus Hamburg



Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation oder Teile einer Dissertation einzureichen bzw. einer Prüfungskommission vorzulegen, noch eine Doktorprüfung durchzuführen.

München, den 2.9.2002

**Gutachter**

**Prof. Dr. Stefan Jentsch und Prof. Dr. Erich A. Nigg**

**Tag der mündlichen Prüfung: 27. 11. 2002**



Die vorliegende Dissertation wurde von Prof. Dr. Stefan Jentsch am Zentrum für Molekularbiologie der Ruprecht Karls Universität in Heidelberg (ZMBH) und am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried betreut.

Wesentliche Teile der Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G., Jentsch, S. (2002). *RAD6*-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, im Druck.

Müller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G., Jentsch, S. (2001). SUMO, Ubiquitin's mysterious cousin. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 202-210.



# Inhaltsverzeichnis

<i>Zusammenfassung</i>	1
<b>1. Einleitung</b>	<b>2</b>
Komponenten von Ubiquitin- und Ubiquitin-ähnlichen Systemen	2
<i>Das Ubiquitin-Konjugationssystem</i>	3
<i>Funktionen des Ubiquitin-Systems</i>	5
<i>Funktionen Ubiquitin-ähnlicher Systeme</i>	7
Das SUMO-System	8
<i>Konjugation</i>	8
<i>Dekonjugation</i>	9
<i>Funktionen</i>	10
<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	16
<b>2. Ergebnisse</b>	<b>17</b>
Aufreinigung von SUMO-Substraten aus <i>S. cerevisiae</i>	17
Das SUMO-Substrat PCNA	19
SUMOylierung von PCNA wird über den Zellzyklus reguliert	20
PCNA-Modifikationsstellen für die SUMOylierung	21
PCNA wird nach DNA-Schädigung ubiquitiniert	22
PCNA ist ein Substrat des <i>RAD6</i> -DNA-Reparaturwegs	24
PCNA wird über Lysin-63-verknüpfte Ubiquitinketten multiubiquitiniert	26
Neue Interaktionspartner von PCNA	26
PCNA-Modifikationen an Lysin-164 sind essentiell für DNA-Reparatur	28
Epistatische Analyse der <i>PCNA-K164R</i> -Mutante	29
Effekt der PCNA Überexpression auf Mutanten des <i>RAD6</i> -Reparaturwegs	32
<b>3. Diskussion</b>	<b>34</b>
Verschiedene Modifikationen regulieren PCNA-Funktionen	34
Modell für die <i>RAD6</i> -abhängige Ubiquitinierung von PCNA	35
PCNA ist ein essentielles Substrat des fehlerfreien <i>RAD6</i> -Reparaturwegs	38
Modell für <i>RAD6</i> -abhängige DNA-Reparatur	39
Ubiquitinierung von PCNA ist konserviert in Eukaryonten	42
Funktionen der PCNA-SUMOylierung	43
Ubiquitin- und SUMO-System können Proteine gemeinsam regulieren	45
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>46</b>
Mikrobiologische Techniken	46
Molekularbiologische Techniken	56
Proteinbiochemische Techniken	59
<b>5. Referenzen</b>	<b>67</b>
<i>Danksagung</i>	77





## **Zusammenfassung**

Das Protein Ubiquitin kann posttranslational an Proteine geknüpft werden. Dieser Vorgang ist für den Abbau von Proteinen durch das Proteasom notwendig. Neben dieser Funktion hat die Modifikation mit Ubiquitin noch weitere Funktionen, die nicht zum Abbau des Proteins führen. Ubiquitin-ähnlichen Proteine, wie beispielsweise SUMO, sind ebenfalls nicht direkt am Proteinabbau beteiligt. Die Konsequenz der Modifikation, und das Zusammenspiel Ubiquitin-ähnlicher-Systeme mit dem Ubiquitin-System sind bisher allerdings wenig verstanden.

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) ist eine zentrale Komponente der DNA-Replikation und DNA-Reparatur. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß PCNA über drei verschiedene posttranslationale Modifikationen reguliert wird. In der S-Phase des Zellzyklus wird PCNA durch SUMO modifiziert. Nach DNA-Schädigung wird PCNA dagegen durch Komponenten des *RAD6*-DNA-Reparaturwegs mono- oder multiubiquitiniert. Alle drei Modifikationen finden am gleichen, zwischen eukaryontischen Spezies konservierten Lysin statt. Der *RAD6*-DNA-Reparaturweg reguliert postreplikative DNA-Reparatur. Eine Schlüsselstellung innerhalb dieses Reparaturwegs nehmen zwei Ubiquitin-konjugierende Enzyme, *RAD6* sowie das Heterodimer *UBC13/MMS2*, die über die RING-Finger Proteine *RAD18* bzw. *RAD5* an das Chromatin rekrutiert werden, ein. Interessanterweise interagiert neben PCNA auch das SUMO-konjugierende Enzym *UBC9* mit den beiden RING-Finger Proteinen sowie mit PCNA selbst und ist so ebenfalls mit dem *RAD6*-Reparaturweg assoziiert. Nach DNA-Schädigung wird PCNA von *RAD6/RAD18* monoubiquitiniert. Alternativ kann PCNA durch das hierfür zusätzlich notwendige Heterodimer *UBC13/MMS2* und das RING-Finger-Protein *RAD5* mit speziellen, Lysin-63-verknüpften Ubiquitinketten, multiubiquitiniert werden. PCNA-Ubiquitinierung ist essentiell für DNA-Reparatur, da eine PCNA-Mutante, die nicht mehr modifiziert wird, starke Sensitivität gegenüber DNA-Schädigung besitzt.

Es konnte gezeigt werden, daß die verschiedenen Modifikationen unterschiedlich auf die Funktionen von PCNA einwirken können. SUMOylierung von PCNA wirkt inhibierend auf *RAD6*-abhängige DNA-Reparatur. PCNA-Multiubiquitinierung durch Lysin-63-verknüpfte Ubiquitinketten aktiviert PCNA in dem *UBC13/MMS2/RAD5*-abhängigen Zweig *RAD6*-abhängiger DNA-Reparatur, der fehlerfrei arbeitet. PCNA-Monoubiquitinierung scheint dagegen den fehlerhaften Zweig *RAD6*-abhängiger DNA-Reparatur zu aktivieren.

# 1. Einleitung

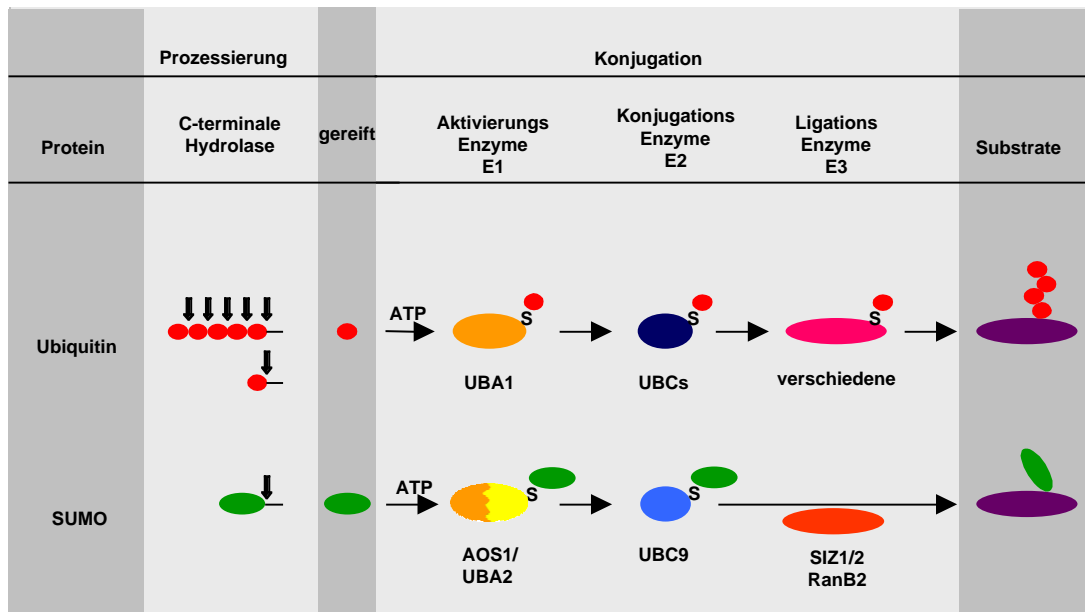
Zelluläre Proteine müssen in ihrer Aktivität, Lokalisierung oder Quantität hochgradig reguliert werden. Posttranslationale Modifikationen spielen dabei eine bedeutende Rolle. Hierfür sind zahlreiche Proteinmodifikationen, wie Phosphorylierung, Glykosylierung, Acetylierung oder Modifikation mit Lipiden bekannt.

Eine bedeutende Rolle innerhalb der posttranslationalen Modifikationssysteme in eukaryontischen Zellen nimmt das Ubiquitin-System ein. Die klassische Funktion des Ubiquitin-Systems ist der gezielte Proteinabbau durch das Proteasom (Hershko und Ciechanover, 1998; Laney und Hochstrasser, 1999; Varshavsky, 1997). Neben dem Abbau von Proteinen durch das Ubiquitin-Proteasom-System deuten sich eine Reihe weiterer Funktionen für die Modifikation mit Ubiquitin an, die nicht den proteasomalen Abbau des ubiquitinierten Substrats zur Folge haben (Pickart, 2001). Zudem wurden zahlreiche Ubiquitin-ähnliche Systeme entdeckt, die ebenfalls nicht direkt mit Proteinabbau in Verbindung gebracht werden. Über kovalente Isopeptidbindung werden Zielproteine (Substrate) mit Ubiquitin oder Ubiquitin-ähnlichen Proteinen verknüpft. Dieser Vorgang wird im Fall von Ubiquitin als Ubiquitinierung bezeichnet. Ubiquitinierung führt häufig zur Bildung sogenannter Ubiquitinketten, in denen einzelne Ubiquitinmoleküle miteinander verknüpft werden. Ubiquitinketten können über unterschiedliche Lysine des Ubiquitins verknüpft werden. Ubiquitinketten, die über Lysin-29 oder Lysin-48 verknüpft sind, werden von einer multikatalytischen Protease, dem Proteasom, erkannt und abgebaut. Proteine können aber auch monoubiquitiniert oder über spezielle Lysin-63-verknüpfte Ubiquitinketten, die nicht vom Proteasom erkannt werden, multiubiquitiniert werden (Lam *et al.*, 2002; Pickart, 1997). Ubiquitin-ähnliche Proteine wie SUMO werden in Analogie zu Ubiquitin an Substrate geknüpft (Abb. 1). In der Regel kommt es aber nicht zur Kettenbildung. Die Konsequenzen und insbesondere das Zusammenspiel des Ubiquitin-Systems mit Ubiquitin-ähnlichen Systemen ist bisher weitgehend unverstanden (Jentsch und Pyrowolakis, 2000).

## Komponenten von Ubiquitin- und Ubiquitin-ähnlichen Systemen

Ubiquitin, ein Protein mit 76 Aminosäuren, ist zwischen eukaryontischen Spezies hoch konserviert. Die Struktur ist globulär sowie äußerst kompakt und lediglich die vier C-terminalen Aminosäuren sind exponiert (Vijay-Kumar *et al.*, 1987). Der C-Terminus wird durch zwei Glycine, die für die Konjugation des Ubiquitins essentiell sind, gebildet. Über das äußere der beiden Glycine wird Ubiquitin aktiviert und über eine Enzymkaskade schließlich auf ein Substrat übertragen. Ubiquitin-ähnliche Proteine haben strukturelle Ähnlichkeit mit Ubiquitin und besitzen ebenfalls ein C-terminales Doppelglycin-Motiv. Die Konjugation erfolgt analog zu Ubiquitin, es wird aber ein anderer Enzymapparat dafür benötigt (Hochstrasser, 1996; Jentsch und Pyrowolakis, 2000) Die Substrat-Verknüpfung erfolgt über eine Isopeptidbindung zwischen

der Carboxylgruppe des Ubiquitin-Glycins und der primären  $\epsilon$ -Aminogruppe eines internen Lysins des Zielproteins. Neben der Konjugation spielt die Dekonjugation von Ubiquitin und Ubiquitin-ähnlichen Proteinen eine wichtige regulatorische Funktion, da das dekonjugierte Protein für andere Funktionen zur Verfügung steht (Wilkinson und Hochstrasser, 1998).



**Abbildung 1. Die Konjugationssysteme von Ubiquitin und des Ubiquitin-ähnlichen Proteins SUMO.** Die Vorläuferformen von Ubiquitin und SUMO werden am C-Terminus von Hydrolasen prozessiert, und über aktivierende (E1), konjugierende (E2) sowie ligierende (E3)-Enzyme an Substratproteine geknüpft. E1 und E2 und verschiedene E3s bilden Thioester (S) mit dem Modifikationsprotein, das schließlich über Isopeptidbindung an ein Lysin des Substratproteins geknüpft wird.

## Das Ubiquitin-Konjugationssystem

Ubiquitin wird über sogenannte E1-Enzyme (Ubiquitin-aktivierendes Enzym) aktiviert (Abb. 1). Dies sind hochkonservierte Proteine, die in den meisten Organismen vermutlich von einem einzigen Gen kodiert werden (Haas *et al.*, 1982). In *S. cerevisiae* ist dies das essentielle Gen *UBA1* (McGrath *et al.*, 1991). In einem ersten, ATP verbrauchenden Schritt wird ein Ubiquitinadenylat gebildet. Dieses wird unter Freisetzung von AMP im zweiten Schritt auf die Thiolgruppe des konservierten Cysteinrestes im aktiven Zentrum des E1-Enzyms unter Ausbildung einer energiereichen Thioesterbindung übertragen. Das aktivierte Ubiquitin wird vom E1-Enzym auf Ubiquitin-Konjugationsenzyme, sogenannte UBCs oder E2-Enzyme, durch Transesterifizierung übertragen (Hershko *et al.*, 1983). E2-Enzyme enthalten als charakteristisches Merkmal eine Ubiquitin-Konjugationsdomäne (UBC-Domäne). Das aktive Zentrum dieser Domäne, ebenfalls ein Cystein, ist der

Akzeptor für Ubiquitin. E2-Enzyme bilden eine große, hochkonservierte Proteinfamilie (Hochstrasser, 1996; Matuschewski *et al.*, 1996). In *S. cerevisiae* konnten 11 E2-Enzyme identifiziert werden. Die Funktionen sind vielseitig und betreffen den Abbau falsch gefalteter Proteine (UBC4/UBC5) (Seufert und Jentsch, 1990), den Abbau von Membranproteinen und Qualitätskontrolle am ER (UBC6/UBC7) (Biederer *et al.*, 1996; Sommer und Jentsch, 1993), Zellzykluskontrolle (CDC34) (Goebel *et al.*, 1988; Krek, 1998), Peroxisomenbiogenese (UBC10) (Wiebel und Kunau, 1992), Regulation der Glykolyse (UBC8) (Schule *et al.*, 2000) sowie DNA-Reparatur (RAD6/UBC13) (Hofmann und Pickart, 1999; Jentsch *et al.*, 1987),

RAD6 (UBC2) ist die zentrale Komponente postreplikativer DNA-Reparatur, des sogenannten RAD6-Reparaturwegs (Lawrence, 1994). Die Ubiquitin-Konjugations-Aktivität ist essentiell für diesen Vorgang, die molekularen Mechanismen sind bisher allerdings unbekannt. Interessant ist, daß UBC13 ebenfalls in diesen Reparaturweg wirkt und zusammen mit MMS2, einem E2-homologen Protein ohne konserviertes Cystein, einen heterodimeren Komplex bildet. Dieser heteromere Komplex wird für die Synthese von K63-verknüpften Ubiquitinketten benötigt und ist, neben der Aktivität von RAD6, essentiell für den RAD6-Reparaturweg (Broomfield *et al.*, 1998; Hofmann und Pickart, 1999). Substrate für RAD6 oder UBC13/MMS2, die in diesem Reparaturweg eine Rolle spielen, blieben jedoch unerkannt.

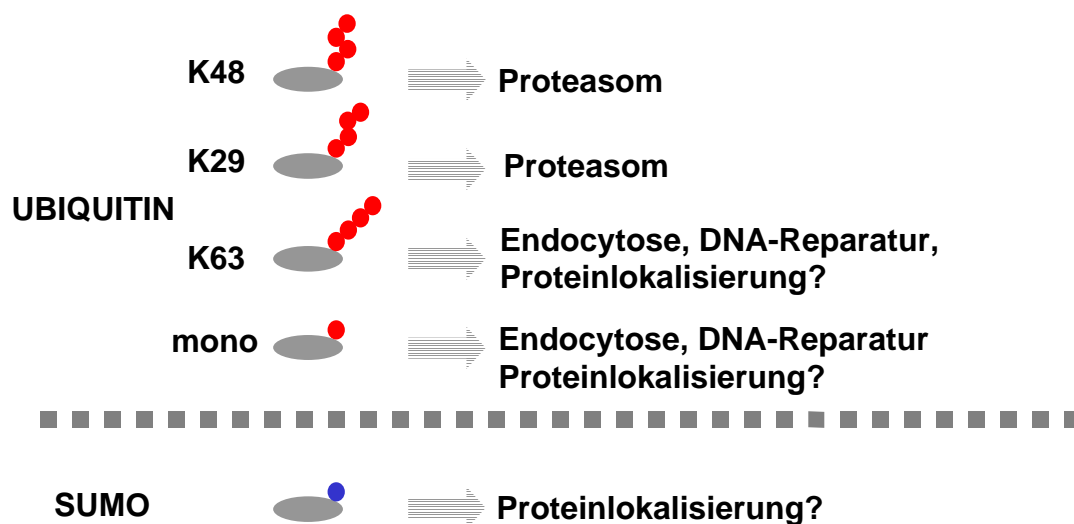
E2-Enzyme übertragen direkt oder mit Hilfe sogenannter Ubiquitin-Ligasen (E3-Enzyme) Ubiquitin auf das Protein-Substrat (Abb. 1). Hier werden verschiedene Arten von E3s unterschieden. Das erste identifizierte E3 aus *S. cerevisiae* ist UBR1 (Bartel *et al.*, 1990) und besitzt als strukturelle Komponente ein RING-Finger Motiv. Die Konservierung dieses Motivs in pflanzlichen „N-end-rule“ E3s deutete die Wichtigkeit des RING-Motivs an. In den letzten Jahren wurde für viele Proteine mit diesem Zink-Finger-verwandten Motiv Ubiquitin-Ligase Aktivität nachgewiesen (Joazeiro und Weissman, 2000). RING-Finger Ubiquitin-Ligasen kommen auch in E3-Ligasekomplexen, wie dem SCF-Komplex (SKP1/CDC53/E-Box) oder dem APC-Komplex (Anaphase-Promoting-Complex) vor, die den Abbau wichtiger Regulatoren, beispielsweise den Cyclinen oder Cyclin-Inhibitoren vermitteln (Krek, 1998; Zachariae und Nasmyth, 1999). Neben den RING-Finger E3-Enzymen gibt es die zweite Klasse, die sogenannten HECT E3s. Im Gegensatz zu RING-Finger E3s können sie, in Analogie zu E2-Enzymen, mit dem Substratprotein einen Thioester über das zentrale Cystein des aktiven Zentrums ausbilden und Substrate ubiquitinieren (Scheffner *et al.*, 1995).

Multiubiquitinierte Substrate können über das 26S Proteasom erkannt und abgebaut werden (Lam *et al.*, 2002; Pickart, 1997). Bei dem 26S Proteasom handelt es sich um einen multikatalytischen Proteasekomplex, der im Cytosol und im Zellkern eukaryontischer Spezies zu finden ist (Enenkel *et al.*, 1999; Russell *et al.*, 1999). Substrate werden durch eine ATP-verbrauchende Reaktion zu kurzen Peptiden abgebaut. Das Proteasom setzt sich aus einem 20S-Zylinder sowie einem 19S-Aufsatz, der sich auf einer oder auf beiden Seiten des Zylinders befinden kann, zusammen. Der Aufsatz besteht in *S. cerevisiae* aus 18 Proteinen (Glickman *et al.*, 1999) unter anderem aus

Komponenten, die die Multiubiquitinketten erkennen können (van Nocker *et al.*, 1996). Unter diesen Proteinen befinden sich AAA-Typ ATPpasen, die vermutlich das Abspalten sowie die Einschleusung von Substraten in den 20S-Zylinder regulieren. (Verma *et al.*, 2002; Wilkinson und Hochstrasser, 1998).

## Funktionen des Ubiquitin-Systems

Das Ubiquitin-System hat neben der bekannten Funktion des proteasomalen Proteinabbaus weitere, nichtproteasomale, regulatorische Funktionen, die in diesem Abschnitt behandelt werden (Abb. 2).



**Abbildung 2. Funktionen des Ubiquitin- und SUMO-Systems.** Ubiquitin (rot) kann als Monomer oder Kette mit Substraten (grau) verknüpft werden. Ketten können über drei verschiedene Lysine (K) des Ubiquitins synthetisiert werden. Die Funktionen der Ubiquitinierung sind unterschiedlich. SUMO (blau) wird in der Regel als Monomer an Substrate geknüpft. Die unterschiedlichen bekannten Funktionen sind angegeben.

Das bekannteste Beispiel für eine nichtproteasomale Funktion des Ubiquitin-Systems ist die Rezeptor-vermittelte Endocytose. Es zeigte sich, daß Ubiquitinierung für die Internalisierung einer Reihe von Membranproteinen notwendig ist. Im Gegensatz zum proteasomalen Abbau werden für die Endocytose keine langen Ubiquitinketten benötigt (Hicke, 1999). Meist scheint Monoubiquitinierung als Endocytosesignal auszureichen. Allerdings wurden auch kurze Ubiquitinketten (mit zwei Ubiquitinen) beschrieben, die über Lysin-63 des ersten Ubiquitins verknüpft sind und für Endocytose bestimmter Membranproteine notwendig sind (Galan und Haguener-Tsapis, 1997). Generell ist die Ubiquitinierung für den ersten Schritt der Endocytose wichtig, bei dem Membranproteine in die primären endocytischen Vesikel gelangen. Monoubiquitin scheint ein dreidimensionales Internalisationssignal zu enthalten, das von bestimmten Komponenten erkannt wird. In Säugern sind

beispielsweise die E3-Ligasen Nedd4 bzw. c-Cbl für die Internalisierung verschiedener Rezeptoren notwendig, sie funktionieren aber nicht als Adaptoren. Lange wurde über Bindeproteine spekuliert, die das ubiquitinierte Protein erkennen können (Hicke, 2001). Schließlich konnte die UIM-Domäne charakterisiert werden, die in vielen Endocytose Faktoren auftritt und die vermutlich Ubiquitin binden kann (Hofmann und Falquet, 2001). Zeitgleich wurde EPS15, eine Komponente der Clathrin-Maschinerie, als Adaptor-Kandidat diskutiert (Hicke, 2001). Es konnte daraufhin nachgewiesen werden, daß die UIM-Domäne in EPS15 tatsächlich Ubiquitin bindet und auch notwendig für Endocytose ist (Polo *et al.*, 2002). Neben der Notwendigkeit der Ubiquitinierung in dem ersten Schritt der Endocytose sprechen neuere Daten für eine weitere Funktion von Ubiquitin in der Sortierung von Vesikeln (Losko *et al.*, 2001). Auch in höheren Eukaryonten führte die Überexpression der E3-Ligase c-CBL überraschenderweise nicht zu einer höheren Internalisierungsrate, sondern einer erhöhten Degradation des Rezeptors in den Lysosomen (Levkowitz *et al.*, 1999). Nähere Einblicke zur weiteren Funktion von Ubiquitin kamen von Studien des Protein CPS (Carboxypeptidase). Es wird in Multivesikeln (MVB, multi vesicular bodies) aktiviert. Die Ausbildung dieser Multivesikel ist in *vps* Mutanten aus *S. cerevisiae* defekt. VPS23 ist ein inaktives Ubiquitin-konjugierendes Enzym und Bestandteil eines 350kD Proteinkomplex (ESCRT I), der monoubiquitiniertes CPS erkennen und sortieren kann (Katzmann *et al.*, 2001). CPS-Mutanten, die nicht mehr monoubiquitiniert werden, gelangen nicht in Multivesikel und werden in der Vakuole als inaktive Form abgebaut.

Monoubiquitinierung spielt ebenfalls eine wichtige Rolle für einige nukleäre, chromatinassoziierte Proteine. Ein Beispiel sind die Modifikationen der Histone (Busch und Goldknopf, 1981; West und Bonner, 1980). Die funktionellen Konsequenzen dieser Ubiquitinierung sind noch unklar. Es konnte aber gezeigt werden, daß *in vitro* und *in vivo* RAD6/UBC2 für die Ubiquitinierung benötigt wird (Jentsch *et al.*, 1987; Robzyk *et al.*, 2000). Eine H2B-Mutante aus *S. cerevisiae*, die nicht mehr ubiquitiniert wird, sporuliert nicht mehr, da die Ubiquitinierung für die Modulation des Chromatins während der Meiose wichtig zu sein scheint. H2B-Mutanten, die nicht mehr ubiquitiniert werden haben allerdings auch einen Defekt im Silencing an Telomeren. Die H2B-Ubiquitinierung bewirkt die Methylierung des Histons H3. Dieser Prozeß ist essentiell für das Silencing an Telomeren. (Sun und Allis, 2002).

Ein weiteres Protein, das monoubiquitiniert wird ist ORC1. Es ist eine Untereinheit eines multimeren Komplexes, der die Startstellen der Replikation erkennt (ORC, origin replication complex). ORC1 aus Säugern wird während des Übergangs von der S- in die M-Phase mono-, bzw. diubiquitiniert. In der S-Phase wird ORC1 zudem selektiv vom Chromatin entfernt. Ubiquitin könnte das Signal sein, um ORC1 vom Chromatin zu entfernen. Das Protein wird am Chromatin aber nicht proteasomal abgebaut (Li und DePamphilis, 2002; Zhang *et al.*, 2000). Der Transkriptionsfaktor MET4, der eine Rolle in der Methioninbiosynthese hat, ist ein weiteres Beispiel. Er wird von dem SCF<sup>MET30</sup> E3-Ligasekomplex ubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut (Rouillon *et al.*, 2000). In einer späteren Arbeit wurde aber demonstriert, daß gerade die ubiquitinierten MET4-Spezies sehr stabil sind und Deletionsmutanten von

*MET30* keinen Einfluß auf die Halbwertszeit des Proteins haben (Kaiser *et al.*, 2000). Es wurde deshalb spekuliert, daß hier die Ubiquitinierung eine vom Abbau unabhängige Funktion hat und *MET4*-Ubiquitinierung die Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren verhindern kann und somit die Methioninbiosynthese inhibiert. Beide gegensätzlichen Ergebnisse sind im Einklang, wenn man annimmt, daß variierende Wachstumsbedingungen unterschiedlichen Einfluß auf die Konsequenz der *MET4*-Ubiquitinierung haben könnten. Interessanterweise ist in *S. cerevisiae* die Aktivierung der kurzlebigen VP16-Transaktivierungsdomäne (TAD) abhängig von SCF<sup>*MET30*</sup>. Mutanten von *MET30* stabilisieren TAD in einer inaktiven Form (Salghetti *et al.*, 2001). Es ist somit vorstellbar, daß Aktivierung und Abbau eines Transkriptionsfaktors jeweils getrennte Ereignisse der Ubiquitinierung sein können (Ulrich, 2002).

Auch in der DNA-Reparatur scheint Monoubiquitinierung eine Rolle zu spielen. Fanconi Anemia (FA) ist eine autosomal rezessive Krankheit, die mit Mutationen in acht verschiedenen Genen in Verbindung gebracht wurde (*FANCA*, *B*, *C*, *D1*, *D2*, *E*, *F*, *G*). Charakteristisch für FA-Zellen ist die Hypersensitivität gegen Agentien, die DNA-Stränge vernetzen (interstrand crosslinker, ICL) wie Mitomycin C (MMC) oder Diepoxybutan (DEB) (Grompe und D'Andrea, 2001). Die FA-Proteine bilden einen multimeren Komplex im Nukleus (*FANCA*, *B*, *C*, *E*, *F*), der nach DNA-Schädigung für die Monoubiquitinierung von *FANCD2* an Lysin-561 notwendig ist (Garcia-Higuera *et al.*, 2001). Interessanterweise ist die Monoubiquitinierung für die Lokalisierung von *FANCD2* in nukleäre Körper (nuclear foci) verantwortlich, in denen auch das Tumorsuppressor- und RING-Finger-Protein *BRCA1* lokalisiert. Alle Komponenten des multimeren Komplex werden für die Monoubiquitinierung benötigt. Es wurde deshalb spekuliert, daß es sich um einen E3-Ligasekomplex handelt, dessen essentielles Substrat *FANCD2* ist. Wie die Monoubiquitinierung schließlich Reparatur geschädigter DNA vermittelt, ist noch unklar. Es konnte aber gezeigt werden, daß die Kopplungsgruppen *FANCB* und *FANCD1* Mutationen in dem Gen *BRCA2* aufweisen (Howlett *et al.*, 2002).

## Funktionen Ubiquitin-ähnlicher Proteine

In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Proteinen identifiziert, die Sequenzähnlichkeiten mit Ubiquitin aufweisen. Neben Proteinen, die Ubiquitin-ähnliche Domänen besitzen und nicht an Substrate konjugiert werden (UDPs; Ubiquitin-domain proteins) existieren Ubiquitin-ähnliche Modifikationsproteine (UBLs; Ubiquitin-like modifier), die, in Analogie zu Ubiquitin, kovalent an Substratproteine geknüpft werden können (Jentsch und Pyrowolakis, 2000).

*RUB1* und sein orthologes Protein *NEDD8* aus höheren Eukaryonten haben ca. 50% Sequenzähnlichkeit zu Ubiquitin. Ein heterodimerer E1-Proteinkomplex (*ULA1/UBA3*) sowie *UBC12* sind für die Konjugation notwendig. Substrate sind die Culline (Lammer *et al.*, 1998; Liakopoulos *et al.*,

1998; Liakopoulos *et al.*, 1999).). Sie bilden das strukturelle Gerüst von den Ubiquitin-E3-Komplexen SCF und CBC (siehe Ubiquitin-Konjugationssystem). Die Modifikation scheint eine effizientere Rekrutierung von Ubiquitin an den E3-Komplex zu ermöglichen (Kawakami *et al.*, 2001).

Zwei weitere Ubiquitin-ähnliche Proteine regulieren den zellulären Vorgang der Autophagie, bei dem cytoplasmatisches Material in Vesikeln (Autophagosomen) eingeschlossen und in die Lysosomen transportiert wird, (Ohsumi, 2001). Von 16 bekannten APG-Genen kodieren 8 für Komponenten dieser zwei Ubiquitin-ähnlichen Systeme. APG12 und APG8 können, analog zu Ubiquitin, an Substrate geknüpft werden. Das Substrat von APG12 ist das Protein APG5. Das Substrat von APG8 ist dagegen kein Protein sondern überraschenderweise das Membranlipid Phosphatidylethanolamin (PE). Das modifizierte APG5 kann stabil mit APG16 assoziieren (Ichimura *et al.*, 2000; Mizushima *et al.*, 1998). Über coiled-coil Domänen von APG16 werden oligomere Komplexe gebildet (APG12/APG5/APG16), die vermutlich durch APG8/PE an Membranen binden können und damit die Bildung von Autophagosomen initiieren.

HUB1 ist ein weiteres Ubiquitin-ähnliches Protein, dessen Proteinsequenz zwischen Mensch und Hefe hochkonserviert ist. Die Sequenzidentität zu Ubiquitin liegt bei nur 22%. Dennoch wird von Ubiquitin-ähnlichen Proteinen vermutet, daß sie trotz geringer Sequenzidentität in ihrer dreidimensionalen Faltung Ubiquitin stark ähneln. Im Gegensatz zu Ubiquitin besitzt HUB1 jedoch keine C-terminalen Glycine (GG-Motiv), sondern zwei Tyrosine. Zur Zeit ist es noch umstritten, ob dieses Protein tatsächlich über den C-Terminus konjugiert werden kann (Dittmar *et al.*, 2002). Phänotypische Analyse von *HUB1*-Deletionsmutanten deuten auf eine Funktion während der Paarung (mating) von Hefen hin.

## Das SUMO-System

### *Konjugation*

SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) ist das bisher am besten untersuchte Ubiquitin-ähnliche Protein (Melchior, 2000; Müller *et al.*, 2001). Invertebraten besitzen ein SUMO-Gen (*SMT3*, Suppressor of *mif2-1*), Vertebraten hingegen *SUMO-1* sowie die verwandten Gene *SUMO-2* und *SUMO-3*. Die Proteinsequenzidentität zwischen SUMO-1 und den anderen beiden SUMO-Proteinen liegt bei ca. 50%. Obwohl die Sequenzidentität zwischen Ubiquitin und SUMO-1 nur bei lediglich 18% liegt, ergaben NMR-Untersuchungen, daß die Proteine sehr ähnliche dreidimensionale Strukturen besitzen (Bayer *et al.*, 1998). Allerdings hat SUMO gegenüber Ubiquitin eine N-terminale Extension (ca. 30 Aminosäuren), deren Bedeutung unklar ist. Die Aktivierung von SUMO erfolgt, analog zu RUB1/NEDD8, durch das Heterodimer AOS1/UBA2 (Johnson *et al.*, 1997). Beide Untereinheiten haben Sequenzidentität mit dem N- bzw. C-Terminus des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms UBA1. SUMO muß analog zu Ubiquitin prozessiert werden, um das C-terminale Doppelglycin zu



aktivieren (Abb. 1). Dies geschieht über die Cysteinprotease ULP1 (Li und Hochstrasser, 1999). Das E2-Enzym für die SUMO-Konjugation ist UBC9, welches hohe Ähnlichkeit zu Ubiquitin-Konjugationsenzymen aufweist (Johnson *et al.*, 1997; Schwarz *et al.*, 1998). Andererseits ist die Oberfläche von UBC9 stark positiv geladen, während beispielsweise die Oberflächen von UBC4 und UBC7 negativ geladen bzw. neutral sind. In *S. cerevisiae* sind *AOS1/UBA2*, *UBC9* und *ULP1* essentielle Gene, und SUMO-Konjugation ist für den G2/M Übergang im Zellzyklus notwendig, da temperatursensitive Mutanten ihr Wachstum mit großen Knospen, replizierter DNA und kurzer Spindel einstellen (Dohmen *et al.*, 1995; Li und Hochstrasser, 1999; Seufert *et al.*, 1995). Kürzlich konnten E3-Faktoren für die SUMO-Konjugation identifiziert werden. Die Proteine SIZ1 und SIZ2 aus *S. cerevisiae* besitzen jeweils eine RING-Finger ähnliche Domäne, die UBC9 rekrutiert und dadurch SUMO-Konjugation effizienter gestaltet (Johnson und Gupta, 2001). In Säugern existieren die SIZ1-homologen Proteine der PIAS-Familie (Protein Inhibitor of activated STAT), die ebenfalls SUMO E3-Aktivität haben (Kahyo *et al.*, 2001; Kotaja *et al.*, 2002; Schmidt und Müller, 2002). Auffallend ist, daß SIZ1 und SIZ2 nicht direkt mit Substraten interagieren. Allerdings ist für UBC9 gezeigt worden, daß es direkt mit Substraten interagieren kann. Wie E2 und E3 des SUMO-konjugierenden Systems zusammen Substratspezifität gewähren, ist bisher nicht bekannt. Ein weiterer E3-Faktor ist RanBP2 (Ran binding protein 2), eine Komponente der Kernpore. Bestimmte SUMO-Substrate können so vermutlich während des Imports in den Kern SUMOyliert werden. (Pichler *et al.*, 2002; Pichler und Melchior, 2002). Die SUMO E3-Ligasen bilden im Gegensatz zu HECT-Ubiquitin-E3s keine Thioester mit den Ubiquitin-ähnlichen Proteinen aus (Abb. 1).

## **Dekonjugation**

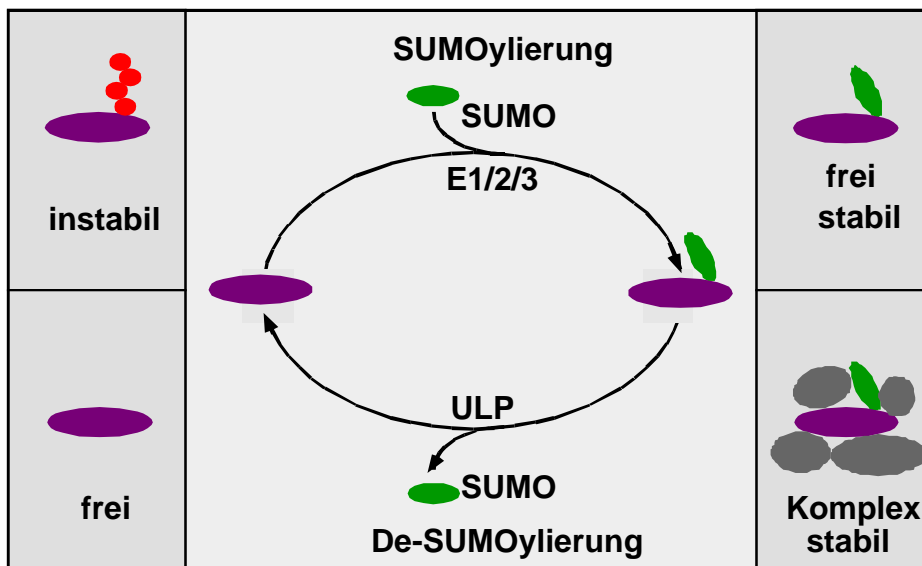
SUMOylierung ist ein dynamischer, reversibler Prozeß (Abb. 3). Die Dekonjugation von Substraten (DeSUMOylierung), wird über Cysteinproteasen der ULP-Familie katalysiert. In *S. cerevisiae* existieren zwei dieser Enzyme, ULP1 und ULP2(SMT4). *In vitro* können beide Proteine sowohl die Vorläuferform von SUMO prozessieren, als auch das über Isopeptidbindung verknüpfte SUMO von Substraten abschneiden (Li und Hochstrasser, 1999; Li und Hochstrasser, 2000). Die Kristallstruktur läßt erkennen, daß ULP1 keine Ähnlichkeit mit deubiquitinierenden Enzymen hat, obwohl ULP1 zur Familie der Cysteinproteasen gehört (Mossessova und Lima, 2000). In menschlichen Zelllinien existieren mindestens 7 verschiedene ULP-Formen (SUSPs oder SENPs; SUMO specific proteases), die überlappende Funktionen in der Prozessierung und in der DeSUMOylierung haben (Yeh *et al.*, 2000). In *S. cerevisiae* haben ULP1 und ULP2 unterschiedliche Substratspezifität und subzelluläre Lokalisation. Während ULP1 überwiegend an der Kernpore vorkommt, befindet sich ULP2 im Zellkern (Li und Hochstrasser, 2000). *ULP1*-Deletionsmutanten können durch die Expression von prozessierten SUMO nicht gerettet werden, Dekonjugation von SUMO-Substraten ist somit lebensnotwendig (Li und Hochstrasser, 1999). Deletionsmutanten von *ULP2* sind dagegen lebensfähig, haben aber deutlich verlangsamtes Wachstum, Chromatindefekte und erhöhte Sensitivität

gegenüber DNA-Schädigung. ULP2 scheint *in vivo* nicht an der Prozessierung der SUMO Vorläuferform beteiligt zu sein, da es im Kern lokalisiert und *ulp2* Zellen keine Akkumulation der ungeriffelten SUMO-Form zeigen (Li und Hochstrasser, 2000).

## **Funktionen**

SUMO besitzt wesentlich weniger Substrate als Ubiquitin, und die meisten bisher identifizierten Substrate sind wichtige zelluläre Regulatoren. Wie die Modifikation mit SUMO die Funktion dieser Proteinsubstrate reguliert, ist molekular bisher nicht verstanden, obwohl viele SUMO-Substrate beschrieben wurden. Generell werden zwei Modelle für die Funktion von SUMO diskutiert. Zum einen wird angenommen, daß SUMOylierung Interaktionen mit spezifischen Faktoren fördert oder SUMO-Proteine in Komplexen stabilisiert. Zum anderen wird diskutiert, daß SUMOylierung eines Substrats Ubiquitinierung und proteasomalen Abbau eines Proteins blockieren kann (Abb. 3).

Das erste identifizierte SUMO-Substrat war RanGAP1, eine Komponente des nukleären Proteinimport. RanGAP1 reguliert die GTPase Ran, ein Regulator für den Transport zwischen Nukleus und Cytoplasma. Interessanterweise bindet die SUMOylierte Form von RanGAP1 an RanBP2, so daß angenommen wurde, daß die SUMOylierung die Lokalisierung von RanGAP1 an die Kernpore bewirkt (Mahajan *et al.*, 1997; Matunis *et al.*, 1996). Neuere Untersuchungen zeigten, daß RanBP2 SUMO-E3-Ligase Aktivität besitzt. Im Komplex mit RanGAP könnte RanBP2 Substrate während ihres Transports in den Nukleus modifizieren. Allerdings ist die SUMOylierung von Substraten nicht essentiell für ihren Import in den Nukleus (Pichler und Melchior, 2002). Interessant ist aber, daß auch die deSUMOylierenden Enzyme ULP1 aus *S. cerevisiae* sowie das humane SENP2 an der inneren Kernpore lokalisieren. SUMOylierung bzw. DeSUMOylierung könnte die Effizienz des Proteinimports, bzw. des Exports erhöhen. Für eine generelle Rolle im Kerntransport spricht auch die *ubc9* Mutante *semushi* aus *Drosophila* (Epps und Tanda, 1998). Der Import des Transkriptionsfaktors bicoid ist in diesen Mutanten blockiert. Der *Drosophila*-Transkriptionsfaktor dorsal wird ebenfalls SUMOyliert. Über den Inhibitor cactus wird dorsal im Cytosol zurückgehalten. Überexpression von UBC9 oder SUMO bewirkt dagegen den Transport in den Nukleus und die Aktivierung von dorsal (Bhaskar *et al.*, 2000).



**Abbildung 3. Reversible Modifikation von Proteinen durch SUMO.** Konjugation von SUMO (SUMOylierung) an Substrate (lila) kann Ubiquitinierung (rot) verhindern und dadurch Proteine, die frei oder in Komplexen vorkommen, stabilisieren. Dekonjugation (DeSUMOylierung) von SUMO wird durch Enzyme der ULP-Familie katalysiert.

Für eine Rolle von SUMO in der Stabilisierung von Proteinkomplexen sprechen Daten zu den sogenannten PML-Körpern (PML bodies or nuclear dots). Im Kern befinden sich SUMOylierte Proteine oft in diesen subnukleären Strukturen. PML ist ein RING-Finger Protein und reguliert Zellwachstum über seine proapoptischen Eigenschaften (Fogal *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2000). PML wird an drei unterschiedlichen Lysinen SUMOyliert. Die PML-SUMOylierung bewirkt die Assemblierung bzw. Stabilisierung von PML-Körpern (nuclear dots). Die PML-Körper enthalten SUMOyliertes PML und haben eine kompakte Struktur (Duprez *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 1998). Die Deassemblierung durch virale Proteine oder während der Mitose bewirkt die Abwesenheit der PML-SUMOylierung. In Zelllinien, in denen *PML* deletiert ist (*PML*<sup>-/-</sup>), treten keine PML-Körper auf (Everett *et al.*, 1998; Everett *et al.*, 1999; Müller und Dejean, 1999). Es wird vermutet, daß die PML-Körper Transkriptionsfaktoren binden und dadurch inaktivieren. Der transkriptionelle Corepressor Daxx wird nach PML-SUMOylierung in die PML-Körper rekrutiert und dadurch inhibiert (Ishov *et al.*, 1999). Der Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor p53 ist auch ein Substrat für SUMO (Gostissa *et al.*, 1999). Nach SUMOylierung wird p53 ebenfalls in die PML-Körper rekrutiert. Allerdings führt das zur transkriptionellen und proapoptischen Aktivierung von p53 (Fogal *et al.*, 2000). p53 wird auch über Acetylierung reguliert und es ist möglich, daß Acetylierung in PML-Körpern zur p53 Aktivierung führt (Pearson *et al.*, 2000). Insgesamt scheinen PML-Körper Zentren der SUMOylierung zu sein und für viele Proteine, die in diesen Körpern lokalisieren, konnte die Modifikation durch SUMO nachgewiesen werden. SP100 ist ebenfalls eine Komponente der PML-Körper und ein Substrat für SUMO (Sternsdorf *et al.*, 1997). Das Protein hat eine Funktion in der Modulation von Chromatin und bindet Proteine der HP1- und HMG1/2-

Familien. Interessanterweise hat SUMOyliertes SP100 *in vitro* höhere Affinität für HP1, so daß vermutet werden kann, daß SUMOylierung die Bindung direkt vermittelt (Seeler *et al.*, 2001). SP100 ist ein Substrat des SUMO-Ligase Faktors RanBP2, der in der Kernpore lokalisiert. Ob SP100 während des Imports SUMOyliert wird und anschließend an Chromatin bindet oder ob Chromatin und Kernpore in räumlicher Nähe zueinander sind, so daß beide Prozesse eng gekoppelt ablaufen können, ist nicht geklärt. Die Chromatinstruktur kann aber von Komponenten der Kernpore moduliert werden (Ishii *et al.*, 2002), so daß es möglich ist, daß Proteinimport, SUMOylierung von Substraten und Modulation des Chromatins tatsächlich gekoppelte Prozesse sind.

Auch für die Substrate HIPK2, TEL und LEF1 konnte ein Zusammenhang zwischen SUMOylierung und subnukleärer Lokalisierung gezeigt werden (Chakrabarti *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 1999; Sachdev *et al.*, 2001). HIPK2 ist eine Serin/Threonin-Kinase die mit Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren interagiert und als transkriptioneller Repressor wirkt. SUMOyliertes HIPK2 findet sich, ähnlich wie PML, in unlöslichen subnukleären Strukturen. TEL ist ein ETS-verwandter, transkriptioneller Repressor, der sich in S-Phase-spezifischen nukleären Körpern befindet. Zwar ist die molekulare Basis dieser Körper noch nicht verstanden, die HIPK2 Lokalisierung hängt aber von der SUMOylierung ab. LEF1 ist ebenfalls ein transkriptioneller Regulator und kann einerseits mit  $\beta$ -Catenin Transkription aktivieren sowie andererseits mit Groucho Transkription reprimieren. LEF1 wird über PIASy, einem SUMO E3-Faktor inhibiert. Der Schluß liegt nahe, daß die LEF1-SUMOylierung die Lokalisierung in PML-Körper bewirkt. Aber eine Mutante von LEF1, die nicht mehr SUMOyliert wird, lokalisiert wie das Wildtyp-Protein (Sachdev *et al.*, 2001). Wenn allerdings eine inaktive PIAS-Form exprimiert wird, geht die PML-Lokalisierung von LEF1 verloren. Noch ein anderes SUMO-Substrat könnte an der LEF1-Lokalisierung beteiligt sein. Ob die Hauptfunktion der PIAS-Proteine die SUMOylierung von Proteinsubstraten ist oder ob das Protein noch andere, SUMO-unabhängige Funktionen, beispielsweise im STAT-Signalweg hat, bleibt eine offene Frage.

Eine interessante Beziehung zwischen dem SUMO-System und dem Ubiquitin-System zeigt die Signalkaskade, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B führt. Dieser wird im Cytosol durch I $\kappa$ B $\alpha$  inhibiert und nach Stimulierung durch Tumornekrosisfaktor (TNF) phosphoryliert, ubiquitiniert und anschließend proteasomal abgebaut. Dadurch wird NF $\kappa$ B freigesetzt. Nach Transport in den Nukleus kann NF $\kappa$ B die Transkription spezifischer Gene aktivieren. Interessanterweise wird I $\kappa$ B $\alpha$  nicht nur ubiquitiniert, sondern alternativ am selben Lysin SUMOyliert. Die SUMOylierte Form von I $\kappa$ B $\alpha$  wird jedoch nicht proteasomal abgebaut. SUMOylierung schützt somit I $\kappa$ B $\alpha$  vor Abbau und es wird vermutet, daß beide Systeme miteinander kompetitieren (Desterro *et al.*, 1998). Allerdings ist nicht klar, ob beide Modifikationen die gleiche Population des Proteins in der Zelle betreffen. I $\kappa$ B $\alpha$ -SUMOylierung könnte auch noch eine andere Funktion besitzen. Beispielsweise könnte die subzelluläre Lokalisierung durch SUMOylierung reguliert werden.

Bemerkenswert ist, daß noch weitere Komponenten des Ubiquitin-Systems in diesem Signalweg charakterisiert worden sind. Die Aktivierung der Kinase IKK, die wiederum I $\kappa$ B $\alpha$  phosphoryliert (IKK), findet über das Ubiquitin-System statt. Dabei ist das E3-Enzym TRAF6 selbst ein Substrat des Ubiquitin-Systems. Es wird durch Lysin-63-verknüpfte Ubiquitinketten modifiziert, die von dem UBC13/MMS2 Heterodimer synthetisiert werden. Die TRAF6-Ubiquitinierung führt zu einer Aktivierung der Kinase TAK1, die wiederum IKK aktiviert (Deng *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). Das Zusammenspiel zwischen dem Ubiquitin-System und dem SUMO-System ist aber noch unklar und vermutlich sind in diesem Signalweg noch andere SUMO/Ubiquitin-Substrate beteiligt, die bisher noch nicht identifiziert wurden.

Für den Schleimpilz *Dictyostelium* konnte gezeigt werden, daß eine zentrale Komponente der in höheren Eukaryonten konservierten MAP-Signalkaskade, MEK1, über SUMOylierung und Ubiquitinierung reguliert wird (Sobko *et al.*, 2002). Auf externen Stimulus durch cAMP reagiert *Dictyostelium* mit Chemotaxis. Der Schleimpilz bewegt sich in Richtung der cAMP Quelle, indem er multizelluläre Anhäufungen bildet. Kurz nach cAMP-Stimulation wird die Kinase MAP1 phosphoryliert, transient SUMOyliert und abhängig von der SUMOylierung aus dem Nukleus zum Zellkortex transportiert. MAP1 kann auch durch das RING-Finger Protein MIP1 reguliert werden. Es ubiquitiniert MAP1 im Nukleus und verhindert die cAMP-abhängige Relokalisierung von MAP1 an den Zellkortex. Im Gegensatz zur Regulation von I $\kappa$ B $\alpha$  wird nicht das selbe Lysin für SUMOylierung und Ubiquitinierung benutzt, beide Prozesse scheinen aber dennoch kompetitiv zu sein.

Zellen in denen die Konjugation bzw. Dekonjugation von SUMO beeinträchtigt ist, zeigen neben mitotischen Wachstumsdefekten auch erhöhte Sensitivität gegenüber DNA-Schädigung. In der Hefe *S. pombe* ist SUMO für das Wachstum nicht essentiell, SUMO sowie UBC9 Deletionsmutanten (*pmt3*<sup>+</sup> bzw. *hus5*<sup>+</sup>) haben aber mitotische Defekte, hohe Verlustraten für Minichromosomen und stark erhöhte Sensitivität gegenüber DNA-Schädigung (al-Khodairy *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1999). In *S. cerevisiae* zeigen *ubc9-1* und *ulp2* Mutanten ähnliche Phänotypen. In diesem Zusammenhang konnten bisher aber nur wenige Proteine als Substrate identifiziert werden, eins ist RAD52, das für homologe Rekombination benötigt wird und bereits lange als UBC9-Interaktor bekannt war (Shen *et al.*, 1996). SUMOylierung wurde schließlich nachgewiesen, aber die Analysen gingen nicht über diesen deskriptiven Aspekt hinaus (Ho *et al.*, 2001). RAD52 lokalisiert während der Meiose an spezifischen Punkten am Chromatin und dies könnte von der SUMOylierung abhängig sein.

Die eindeutigste Funktion von SUMO in einem spezifischen Aspekt der DNA-Reparatur wurde durch die Analyse der Thymidin-DNA-Glycosylase (TDG) beschrieben (Hardeland *et al.*, 2002). DNA-Glycosylasen initiieren Exzisionsreparatur von abberanten Basen (BER, base excision repair) über die Generierung sogenannter AP-Stellen (abasic sites). Die Dissoziation des Enzyms von AP-Stellen ist dabei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der enzymatischen Reaktion. Es konnte gezeigt werden, daß SUMOylierung

der Glycosylase deren Bindungsaffinität für AP-Stellen drastisch herabsetzt und das Enzym dadurch schneller wieder freigesetzt werden kann. Über einen regulierten Zyklus der SUMOylierung und DeSUMOylierung könnte die Reparaturrate des Enzyms reguliert werden.

Die RecQ-Typ DNA-Helikasen WRN und BLM werden für DNA-Reparatur benötigt. WRN scheint aber auch einen Einfluß auf Transkription im Nukleolus zu haben, wo Lokalisierung des Proteins auch nachgewiesen werden konnte. Mutationen in beiden Genen führen zu erheblich beschleunigter Alterung, die bereits im Kindesalter einsetzt (Werner syndrome, Bloom syndrome). Für WRN und BLM wurde SUMOylierung bzw. Interaktion mit UBC9/SUMO demonstriert, allerdings sind die Auswirkungen bisher unklar (Kawabe *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001).

Weitere Substrate sind Topoisomerase I und II, die neben ihrer Funktion in der Replikation auch für andere Chromatin modulierenden Funktionen, wie Chromatidcohesion und DNA-Reparatur benötigt werden. Nach Behandlung mit Camptothecin, einem Topoisomeraseinhibitor, wird die SUMOylierung beider Topoisomerasen induziert (Mao *et al.*, 2000; Mao *et al.*, 2000). Nach SUMOylierung scheint Topoisomerase I seine nukleoläre Lokalisation zu verlieren (Mo *et al.*, 2002). Topoisomerase II wird allerdings nach Behandlung mit Camptothecin ebenfalls ubiquitiniert (Desai *et al.*, 1997). Die Regulation und das Zusammenspiel der Ubiquitinierung und SUMOylierung nach Behandlung mit Topoisomeraseinhibitor wurde bisher aber nicht weiter untersucht. Topoisomerase II ist zudem ein Substrat des SUMO-dekonjugierenden Enzyms ULP2. Topoisomerase II und ULP2 scheinen an der Regulation der Chromatidcohesion beteiligt zu sein. *ULP2* Deletionszellen haben erhöhte Chromatidcohesion, die zu Defekten während der Mitose führt. Eines der wichtigen *ULP2*-Substrate scheint Topoisomerase II (*TOP2*) zu sein und die regulierte Dekonjugation von *TOP2* ist wichtig für die korrekte Trennung der Schwesterchromatiden. Der Phänotyp von *ULP2* Deletionsmutanten wird durch Überexpression von nicht SUMOylierbaren *TOP2* Mutanten partiell gerettet, da in *ulp2* Zellen SUMOyliertes *TOP2* exakte Trennung der Schwesterchromatiden verhindert (Bachant *et al.*, 2002). Insbesondere die Tatsache, daß die Gene *SMT3* (*SUMO*) und *SMT4* (*ULP2*) als Suppressoren der centromeren Mutante *mif2-1* beschrieben wurden (Meluh und Koshland, 1995), deutet auf eine generelle Funktion des SUMO-Systems in der Organisation der Chromosomstruktur am Centromer hin. Weiterhin wurde über mikroskopische Selektion das *smt3-333* Allel identifiziert, das einen Defekt in der Chromatidcohesion besitzt (Biggins *et al.*, 2001).

In der Hefe *S. cerevisiae* sind neben *TOP2* die cytosolischen Septine *CDC3*, *CDC11* und *SEP7* als SUMO-Substrate bekannt (Johnson und Blobel, 1999). Septine formen einen 10nm filamentösen Ring um die Knospungsstelle der Mutterzelle. Dieser Ring ist für die Zellpolarität und Regulation der Cytokinese wichtig und bleibt bis zur Abtrennung der Tochterzelle von der Mutterzelle erhalten. In der G2/M Phase des Zellzyklus wird die Integrität dieses Rings über bislang unbekannte Mechanismen des Morphogenesekontrollpunkts (morphogenesis checkpoint) geprüft. Die SUMOylierung der Septine findet

während der Mitose vor Beginn der Anaphase statt und verschwindet abrupt mit Einsetzen der Cytokinese. Der Abbau des Rings ist in Septin-Mutanten gestört, die nicht mehr SUMOyliert werden können. Für die Dynamik des Ringes scheint die SUMOylierung benötigt zu werden, allerdings haben nicht-SUMOylierbare Septinmutanten keinen Wachstumsphänotyp, und der G2/M-Phänotyp der (De)-Konjugationsmutanten (*uba2ts*, *ubc9-1*, *ulp1ts*) läßt sich hierdurch nicht erklären (Johnson und Blobel, 1999).

## **Zielsetzung der Arbeit**

Die Konjugation des Ubiquitin-ähnlichen Proteins SUMO an zelluläre Proteine sowie die SUMO-Dekonjugation von Substraten sind essentielle Vorgänge in der Hefe *S. cerevisiae*. Die Gründe hierfür sind aber bisher nicht bekannt. Obwohl in Säugern, im Gegensatz zur Hefe, bereits eine Vielzahl von SUMO-Substraten identifiziert wurden, sind Konsequenz und Funktion der Modifikation noch weitgehend unverstanden.

Ziel dieser Arbeit war, Funktionen des SUMO-Systems besser zu verstehen. Insbesondere sollte der Frage nachgegangen werden, ob und wie das SUMO-System funktionell mit dem Ubiquitin-System verknüpft ist und wie beide Systeme sich gegenseitig beeinflussen können. In *S.cerevisiae* sollten dafür SUMO-Substrate biochemisch aufgereinigt, mittels Massenspektrometrie identifiziert und weitergehend charakterisiert werden. Besonders bei zentralen Regulatoren der Zelle wäre es möglich, daß die SUMO-Konjugation für das Wachstum unter bestimmten Bedingungen notwendig ist und ebenfalls eine Regulation über das Ubiquitin-System stattfindet. Phänotypische Analysen könnten dann Aufschluß über die Funktion der SUMOylierung sowie die Verknüpfung zum Ubiquitin-System geben und modellartig für eine interaktive Regulation durch beide Systeme sein.

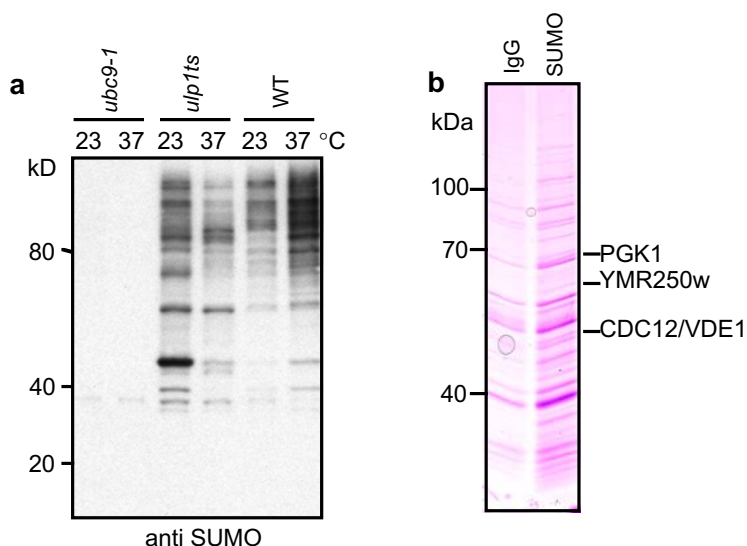
Für die biochemische Aufreinigung wurden Hefen verwendet, die SUMO-Substrate akkumulieren. Die Herstellung eines spezifischen anti-SUMO-Antikörpers sollte die Immunoselektion von SUMO-Substraten ermöglichen.



## 2. Ergebnisse

### Aufreinigung von SUMO-Substraten aus *S. cerevisiae*.

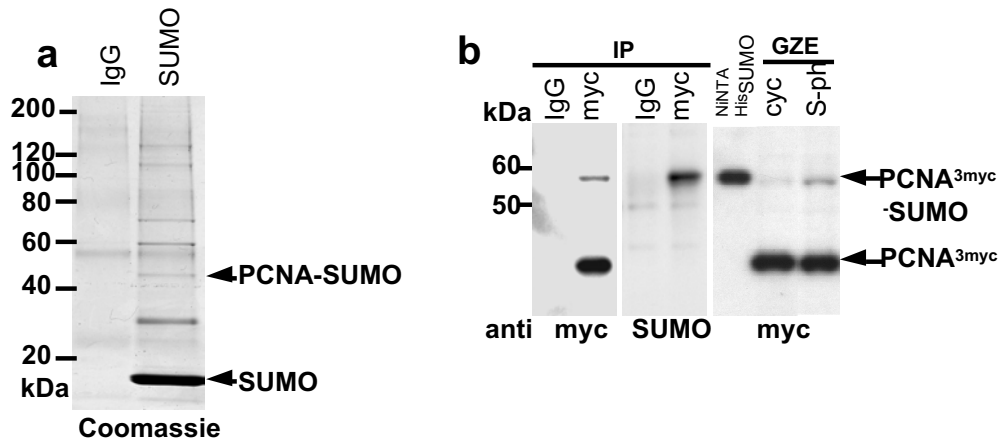
Für eine biochemische Aufreinigung ist es von besonderer Bedeutung während der Zellyse und der anschließenden Aufreinigung SUMO-dekonjugierende Enzyme zu inaktivieren. Das Gen *ULP1* kodiert für ein SUMO-prozessierendes und dekonjugierendes Enzym (Li und Hochstrasser, 1999). Ein Hefestamm mit dem konditionalen Allel *ulp1ts* reichert bestimmte SUMO-Substrate bereits bei permissiven Temperaturen an, so daß dieser Stamm für eine Aufreinigung geeignet schien. Zur Aufreinigung von SUMO-Substraten wurde in Kaninchen ein Serum gegen das Hefe-SUMO hergestellt. Das affinitätsgereinigte Serum erkannte in Western blots aus Gesamtzellextrakt spezifisch SUMO-Substrate (Abb. 4a). Diese Substrate waren im *ubc9-1* Stamm, der konditional inaktiv in der SUMO-Konjugation ist, abwesend und einige Substrate akkumulieren in dem *ulp1ts* Stamm. In Immunpräzipitationen (IPs) konnte weitergehend gezeigt werden, daß SUMO-Substrate spezifisch aus Zellysaten aufgereinigt und über Western blot nachgewiesen werden können (nicht gezeigt). Für eine Aufreinigung im präparativen Maßstab wurden *ulp1ts* Zellen, die bei permissiver Temperatur wuchsen, unter nativen Bedingungen lysiert und mit anti-SUMO Antikörpern, die an magnetische Protein A Perlen gekoppelt waren, immunpräzipitiert. Gebundene Proteine wurden eluiert, elektrophoretisch aufgetrennt und über Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Es konnten mehrere, spezifisch in der anti-SUMO IP auftretende Banden nachgewiesen werden (Abb. 4b).



**Abbildung 4. SUMO-Substrate können mit anti-SUMO Antikörpern spezifisch nachgewiesen und immunpräzipitiert werden.** a, Western blot aus Gesamtzellextrakt der thermosensitiven Hefen *ubc9-1*, *ulp1ts* sowie WT-Zellen. Kultivierung der Zellen fand bei 23°C statt. Zur Inaktivierung der thermosensitiven Mutantenproteine wurden die Zellen 4h bei 37°C inkubiert. b, Aufreinigung von SUMO-Substraten unter nativen Bedingungen. Anti-SUMO-Immunpräzipitation aus Gesamtzellextrakt von *ulp1ts* Zellen. Als Kontrolle wurden unspezifische IgGs verwendet. Proteine wurden mit Coomassie gefärbt.

Im anti-SUMO Western blot wurden nur in der anti-SUMO IP und nicht in der unspezifischen Kontroll-IP Konjugate nachgewiesen (nicht gezeigt). Die Banden bei 48kD, 63kD und 70kD wurden massenspektroskopisch identifiziert. Die 70kD-Bande enthielt Peptide der Phosphoglycerat-Kinase aus Hefe (PGK1) sowie Peptide von SUMO. PGK1 ist ein essentielles Enzym der Glykolyse mit einem Molekulargewicht von 45kD, so daß es sehr wahrscheinlich war, daß es sich um ein SUMO-Substrat handelt. Dies konnte in anschließenden Experimenten bestätigt werden (nicht gezeigt). Bei den anderen Protein-Spezies handelte es sich um SUMO-interagierende Proteine, da diese im Gel nicht geringere Mobilität als unmodifizierte Formen der Proteine besaßen. Dies konnte für die 48kD-Bande, die als unmodifiziertes CDC12 identifiziert wurde, bestätigt werden. Im Laufe dieser Arbeit publizierte Erica Johnson (Johnson und Blobel, 1999), daß die Hefe-Septine SUMO-Substrate sind. CDC12 ist selbst ein Septin, wird aber nicht SUMOyliert, interagiert aber mit den Septinen CDC3, CDC11 und SEP7, die Zellzyklus-abhängig SUMOyliert werden (vergl. S. 14). Zwei weitere SUMO-Interaktoren sind YMR250w, eine putative Glutamat-Decarboxylase (Bande bei 63kD), sowie die Nuklease VDE1, die ebenfalls in der 48kD-Bande identifiziert wurde (Abb. 4b).

Um weitere SUMO-Substrate zu identifizieren, wurde eine Aufreinigung in zwei Schritten etabliert. Hierfür wurde ein mit sieben Histidinen markiertes SUMO-Konstrukt (<sup>His</sup>SUMO), welches unter Kontrolle des konstitutiven, starken Promotors des *ADH1*-Gens steht, in das Genom des *ulp1ts* Stamms integriert. In Western blots konnte gezeigt werden, daß <sup>His</sup>SUMO *in vivo* effizient an Zielproteine geknüpft (konjugiert) werden kann, da sich das Substratmuster im Western blot um die Größe der sieben Histidine zu einem leicht höheren Molekulargewicht hin veränderte (nicht gezeigt). Im ersten Schritt der Aufreinigung wurden die Zellen aufgeschlossen und die <sup>His</sup>SUMO-Substrate über NiNTA-Agarose angereichert. Die eluierten Proteine wurden in einer anschließenden anti-SUMO IP aufgereinigt. Die gebundenen Proteine wurden eluiert, elektrophoretisch aufgetrennt und über Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Es konnten neben unkonjugierten, freien <sup>His</sup>SUMO eine Reihe von <sup>His</sup>SUMO-Substraten nachgewiesen werden, da diese Proteine spezifisch in der anti-SUMO IP und nicht in der Kontrollspur zu finden waren (Abb. 5a). Die entsprechenden Proteinbanden wurden massenspektroskopisch identifiziert (TOP2, PGK1, PCNA/POL30, RPS3). Die 44,5kD Proteinbande enthielt verschiedene Proteinspezies. Neben Massen des ribosomalen Proteins RPL3 welches wegen seines Molekulargewichts (44kD) im Gel nicht als SUMO-Substrat vorgelegen haben kann, enthielt die Bande Massen des ribosomalen Proteins RPS3 und des Proteins POL30, dem Hefe-PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Tsurimoto, 1998). Es war sehr wahrscheinlich, daß es sich bei RPS3 und POL30 um SUMO-konjugierte Proteine handelt, da das Molekulargewicht beider unmodifizierten Proteine lediglich 26,5kD bzw 29,1kD beträgt.



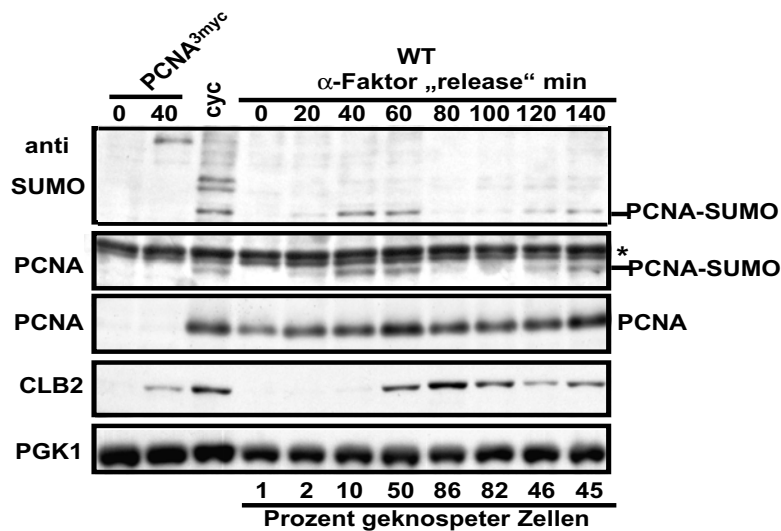
**Abbildung 5. Aufreinigung und Nachweis von SUMO-Substraten.** **a**, Durch denaturierende NiNTA-Chromatographie wurden <sup>His</sup>SUMO-Substrate aus dem Stamm *ulp1ts* (YCH123) angereichert und anschließend über anti-SUMO-Immünpräzipitation gereinigt. Als Kontrolle wurden unspezifische IgGs verwendet. Nach Coomassiefärbung wurden die Proteine über Massenspektroskopie bestimmt. In der 45kD-Bande wurde PCNA identifiziert. **b**, PCNA ist ein SUMO-Substrat. Anti-PCNA<sup>3myc</sup>-Immünpräzipitation aus *ulp1ts* Zellen (IP), denaturierende NiNTA-Chromatographie aus <sup>His</sup>SUMO-exprimierenden Zellen (NiNTA-<sup>His</sup>SUMO), Gesamtzellextrakt (GZE) aus logarithmisch wachsenden WT-Zellen (*cyc*) oder S-Phase Zellen (S-ph). Nachweis der Proteine erfolgte über anti-myc, bzw. anti-SUMO Western blot.

## Das SUMO-Substrat PCNA

Um zu bestätigen, daß PCNA ein SUMO-Substrat ist, wurde im *ulp1ts* Hefestamm chromosomal der *POL30* Leserahmen am 3'-Ende mit der Sequenz eines dreifachen myc Epitops fusioniert (PCNA<sup>3myc</sup>). Dieser Stamm ist lebensfähig und hat keinen erkennbaren Wachstumsunterschied gegenüber WT-Zellen. Nach IP von Zellextrakten mit anti-myc Antikörpern konnte die SUMO-Modifikation von PCNA bestätigt werden. Im anti-myc blot traten zwei PCNA<sup>3myc</sup> Formen unterschiedlicher Mobilität auf (Abb. 5b, links). Nur die hochmolekulare Form wurde spezifisch von SUMO-Antikörpern erkannt (Abb. 5b, mitte). PCNA<sup>3myc</sup>, welches kovalent mit SUMO verknüpft ist, läuft im Gel bei 55kD, während das unmodifizierte PCNA<sup>3myc</sup> bei ca. 38kD nachgewiesen wurde. Obwohl SUMO lediglich ein Molekulargewicht von 12kD besitzt, ist das apparente Molekulargewicht in Gelen häufig größer. Um erneut zu bestätigen, daß es sich bei der 55kD-Bande um SUMO-verknüpftes PCNA handelt, wurde N-terminal mit 7 Histidinen markiertes SUMO (<sup>His</sup>SUMO) in WT-Zellen (sie exprimieren PCNA<sup>3myc</sup> vom PCNA Locus) exprimiert. <sup>His</sup>SUMO-Substrate aus diesen Zellen wurden anschließend über NiNTA-Chromatographie aufgereinigt. Im Western blot ließ sich erneut modifiziertes PCNA nachweisen (Abb. 5b, rechts).

## SUMOylierung von PCNA wird über den Zellzyklus reguliert

PCNA ist eine essentielle Komponente eukaryontischer DNA Replikation und wird ebenfalls für eine Reihe replikationsassoziierter Prozesse benötigt (Tsurimoto, 1998; Zhang *et al.*, 2000). Dabei formt PCNA ein ringförmiges Homotrimer, das die DNA umschließt. Auf die DNA wird PCNA mithilfe eines multimeren Proteinkomplexes geladen (RFC-Komplex), der sich aus fünf AAA-Typ-ATPasen zusammensetzt. Auf der DNA interagiert PCNA mit Polymerasen, die durch Bindung auf der DNA stabilisiert werden und so mit erhöhter Prozessivität replizieren bzw. synthetisieren können. Da PCNA in der S-Phase mit Polymerase  $\delta$  für Replikation essentiell ist, wurde die Frage untersucht, ob die SUMOylierung zellzyklus-abhängig reguliert wird. Es wurde deshalb in Kaninchen ein Antiserum gegen Hefe-PCNA hergestellt und über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Diese anti-PCNA Antikörper erkannten spezifisch PCNA sowie die sumoylierte Form von PCNA. Hefezellen wurden über Zugabe von  $\alpha$ -Faktor in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert und nach Entfernen des Peptids durch Waschen der Zellen synchron in den Zellzyklus geführt. Die konjugierte Form von PCNA (PCNA-SUMO) wurde durch anti-SUMO und anti-PCNA Western blots nachgewiesen. Im Verlauf des Zellzyklus konnte eine starke Änderung der Menge von PCNA-SUMO beobachtet werden (Abb. 6).



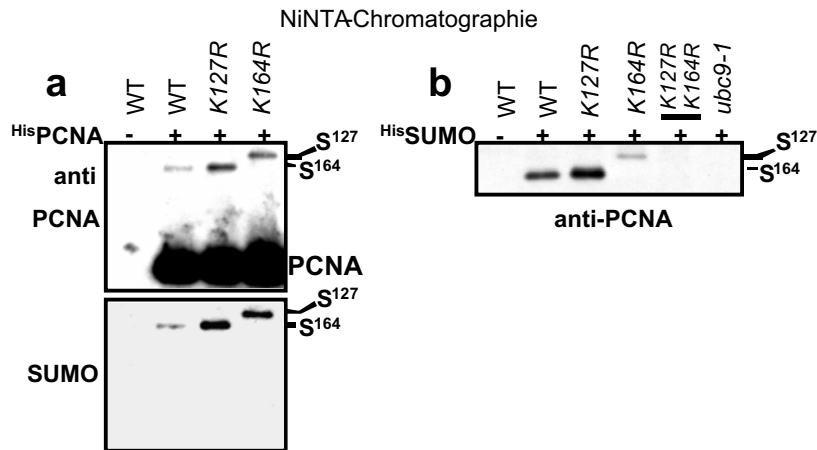
**Abbildung 6. PCNA-SUMOylierung findet in der S-Phase des Zellzyklus' statt.** WT-Zellen wurden durch Zugabe von  $\alpha$ -Faktor arretiert und anschließend synchron in die G1-Phase des Zellzyklus' entlassen. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und im Western blot analysiert (Beschriftung siehe links). Die Spezifität der PCNA und der PCNA-SUMO Banden wurde durch den Mobilitätsunterschied zu der PCNA-Variante PCNA<sup>3myc</sup> demonstriert (links oben). Die PCNA-SUMO Proteinmenge erreicht ihr Maximum nach 40min, während bei unmodifiziertem PCNA dies nach 60min der Fall ist. Unspezifische Banden sind mit einem Stern markiert. Die Zellzyklusstadien wurden über die Proteinmengen des Cyclins CLB2 sowie den Knospungsindex (unter der Abbildung) bestimmt. Als Ladekontrolle diente ein anti-PGK1 (Phosphoglycerat-Kinase) Western blot.

Während in der G1-Phase kein modifiziertes PCNA nachgewiesen werden kann (0min), steigt die PCNA-SUMO Menge danach stark an und erreicht ihr Maximum nach 40min in der S-Phase. Die Menge an unmodifiziertem PCNA wird ebenfalls reguliert. Das Maximum der Proteinmenge wird hier erst in der späten S-Phase (60min) erreicht und scheint gegenüber PCNA-SUMO zeitversetzt zu sein. Als Kontrolle der Zellzyklus-Stadien diente ein anti-CLB2 Western blot. CLB2 ist ein Cyclin, das ab der S-Phase akkumuliert und zum G2/M-Übergang des Zellzyklus proteasomal abgebaut wird (Schwab *et al.*, 1997). Als weitere Kontrolle diente der Knospungsindex, der den prozentualen Anteil von Hefezellen mit Knospe angibt. Der Beginn der Knospung von Hefen korreliert mit der S-Phase. Diese Kontrollen bestätigten, daß PCNA-Sumoylierung spezifisch für S-Phase ist (Abb. 6).

## PCNA-Modifikationsstellen für die SUMOylierung

Da die SUMOylierung von PCNA in der S-Phase erfolgt, erscheint es plausibel, daß diese Modifikation auch eine replikationsassoziierte Funktion erfüllt. Um einen näheren Einblick in die Funktion zu bekommen, war das nächste Ziel PCNA-Mutantenproteine herzustellen, die nicht mehr sumoyliert werden können. Analyse der PCNA Proteinsequenz ergab, daß im Molekül 18 Lysine vorhanden sind, die möglicherweise konjugiert werden können. Ein Sequenzvergleich mit anderen eukaryontischen Spezies zeigte eine hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenz (zwischen Hefe und Mensch 36% identische Sequenz). Von den 18 vorhandenen Lysinen sind sieben Lysine zwischen allen untersuchten Spezies konserviert. Desweiteren wurde untersucht ob im Molekül Konsensusmotive für SUMOylierung vorhanden sind. Dieses Motiv wurde in der Literatur vorgeschlagen ( $\Psi$ KXD/E;  $\Psi$  ist eine hydrophobe Aminosäure; Johnson und Blobel, 1999). Lediglich Lysin-127 und Lysin-196 weisen solch ein Konsensusmotiv auf. Im Sequenzvergleich mit den anderen Spezies zeigte sich aber, daß diese beiden Lysine nur in *S. cerevisiae* vorhanden sind und nicht in anderen eukaryontischen Spezies. Es erschien deshalb möglich, daß auch andere Lysine potentielle Modifikationsstellen sind. Deshalb wurden alle Lysine des Proteins individuell zu Argininen mutiert und die unterschiedlichen PCNA-Mutanten auf Modifikation analysiert. In anti-SUMO Western blots aus Gesamtzellextrakten konnten die PCNA-spezifischen Banden nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Interessanterweise konnte Modifikation an K127 und K164, einem konservierten Lysin, welches nicht von einem Konsensusmotiv umgeben ist, demonstriert werden. Die Ergebnisse wurden durch Aufreinigungen von <sup>His</sup>PCNA und <sup>His</sup>SUMO und anschließenden Western blots bestätigt (Abb. 7). PCNA kann an K127 und K164 SUMOyliert werden und in Mutanten, in denen beide Lysine zu Argininen mutiert sind, wird PCNA nicht mehr modifiziert (Abb. 7, rechts). Im *ubc9-1* Stamm, der ein temperatursensitives Allel des SUMO-konjugierenden Enzyms UBC9 trägt, wird PCNA ebenfalls nicht mehr SUMOyliert. In WT-Zellen wird PCNA hauptsächlich an K164 modifiziert, während Modifikation an K127 verstärkt wird, wenn K164 abwesend ist (Abb. 7). Es ließ sich in diesem Zusammenhang beobachten, daß die PCNA-

SUMO Form an K127 eine leicht verminderte elektrophoretische Mobilität gegenüber der entsprechenden K164-verknüpften Form besitzt, vermutlich weil K127 weiter in der Mitte des Proteins liegt und das über Isoeptidbindung verknüpfte Fusionsprotein dadurch langsamer im Gel läuft.



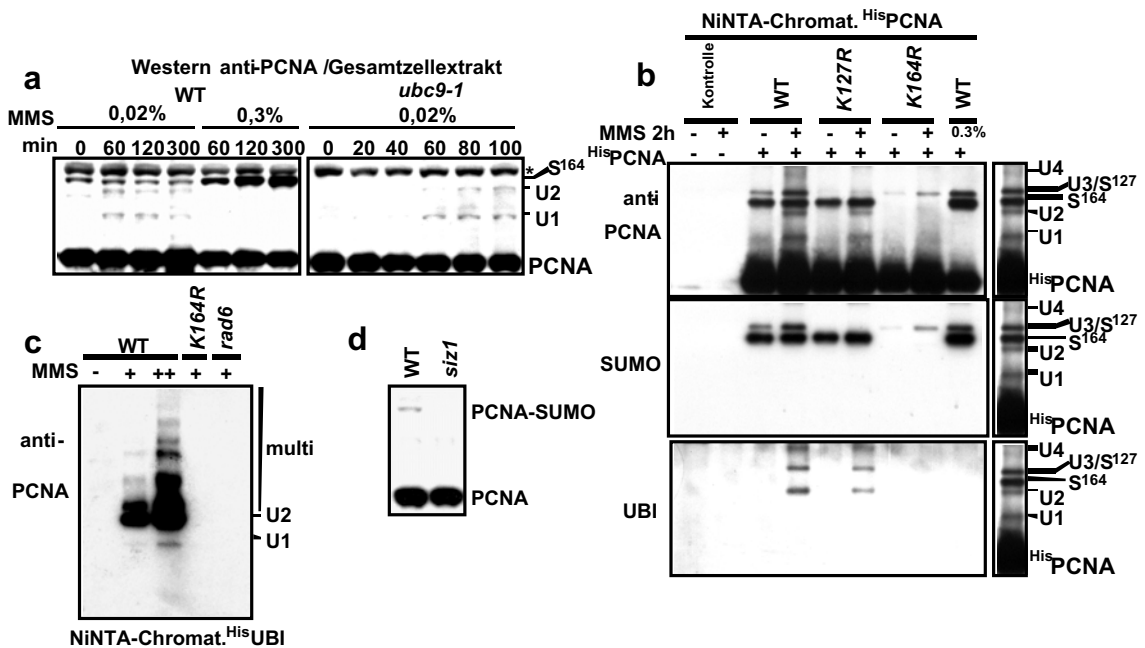
**Abbildung 7. PCNA-SUMOylierung findet an zwei Lysinen statt.** **a**, NiNTA-Chromatographie aus Zellen, die <sup>His</sup>PCNA (WT), oder His-markierte PCNA-Mutanten (K127R oder K164R) als einzige Form von PCNA exprimieren. Proteine wurden im Western blot wie angegeben nachgewiesen. SUMO wird vornehmlich an K164 konjugiert (S<sup>164</sup>), während Modifikation an K127 (S<sup>127</sup>) verstärkt ist, wenn K164 mutiert ist. **b** NiNTA-chromatographische Aufreinigung von <sup>His</sup>SUMO-Konjugaten aus den angegebenen Zellen. PCNA-<sup>His</sup>SUMO-Konjugate wurden im anti-PCNA Western blot nachgewiesen. PCNA wird im Stamm *ubc9-1* nicht SUMOyliert oder wenn beide PCNA-Lysine mutiert sind (K127R K164R).

## PCNA wird nach DNA-Schädigung ubiquitiniert

Neben der Funktion in der Replikation ist PCNA ebenfalls in verschiedene Arten der DNA-Reparatur, wie der Nukleotid Exzisions Reparatur (NER, nucleotide excision repair) und der Reparatur fehlgepaarter DNA (MMR, mismatch repair), involviert (Tsurimoto, 1998). Weiterhin konnte ein Allel (*pol30-46*) von PCNA aus *S. cerevisiae* genetisch in den fehlerfreien Zweig postreplikativer DNA-Reparatur eingeordnet werden (Torres-Ramos *et al.*, 1996), der über das Ubiquitin-konjugierende Enzym RAD6 vermittelt wird (RAD6-DNA-Reparaturweg).

Es sollte deshalb untersucht werden, ob PCNA-SUMOylierung auch über DNA-Schädigung reguliert werden kann. Dafür wurden Zellen mit der DNA-alkylierenden Substanz Methyl-Methanosulfonat (MMS) unterschiedlich lange behandelt und im anti-PCNA Western blot die SUMOylierung beobachtet. Bei einer geringen Konzentration von MMS (0,02%) wurde nur eine unbedeutende Änderung der SUMOylierung beobachtet (Bande S<sup>164</sup>; Abb. 8a, links) Wenn aber eine für die Zellen tödliche Konzentration (0,3%) eingesetzt wurde, nahm die SUMOylierung drastisch zu (Abb. 8a). Der Anteil der SUMOylierten Form gegenüber der unmodifizierten Form lag bei ca. 30-40%.

Da PCNA in der Zelle als Homotrimer vorliegt und eventuell nicht alle Untereinheiten eines Homotrimers modifiziert werden, reicht dieser Anteil vermutlich aus, Replikation drastisch zu beeinflussen. Die Spezifität der Modifikation wurde mit dem *ubc9-1* Stamm bewiesen, in dem SUMOylierung an PCNA nicht beobachtet werden kann. Interessanterweise traten nach Behandlung mit geringer Konzentration MMS (0,02%) noch weitere Modifikationen auf, die nicht *UBC9*-abhängig waren und auch nicht in unbehandelten Zellen auftraten (Abb. 8a).



**Abbildung 8. PCNA-Modifikationen werden durch DNA-Schädigung reguliert.** DNA-Schädigung von Zellen wurde mit 0,02% bzw. 0,3% MMS für die angegebene Zeit induziert. **a**, Extrakte der angegebenen Zellen wurden in anti-PCNA Western blots analysiert. SUMOyliertes PCNA an K164 ( $S^{164}$ ) und ubiquitiniertes PCNA (U1 und U2) sind auf der rechten Seite der Abbildung markiert. Eine unspezifische Bande, die im Gel mit den Konjugaten U3 und  $S^{127}$  comigriert, ist mit einem Stern markiert (siehe aber auch b). **b**, Nachweis von SUMOylierten und ubiquitinierten PCNA. NiNTA-Chromatographie aus Zellen, die  $^{His}$ PCNA und seine angegebenen Lysin-Mutanten als einzige Form von PCNA exprimieren. Die monoubiquitinierte Form (U1) wird nicht vom anti-Ubiquitin Antikörper erkannt. (siehe aber a und c). U1, monoubiquitiniert; U2-4, multiubiquitiniert;  $S^{127}$  und  $S^{164}$ , SUMOyliert an K127, bzw. K164.  $^{His}$ PCNA-Mutanten (*K127R* und *K164R*) wurden benutzt, um die Lysine für Modifikation nachzuweisen. Die Konjugate U3 und  $S^{127}$  comigrieren in Gelen. **c**, Mono- und Multiubiquitinierung von PCNA an K164 werden durch verschiedene MMS-Konzentrationen reguliert. NiNTA-Chromatographie aus Zellen, die His-markiertes Ubiquitin ( $^{His}$ UBI) exprimieren. Nachweis der PCNA Ubiquitin-Konjugate im anti-PCNA Western blot. (-, kein MMS; +, 1h 0,02% MMS; ++, 2h 0,02% MMS) **d**, PCNA-SUMOylierung ist abhängig vom SUMO E3-Faktor SIZ1. SUMOylierung wird lediglich in ungeschädigten WT-Zellen, nicht aber in *siz1* Zellen beobachtet

Ausgehend von diesen Beobachtungen und der Mobilität der Modifikationen (37kD bzw 44kD, U1 bzw. U2), wurde spekuliert, daß es sich um PCNA-Ubiquitin-Konjugate handelt. In anschließenden Experimenten konnte dies

bewiesen werden. Es wurden Stämme hergestellt, die als einzige PCNA-Form Epitop-markiertes <sup>His</sup>PCNA exprimierten. Über NiNTA-Chromatographie wurde <sup>His</sup>PCNA spezifisch aufgereinigt und mithilfe von Western blots auf Modifikationen untersucht (Abb. 8b). In anti-Ubiquitin Western blots konnten <sup>His</sup>PCNA-Ubiquitin-Konjugate mit zwei, drei und vier verknüpften Ubiquitinen nachgewiesen werden (U2-U4). Diese Modifikationen wurden spezifisch nach Behandlung mit geringer Konzentration von MMS induziert und waren abhängig von K164. Als Kontrolle diente die Mutante *K127R*, die an K164 noch ubiquitiniert wird. Somit wird PCNA nach nicht letaler DNA-Schädigung spezifisch an K164 mono-, bzw. multiubiquitiniert, während nach Schädigung mit letaler Dosis MMS (0,3%) keine Ubiquitinierung mehr stattfindet und stattdessen am gleichen Lysin eine drastische Zunahme der SUMOylierung zu beobachten ist.

## **PCNA ist ein Substrat des *RAD6*-Reparaturweges**

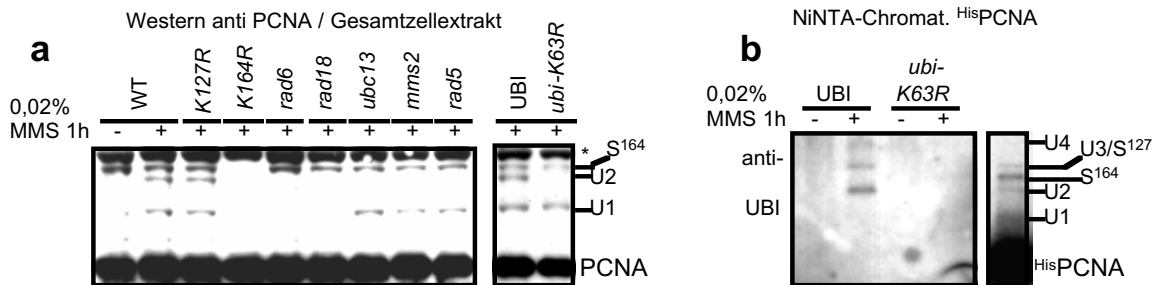
Es konnte gezeigt werden, daß PCNA spezifisch nach DNA-Schädigung ubiquitiniert wird. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob PCNA ein Substrat des *RAD6*-Reparaturweges ist. Dieser Reparaturweg ist die zentrale Komponente der postreplikativen DNA-Reparatur eukaryontischer Zellen (Prakash *et al.*, 1993). Seine Schlüsselemente sind zwei Ubiquitin-konjugierende Enzyme, *RAD6* und das *UBC13/MMS2*-Heterodimer, das über zwei RING-Finger Proteine *RAD18* und *RAD5*, zum Chromatin rekrutiert wird (Abb. 10 und Ulrich und Jentsch, 2000).

Es konnte in detaillierten Experimenten gezeigt werden, daß PCNA tatsächlich ein Substrat des *RAD6*-Reparaturweges ist. In anti-PCNA Western blots aus Stämmen, die jeweils einzelne Gene des *RAD6*-Reparaturweges deletiert haben, bot sich nach Induktion von DNA-Schädigung ein interessantes Bild (Abb. 9a). PCNA-Ubiquitin Konjugate waren abwesend in *rad6* und *rad18* Mutanten, während in *ubc13*, *mms2* und *rad5* Mutanten jeweils nur noch monoubiquitiniertes PCNA beobachtet wurde (Bande U1). Im Gegensatz dazu war die Konjugation von SUMO an PCNA, wie bereits in vorherigen Experimenten gezeigt, unbeeinflusst da SUMOylierung an Lysin-164 weiterhin beobachtet wurde (Bande S<sup>164</sup>). In *PCNA-K164R*-Mutanten war nicht nur die SUMOylierung, sondern ebenfalls auch die Ubiquitinierung abwesend, während in *K127R*-Mutanten die Ubiquitinierung der WT-Situation entsprach (Abb. 9a, Banden U1 und U2).

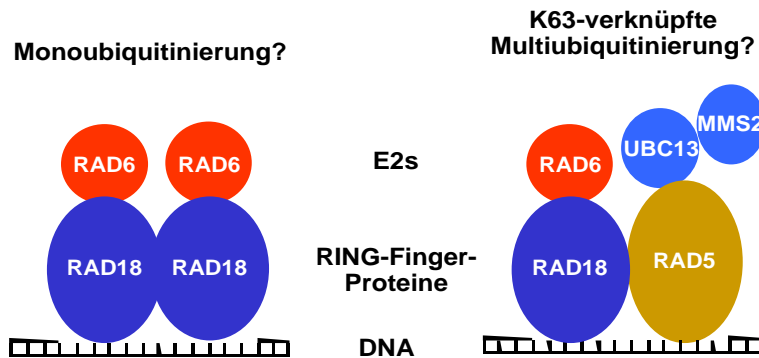
Es wurde gefolgert, daß die Enzyme des *RAD6*-Reparaturwegs PCNA nach DNA-Schädigung ubiquitinieren und PCNA ein Substrat von *RAD6* ist. In einer vorhergehenden Arbeit im Labor konnte gezeigt werden, daß *RAD18* mit *RAD5*, ebenfalls ein DNA-bindendes Protein, welches das heterodimere *UBC13/MMS2* Ubiquitin-konjugierende Enzym zum Chromatin rekrutiert, assoziiert ist (Ulrich und Jentsch, 2000). Es wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, in dem die Komponenten *RAD6/RAD18* zusammen mit *UBC13/MMS2/RAD5* die Ubiquitinierung von unbekanntem Substraten bewirken. Die Abhängigkeit der PCNA-Ubiquitinierung von diesen



Komponenten konnte jetzt demonstriert werden (Abb. 9 und 10). Weitere Experimente sollten einen genaueren Einblick in das Zusammenspiel der Komponenten geben.



**Abbildung 9. PCNA-Ubiquitinierung wird von Komponenten des RAD6-Reparaturwegs spezifisch nach DNA-Schädigung vermittelt.** **a**, PCNA-Ubiquitinierung wird von Mutanten des RAD6-Reparaturwegs unterschiedlich beeinflusst. Ubiquitinierung (U1 und U2) ist in *rad6* und *rad18* Zellen komplett abwesend. Lediglich monoubiquitiniertes PCNA (U1) ist in *ubc13*, *mms2* und *rad5* vorhanden. Gleiches gilt für die Ubiquitin-Mutante (*ubi-K63R*). SUMOylierung ist unbeeinflusst und lediglich in *PCNA-K164R* Mutanten abwesend. Nachweis der PCNA-Konjugate erfolgte im anti-PCNA Western blot. **b**, PCNA-Multiubiquitinketten werden über Lysin-63 des Ubiquitins verknüpft. <sup>His</sup>PCNA NiNTA-Chromatographie aus Zellen, die WT-Ubiquitin (UBI) oder die *ubi-K63R*-Mutante als einzige Form von Ubiquitin exprimieren. Nachweis der PCNA-Ubiquitin-Konjugate erfolgte im anti-Ubiquitin Western blot.



**Abbildung 10. Modell alternativer Proteinkomplexe von Komponenten des RAD6-Reparaturwegs.** Die RING-Finger Proteine RAD18 und RAD5 bilden Homodimere (Für RAD5 in Abbildung nicht gezeigt). RAD18 und RAD5 rekrutieren die Ubiquitin-konjugierenden Enzyme RAD6 bzw. das Heterodimer UBC13/MMS2 an die geschädigte DNA. Durch Heterodimerisierung von RAD18 und RAD5 könnte ein Komplex gebildet werden, der K63-verknüpfte Multiubiquitinketten synthetisiert (nach Ulrich *et al.*, 2000).

## PCNA wird über Lysin-63-verknüpfte Ubiquitinketten multiubiquitiniert

Das UBC13/MMS2 Heterodimer ist das Konjugationsenzym für die Synthese von freien Multiubiquitinketten, die über Lysin-63 des Ubiquitins verknüpft werden. Substrate für diese Ketten sind im Kontext der DNA-Reparatur bisher nicht bekannt (Hofmann und Pickart, 1999; Pickart, 2000). Aber Hefen, die lediglich die mutante Form von Ubiquitin exprimieren (*ubi-K63R*) und keine K63-verknüpften Ketten mehr synthetisieren können, sind sensitiv gegenüber DNA-Schädigung (Spence *et al.*, 1995). Dadurch bot sich ebenfalls eine Erklärung für die *ubc13*, *mms2* bzw. *rad5* Mutanten, in denen nur noch PCNA-Monoubiquitinierung beobachtet wurde (vergl. Abb. 9). Über das Lysin-63 des verknüpften Ubiquitins an PCNA könnten Multiubiquitinketten synthetisiert werden. In Hefezellen, in denen alle vier Ubiquitin-Gene deletiert sind und die als einzige und lebensnotwendige Quelle WT-Ubiquitin (UBI) oder die resultierende Mutante K63R (*ubi-K63R*) von einem Plasmid exprimieren, konnte die Wichtigkeit des Lysin-63 für die PCNA-Ubiquitinierung demonstriert werden. In der Tat konnten nur monoubiquitinierte PCNA-Spezies (U1) in anti-PCNA Western blots nachgewiesen werden (Abb. 9a, rechts).

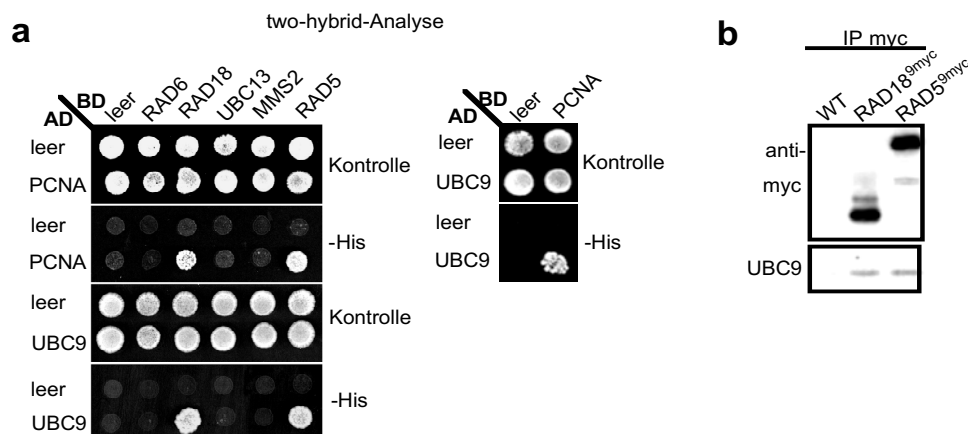
Um zu bestätigen, daß PCNA-Ubiquitinketten in *ubi-K63R* Mutanten abwesend sind, wurden NiNTA-Aufreinigungen von <sup>His</sup>PCNA (Expression mit niedriger Kopienzahl vom PCNA-Promotor) aus den beiden entsprechenden Stämmen (UBI und *ubi-K63R*) durchgeführt und mit anti-Ubiquitin Antikörper entwickelt (Abb. 9b). Ubiquitinketten an PCNA konnten in *ubi-K63R* Mutanten nicht detektiert werden, während das Ergebnis aus den Zellen, die WT-Ubiquitin exprimierten, den vorhergehenden Ergebnissen entsprach: Ubiquitinketten an PCNA werden spezifisch nach DNA-Schädigung induziert (Banden U2 bis U4) und sind abhängig von Lysin-63 des Ubiquitins (Abb. 9b). Um nochmals zu demonstrieren, daß die PCNA-Multiubiquitinierung tatsächlich von Komponenten des RAD6-Reparaturwegs abhängt, wurden Versuche mit markiertem Ubiquitin (<sup>His</sup>UBI) durchgeführt. <sup>His</sup>UBI wurde in WT, *pol30-K164R* sowie in *rad6* Mutanten exprimiert und ebenfalls über NiNTA-Chromatographie aufgereinigt. Es konnten, wie erwartet, keine PCNA-Ubiquitin-Konjugate in *pol30-K164R* sowie in *rad6* Mutanten nachgewiesen werden. PCNA-Multiubiquitinierung war auch hier abhängig von DNA-Schädigung und hochmolekulare PCNA-Ubiquitinspezies wurden im anti-PCNA Western blot klar sichtbar (Abb. 8c).

## Neue Interaktionspartner von PCNA

PCNA wird von einem spezifischen Ladekomplex (RFC-Komplex; "clamp loader") auf die DNA geladen (Tsurimoto, 1998). Es wurde beobachtet, daß ein Mutantenprotein von PCNA (Mutation in einem  $\beta$ -Faltblatt; S115P-Mutation; *pol30-52*; Ayyagari *et al.*, 1995), das nicht mehr ausreichend trimerisiert, *in vivo* nicht nachweisbar modifiziert wird (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Interpretation ist, daß die Modifikationen nach der Trimerisierung stattfinden und DNA-assoziierte Enzyme involviert sind. Es wurden deshalb die enzymatischen Komponenten des RAD6-Reparaturwegs

auf physische Interaktion mit PCNA im „two hybrid assay“ getestet. Tatsächlich konnte Interaktion mit den DNA-bindenden Proteinen RAD18 und RAD5 nachgewiesen werden, nicht jedoch mit den anderen getesteten Komponenten des *RAD6*-Reparaturwegs (Abb. 11a, links). Dies ist von hohem Interesse, da es sich bei beiden Proteinen um sogenannte RING-Finger-Proteine handelt, die zu einer Klasse von Ubiquitin-Ligasen gehören (Joazeiro und Weissman, 2000). Diese Beobachtung, zusammen mit der Erkenntnis, daß RAD18 und RAD5 PCNA-Ubiquitinierung vermitteln (vergl. 9a), spricht stark dafür, daß diese beiden Proteine DNA-gebundene Ubiquitin-Ligasen für PCNA sind.

Das SUMO-konjugierende Enzym UBC9 interagiert in der Regel direkt mit Substraten (Bernier-Villamor *et al.*, 2002; Hochstrasser, 2002). Es wurde deshalb getestet, ob auch PCNA von UBC9 direkt erkannt werden kann. In der Tat ist dies auch für PCNA der Fall, wie ebenfalls in einem „two hybrid assay“ gezeigt werden konnte (Abb. 11a, rechts). Überraschend ist aber, daß UBC9 ebenfalls an die Proteine RAD18 und RAD5 des *RAD6*-Reparaturwegs binden kann (Abb. 11a). Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden Co-IPs durchgeführt. In der Tat konnte UBC9 in IPs von chromosomal markiertem RAD18 bzw. RAD5 nachgewiesen werden (Abb. 11b). Diese Ergebnisse deuten an, daß UBC9 funktionell mit dem *RAD6*-Reparaturweg assoziiert ist und das darüberhinaus die Komponenten eine regulatorische Einheit bilden könnten.

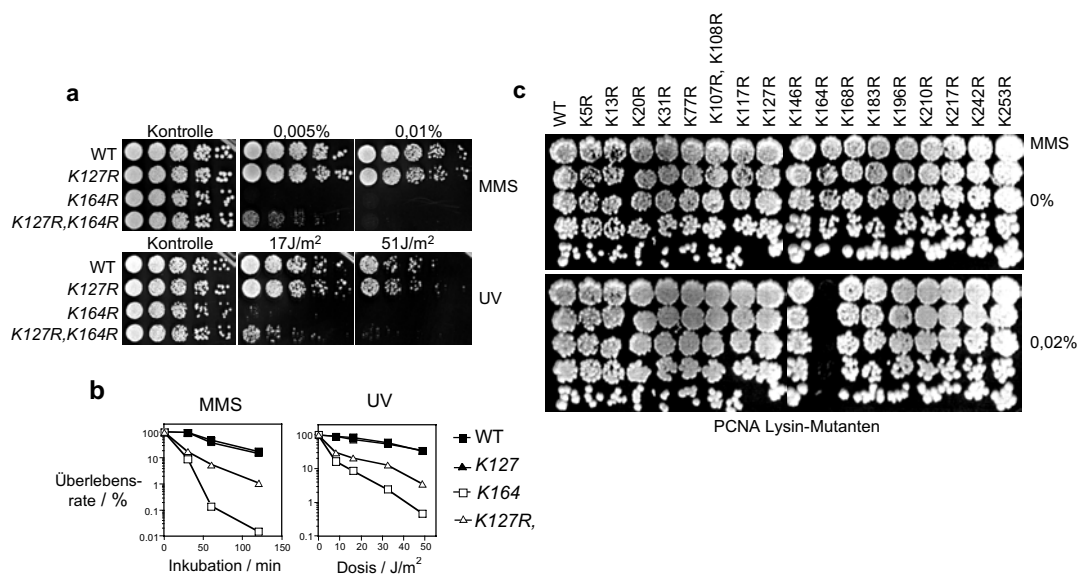


**Abbildung 11. UBC9 und PCNA interagieren mit Komponenten des *RAD6*-Reparaturwegs.** **a**, Spezifische Interaktion von UBC9 und PCNA mit den RING-Finger-Proteinen RAD18 und RAD5. UBC9 interagiert außerdem mit PCNA. Nachweis der Interaktionen erfolgte im „two hybrid assay“. **b**, Co-Immünpräzipitationen von UBC9 (exprimiert in hoher Kopienzahl) mit RAD18 (RAD18<sup>9myc</sup>) oder RAD5 (RAD5<sup>9myc</sup>). Detektion im anti-UBC9 Western blot.

Die beobachteten physischen Interaktionen sowie die Tatsache, daß das gleiche Lysin (K164) entweder SUMOyliert oder ubiquitiniert werden kann, sprechen dafür, daß die unterschiedlichen Modifikationen PCNA für unterschiedliche Funktionen markieren.

## PCNA-Modifikationen an Lysin-164 sind essentiell für DNA-Reparatur

Um die Frage nach der Relevanz der neu beschriebenen Modifikationen zu untersuchen, wurden Hefestämme, die als einzige Änderung in ihrem genomischen PCNA-Lokus jeweils einen Lysin-zu-Arginin Austausch besitzen, phänotypisch untersucht. Ein beobachteter Phänotyp kann den entsprechenden Modifikationen, die an diesem Lysin in WT-Zellen stattfinden können, zugeordnet werden.



**Abbildung 12. PCNA-Modifikationen an K164 sind essentiell für DNA-Reparatur.** **a**, Sensitivität von PCNA-Mutanten gegenüber DNA-Schädigung durch MMS und UV-Licht. Fünffache, serielle Verdünnungen einer gleichen Anzahl von Zellen der stationären Phase wurden auf Platten aufgebracht. WT-PCNA und die angegebenen Mutanten wurden als einzige PCNA-Quelle vom eigenen genomischen Locus exprimiert **b**, Quantifizierung der Überlebensraten von Zellen aus **a**. Die Werte repräsentieren den prozentualen Anteil überlebender Zellen nach Bestrahlung mit UV-Licht oder Behandlung mit MMS. **c**, Lediglich die PCNA Lysin-Mutante K164R und keine der anderen angegebenen Lysin-Mutanten zeigt erhöhte Sensitivität gegenüber MMS. Stationäre Zellen der angegebenen Mutanten (hergestellt über "plasmid shuffle") wurden in fünffachen Verdünnungen auf YPD-Platten aufgebracht und nach Wachstum auf YPD- sowie auf YPD-MMS-Platten (0,02%) umgestempelt.

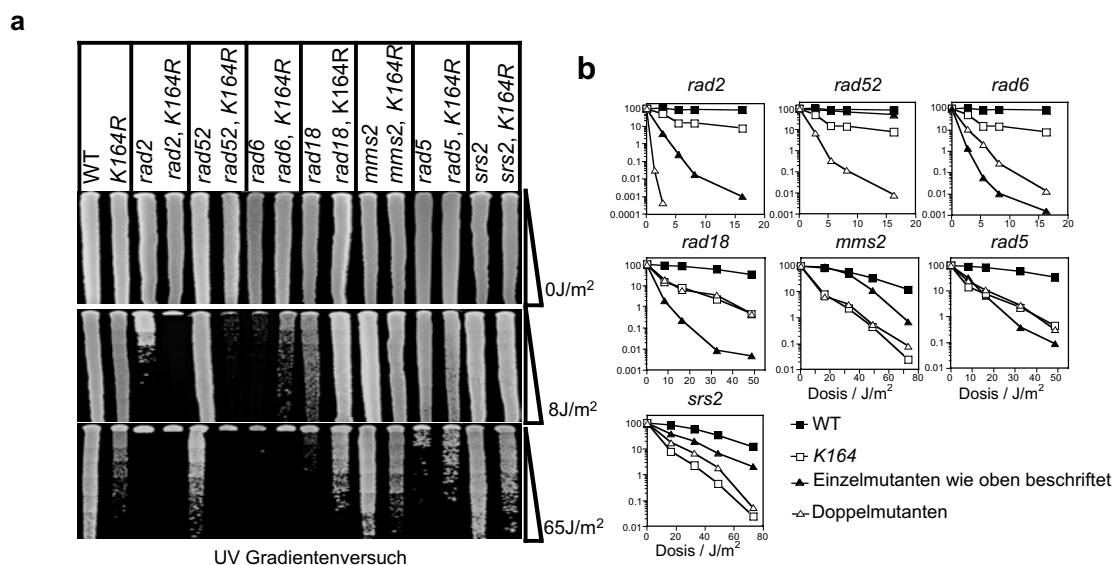
Es zeigte sich, daß Stämme in denen PCNA-K164 mutiert ist (*pol30-K164R*), keinen detektierbaren mitotischen Wachstumsdefekt aufwiesen. Gleiche Beobachtungen wurden für die SUMOylierungsstelle K127 (*pol30-K127R*) gemacht. Daraus kann geschlossen werden, daß die Modifikationen nicht essentiell für Replikation sind. Aber es wurde beobachtet, daß Zellen, in denen PCNA-K164 abwesend ist (*pol30-K164R*), stark sensitiv gegen DNA-Schädigung sind. Zellen dieses Stammes stellten ihr Wachstum ein, wenn sie mit UV-Licht bestrahlt wurden. Ähnliche Beobachtungen wurden gemacht, wenn die gleichen Zellen mit der DNA-alkylierende Substanz MMS behandelt wurden (Abb. 12a). Hierfür wurden serielle Verdünnungen von stationären Zellen auf MMS-haltige Platten aufgetragen. Während das Wachstum von WT- und *pol30-K127R*-Zellen bei einer MMS Konzentration von 0,01% und einer UV-Dosis von 51J/m<sup>2</sup> nur unwesentlich beeinflusst war, wuchs die *pol30-K164R*-Mutante unter diesen Bedingungen nicht mehr (Abb. 12a und b). Weitere Test ergaben, daß K164 das einzige Lysin von PCNA ist, welches für eine zelluläre Antwort auf DNA-Schädigung benötigt wird und keine der anderen 17 Lysin-Mutanten von PCNA einen Wachstumsdefekt unter diesen Bedingungen aufwies (Abb. 12c).

Bemerkenswert sind die Ergebnisse einer Mutante, bei der beide Modifikationsstellen mutiert sind (*pol30-K127R,K164R*). Während die Einzelmutante *pol30-K164R* bei einer MMS Konzentration von 0,005% nicht mehr wächst, kann die *pol30-K127R,K164R*-Doppelmutante noch überleben, wenn auch das Wachstum gegenüber WT extrem gering ist und diese Mutante bei höherer MMS Konzentration ebenfalls stirbt (Abb. 12a). Der Wachstumsdefekt von *pol30-K164R* nach DNA-Schädigung wird somit partiell durch die *pol30-K127R*-Mutante supprimiert. Während Modifikation an K164 somit essentiell für DNA-Reparatur ist, scheint SUMOylierung an K127 inhibierend auf DNA-Reparatur zu wirken. Um die beschriebenen Ergebnisse quantitativ zu erfassen, wurden Zellen der entsprechenden Stämme entweder in MMS-haltigen Medium kultiviert und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten auf Medium ohne MMS ausplattiert, oder direkt ausplattiert und unterschiedlich stark mit UV-Licht bestrahlt. Anhand dieser Ergebnisse konnten die vorherigen, qualitativen Ergebnisse bestätigt werden (Abb. 12b).

## **Epistatische Analyse der *PCNA-K164R*-Mutante**

Um die Modifikationen an Lysin-164 auch genetisch einzuordnen, wurden vergleichende Analysen mit Komponenten beschriebener DNA-Reparaturwege durchgeführt. Detaillierte genetische Analysen der letzten zwanzig Jahre führten zu der Erkenntnis, daß in Hefe drei distinkte DNA-Reparaturwege existieren (Broomfield *et al.*, 2001; Friedberg *et al.*, 1995; Prakash *et al.*, 1993). Der *RAD3*-Reparaturweg vermittelt Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) von UV-Licht induzierten Pyrimidin-Dimeren und anderen sperrigen DNA-Addukten. Der *RAD52*-Reparaturweg beseitigt DNA-Doppelstrangbrüche über homologe Rekombination, und der *RAD6*-Reparaturweg vermittelt postreplikative Reparatur.

Über Kreuzung der PCNA-Mutante *pol30-K164R* mit Mutanten der unterschiedlichen DNA-Reparaturwege wurden Doppelmutanten hergestellt, die auf ihre UV-Sensitivität gegenüber Einzelmutanten getestet wurden (Abb. 13a und b). Zellen, in denen *RAD2* deletiert ist, zeigen wie erwartet starke Sensitivität. Die entsprechende Doppelmutante hingegen zeigt nochmals drastisch erhöhte Sensitivität gegenüber der *rad2* Einzelmutante. *RAD2* ist somit nicht epistatisch zu *pol30-K164R*, da die Sensitivität der Doppelmutante gegenüber der Einzelmutante stark erhöht ist und ausgeschlossen werden kann, daß beide Gene im gleichen Reparaturweg wirken. Ähnlich verhält es sich mit der *rad52* Mutante. Sie zeigt relativ geringe Sensitivität, da durch UV-Licht verhältnismäßig wenige Doppelstrangbrüche induziert werden. Die Doppelmutante *rad52 pol30-K164R* dagegen weist eine extrem hohe Sensitivität auf. *rad52* ist somit ebenfalls nicht epistatisch zu *pol30-K164R*, so daß PCNA-Modifikationen an K164 in beiden Reparaturwegen keine entscheidende Rolle spielen können.



**Abbildung 13.** Epistatische Analyse der PCNA-Mutante *K164R* (*pol30-K164R*) mit Mutanten verschiedener DNA-Reparaturwege. **a**, Bestrahlung mit UV-Licht. Hierfür wurden gleiche Mengen Zellen der stationären Phase in parallelen Linien auf YPD Platten aufgetragen und anschließend mit einem von oben schrittweise größer werdenden UV-Gradienten bestrahlt. **b**, Quantifizierung der Überlebensraten. Die Werte stellen den prozentualen Anteil überlebender Zellen nach Bestrahlung mit UV-Licht dar. Die Behandlung der Zellen erfolgte wie in den Methoden beschrieben. Die Werte stammen aus 2-4 unabhängigen Experimenten mit jeweils doppelter Auszählung der Zellen. Der relevante Genotyp, mit dem *pol30-K164R* gekreuzt wurde, ist über der Abbildung angegeben.

Die Proteine des *RAD6*-Reparaturwegs wirken vermutlich direkt auf die Replikationsmaschinerie an der Replikationsgabel, die nach dem Antreffen geschädigter DNA anhält. Sie ermöglichen schließlich eine Wiederaufnahme der Replikation nachdem sie den Schaden beseitigt haben (Broomfield *et al.*, 2001; Hoeijmakers, 2001). Dies kann über zwei distinkte, *RAD6*-abhängige Reparaturzweige erfolgen (Xiao *et al.*, 2000). Bei dem fehlerhaften Zweig (error prone mode) werden vermutlich spezifische Polymerasen, die hohe sterische Toleranz für DNA-Schädigungen haben, rekrutiert. Sie bauen dann anschließend mit hoher Fehlerrate neben richtig gepaarten auch falschgepaarte Nukleotide gegenüber des fehlerhaften Strangs ein. Der andere *RAD6*-abhängige Zweig (error free mode) scheint fehlerfrei zu funktionieren, da er nicht die geschädigte Sequenz, sondern die korrekte Sequenz des Schwester-Duplexstrangs an der Replikationsgabel nutzt, um die geschädigte DNA zu reparieren. Die zugrundeliegenden Mechanismen, mit denen *RAD6* diese beiden genetisch charakterisierten Zweige kontrolliert, sind bis heute ungeklärt (Ulrich, 2002). Allerdings ist bekannt, daß die Ubiquitin-konjugierende-Aktivität des *RAD6*-Enzyms für die DNA-Reparatur essentiell ist. Es wird angenommen, daß zudem rekombinationsähnliche Ereignisse stattfinden müssen. Um die Rolle von PCNA als *RAD6*-Substrat näher zu verstehen, wurden weitere Analysen durchgeführt.

Deletionsmutanten von *RAD6*, *RAD18* und *RAD5* sind epistatisch zu *pol30-K164R*, sind aber ebenfalls sensitiver als *pol30-K164R*-Mutanten (Abb. 13), da die kodierten Proteine neben PCNA vermutlich noch andere Substrate besitzen, die eine Funktion in der DNA-Reparatur haben. Dies ist nicht überraschend, da *RAD6* nicht nur in der DNA-Reparatur Funktionen besitzt (Prakash, 1994). *RAD5* ist verwandt mit SNF2/SWI2-ähnlichen Helikasen und könnte auch eine Rolle in der Modulation von Chromatin haben (Johnson *et al.*, 1992). Ein wichtiger Befund ist aber, daß *pol30-K164R* epistatisch zu *mms2* ist, da die Doppelmutante *pol30-K164R mms2* nicht stärker sensitiv ist als die Mutante *pol30-K164R* (Abb. 13). Die K63-abhängige Multiubiquitinierung von PCNA an K164 ist somit genetisch eng mit *MMS2*-abhängiger DNA-Reparatur verbunden. Da *ubc13* und *mms2* Mutanten einen spezifischen Defekt in der fehlerfreien Reparatur haben (Broomfield *et al.*, 1998; Hofmann and Pickart, 1999), wird die K63-abhängige Multiubiquitinierung von PCNA für diesen Zweig des *RAD6*-Reparaturwegs elementar benötigt. Andererseits deutet die stärkere Sensitivität der Doppelmutante *pol30-K164R mms2* gegenüber der *mms2* Mutante auf eine Funktion der monoubiquitinierten Form von PCNA (die in der *mms2* Mutante noch vorhanden ist) in der DNA-Reparatur hin, die nach den Daten unabhängig vom fehlerfreien Reparaturzweig ist. Um diese Ergebnisse zu unterstützen wurde auch der Effekt von *srs2* untersucht. *SRS2* kodiert für eine Helikase und die entsprechende Deletion supprimiert partiell den fehlerfreien Zweig der DNA-Reparatur und leitet die Reparatur in den *RAD52*-Reparaturweg (Lawrence und Christensen, 1979; Schiestl *et al.*, 1990; Ulrich, 2001). Für die *pol30-K164R*-Mutante konnte ebenfalls eine leichte Suppression durch *srs2* beobachtet werden (Abb. 13). Dadurch konnte bestätigt werden, daß K63-abhängige Multiubiquitinierung von PCNA innerhalb des fehlerfreien Zweigs der *RAD6*-abhängigen Reparatur wirkt.

Während in *rad6* und *rad18* Zellen PCNA noch an beiden Lysinen SUMOyliert werden kann, findet in der *rad6 pol30-K164R*-Doppelmutante nur noch SUMOylierung an K127 statt. In *rad5* Zellen dagegen kann auch Monoubiquitinierung von PCNA noch stattfinden (vergl. Abb. 9a), SUMOylierung dagegen bleibt unbeeinträchtigt, während in der *rad5 pol30-K164R*-Doppelmutante nur noch an K127 SUMOyliert werden kann. Interessante Ergebnisse zeigten die Doppelmutanten mit *rad6*, *rad18* und *rad5*. In allen drei Fällen wurde die UV-Sensitivität der Einzelmutanten durch *pol30-K164R* partiell supprimiert (Abb. 13). Dies deutet auf einen inhibitorischen Effekt der SUMOylierung an K164 für DNA-Reparatur hin, neben dem bereits im oberen Teil beschriebenen inhibitorischen Effekt an K127 (vergl. Abb. 11a und b), da nur WT-PCNA an K164 sumoyliert werden kann und nicht die Mutante.

Insgesamt konnten die neu gefundenen PCNA-Modifikationen über genetische Analysen in den *RAD6*-Reparaturweg eingegliedert und funktionell zugeordnet werden.

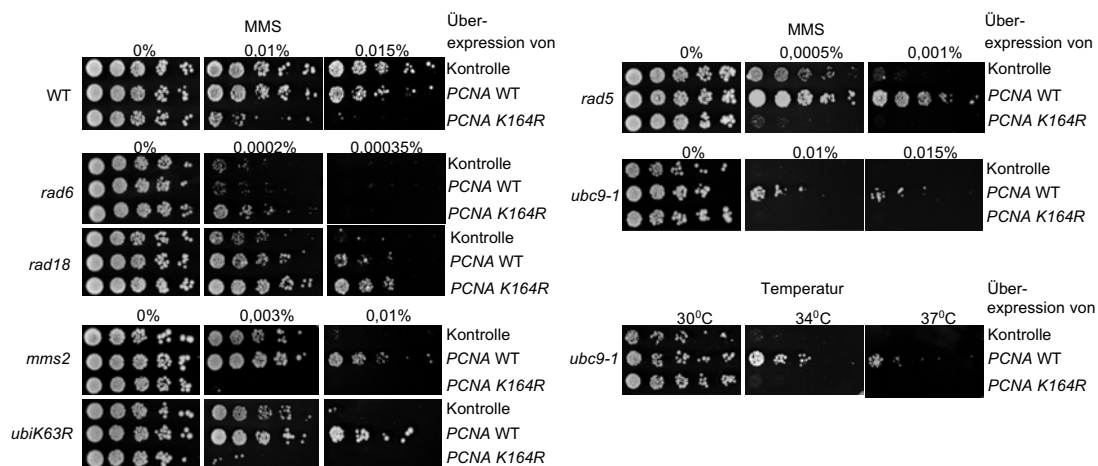
## **Effekt von PCNA Überexpression auf Mutanten des *RAD6*-Reparaturwegs**

Um die aus der epistatischen Analyse getroffenen Annahmen über die Funktionen der PCNA-Modifikationen zu stützen, wurde *PCNA* als WT bzw. *K164R*-Mutante in hoher Kopienzahl in Mutanten des *RAD6*-Reparaturwegs exprimiert und der Effekt von MMS-haltigem Medium auf Wachstum untersucht (Abb. 14).

Durch Überexpression von WT-*PCNA* werden *mms2* und *rad5* Mutanten sowie Ubiquitin-Mutanten, die Lysin-63 nicht besitzen (*ubi-K63R*), deutlich in ihrer MMS-Sensitivität supprimiert (Abb. 14 links). Die K63-abhängige Ubiquitinierung an PCNA, vermittelt über UBC13/MMS2/RAD5 aktiviert somit vermutlich die Funktion von PCNA im fehlerfreien Reparaturzweig und hohe Proteinkonzentrationen von PCNA können offensichtlich den aktivierenden Effekt der Multiubiquitinierung teilweise kompensieren. Diese Daten bestätigen auch die vorherige Erkenntnis, daß PCNA das Schlüsselsubstrat des fehlerfreien Reparaturzweigs ist. Überexpression der *PCNA-K164R*-Mutante (*pol30-K164R*), die weder mono- noch multiubiquitiniert wird, kann diesen Effekt dagegen nicht kompensieren. Vielmehr ist ein inhibitorischer Effekt zu beobachten, der allerdings auch in WT-Zellen nach DNA-Schädigung auftritt. Die monoubiquitinierte Form von PCNA ist somit für Kompensation des Defekts im fehlerfreien Reparaturzweigs notwendig. In WT-Zellen, in denen Mutanten-PCNA in hohen Mengen exprimiert wird, bilden sich vermutlich gemischte PCNA-Trimere, die nicht mehr normal modifiziert und somit auch nicht mehr effizient für DNA-Reparatur genutzt werden können. *rad6* und *rad18* Zellen können nur schwach durch WT-PCNA Überexpression gerettet werden. In diesen Zellen findet auch keine Monoubiquitinierung mehr statt. Die Sensitivitäten der *rad6* und *rad18* Zellen



werden schwach durch Expression der *pol30-K164R*-Mutante supprimiert (Abb. 14 links). Dies ist wiederum in Einklang mit der früheren Erkenntnis, daß SUMOylierung an K164 offensichtlich PCNA-abhängige DNA-Reparatur inhibiert.



**Abbildung 14. MMS-Sensitivitäten von Mutanten des RAD6-Reparaturwegs können durch starke Expression von PCNA supprimiert werden.** WT-PCNA und Mutanten-PCNA (*K164R*) wurde verglichen mit einem leeren Vektor (Kontrolle). Die Zellen besitzen noch die genomische PCNA-Kopie. Fünffache Verdünnungen frischer Zellen der angegebenen Mutanten wurden auf Platten unterschiedlicher MMS-Konzentration aufgebracht

Die Überexpressionsdaten des Stammes *ubiK63R* unterstreichen die Bedeutung von PCNA als SUMO-Substrat. Die temperatursensitive Mutante *ubiK63R* des SUMO-konjugierenden Enzyms ist sensitiv gegen DNA-Schädigung und Replikationsinhibition durch Zugabe von Hydroxyurea (Li und Hochstrasser, 2000). Bemerkenswert ist, daß *ubiK63R* Mutanten deutlich weniger sensitiv gegen MMS sind, wenn WT-PCNA überexprimiert wird. Darüberhinaus wird auch der Wachstumsdefekt der *ubiK63R* Mutante bei höheren Temperaturen partiell supprimiert (Abb. 14 rechts). Dies spricht dafür, daß bei PCNA-Überexpression vermutlich nicht die Ubiquitinierung an PCNA die Mutante *ubiK63R* supprimiert, da Ubiquitinierung von PCNA nur nach DNA-Schädigung induziert wird. Vielmehr ist vermutlich durch Überexpression von PCNA die Erhöhung der PCNA-SUMO-Menge für die Suppression verantwortlich, da die Erhöhung der Substratmenge auch die Konjugationsrate des instabilen Protein *ubiK63R* erhöht. Dies zeigt, daß PCNA in Zellen, in denen SUMO-Konjugation limitierend ist, ein wichtiges Substrat ist.

### 3. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig gezeigt, daß PCNA über drei verschiedene, posttranslationale Modifikationen reguliert werden kann. PCNA wird SUMOyliert, monoubiquitiniert und durch K63-verknüpfte Ubiquitinketten multiubiquitiniert. Von besonderer Bedeutung ist, daß diese Modifikationen alle am gleichen, zwischen eukaryontischen Spezies konservierten Lysin K164 stattfinden und dadurch PCNA für unterschiedliche Funktionen aktiviert werden kann. PCNA-Ubiquitinierung ist essentiell für *RAD6*-abhängige DNA-Reparatur, und Multiubiquitinierung durch K63-verknüpfte Ubiquitinketten aktiviert den *RAD5*-abhängigen Zweig dieses fehlerfreien Reparaturweges, in dem PCNA das entscheidende Ubiquitinierungssubstrat ist.

Hiermit wird ein neues Konzept *RAD6*-abhängiger DNA-Reparatur vorgeschlagen, in dem die angehaltene Replikationsgabel über die verschiedenen PCNA-Modifikationen für unterschiedliche Funktionen aktiviert werden kann.

#### **Verschiedene Modifikationen regulieren PCNA-Funktionen**

SUMOylierung von PCNA ist S-Phase abhängig und es wurden zwei verschiedene Modifikationsstellen identifiziert. K164, das zwischen eukaryontischen Spezies konservierte Lysin, wird SUMOyliert und ubiquitiniert. K127 ist hefespezifisch und wird ausschließlich SUMOyliert. Die SUMO-Modifikation erfolgt an beiden Lysinen zeitgleich in der S-Phase des Zellzyklus'. Neben der mono-SUMOylierung kommt es auch zur multi-SUMOylierung, die hauptsächlich an K164 zu beobachten ist. Diese variiert aber je nach Nachweismethode und der prozentuale Anteil gegenüber unmodifiziertem PCNA ist schwer abzuschätzen. Gemischte Ketten, die aus SUMO und Ubiquitin bestehen, konnten nicht nachgewiesen werden (unpublizierte Daten). Ob die Ketten, wie in höheren Eukaryonten, über konservierte Lysine des SUMO-N-Terminus gebildet werden, bleibt offen. Interessant ist, daß eine letale Dosis *MMS* die Abnahme der multi-SUMOylierung bewirkt, die mono-SUMOylierung dagegen drastisch induziert wird.

PCNA wird an K164 nach DNA-Schädigung außerdem ubiquitiniert. Neben Monoubiquitinierung findet auch Multiubiquitinierung durch K63-verknüpfte Ubiquitinketten statt. In normal wachsenden Zellen ist PCNA-Ubiquitinierung abwesend, während SUMOylierung spezifisch in der S-Phase stattfindet. Nach DNA-Schädigung wird Ubiquitinierung induziert. In Extrakten dieser Zellen lassen sich sowohl SUMOylierung als auch Ubiquitinierung nachweisen. Ein PCNA-Molekül wird aber an K164 entweder SUMOyliert oder ubiquitiniert. Nimmt die DNA-Schädigung der Zellen stark zu, dann ist Ubiquitinierung nicht mehr nachweisbar. Die mono-SUMOylierung wird drastisch induziert, während multi-SUMOylierung abnimmt.

Die Lokalisierung der PCNA-Modifikationsstellen in der Kristallstruktur des Homotrimers ist aufschlußreich (Krishna *et al.*, 1994). Beide Lysine befinden

sich distal der umschlossenen DNA am äußeren Rand des trimeren Rings (Abb. 16, links oben). Die Modifikationsstelle für SUMO/Ubiquitin an K164 sitzt in einer Windung zwischen zwei  $\beta$ -Faltblättern und ragt seitlich hervor. K127 hingegen liegt zentral in einer langen, unstrukturierten Schleife, die die beiden Domänen eines PCNA-Monomers auf der Außenseite verbindet (interdomain connector loop). Entsprechend sollten die Modifikationen an der Oberfläche des Moleküls die DNA-bindenden Eigenschaften von PCNA vermutlich nicht direkt verändern. In einem Modell wurde Ubiquitin an die Lysine-164 des PCNA-Homotrimers geknüpft (Abb. 15). Es wird deutlich, daß die Ubiquitine seitlich nach außen ragen. Ubiquitinketten, die über K63 verknüpft sind, haben vermutlich eine gerade Struktur (Pickart, 2000). Auch Ubiquitinketten an PCNA könnten somit, von der DNA weg, weit nach außen gerichtet sein (Abb. 15).



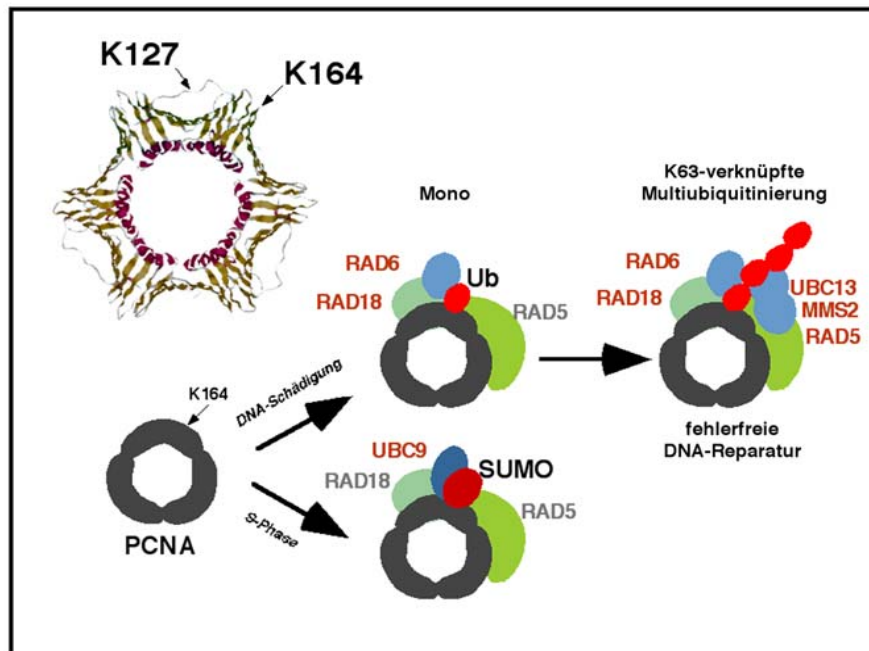
**Abbildung 15. Monoubiquitiniertes PCNA im Modell.** Ubiquitin wurde über Isopeptidbindung an die Lysine-164 des PCNA-Homotrimers geknüpft (Modellierung von Michael Groll). Die Ubiquitine an PCNA ragen seitlich weit nach außen und stehen nicht in Kontakt mit der DNA (nicht dargestellt), die von PCNA umschlossen wird.

Da alle Modifikationen das gleiche, konservierte Lysin betreffen ist es sehr wahrscheinlich, daß die unterschiedlichen Modifikationen jeweils spezifische Funktionen aktivieren. Vermutlich werden bestimmte Proteine durch die PCNA-Modifikationen rekrutiert, die jeweils eine spezifische Funktion in einem replikationsassoziierten Prozeß haben. Während Multiubiquitinierung an PCNA den fehlerfreien Zweig des *RAD6*-Reparaturwegs aktiviert, ist die Monoubiquitinierung vermutlich für die Aktivierung des fehlerhaften Zweigs des *RAD6*-Reparaturwegs verantwortlich. SUMOylierung hingegen inhibiert die DNA-Reparatur.

## Modell für die *RAD6*-abhängige Ubiquitinierung von PCNA

Der *RAD6*-Reparaturweg vermittelt postreplikative DNA-Reparatur. Er gehört neben dem Nukleotid-Exzisions-Reparaturweg und dem Reparaturweg, der über homologe Rekombination Doppelstrangbrüche repariert, zu den zentralen DNA-Reparaturwegen eukaryontischer Zellen. Der *RAD6*-Reparaturweg wird aktiv, wenn die Enzyme der Replikationsgabel an einer DNA-Schadensstelle zum Stillstand kommen, da sie nicht in der Lage sind, die geschädigte DNA zu replizieren. Über bisher unverstandene Mechanismen dirigieren die Komponenten des *RAD6*-Reparaturwegs danach die Behebung des Schadens (Hoeijmakers, 2001; Prakash *et al.*, 1993; Ulrich, 2002). *RAD6* ist ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (UBC2), und diese Aktivität ist essentiell für *RAD6*-abhängige DNA-Reparatur (Jentsch, 1987). Genetisch wird der *RAD6*-Reparaturweg in einen fehlerfreien und einen fehlerhaften Zweig gegliedert (Xiao *et al.*, 2000). Molekular interagieren *RAD6* und *RAD18* mit dem RING-Finger-Protein *RAD5*, welches das Heterodimer UBC13/MMS2 an das Chromatin rekrutiert (vergl. Abb. 10) UBC13/MMS2 besitzt wiederum die Aktivität freie, K63-verknüpfte Ubiquitinketten zu synthetisieren (Hofmann und Pickart, 1999). UBC13 trägt das katalytische Cystein, während mit MMS2 das aktive Heterodimer gebildet wird. In einer vorhergehenden Arbeit unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, daß UBC13/MMS2 spezifisch nach DNA-Schädigung vom Cytosol in den Zellkern importiert und anschließend im Zellkern über den RING-Finger von *RAD5* an das Chromatin rekrutiert wird (Ulrich und Jentsch, 2000).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß PCNA an Lysin-164 durch spezielle, K63-verknüpfte Ubiquitinketten multiubiquitiniert wird. PCNA ist damit das erste beschriebene Substrat des *RAD6*-Reparaturwegs. Für die Funktion von PCNA in diesem Reparaturweg läßt sich ein Modell postulieren, in dem die Enzyme des *RAD6*-Reparaturwegs an PCNA in einer sequentiellen Weise wirken können (Abb. 16). Ausgelöst durch DNA-Schädigung monoubiquitiniert *RAD6/RAD18* PCNA. Es konnte dadurch *in vivo* erstmalig demonstriert werden, daß *RAD18*, ein RING-Finger Protein, Ubiquitin-Ligase Aktivität hat und diese Aktivität für die PCNA-Monoubiquitinierung essentiell ist. Die Interaktion von *RAD6* und *RAD18* führt somit die Ubiquitin-Konjugationsaktivität von *RAD6* mit der Ubiquitin-Ligaseaktivität von *RAD18* am Chromatin nach DNA-Schädigung zusammen. Über die Interaktion von *RAD5-RAD18* werden UBC13/MMS2 mit *RAD6* in Kontakt gebracht. In einer zweiten enzymatischen Reaktion bewirkt dieser transiente Proteinkomplex dann die Konjugation weiterer Ubiquitin-Moleküle an das bereits monoubiquitinierte, chromatin-assoziierte PCNA. Hierbei wird eine K63-verknüpfte Ubiquitinkette an PCNA gebildet. Für das RING-Finger-Protein *RAD5* konnte somit ebenfalls Ligaseaktivität *in vivo* nachgewiesen werden. K63-verknüpfte Ubiquitinketten führen nach Daten verschiedener Forschungsgruppen im Gegensatz zu K48-verknüpften Ketten nicht zum proteasomalen Abbau (Pickart, 2000; vergl. Abb. 2). Insgesamt sind die Daten mit einem Modell konsistent, in dem K63-verknüpfte Multiubiquitinierung PCNA für seine Funktion in dem fehlerfreien Zweig *RAD6*-abhängiger DNA-Reparatur aktiviert (Abb. 16 und 17).



**Abbildung 16. Modell der Ubiquitinierung und SUMOylierung von PCNA.** DNA-Schädigung induziert Monoubiquitinierung von PCNA an K164, vermittelt durch UBA1 (nicht dargestellt), sowie RAD6 und RAD18. DNA-Schädigung induziert auch den Import von UBC13/MMS2 in den Nukleus. Dieses Heterodimer wird von RAD5 an das Chromatin rekrutiert und synthetisiert zusammen mit RAD6/RAD18 K63-verknüpfte Multiubiquitinketten an PCNA. PCNA-Multiubiquitinierung aktiviert RAD6-abhängige, fehlerfreie DNA-Reparatur. In Abwesenheit von DNA-schädigenden Substanzen wird PCNA in der S-Phase an K164 SUMOyliert, vermittelt durch UBA2/AOS1 (nicht dargestellt), UBC9 sowie SIZ1 (nicht dargestellt). UBC9 interagiert mit PCNA sowie mit RAD18 und RAD5. Aktive Komponenten sind in rot, inaktive Komponenten in grau dargestellt. Die Hefe PCNA-Struktur (oben links) basiert auf Daten von Krishna *et al.*, 1994.

Eine aktivierende Rolle von K63-verknüpften Ketten ließ sich auch für die Regulation der Kinase IKK des NF $\kappa$ B Signalwegs nachweisen. I $\kappa$ B $\alpha$ , der Inhibitor von NF $\kappa$ B wird von der Kinase IKK phosphoryliert. TRAF6, ein RING-Finger-E3 ist ein Substrat für K63-verknüpfte Ubiquitinketten, die die TAK1-Kinase aktivieren. TAK1-Phosphorylierung aktiviert schließlich IKK (Deng *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). Nach IKK-abhängiger Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  wird das Protein ubiquitiniert und proteasomal abgebaut. Obwohl TRAF6 ein Substrat für K63-verknüpfte Ubiquitinketten ist, bleibt die Frage offen, ob TRAF6 auch das essentielle Substrat dieses Signalwegs ist, da Autoubiquitinierung von RING-Finger-Proteinen häufig als sekundärer Effekt beobachtet wurde. K63-verknüpfte Ubiquitinketten scheinen ebenfalls für Ribosomenfunktion und Rezeptor-abhängige Endocytose wichtig zu sein (Galan und Haguenaer-Tsapis, 1997; Spence *et al.*, 2000; vergl. Abb. 2). Bisher sind Proteine, die an diese Ketten spezifisch binden können, nicht charakterisiert worden und der mechanistische Aspekt der Regulation bleibt offen.

Auch eine monoubiquitinierte Form von PCNA kann neben der multiubiquitinierten Form beobachtet werden. Beide Formen werden aber unterschiedlich reguliert. Mit zunehmender DNA-Schädigung nimmt der Anteil der monoubiquitinierten Form gegenüber der multiubiquitinierten Form zu (nicht gezeigt). Somit könnte bei starker DNA-Schädigung vermehrt monoubiquitiniertes PCNA benötigt werden. Mechanistisch ist dies ein interessanter Aspekt, da das Gleichgewicht zwischen dem RAD6/RAD18-Komplex, der PCNA monoubiquitiniert und dem RAD6/RAD18/UBC13/MMS2/RAD5-Komplex, der PCNA multiubiquitiniert, reguliert werden muß. Damit ist die Monoubiquitinierung von der Multiubiquitinierung funktionell getrennt. Interessant ist auch, wie die Verlängerung von monoubiquitinierten PCNA stattfindet. Zum einen ist es vorstellbar, daß eine Kette prozessiv über Verlängern des verknüpften Ubiquitins entsteht. Andererseits ist es auch vorstellbar, daß freie, vorgefertigte Ubiquitinketten an das monoubiquitinierte PCNA geknüpft werden können. Dieser Aspekt könnte in *in vitro* Studien geklärt werden. Genetisch ist die Monoubiquitinierung Voraussetzung für Multiubiquitinierung, da in Mutanten von *RAD6* oder *RAD18* PCNA nicht mehr ubiquitiniert wird.

## **PCNA ist ein essentielles Substrat des fehlerfreien RAD6-Reparaturwegs**

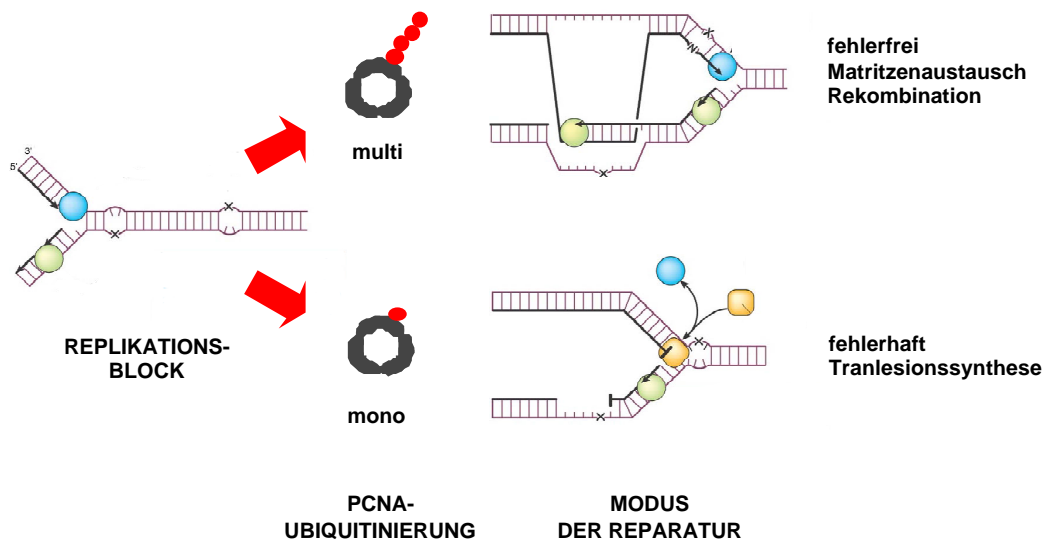
PCNA konnte in dieser Arbeit als das erste *RAD6*-Substrat für DNA-Reparatur identifiziert werden. Die genetischen Daten zeigen, daß PCNA das essentielle Substrat des fehlerfreien Zweigs dieses Reparaturwegs zu sein scheint. Die Phänotypen der Mutanten *mms2*, *ubi-K63R* und *rad5* konnten durch PCNA-Überexpression deutlich supprimiert werden. Ein weiterer Hinweis ist, daß die Mutante von PCNA, die nicht mehr ubiquitiniert werden kann (*pol30-K164R*), epistatisch zu *mms2* ist und somit genetisch die PCNA-Multiubiquitinierung eng mit dem fehlerfreien Zweig *RAD6*-abhängiger DNA-Reparatur verbunden ist. In Bezug auf DNA-Reparatur scheint PCNA das einzig relevante Substrat für K63-verknüpfte Ubiquitinketten zu sein, da die erhöhte Sensitivität der Ubiquitinmutante *ubi-K63R* gegenüber DNA-Schädigung nach PCNA Überexpression supprimiert wird. *RAD6* dagegen besitzt noch andere Substrate und Funktionen. Es wird beispielsweise für den Abbau sogenannter „N-end-rule“-Substrate benötigt, ist essentiell für Sporulation und an der Assemblierung von Chromatin durch die Chromatin-Assemblierungsfaktoren (CAFs) beteiligt (Dohmen *et al.*, 1991; Game und Kaufman, 1999). Deletionmutanten von *RAD6* zeigen sehr starke Sensitivität gegenüber DNA-Schädigung und daneben noch andere, DNA-Reparatur-unabhängige Defekte, die auf *RAD18*-unabhängige Funktionen von *RAD6* hindeuten. Deletionsmutanten von *RAD5* haben höhere Sensitivität als *pol30-K164R*-Zellen. *RAD5* ist verwandt mit SWI/SNF2-Helikasen und könnte somit noch eine Ubiquitin-unabhängige Funktion in der Modulation von Chromatin besitzen oder aber noch weitere, *UBC13/MMS2*-unabhängige Substrate für Ubiquitinierung haben.

Die einzigen bisher bekannten Substrate von RAD6 *in vivo* sind die Histone. H2A und H2B aus höheren Eukaryonten werden *in vitro* von RAD6 ohne zusätzliches E3 ubiquitiniert (Jentsch *et al.*, 1987). *In vivo* wird H2A und H2B (HTA1 und HTB1 in Hefe) ebenfalls RAD6-abhängig ubiquitiniert. Hefemutanten von H2A und H2B, die nicht mehr ubiquitiniert werden können, zeigen aber keine erhöhte Sensitivität gegenüber DNA-Schädigung, sondern einen Sporulationsdefekt, den auch *rad6* Zellen haben. RAD6-abhängige H2B Ubiquitinierung hat somit eine Funktion in der Meiose, nicht aber in der RAD6-abhängigen DNA-Reparatur (Robzyk *et al.*, 2000).

## Modell für RAD6-abhängige DNA-Reparatur

Es wird vermutet, daß im postreplikativen, fehlerfreien Zweig der Reparatur an der angehaltenen Replikationsgabel ein Austausch („switch“) der Matrize vom geschädigten zum ungeschädigten Schwesterstrang stattfindet. Damit könnte der DNA-Schaden über Ablesen der korrekten Information des Schwesterstranges kompensiert werden (Hoeijmakers, 2001). Durch Experimente mit Proteinen des Bakteriophagen  $\lambda$  konnte ein Umspringen („switch“) von Proteinen auf den Nachbarstrang *in vitro* mit aufgereinigten Komponenten rekonstituiert werden (Formosa und Alberts, 1986).

Die präsentierten Daten dieser Arbeit legen nahe, daß der fehlerfreie Reparaturzweigs durch PCNA-Multiubiquitinierung aktiviert wird (Abb. 17). Die mechanistischen Folgen der Ubiquitinierung sind allerdings nicht untersucht. Nach einem Umspringen von PCNA auf die fehlerfreie Matrize könnte Polymerase  $\delta$  mit PCNA als Prozessivitätsfaktor selbst an der Behebung des Schadens beteiligt sein. Polymerase  $\delta$  ist zusammen mit PCNA für die Synthese beider Stränge während der Replikation notwendig. Daneben scheint Polymerase  $\delta$  auch eine Rolle in dem postreplikativen Reparaturweg zu haben (Torres-Ramos *et al.*, 1997). Eine Einordnung fand durch die genetischen Eigenschaften der kältesensitiven Mutante der Untereinheit POL3 der Polymerase  $\delta$  (*pol3-3*) statt. Die Ubiquitinketten an PCNA könnten selbst die Interaktion der angehaltenen Replikationsgabel mit Proteinen des ungeschädigten Schwesterstrang ermöglichen. Über diesen Kontakt könnte PCNA/Polymerase  $\delta$  auf den Schwesterstrang gelangen, die korrekte Information ablesen und danach wieder auf den ursprünglichen Strang zurückspringen. In welchem Maß Rekombination hierbei beteiligt ist, oder wie die Neubeladung des Polymerasekomplexes stattfindet, bleibt bislang ungeklärt. Wenn der Polymerasekomplex aber nicht neu auf die DNA geladen wird und trotzdem fehlerfreie Reparatur stattfinden soll, dann sind Rekombinationsereignisse notwendig.



**Abbildung 17. Modell *RAD6*-abhängiger DNA-Reparatur.** Nach einem Block der Replikation durch DNA-Schäden wird PCNA von Komponenten des *RAD6*-Reparaturwegs ubiquitiniert. Multiubiquitinierung aktiviert den fehlerfreien Zweig der Reparatur, bei dem in einem rekombinationsähnlichen Mechanismus die geschädigte DNA-Matrize gegen die Ungeschädigte des Schwesterstrangs ausgetauscht wird (rechts oben). Monoubiquitinierung aktiviert wahrscheinlich den fehlerhaften Zweig der Reparatur, bei dem die Replikationspolymerasen (blau und grün) gegen Translesionspolymerasen (gelb) ausgetauscht werden (rechts unten). Modifiziert nach Hoeijmaker, 2001

Gegen eine Funktion von Polymerase  $\delta$  in der fehlerfreien Reparatur sprechen neuere Daten. Die Mutante *pol32*, in der die dritte, für normales Wachstum nicht benötigte Untereinheit der Polymerase  $\delta$  deletiert ist, zeigt Sensitivität gegen Replikationsinhibitoren wie Hydroxyurea und ist sensitiv gegenüber DNA-Schädigung. Weitere genetische Analysen ergaben, daß Zellen dieses Stamms einen Defekt in der UV-induzierten Mutagenese, einer charakteristischen Eigenschaft des fehlerhaften Zweigs der postreplikativen Reparatur, haben. Weiterhin ist *pol32* epistatisch zu *rev3*, der Deletionsmutante einer Polymeraseuntereinheit des fehlerhaften Zweigs (Polymerase  $\zeta$ ), nicht aber zu *mms2* des fehlerfreien Zweigs *RAD6*-abhängiger Reparatur (Huang *et al.*, 2000). Beide widersprüchlichen Ergebnisse wären im Einklang, wenn zwar die katalytische große Untereinheit POL3 von Polymerase  $\delta$  für den fehlerfreien Zweig der DNA-Reparatur benötigt wird, POL32 aber nicht. POL32 könnte spezifisch für fehlerhafte Reparatur rekrutiert werden und eventuell zusammen mit Polymerase  $\zeta$  fehlerhafte Tranlesionssynthese durchführen.

Neben dem Austausch von Untereinheiten der Polymerase  $\delta$  ist auch der Austausch der ganzen Polymerase denkbar. Die Translesionspolymerase  $\eta$  (*RAD30*) könnte anstelle von Polymerase  $\delta$  rekrutiert werden. Polymerase  $\eta$



kann an Position UV-Licht-induzierter Thymidin-Dimere, trotz sterischer Unterschiede zur ungeschädigten Struktur korrekte Nukleotide in den neusynthetisierten Strang einbauen und so den Schaden beheben. Die Prozessivität des Proteins ist allerdings sehr gering und die genetischen Daten sind nicht eindeutig. Die Deletionsmutante *rad30* wird in einen eigenen, *RAD5*-unabhängigen Zweig der *RAD6*-abhängigen, fehlerfreien DNA-Reparatur eingeordnet (McDonald *et al.*, 1997). Es ist aber nicht geklärt, ob das Enzym *in vivo* tatsächlich fehlerfrei arbeitet. Interessant ist, ob für die Aktivierung von *RAD30* *PCNA* modifiziert wird. Wenn *rad30* Mutanten mit *pol30-K164R* kombiniert wurden, erhöhte sich die Sensitivität der Doppelmутante gegenüber der *pol30-K164R* Einzelmутante nicht (nicht gezeigt). Diese epistatische Beziehung spricht dafür, daß *RAD30* genetisch unterhalb von *PCNA* im *RAD6*-Reparaturweg eingeordnet werden kann. Da die Deletionsmutante *rad30* aber nicht epistatisch mit *rad5* ist, läßt sich folgern, daß nicht die Multiubiquitinierung, sondern die Monoubiquitinierung von *PCNA* *RAD30* aktivieren könnte, da in *rad5* Zellen *PCNA* nur noch monoubiquitiniert werden kann. Ob Polymerase  $\eta$  oder auch andere Translesionspolymerasen tatsächlich über monoubiquitiniertes *PCNA* aktiviert werden, müssen weitere Experimente zeigen. *in vitro* und *in vivo* wurde aber bereits die Wichtigkeit der Interaktion Polymerase  $\eta$  mit *PCNA* für DNA-Reparatur bewiesen. Mutanten der Polymerase  $\eta$ , in denen das *PCNA*-Bindemotiv (Q - - L - - FF ) mutiert ist, zeigen gleiche UV-Sensitivität wie die Deletionsmutante (*rad30*) selbst. Analyse der UV-induzierten Mutageneserate der *pol30-K164R*-Mutante könnte weiteren Aufschluß über die Funktion der *PCNA*-Monoubiquitinierung in dem fehlerhaften Zweig *RAD6*-abhängiger DNA-Reparatur geben.

Es wurde bereits angedeutet, daß neben der Multiubiquitinierung auch die Monoubiquitinierung diskontinuierliche funktionelle Relevanz besitzt. Es ist vorstellbar daß Zellen über die Mono- bzw. Multiubiquitinierung steuern können, welcher Zweig *RAD6*-abhängiger DNA-Reparatur für welches Ausmaß an Schaden am sinnvollsten erscheint (vergl. Abb. 18). Vornehmlich bei starker DNA-Schädigung greift die Zelle vermutlich auf den fehlerhaften Mechanismus zurück. Folglich ist bei starker DNA-Schädigung die Multiubiquitinierung nicht mehr zu beobachten. Die Akkumulation von monoubiquitiniertem *PCNA* und der Rückgang der multiubiquitinierten Form in Zellen, die mit höheren Konzentrationen *MMS* behandelt worden sind, spricht neben der Epistasie von *pol30-K164R* zu *rad30*, für eine Rolle der monoubiquitinierten Form im fehlerhaften Zweig der DNA-Reparatur. Die Sensitivität der *pol30-K164R*-Mutante ist zudem höher als die der *ubi-K63R* und der *mms2* Mutante. Die Untersuchung der genetischen Beziehung von Komponenten des fehlerhaften DNA-Reparaturzweigs (*REV3*) zu *pol30-K164R* könnte diese Annahme bestätigen. Auch der genetische Vergleich einer *rad30 mms2* Doppelmутante mit *pol30-K164R* würde nähere Informationen liefern. Weitere genetische Analysen erfordern aber auch Allele, die lediglich für inaktive Proteine kodieren und die nicht über komplette Gendelektionen Proteinkomplexe zerstören können.

## Ubiquitinierung von PCNA ist konserviert in Eukaryonten

PCNA ist ein hochkonserviertes Protein und die Sequenzidentität zwischen den Proteinen aus Hefe (*S.cerevisiae*) und Mensch beträgt 35%. Deshalb wurde in unserem Labor von Lucian Moldovan untersucht, ob humanes PCNA ebenfalls modifiziert wird. Es konnte demonstriert werden, daß PCNA-Ubiquitinierung spezifisch nach DNA-Schädigung induziert wird. Die Ubiquitinierung von PCNA nach DNA-Schädigung ist somit von der Hefe bis zum Mensch konserviert und vermutlich eine generelle Antwort eukaryontischer Zellen auf DNA-Schädigung.

DNA mutationsfrei zu reparieren ist für die Vermeidung von Carcinogenese von hoher Bedeutung (Hoeijmakers, 2001). Untersuchungen von Patienten, bei denen eine variante Form der Xeroderma pigmentosum (XP-V) vorliegt, ergaben, daß *RAD30* mutiert ist und die Hypersensitivität gegenüber Sonnenlicht vermutlich auf die Akkumulation von lichtinduzierten DNA-Schäden zurückzuführen ist. Dies führt schließlich zu drastisch erhöhtem Risiko für Hautkrebs. Interessant ist, daß in menschlichen Zellen vornehmlich monoubiquitiniertes PCNA detektiert werden kann, der Form von PCNA, die mit dem fehlerhaften Zweig der Reparatur in Verbindung gebracht wurde. Die Translesionssynthese von *RAD30* ist vermutlich auf die Reparatur von Pyrimidin-Dimeren beschränkt. In Hefe dagegen besitzt der *RAD5*-abhängige Zweig eine größere Bedeutung (Torres-Ramos *et al.*, 2002). Neuere Daten unterstreichen aber auch die Bedeutung des *RAD5*-abhängigen Reparaturzweigs in Säugern (Li *et al.*, 2002). Es ist denkbar, daß bestimmte DNA-Reparaturdefekte in höheren Eukaryonten einen veränderten PCNA-Modifikationsstatus bedingen. Dies könnte zum einen Mutationen in übergeordneten Komponenten des Enzymapparats, der für die PCNA-Ubiquitinierung benötigt wird, betreffen, aber auch Mutationen in PCNA selbst, die normales Wachstum problemlos ermöglichen, aber ihre Konsequenzen erst bei stark erhöhter DNA-Schädigungen entfalten. Durch die hohe Lebensspanne von Säugern könnte damit die Akkumulation von Mutationen durch mutagene Translesionssynthese, die bei Defekten des fehlerfreien Zweigs *RAD6*-abhängiger DNA-Reparatur induziert wird, einen wesentlichen Beitrag zur Carcinogenese haben. Nähere Kenntnisse des hier entdeckten Regulationsmechanismus könnten DNA-Reparaturdefekte menschlicher Zellen verständlicher machen und eventuell auch zu besseren Behandlungsmöglichkeiten führen.

## Funktionen der PCNA-SUMOylierung

SUMOylierung findet an zwei Lysinen an der Oberfläche des Hefe-PCNA-Homotrimers statt. In der Schleife um das Lysin-127 liegt die Region, die mit Polymerase  $\delta$  und anderen Polymerasen sowie dem Chromatin-Assemblierungsfaktor CAF1 interagiert (Amin und Holm, 1996; Eissenberg *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000). Modifikation mit dem globulären Molekül SUMO an dieser Stelle sollte die Interaktion mit Polymerase  $\delta$  sowie CAF1 dramatisch beeinflussen. Da aber die entsprechende Mutante *K127R* keinen Wachstumsdefekt besitzt, kann die SUMOylierung an dieser Stelle nicht den Anteil der PCNA Moleküle betreffen, die mit Polymerase  $\delta$  die „leading“- und „lagging“-Strang Synthese während der Replikation durchführen. Vermutlich ist SUMOylierung dieses Lysins aber ein Mechanismus, einer Subfraktion von PCNA Interaktion mit Polymerase  $\delta$  nicht zu ermöglichen, um replikationsassoziierte Prozesse, wie beispielsweise Modulation des Chromatins, zu aktivieren oder aber einfach, um die Replikationsgabel zu arretieren. Durch SUMOylierung an K164 kann PCNA-abhängige DNA-Reparatur, die über Ubiquitinierung signalisiert wird, verhindert werden. Mutationsanalyse des Motivs um Lysin-164 sowie von Aminosäuren in räumlicher Nähe könnte Aufschluß über mögliche Interaktionspartner sowie über Erkennungssequenzen der modifizierenden Enzyme geben. Bei dem zwischen eukaryontischen Spezies konservierten Lysin K164 handelt es sich nämlich nicht um eine Konsensusstelle für SUMOylierung. Es ist somit nicht klar, wie das SUMO-konjugierende Enzym UBC9 dieses Motiv erkennen kann. Der SUMO-Ligasefaktor SIZ1, der für PCNA-Konjugation benötigt wird (Abb. 8d), bindet an UBC9, nicht aber an PCNA. Allerdings kann Interaktion von PCNA und UBC9 im "two hybrid assay" nachgewiesen werden. Es ist somit möglich, daß noch weitere Faktoren an der SUMOylierung von PCNA beteiligt sind. Die RING-Finger-Proteine RAD18 und RAD5 interagieren zwar mit PCNA und UBC9, sind aber nicht an der PCNA-SUMOylierung beteiligt. *in vitro* SUMOylierungstests von PCNA mit gereinigten Komponenten könnten darüber Aufschluß geben. Es ist denkbar, daß die Aminosäuren um K164 ein neues Konsensusmotiv bilden, das sowohl von Konjugationsenzymen des Ubiquitin-Systems, als auch des SUMO-Systems erkannt werden kann. Ein offener Aspekt ist, wie die Interaktionen von RAD5 und RAD18 mit UBC9 und PCNA reguliert werden und welche Signale spezifisch Ubiquitinierung oder SUMOylierung aktivieren.

Für die Ubiquitinierung ist, ähnlich wie für die SUMOylierung, die Frage, wie sie die Funktion von PCNA beeinflusst. Anhand genetischer Daten konnte gezeigt werden, daß SUMOylierung an K164 *RAD6*-abhängige DNA-Reparatur inhibiert. Zudem bewirken letale Dosen von MMS, wie bereits erwähnt, eine drastische Induktion der SUMOylierung. Etwa 30% der PCNA-Moleküle sind unter diesen Bedingungen SUMOyliert. Sämtliche PCNA-Trimere könnten unter diesen Bedingungen somit modifiziert vorliegen und *RAD6*-abhängige DNA-Reparatur vermutlich komplett inhibieren. Ob PCNA-SUMOylierung selbst das Anhalten der Replikationsgabel bewirken kann, oder aber angehaltene Replikationsgabeln markiert, ist zur Zeit nicht untersucht. Ob durch die Inhibition *RAD6*-abhängiger DNA-Reparatur durch

PCNA-SUMOylierung ein anderer Reparaturweg, wie beispielsweise der *RAD52*-Reparaturweg aktiviert wird, ist eine interessante Frage. Unter bestimmten Wachstumsbedingungen könnte es für die Zelle sinnvoll sein, auf *RAD6*-abhängige DNA-Reparatur zu verzichten. Eine Verbindung zu dem *RAD52*-Reparaturweg wurde bereits mehrfach demonstriert, und die DNA-Helikase SRS2 hat in diesem Zusammenhang eine Funktion. Nach dem derzeitigen Modell hemmt SRS2 den *RAD52*-Reparaturweg (Liberi *et al.*, 2000; Schiestl *et al.*, 1990). Die Deletionsmutante *srs2* dagegen lenkt die Reparatur der DNA-Schäden in den rekombinatorischen *RAD52*-Reparaturweg. Zwei SRS2-Interaktoren wurden in der Literatur beschrieben. Zum einen interagiert SRS2 mit SUMO, zum anderen mit POL32, der kleinen Untereinheit der Polymerase  $\delta$  (Huang *et al.*, 2000; Uetz *et al.*, 2000). Vorstellbar wäre, daß SRS2 an die sumoylierte Form von PCNA gebunden wird und dadurch die anti-rekombinatorische Funktion von SRS2 inhibiert. Ferner könnte die SRS2-POL32-Interaktion durch SUMOylierung reguliert werden und das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Reparaturwegen verändern. SRS2 ist eine Komponente des S-Phase spezifischen DNA-Kontrollmechanismus‘ (intra-S-phase checkpoint) (Liberi *et al.*, 2000; Marchetti *et al.*, 2002). Dieser sorgt dafür, daß DNA-Replikation nach DNA-Schädigung verlangsamt wird. Ob PCNA-SUMOylierung in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt, ist unklar. Außerdem wird SRS2 nach Aktivierung des S-Phase Kontrollpunkts phosphoryliert. Welche dieser Modifikationen eine Rolle in der Aktivierung des *RAD6*-Reparaturwegs hat, bleibt vorerst ungeklärt.

Wie die Enzyme der SUMO-Konjugation und der SUMO-Dekonjugation reguliert werden, ist ebenfalls ein ungeklärter Aspekt. Neuere Arbeiten geben aber einige Hinweise. Die SUMO-Ligase SIZ1 wird in der M-Phase phosphoryliert (Takahashi *et al.*, 2001). Die Relevanz dieser Modifikation ist aber bisher nicht untersucht. Interessanterweise wird die RNA-Menge des SUMO dekonjugierenden Enzyms ULP2 durch DNA-Schädigung erhöht. Entsprechend könnte sich die Proteinmenge nach DNA-Schädigung ebenfalls erhöhen und spezifische Substrate, die inhibitorische Funktion für DNA-Reparatur oder andere Prozesse haben, könnten dekonjugiert werden. Bisher ist nicht untersucht, ob für die Dekonjugation von PCNA ULP2 benötigt wird oder ob der Phänotyp von Zellen, in denen *ULP2* deletiert ist, mit einem PCNA-Dekonjugationsdefekt in Verbindung gebracht werden kann.

## **Ubiquitin- und SUMO-System können Proteine gemeinsam regulieren**

Ein auffälliger Aspekt der vorliegenden Arbeit ist, daß Regulation durch SUMOylierung und Ubiquitinierung eng verknüpfte Prozesse sind. Die PCNA-Modifikationen betreffen das gleiche, konservierte Lysin. Da alle bisher in der Literatur beschriebenen Funktionen von PCNA auf der DNA und in der Regel in Nähe der Replikationsgabel stattfinden, müssen die Modifikationen zwischeneinander sehr gut abgestimmt werden. Dies kann nur durch Kommunikation zwischen Ubiquitin-System und SUMO-System stattfinden. Ein Beispiel für die enge regulative Verknüpfung des Ubiquitin-Systems mit

einen System für die Konjugation eines Ubiquitin-ähnlichen Proteinen ist bereits bekannt. Der Ubiquitin-Ligasekomplex SCF wird von dem Ubiquitin-ähnlichen Protein RUB1/NEDD8 modifiziert. Es scheint, daß die Ligaseaktivität des SCF-Komplexes durch die Modifikation reguliert werden kann und genetisch konnte eine funktionelle Interaktion beider Systeme ebenfalls gezeigt werden (Lammer *et al.*, 1998; Liakopoulos *et al.*, 1998).

Die Assoziation von der Komponente des SUMO-Systems, UBC9, mit Komponenten des Ubiquitin-Systems, den Ubiquitin-Ligasen RAD18 und RAD5 an PCNA bietet zentrale, DNA-assozierte Regulationsmöglichkeiten. Ob und wie diese Assoziation, die transient zu sein scheint, reguliert wird, bedarf weiterer Analysen. Wichtig ist, daß die Interaktionen an der zentralen Komponente replikativer Funktionen, an PCNA stattfinden. Durch die Interaktion beider Konjugationskomponenten und der daraus resultierenden räumlichen Nähe zur Replikationsgabel können die PCNA-Modifikationen vermutlich Regulatoren verschiedener Funktionen aktivieren. Um diesen Prozeß funktionell näher zu beleuchten, könnten PCNA-Mutanten, die spezifisch nicht mehr SUMOyliert, aber noch ubiquitiniert werden können, bzw. Mutanten, die einen Ubiquitinierungsdefekt haben, aber noch normal SUMOyliert werden, von großer Bedeutung für weitere Analysen sein.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß PCNA durch neuartige Mechanismen reguliert wird. Bisher standen der Vielfalt von PCNA-Funktionen unverstandene Regulationsmechanismen gegenüber. Die Modifikation eines Lysin durch verschiedene Proteine bietet hier eine exklusive Regulationsmöglichkeit, ähnlich der eines multifunktionellen Schalters, um verschiedene Funktionen zu aktivieren. Exemplarisch wurde für PCNA-Multiubiquitinierung die Aktivierung des fehlerfreien Zweigs *RAD6*-abhängiger DNA-Reparatur demonstriert sowie für Monoubiquitinierung die enge genetische Beziehung zum fehlerhaften Zweig aufgezeigt, während SUMOylierung *RAD6*-abhängige Reparatur inhibiert, und vermutlich noch eine andere, bisher nicht verstandene Funktion von PCNA aktiviert. Ob noch andere posttranslationale Modifikations-Systeme PCNA regulieren, und diese auch mit Komponenten des Ubiquitin- und SUMO-Systems interagieren und den multifunktionellen Schalter an PCNA erweitern, bleibt eine interessante Frage zukünftiger Untersuchungen. Auch andere, zentrale Proteine haben vielfältige Funktionen und können vermutlich über ähnliche Mechanismen reguliert werden. Für das detaillierte Verständnis zellulärer Vorgänge ist es somit von großer Bedeutung weitere, konzeptionell ähnliche Regulationsmechanismen zu entdecken.

## 4. Material und Methoden

Soweit nicht anders vermerkt, wurden analysenreine Chemikalien und Reagenzien der Firmen Aldrich, Applied Biosystems, Biomol, Biorad, Difco, Fluka, Invitrogen, Kodak, Merck, Roth, Riedel de Haen, Serva oder Sigma verwendet. Molekularbiologische Reagenzien, Restriktionsendonukleasen und die Mehrzahl anderer Enzyme wurden (wenn nicht anders angegeben) von den Firmen Roche, MBI, New England Biolabs, Pharmacia und Promega bezogen. Radiochemikalien stammten von den Firmen Amersham. In fast allen der unten beschriebenen Methoden wurden sterile Lösungen und sterile Gefäße eingesetzt. Als Wasser wurde ausschließlich deionisiertes Wasser verwendet.

### Computeranalysen

Datenbankrecherchen (Sequenzsuche und Sequenzvergleiche sowie Literaturrecherchen wurden mit Hilfe des "National Center for Biotechnology Information" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt. Für Sequenzanalysen (Erstellen von Restriktionskarten, Auswertung von DNA-Sequenzierungen, Vergleiche von Proteinsequenzen und Primerdesign) wurde das Programmpaket DNA-Star (DNA Star Inc.) verwendet. Proteinstrukturen wurden über das frei erhältliche Programm Rasmol für Macintosh (RasMac) dargestellt.

### Antikörper

Als polyklonale sekundäre Antikörper für Western blots wurden mit Peroxidase gekoppelte anti-Kaninchen bzw. anti-Maus-IgG (H+L) eingesetzt (Dianova bzw. Sigma). Außerdem wurden folgende kommerzielle Antikörper benutzt. Polyklonaler anti-myc sowie anti-CLB2 aus Kaninchen (Santa Cruz Biotechnology), sowie die monoklonalen Antikörper anti-myc (Klon 9E10), anti-PGK1 (Molecular Probes), anti-PCNA (PC10; Abcam) und anti-V5 (Invitrogen) Antikörper aus Mäusen.

Die nachfolgenden mikrobiologischen, molekularbiologischen und biochemischen Methoden richten sich im wesentlichen nach Ausubel *et al.*, 1987 und nach den Angaben der Hersteller.

## I. Mikrobiologische Techniken

### *E. coli* –Stämme

XL1-Blue:

sup E44, hsd R17, rec A1, gyr A46, thi, rel A1, lac - ,  
F' [pro AB + , lac I q , Lac Z M15,  
Tn10(tet r )] (Stratagene)

BL21-Gold (DE3):

B F-, ompT, hsdS( $r_B^- m_B^-$ )dcm<sup>+</sup>, Tet<sup>r</sup>, gal, endA, Hte

TG1:  
D(lac, pro ), supE, thi, hsd D5,  
F'[Tra D36,pro<sup>+</sup>,lac Iq,lacZ DM15 ]

### ***E. coli* –Vektoren**

pet28c (Novagen)  
pGEX-4TK (Amersham)

LB-Medium (Agar)  
1% Trypton (Difco)  
0,5% Hefeextrakt (Difco)  
1% NaCl  
(1,5% Agar)  
sterilisiert durch Autoklavieren

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

Flüssigkulturen in LB-Medium, außer zur Proteinexpression, wurden bei 37°C geschüttelt (200 rpm) und Agarplatten bei 37°C inkubiert. Antibiotika für die Selektion von transformierten Bakterien wurden in einer Konzentration von 50 µg/ml (Ampicillin) bzw. 30µg/ml (Kanamycin) dem Medium zugefügt. Die Dichte von *E. coli* -Kulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) bestimmt. Kurzfristig wurden Ausstriche auf Agarplatten bis zu einem Monat bei 4°C gelagert. Für die langfristige Lagerung wurden stationäre Flüssigkulturen mit Glycerol versetzt (Endkonzentration 18%) und bei -80°C eingefroren.

### **Herstellung kompetenter Bakterien**

Es wurden sowohl chemisch-kompetente als auch elektrokompente Zellen verwendet. In beiden Fällen wurde aus einer Einzelkolonie des entsprechenden *E. coli* -Stamms eine Übernachtskultur in Flüssigmedium hergestellt. Mit 10ml dieser Kultur wurde 1l LB-Medium angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,6-0,8 bei 37°C inkubiert. Nach 20min Abkühlung der Kultur in Eiswasser wurden die Zellen durch Zentrifugation (5min, 5000g, 4°C) geerntet. Alle weiteren Schritte wurden im Kühlraum unter Verwendung von vorgekühlten Materialien und Lösungen durchgeführt. Für die Herstellung von elektrokompenten Zellen wurde das Zellsediment in 1l sterilem Wasser vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und der letzte Schritt mit 0,5l Wasser wiederholt. Die Zellen wurden in 20ml 10% Glycerin resuspendiert und erneut durch Zentrifugation geerntet. Schließlich wurden die Zellen in 3ml 10% Glycerin resuspendiert, in 100µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Für die Herstellung der chemisch-kompetenten Zellen wurde das Zellsediment in 200 ml kalten MgCl<sub>2</sub>-Lösung (100mM) vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, in 400ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung (100mM) resuspendiert, für 20min in Eiswasser abgekühlt und erneut abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde schließlich in 20ml 15% Glycerin und 100mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen und in 100µl-Aliquots bei -70°C gelagert.

### Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Kurz vor der Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Für eine Elektroporation wurden ca. 0,1pmol Plasmid bzw. 1µl eines Ligationsansatzes mit 30µl der elektrokompenten Zellen gemischt. Die Suspension wurde in eine Elektroporations-Küvette (0,1cm Dicke) und einem Puls von 1,8kV und 25µF bei einem Widerstand von 200Ω elektroporiert. Unmittelbar nach dem elektrischen Puls wurden die Zellen in 0,5ml LB-Medium aufgenommen, in ein Eppendorf-Gefäß transferiert und nach 60min Inkubation bei 37°C auf Selektionsplatten ausgestrichen. Für eine chemische Transformation wurden 50µl der aufgetauten Zellen mit ca. 0,1pmol Plasmid bzw. bis zu 10µl eines Ligationsansatzes gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend fand ein Hitzeschock für 1,5min bei 42°C statt, die Zellen wurden 2min auf Eis abgekühlt und in 0,5ml LB-Medium (ohne Antibiotika) aufgenommen. Nach einer Inkubation 60min bei 37°C wurde die Zellsuspension auf Selektionsplattenausgestrichen. Die LB-Agarplatten wurden in der Regel über Nacht bei 37°C inkubiert.

### Expression von Proteinen in *E. coli*

Für analytische Zwecke wurde die Expression rekombinanter Proteine in 1ml-LB-Kulturen induziert. Dafür wurde das Medium mit 50µl einer frischen über Nacht-Kultur angeimpft. Bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 wurde die Expression durch IPTG Zugabe (2mM Endkonzentration) bei 30°C, bzw. der optimalen Expressionstemperatur, induziert. Es wurden je 500µl Zellen durch Zentrifugation (1 min, 16000g) geerntet, in 50µl Wasser resuspendiert und durch Zugabe von 50µl Protein-Probenpuffer und 15min Kochen aufgebrochen. Je 5µl der Extrakte wurden durch Gelelektrophorese auf die Expression des Proteins analysiert. Für die Expression im präparativen Maßstab wurde 1l Medium mit einer Vorkultur angeimpft und bis zur gewünschten OD inkubiert. Für die Isolierung und Reinigung der rekombinanten Proteine wurden die Zellen nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

### *S. cerevisiae* – Stämme

Alle Stämme sind isogen zu dem Stamm Y0001 (isogen zu DF5, Finley *et al.*, 1987))

Y0001	diploid WT, DF5, <i>his3Δ200, leu2-3,2-112, lys2-801, trp1-1(am), ura3-52</i> <i>his3Δ200, leu2-3,2-112, lys2-801, trp1-1(am), ura3-52</i>
Y0002	<i>MATα</i> , DF5α, isogen zu Y0001
Y0003	<i>MATa</i> , DF5a, isogen zu Y0001
YCH038	<i>MATa, ulp1ts (ulp1::HIS3, YCplac22-ULP1ts-3-33, TRP<sup>+</sup>)</i> , isogen zu Y0001, MHY1490, (Li und Hochstrasser, 1999)
YCH123	<i>MATa, ulp1ts(YCH038), YIPlac211ADH<sup>His</sup>SMT3::SMT3 (URA3<sup>+</sup>)</i>
YO233	<i>MATa, ubc9-1 (ubc9::TRP1, ubc9-1::LEU2, bar1::HIS3)</i> , (Seufert <i>et al.</i> , 1995).
YCH143	<i>MATa, POL30<sup>myc3</sup>::POL30 (kanMX4)</i>
YCH146	<i>MATα, POL30<sup>myc3</sup>::POL30 (kanMX4)</i> , <i>YIPlac211ADH<sup>His</sup>SMT3::SMT3 (URA3<sup>+</sup>)</i>
YCH131	<i>MATa, ulp1ts, POL30<sup>myc3</sup>::POL30 (kanMX4)</i>



YCH145 *pol30::kanMX4* in DF5 diploid  
YCH193 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-POL30*  
YCH230 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-K127R*  
YCH251 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-K164R*  
YCH272 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-K127R, K164R*  
YCH219 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-46*  
(E104A, D105A, D256A, E257A)  
YCH229 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-52 (S115P)*  
YCH381 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac<sup>His</sup>POL30*  
YCH399 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-K5R*  
YCH400 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-K13R*  
YCH401 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-K20R*  
YCH402 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-K31R*  
YCH403 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-K77R*  
YCH404 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-K107R, K108R*  
YCH405 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-K117R*  
YCH406 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-K127R*  
YCH407 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-K146R*  
YCH408 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-K164R*  
YCH409 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-K168R*  
YCH410 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-K183R*  
YCH411 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-K196R*  
YCH412 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-K210R*  
YCH413 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-K217R*  
YCH414 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-K242R*  
YCH415 *MATa, pol30::kanMX4, YC33plac-pol30-K253R*  
YCH346 *MATa, rad6::HIS3*  
YCH347 *MAT $\alpha$ , rad6::HIS3, pol30-K164R*  
YCH367 *rad18::TRP1, haploid*  
YCH366 *rad18::TRP1, pol30-K164R, haploid*  
YCH379 *MATa, rad5::kanMX4*  
YCH384 *rad5::kanMX4, pol30-K164R, haploid*  
YCH357 *MAT $\alpha$ , mms2::HIS3*  
YCH394 *mms2::HIS3, pol30-K164R, haploid*  
YCH349 *MATa, rad2::URA3*  
YCH348 *MAT $\alpha$ , rad2::URA3, pol30-K164R*  
YCH342 *MATa, rad52::URA3*  
YCH343 *MAT $\alpha$ , rad52::URA3, pol30-K164R*  
YCH353 *MATa, srs2::HIS3*  
YCH354 *MAT $\alpha$ , srs2::HIS3, pol30-K164R*  
YCH355 *rad30::HIS3, haploid*  
YCH356 *rad30::HIS3, pol30-K164R; haploid*  
YCH291 *MAT $\alpha$ , pol30-K127R (genomic copy)*  
YCH294 *MAT $\alpha$ , pol30-K164R (genomic copy)*  
YCH298 *MAT $\alpha$ , pol30-K127R, K164R (genomic copy)*  
YCH300 *MAT $\alpha$ , pol30-52 (S115P) (genomic copy)*  
YO352 *MAT $\alpha$ , rad18::LEU2 (Fabre et al., 1989)*

- PJ69-4a     *MAT $\alpha$* , *trp1-901*, *leu2-3,112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4*, *gal80*,  
*GAL1::HIS3*, *GAL2-ADE2*, *met2::GAL7-lacZ* (James *et al.*, 1996,  
nicht isogen zu Y0001)
- SUB280     *MAT $\alpha$* , *ubi1- $\Delta$ 1::TRP1*, *ubi2- $\Delta$ 2::ura3*, *ubi3- $\Delta$ ub-2*,  
*ubi4- $\Delta$ 2::LEU2* (pUB100)(pUB39) (Spence *et al.*, 1995).
- SUB413     *MAT $\alpha$* , *ubi1- $\Delta$ 1::TRP1*, *ubi2- $\Delta$ 2::ura3*, *ubi3- $\Delta$ ub-2*,  
*ubi4- $\Delta$ 2::LEU2* (pUB100 with K63R-Mutation; *ubi-K63R*)(pUB39)  
(Spence *et al.*, 1995)

### ***S.cerevisiae* Vektoren**

pYC*plac33*  
pYC*plac22*  
pY*lplac211*  
pY*lplac211* ADH- (ADH-Promotor, modif.)  
pYE*plac195*  
(alle Gietz und Sugino, 1988)  
pGBT9 (Bartel *et al.*, 1993)  
pGAD424 (Bartel *et al.*, 1993)  
pGAD-C (James *et al.*, 1996)  
pGBD-C (James *et al.*, 1996)

### YPD-Medium

1% Bacto Yeast Extract (Difco)  
2% Bacto-Peptone (Difco)  
2% D-(+)-Glukose

### YPD G418 Platten / YPD MMS-Platten

YPD Medium auf 50°C abkühlen lassen, Zugabe von 200mg/l G418 als Pulver  
bzw. flüssiges MMS.

### YPGal-Medium

1% Bacto Yeast Extract (Difco)  
2% Bacto-Peptone (Difco)  
2% Galaktose

### SC-Medium

2% Kohlenstoffquelle (je nach Bedarf Glukose, Raffinose, Galaktose)  
0,67% Yeast Nitrogen Base (Difco)  
0,2% "Drop out " Aminosäure-Mix (je nach Bedarf hergestellt)  
(2% Bacto Agar (Difco))

#### 5-FOA Platten

6,7g Yeast Nitrogen Base (Difco)  
20g Glukose  
2g Aminosäure "drop out" Pulver mit allen Aminosäuren  
30mg Uracil  
20g Bacto Agar  
auffüllen auf 1l  
nach abkühlen auf 50°C Zugabe von 1g 5-FOA

#### Sporulations-Medium

1,5 % Kaliumacetat in Wasser

#### SORB

100mM LiOAc  
10mM Tris/HCl, pH 8,0  
1mM EDTA/NaOH, pH 8,0  
1M Sorbitol  
sterilisiert durch Filtration

#### PEG

100mM LiOAc  
10mM Tris/HCl, pH 8,0  
1mM EDTA/NaOH, pH 8,0  
40% PEG  
sterilisiert durch Filtration, Lagerung bei 4°C

#### Carrier-DNA

10mg/ml Lachssperma-DNA (Invitrogen)

#### Zymolyase 20T-Lösung

0,9M Sorbitol  
0,1M Tris/HCl, pH 8,0  
0,1M EDTA  
50mM DTT (frisch zugegeben)  
0,5mg/ml Zymolyase 20T (ICN Biochemicals)  
(alternativ kann die Zymolyase direkt in Wasser gelöst werden)

### **Kultivierung von Hefen**

Flüssigkulturen wurden mit frisch gewachsenen Hefen von Plattenausstrichen angeimpft. Für größere Volumina (ab 100ml) wurden Vorkulturen angezogen. Das Wachstum erfolgte bei 23°C oder 30°C. Die nicht-permissive Temperatur für temperatursensitive Mutanten, bei dem das Wachstum eingestellt wird, ist 37°C. Die Zelldichte wurde photometrisch bestimmt und die Zellzahl kalkuliert ( $O_{D600} = 1$  entsprechen circa  $3 \times 10^7$  Zellen/ml). Für kurze Zeit wurden Hefen auf Platten bei 4°C gelagert. Für die Langzeitaufbewahrung wurde die Kultur mit 18% Glycerin versetzt und bei -80°C aufbewahrt.

### **Herstellung kompetenter Hefezellen**

Hefezellen wurden aus einer Vorkultur inokuliert und bei 30°C in YPD-Medium 6-8 Stunden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,7 kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (500g, 5min, RT) geerntet, auf Eis mit sterilem Wasser und SORB gewaschen und in 360µl SORB pro 50ml Zellkultur resuspendiert. Nach Zugabe von 40µl Carrier-DNA, wurden die Zellen aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

### **Transformation von Hefezellen**

Zu in der Regel 50µl (10µl für Plasmide) der kompetenten Zellen wurde die zu transformierende DNA (PCR-Fragment, linearisierter Vektor oder Plasmid) gegeben und gut gemischt. Diese Suspension wurde in 6Vol PEG aufgenommen und bei RT für ca. 30min inkubiert. Nach der Zugabe von DMSO (Endkonzentration 10%) wurde für 15min bei 42°C inkubiert, anschließend zentrifugiert (2-3min bei 400g), in 100-200µl Wasser aufgenommen und auf Selektionsmedium ausplattiert.

### **Tetradenanalyse**

Hefezellen (500µl) einer stationären Kultur (Wachstum länger als 24h) in SC- oder YPD-Medium wurden abzentrifugiert, mehrfach mit sterilem Wasser gewaschen und in Sporulationsmedium (4ml) aufgenommen. Nach drei Tagen (bei 23°C) wurden 10µl der sporulierten Zellen mit 10µl Zymolyase-20T-Lösung gemischt und 10min bei RT inkubiert. Nach dem Auftropfen und parallelem Herunterlaufen der Zellen entlang des Durchmessers einer YPD-Agarplatte, wurden die Tetraden mit Hilfe eines Mikromanipulators (Singer MSM System) ausgelegt. Das Wachstum der Sporen erfolgte für mehrere Tage.

### **Plasmid-shuffle von Genallelen**

Funktionelle Analyse essentiellen Genen ist *in vivo* in Hefe gut möglich. Es können sogenannte "shuffle Stämme" hergestellt werden, in denen die genomische Kopie eines Gens deletiert ist und das WT-Gen von einem centromeren Plasmid mit *URA3*-Auxotrophiemarker vom eigenen Promotor exprimiert wird. Mutanten-Allele dieses Gens können nun parallel in die Zelle transformiert werden, allerdings mit einem Vektor der kein *URA3* trägt, sondern einen anderen selektierbaren Marker. Die Wildtypkopie kann durch Umstreichen auf 5-FOA Platten entfernt werden, da 5-FOA nur Wachstum erlaubt, wenn *URA3* abwesend ist. Der Phänotyp des Hefestamms, der nur das Mutanten-Allel exprimiert, kann nun untersucht werden.

### **Homologe Rekombination zur genomischen Einführung von DNA-Sequenzen**

Die Integration von DNA in das Hefegenom erfolgt über homologe Rekombination. Integrationsplasmide (Gietz und Sugino, 1988) enthalten lediglich Wildtypallele der Auxotrophiemarker und keine autonomen Replikationselemente. Das untersuchte Gen wurde in die "multiple cloning site" hinter einen Hefepromotor, der die konstitutive oder konditionale Expression des Gens ermöglicht, kloniert. Für die Transformation wurde das Plasmid im Markergen, bzw. im klonierten Gen, linearisiert. Die entstandenen

DNA Enden können sich im Genom an die entsprechenden homologen Bereiche anlagern und es kommt zur homologen Rekombination

### **Gendeletion über homologe Rekombination ("knock-out") und *in vivo* Markierung von Hefegenen**

Die Gendeletion erfolgt über ein zweifaches homologes Rekombinationsereignis und ist damit relativ ineffizient. Für die Erstellung eines "knock-out"-Konstrukts wurde eine PCR-Strategie verwendet (Knop *et al.*, 1999). Circa 50 Basenpaare des Promotors vor dem Start-Codon bzw. des Terminators wurden als Oligonukleotide synthetisiert. An beide Primer ist eine Standardsequenz angefügt, mit der eine Deletionskassette über PCR amplifiziert werden kann. Anschließend wurde das erhaltene lineare Fragment transformiert. Die Gendeletion wurde mittels PCR, über phenotypische Analyse sowie über Rückkreuzung und Analyse der Marker verifiziert. Nach einer sehr ähnlichen Strategie lassen sich *in vivo* Hefegene mit Epitopen am C-Terminus markieren. *In vivo* Markierungskassetten stehen ebenfalls zur Verfügung, und hierfür werden Oligonukleotidsequenzen gewählt, die Homologie mit dem C-terminus des offenen Leserahmens, bzw. des 3' untranslatierten Bereiches besitzen. Der Nachweis der entstehenden Fusionsproteine erfolgt immunologisch oder über PCR Analyse (Knop *et al.*, 1999).

### **Integration von Allelen in den eigenen Genlokus**

Ähnlich wie die Gendeletion findet die Integration von Allelen in den eigenen Genlokus über homologe Rekombination statt. Dabei wurde eine doppelte Selektionsstrategie gewählt, für die ein "shuffle Stamm" benötigt (siehe oben "Plasmid-shuffle von Genallelen"). Zur Integration eines Allels des Zielgens wird ein lineares DNA-Fragment des Allels, welches ebenfalls Sequenzen von Promotor und Terminator des Zielgens trägt in Zellen des "shuffle Stamm" transformiert. Die Zellen werden nach der Transformation dann 2h in YPD kultiviert und anschließend auf 5-FOA Platten ausplattiert. Hefezellen können auf 5-FOA nur wachsen, wenn *URA3* abwesend ist. Demnach können nur die Zellen überleben, die das Plasmid verlieren und stattdessen das transformierte Allel über doppelte Rekombination in den deletierten offenen Leserahmen des Zielgens einbauen. Überlebende Zellen werden auf Abwesenheit des Markers für die Gendeletion sowie über PCR und Sequenzierung überprüft. Stämme wurden mit WT-Zellen gekreuzt und überprüft.

### **Isolierung chromosomaler Hefe-DNA**

Lösungen:

Lyse-Puffer 10mM Tris-HCl pH 8.0

100 mM NaCl

1mM EDTA

2% Triton X-100

1% SDS

TE-Buffer 10mM Tris-HCl pH 8.0

1mM EDTA

Phenol/CHCl<sub>3</sub> 1:1 Phenol-CHCl<sub>3</sub> Mischung

RNase A-Lösung 10mg/ml RNase A in Wasser

Eine 10ml YPD Hefekultur von  $OD_{600}$  5-10 wurde geerntet, die Zellen einmal mit Wasser gewaschen und nach der Zentrifugation in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Zu den Zellen wurden jeweils 200 $\mu$ l Lyse-Buffer und Phenol/ $CHCl_3$  und 300mg "acid washed glass beads" (Sigma) gegeben und 5min mit dem Vortexer gemischt. Anschließend wurden 200 $\mu$ l TE-Puffer dazugegeben, das Gemisch für 5min bei 14000rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Nach Zugabe von 1ml reinem Ethanol wurde kurz zentrifugiert und die gefällte Nukleinsäure in 400 $\mu$ l TE-Puffer plus 3 $\mu$ l RNase A-Lösung gelöst. Die Nukleinsäure wurde mit 10 $\mu$ l  $NH_4Ac$  und 1ml reinem Ethanol noch einmal gefällt, kurz abzentrifugiert und in 50 $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260nm bestimmt. Die Ausbeute betrug 10-20 $\mu$ g chromosomaler Hefe-DNA.

### **Kreuzung von Hefe-Stämmen**

Zwei Stämme mit unterschiedlichem "mating type" ( $MATa$  und  $MAT\alpha$ ) wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase inkubiert. Aliquots der gleichen Zellmenge wurden gemischt und 10 $\mu$ l davon auf eine YPD-Agarplatte getüpfelt. Nach 4h Inkubation konnten fusionierte Hefezellen aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie (sog. "mexican hat"; hantelförmige Zellen, die in der Mitte eine Knospe tragen) mit dem Mikromanipulator (Singer MSM Systems) identifiziert und isoliert werden. Alternativ wurden die Zellen auf Platten umgestrichen, die die Identifizierung von diploiden Zellen über Selektion erlaubte, da beide Ursprungsstämme unterschiedliche Marker trugen.

### **Analyse des Konjugationstyps ("mating type") von Hefezellen**

Für die Analyse des Konjugationstyps wurden die Testerstämme RC634a und RC75-7 $\alpha$  verwendet. Es kommt zur Ausbildung eines Halo um die zu testende Kolonie, wenn der Testerstamm jeweils den anderen Konjugationstyp besitzt. 50 $\mu$ l einer wässrigen Zellsuspension jedes Testerstammes wurde zu 5ml einer geschmolzenen 1%igen wässrigen Agarlösung, die auf 45°C abgekühlt ist, gegeben, vermischt und als Top-Agar auf eine YPD-Platte gegossen. Die zu testenden Stämme können nach Erstarren des Agars als Replika auf den hergestellten Top-Agar, der die Testerstämme trägt, plattiert werden. Nach 1-2 Tagen Inkubation bilden sich Halos aus.  $MATa$  Zellen bilden einen Halo mit RC75-7( $\alpha$ ) während  $MAT\alpha$  Zellen ein Halo mit RC634a Zellen ausbilden. Diploide Zellen bilden mit beiden Testerstämmen kein Halo aus.

### **Serielle Verdünnungsreihe von Hefezellen**

Für die phänotypische Analyse von Hefestämmen wurden serielle Verdünnungen von Hefekulturen auf Testmedien getüpfelt. Dies erlaubte durch den Vergleich des Zellwachstums bei gleicher Zellzahl eine zuverlässigere Aussage als das Ausstreichen von Einzelkolonien. Dazu wurden Hefekulturen in YPD oder Selektivmedium aus der logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{600}$  =0,5-1,0) oder aus stationären Kulturen eingesetzt. Die Kulturen wurden in sterilem Wasser auf eine  $OD_{600}$  von 0,5 (entspricht etwa  $6 \times 10^6$  Zellen) verdünnt und fünf weitere Verdünnungen (1:5) pipettiert.

Jeweils 5µl der letzten fünf Verdünnung wurden nebeneinander auf ein Raster getüpfelt und in der Regel drei Tage unter den entsprechenden Bedingungen inkubiert.

### **Analyse von Protein-Interaktionen mit dem "two-hybrid"-System**

Zum Nachweis von Protein-Interaktionen wurden Proteine unter anderem mit dem two-hybrid System getestet (Fields und Song, 1989). Das zu untersuchende Protein wurde dazu am N-Terminus mit der Aktivierungs-, bzw. Bindedomäne von *GAL4* fusioniert. Für two-hybrid Analysen wurden im Hefestamm PJ69-4a (James *et al.*, 1996) gleichzeitig beide Konstrukte exprimiert. Die Interaktion zwischen beiden Proteinen führte zur funktionellen Rekonstitution des *GAL4*-Transkriptionsaktivators, so daß ein Reporter gen, welches unter der Transkriptionskontrolle von *GAL4* lag, exprimiert wurde. Als Reporter gen diente das *S.cerevisiae HIS3*-Gen. Bei einer positiven Interaktion können Zellen auf His<sup>-</sup> Medium wachsen.

### **Synchronisation von Hefekulturen**

Hefezellen (*MATa*) arretieren in der G1-Phase des Zellzyklus wenn sie mit dem Paarungshormon  $\alpha$ -Faktor behandelt werden. Dafür müssen die Zellen logarithmisch wachsen und sollten eine OD<sub>600</sub> von weniger als 0,4 aufweisen. Der Arrest erfolgte bei 23°C für mindestens 2h und wurde mikroskopisch über die Anwesenheit charakteristischer "shmoos" oder über FACS-Analyse verifiziert. Nach waschen der Zellen mit vorgewärmten Medium wurden die Zellen rasch in neues Medium gegeben, um sie synchron aus der G1-Phase zu entlassen. Proben wurden nach jeweils 20min entnommen. Um die Phase des Zellzyklus zu bestimmen wurde der Knospungsindex (prozentualer Anteil geknospeter Zellen der Kultur), der DNA-Gehalt (FACS-Analyse) sowie der CLB2-Proteingehalt der Zellen bestimmt.

### **Bestimmung von Überlebensraten nach DNA-Schädigung**

Logarithmisch wachsende Hefezellen wurden in Wasser verdünnt und in verschiedenen Konzentrationen auf YPD-Platten ausplattiert. Danach wurden die Zellen unterschiedlichen lang mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254nm im Dunkeln bestrahlt (Intensität von 0,27J/m<sup>2</sup>/s; Handlampe, 25cm Abstand, Vetter GmbH). Nach Bestrahlung wurden die Platten für 3 Tage im Dunkeln bei 30°C inkubiert (Inhibition von Photoreparatur) und anschließend die Anzahl der Kolonien bestimmt. Das Verhältnis der Anzahl von Kolonien auf unbehandelten Platten gegenüber bestrahlten Platten bildete die Überlebensrate. Die Bestrahlung wurde jeweils mit Duplikaten und unterschiedlicher Verdünnungen durchgeführt. Werte wurden aus parallelen Experimenten gemittelt.

Alternativ wurden logarithmisch wachsende Hefen in Flüssigkultur in Anwesenheit von 0,1% MMS für unterschiedliche Zeiten inkubiert und anschließend in verschiedenen Verdünnungen in Duplikaten auf YPD-Platten ohne MMS plattiert, für drei Tage inkubiert und die Überlebensraten bestimmt.

### **Qualitativer UV-Gradienten Überlebensassay**

Zum qualitativen, direkten Vergleich der Sensitivitäten verschiedener Hefestämme wurde ein qualitativer UV-Gradientenassay benutzt. Hefen wurden dafür in parallelen Linien auf YPD-Platten (Durchmesser 15cm) von oben aufgebracht (20µl einer 1:40 Verdünnung OD<sub>600</sub> 0,5) und danach mit schrittweise steigenden UV-Dosen beginnend von oben nach unten bestrahlt und anschließend für drei Tage im Dunkeln inkubiert (30°C).

## **II. Molekularbiologische Techniken**

### **Puffer und Lösungen**

TE-Puffer

10mM Tris

1mM EDTA

pH 8.0

sterilisiert durch Autoklavieren

TBE-Puffer

90mM Tris

90mM Borsäure

2,5mM EDTA

als 5 x Stocklösung angesetzt und autoklaviert

DNA-Probenpuffer (10x)

0,5% SDS

0,25% Bromphenolblau oder OrangeG

25% Glycerol

25mM EDTA

### **Extraktion von DNA**

Um Verunreinigungen wie z. Bsp. Proteine aus DNA-Lösungen zu entfernen, wurden diese 1- bis 3mal (je nach Verunreinigungsgrad) mit 1Vol TE-äquilibriertem Phenol/Chloroform extrahiert. Phenol-Reste wurden anschließend durch eine Chloroform-Extraktion beseitigt, die DNA durch eine Ethanol-Fällung präzipitiert und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer bzw. Wasser aufgenommen.

### **Präzipitation von DNA**

Für die Ethanol-Fällung wurden 1/10 Vol 3M Na-Acetat (pH 4,8) und 2,5Vol Ethanol zu der DNA-Lösung gegeben. Nach einer Inkubation des Ansatzes bei 4°C, bzw. -20°C wurde die DNA durch Zentrifugation bei 16000g und 4°C für 20 min pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, die DNA durch Zugabe von 70% igem Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder in destilliertem Wasser aufgenommen. Bei der Isopropanol-Fällung wurde die DNA mit 1Vol Isopropanol bei RT präzipitiert.



### **Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Bestimmung der Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm. Eine optische Dichte von eins entspricht dabei einer Konzentration von 50µg/ml für doppelsträngige DNA.

### **Isolierung von Plasmid-DNA**

Die DNA wird über Anionenaustauscher-Säulen der Firma Qiagen nach alkalischer Lyse isoliert. Kleine Mengen DNA (5-10 µg) wurden aus 4ml-über Nacht-Bakterienkulturen gewonnen, für mittlere und größere Mengen wurden 100ml- bzw. 400ml-Kulturen angesetzt. Die Reinigung der Plasmide mittels der Qiagen-Säulen erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers (Qiagen Plasmid Handbuch).

### **Restriktionsverdau von DNA**

Die Restriktionsbedingungen wurden entsprechend der Empfehlungen der Hersteller gewählt. Die maximale Konzentration der DNA im Restriktionsansatz betrug 0,20µg/µl. Die Restriktionsansätze wurden mindestens 30min für analytische und 2h für präparative Zwecke bei der für das jeweilige Enzym geeigneten Temperatur inkubiert. Die erforderlichen Salz- und pH-Bedingungen wurden mit den 10x konzentrierten Puffern des jeweiligen Herstellers eingestellt.

### **Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA**

Für analytische und präparative Isolierungen von DNA-Fragmenten wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1xTBE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung mit Ethidiumbromid (0,2µg/ml) versetzt und in Flachkammern mit Kämmen für die Geltaschen gegossen. Als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag mit DNA-Probepuffer versetzt. Die angelegte Spannung lag zwischen 80 und 180V. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid mit DNA kann die aufgetrennte DNA auf einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und fotografiert werden. Durch die parallele Auftrennung eines Größenmarkers (1kb DNA-Ladder, Invitrogen) kann die Länge der DNA-Fragmente ermittelt werden.

### **Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die zu isolierende Bande wurde unter langwelligem UV-Licht (324nm) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. In den meisten Fällen wurde die DNA aus dem Gelstück mithilfe des QiaExII Gel Extraction Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers eluiert. Das isolierte DNA-Fragment wurde dann in einem geeigneten Volumen Wasser aufgenommen.

### **Quantitative Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Um bei Klonierungen die Religation des Vektors zu vermeiden, wurden die 5'-Enden der DNA dephosphoryliert. Die Reaktion erfolgte in einem speziellen Phosphatasepuffer mit ca. 0,1u (calf intestine-) Phosphatase (NEB) pro 20pmol 5'-DNA-Enden bei 37°C für 30min.

### **Ligation von DNA**

Die Mengen der für die Ligationsreaktion eingesetzten DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen abgeschätzt. Für die Ligation wurden Fragmente und Vektor im Verhältnis 5:1 bis 10:1 (ca. 100ng Vektor) eingesetzt. Zu dem Ligationsansatz (10µl) wurde 1µl T4 DNA-Ligase (NEB) gegeben und das Reaktionsgemisch anschließend 4h bei 16°C oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

### **Sequenzierung von DNA**

DNA-Sequenzierungen wurden mit einem 377-Sequencer der Firma ABI in der Arbeitsgruppe oder durch Firmen durchgeführt. Die Sequenzierreaktion sowie die nachfolgende Probenaufbereitung erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers mit dem Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham-Pharmacia). Der Ansatz enthielt ca. 0,5µg Plasmid-DNA und 5pmol Primer.

### **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Standard-PCR-Reaktionen fanden in einem Volumen von 50µl mit ca. 50ng Plasmid-DNA oder 0,2µg genomischer DNA in einfach konzentriertem PCR-Puffer (Spezialpuffer der jeweiligen Polymerase, bzw. Expand-Puffer (Roche)) mit jeweils 0,2mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 0,6 µM der entsprechenden Oligonukleotide (Primer) und 0,2-5u Polymerase (Taq, Taq/Vent-Mischung 4:1 oder Pfu-Turbo, Stratagene) statt. Wenn nicht im 10x konzentrierten PCR-Puffer enthalten, wurde MgCl<sub>2</sub> in einer Endkonzentration von 1-3mM zu den Reaktionsansätzen gegeben. Die Amplifizierung wurde in einem "Mastercycler" der Firma Eppendorf durchgeführt. Das Profil der Reaktion richtete sich nach der Quantität und Qualität der Matrizen-DNA, der Länge und dem G/C-Gehalt der beiden Oligonukleotide und der Länge des erwarteten PCR-Fragments. In der Regel wurden lediglich die Temperaturen für die Primerbindung optimiert. Das Standard-PCR-Programm, das für alle Anwendungen gute Ergebnisse lieferte und insbesondere für Amplifikation von Kassetten für homologe Rekombination entwickelt wurde, ist das Folgende:

#### **CASTORP**

94°C 4min

(94°C 1min, 45°C 50s, 68°C 1min 40s) 10 Zyklen

(94°C 1min, 53°C 50s, 68°C 1min 40s Extension 20s/Zyklus) 20 Zyklen

4°C

speziell für genomische DNA wurde ebenfalls verwendet:

#### **CHAUCHAT**

94°C 2min

(94°C 30s, 44°C 1min, 72°C 1min) 5 Zyklen

(94°C 30s, 50°C 30s, 72°C 2min Extension 15s/Zyklus) 27 Zyklen

72°C 15min

4°C

### **Zielgerichtete *in vitro* Punktmutagenese**

Es wurde eine PCR-basierte Methode verwendet, die in Anlehnung an die QuikChange Anleitung (Stratagene) entwickelt wurde (Francis Bar) und zwei komplementäre Primer benötigt, die exakt 33bp lang sind und exakt in der Mitte eine Punktmutation gegenüber der Zielsequenz aufweisen. Für die Reaktion wurden Ansätze von 25µl verwendet (2,5µl Pfu Puffer, Stratagene; je 0,5µl Primer, 120ng/µl; 0,625µl dNTPs, 10mM; 0,5µl Pfu Turbo, Stratagene; 5-50ng Plasmid-DNA; Auffüllen auf 25µl), und im Mastercycler unter folgenden Bedingungen inkubiert:

(95°C 30s, 52°C 1min, 68°C 15min) 19 Zyklen

Bei der Reaktion wird das gesamte Plasmid amplifiziert. Um die Plasmid-DNA der Matritze zu beseitigen wird 1h mit DpnI, einer Restriktionsendonuklease, die spezifisch methylierte DNA schneidet, verdaut. Anschließend kann ein Aliquot direkt in *E. coli* transformiert werden. Über Sequenzierungen wurden die eingefügten Mutationen verifiziert.

## **III. Proteinbiochemische Techniken**

### **Puffer und Lösungen**

Sammelgelpuffer/Trenngelpuffer  
1M Tris, pH 6,8/1,5M Tris, pH 8,8

Elektrophorese-Laufpuffer  
60mM Tris  
0,55% Glycin  
0,1% SDS

Protein-Probenpuffer (1)  
2% SDS  
100mM DTT  
60mM Tris/HCl, pH 6,8  
1% Bromphenolblau (BPB)  
20% Glycerol

Protein-Probenpuffer (2), HU-Puffer  
8M Urea  
5% SDS  
200mM Tris, pH 6,8  
1mM EDTA  
Bromphenolblau  
1,5% DTT

Protein-Transferpuffer  
250mM Tris  
1,92M Glycin  
0,1 %SDS  
20%Methanol

TBST

137mM NaCl

25mM Tris

2,6mM KCl

0,1% Tween 20

NiNTA-Chromatographie (denaturierend)

1. Puffer A

6M Guanidiniumchlorid

100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

10mM Tris/HCl pH 8,0

(10-20mM Imidazol zur Kompetition unspezifischer Interaktionen)

(0,05% Tween-20, bei Verwendung von magnetischen Perlen)

- Puffer C

8M Urea

100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

10mM Tris/HCl pH 6,3

(0,05% Tween-20, bei Verwendung von magnetischen Perlen)

- Puffer D

100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

10mM Tris/HCl pH 5,9

(0,05% Tween-20, bei Verwendung von magnetischen Perlen)

- Puffer E

100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

10mM Tris/HCl pH 4,5

(0,05% Tween-20, bei Verwendung von magnetischen Perlen)

Lyse-Puffer (Hefe)

150mM NaCl

50mM Tris/HCl pH 7.4

Protease Inhibitoren (je nach Bedarf: complete mix, Roche; NEM 20mM;

Benzamidin 5mM; Antipain 6µg/ml; 6µg/ml Leupeptin; 4,5µg/ml Aprotinin;

5µg/ml Trypsin Inhibitor; PMSF 2mM; 5µg/ml Pepstatin; 6µg/ml Chymostatin)

IP-Puffer (Hefe)

enthält Lyse Puffer

0,1-1% Triton-X100

(0,1% SDS)

PBS, pH 7,4

137mM NaCl

2,7mM KCl

8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

MOPS (20x)

1M MOPS (Morpholinoethansulfonsäure)

1M Tris Base

69,3mM SDS

20,5mM EDTA

RIPA-Puffer  
150mM NaCl  
50mM Tris/HCl pH 8,0  
1% Triton-X100  
0,5% DOC (Deoxycholat)  
0,1% SDS

### **Bestimmung der Proteinkonzentration**

Proteinbestimmungen wurden nach mit dem "BioRad-Proteinassay" (Biorad, Bradford-Assay) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Standard wurde eine wässrige IgG-Lösung bekannter Konzentration verwendet.

### **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Für die Auftrennung von Proteinen über denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gele (Laemmli) wurden 10-15%ige Trenngel-Lösungen hergestellt (Angaben für 5 Gele: 10-15ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid; 12,5ml Trenngelpuffer; 250µl 10% SDS und 250µl 10% APS; auf 30ml mit Wasser aufgefüllt; 5µl TEMED) und in "mighty small" Gelsystemen (Hoefer) gegossen. Nach dem Gießen wurden die Trenngele mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde der Alkohol entfernt, die Geloberfläche mit Wasser gespült und ein 4%iges Sammelgel (pro Gel: 250µl 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid, 250µl Sammelgelpuffer, 60µl 10% SDS, 1450µl H<sub>2</sub>O, 60µl 10% APS, 5µl TEMED) gegossen und die Geltaschen mit einem geeigneten Kamm gesteckt. Die Proteinproben wurden in Probenpuffer aufgenommen, durch Erhitzen (5-15min bei 96°C, bzw. 65°C in HU-Puffer) denaturiert, auf das Gel aufgetragen und bei einer Stromstärke von 20-40 mA aufgetrennt (Molekulargewichts-Standard: 10kD Leiter, Invitrogen). Alternativ wurden 4-12% Bis-Tris Fertiggele (Invitrogen) verwendet, die in einer eigenen Apparatur in 1x MOPS Puffer und bei 120-200V benutzt wurden.

### **Coomassie-Färbung von Proteingelen**

Um Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden Polyacrylamid-Gele 30min in einer Coomassie-Lösung (R-250 in 10% Essigsäure, 20% Methanol) gefärbt oder in der Mikrowelle kurz erhitzt und anschließend durch wiederholtes Waschen mit 10% Essigsäure/20% Methanol entfärbt bis der Hintergrund des Gels klar wurde.

### **Western blot**

SDS-Polyacrylamidgele wurden unmittelbar nach der Elektrophorese mithilfe einer Tankblot-Apparatur (Hoefer) in Transferpuffer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon, Pharmacia) überführt. Der Transfer erfolgte 45min bis 1h30min bei einer konstanten Spannung von 70 V.

### **Immunologischer Nachweis von membrangebundenen Proteinen**

Die PVDF-Membran mit den immobilisierten Proteinen wurde mindestens 20min bei RT in 5% Magermilchpulver (w/v) in TBST blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte 1-2h bei RT, bzw. vorzugsweise über Nacht in 5% Magermilchpulver (w/v) in TBST. Die Membran wurde mindestens fünfmal 5min (bzw. verlängerte Zeiten) mit TBST gewaschen und

anschließend mit einem sekundären Antikörper in einer 1:10000-15000 Verdünnung in 5% Magermilchpulver/TBST für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBST wie oben erfolgte die Detektion mittels Chemolumineszenz (ECL-Western Kit, Amersham) nach Herstellerangaben auf ECL-Hyperfilm (Amersham).

### **Reinigung rekombinanter Proteine unter nativen Bedingungen**

Die Reinigung in *E. coli* (bei RT oder 30°C) exprimierter rekombinanter Proteine mit GST-Fusionsanteilen erfolgte mittels Affinitäts-Chromatographie unter Verwendung von Glutathion-Sepharose (Pharmacia) unter nativen Bedingungen und nach Angaben des Herstellers. Für die Reinigung von GST-Fusionsproteinen wurde das Zellsediment in 30ml PBS mit Proteaseinhibitoren aufgenommen und die in einer "French press" durch zweimaliges Durchpressen lysiert. Nach 30min Zentrifugation bei 20000g erfolgte die Bindung des Überstands an Glutathion-Sepharose bei 4°C (in PBS, 1% Triton-X100, 5mM DTT) Die Sepharose-Beads wurden abzentrifugiert, in eine Säule überführt, mit 50mM Tris, pH 7,5, 500mM NaCl, 1% Triton-X100 und abschließend mit PBS gewaschen. Das gereinigte rekombinante Protein wurde mit 3ml 50mM Tris, pH 8,0, 10 mM Glutathion eluiert, in Fraktionen mit je 0,5ml gesammelt, gegen PBS mit 5mM DTT dialysiert und mittels SDS-PAGE auf seine Reinheit überprüft. Alle Schritte erfolgten mit vorgekühlten Materialien bei 4°C.

### **Denaturierende NiNTA-Chromatographie rekombinanter Proteine**

Um mit dem His-Epitop markierte Proteine aus *E. coli* denaturierend aufzureinigen, wurden das Zellpellet (0,5-1l Kultur) in Puffer A resuspendiert und die Zellen wurden über Nacht lysiert. Nach Zentrifugation 2x 20000g wurde der Überstand mit 10-20mM Imidazol versetzt und an 5ml NiNTA Perlen (Qiagen) gebunden. nach Beladung der Suspension auf eine Säule wurde mit 10Vol Puffer A gewaschen sowie 5Vol Puffer C, bis die OD<sub>280</sub> einen Wert kleiner 0,02 hat. Die Elution erfolgt mit Puffer D und E, jeweils in 1ml Fraktionen. Alternativ kann über die Zugabe von 200mM Imidazol eluiert werden. Die Fraktionen, in denen das Protein eluiert, wurden vereint und gegen PBS mit 5mM DTT dialysiert.

### **Herstellung von denaturierten Hefe-Extrakten**

Um posttranslationale Modifikation zu erhalten und Proteolyse zu vermeiden wurden für analytische Zwecke ausschließlich denaturierte Extrakte hergestellt. Logarithmisch wachsende Hefezellen der Zelldichte von OD<sub>600</sub> = 0,4-1 wurden geerntet (1ml) und in 1ml kaltem Wasser resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 150µl 1,85M NaOH/7,5% β-Mercaptoethanol gemischt und 15min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 150µl 55% Trichloressigsäure (TCA) wurde das Gemisch weitere 15min auf Eis inkubiert und die Proteine anschließend pelletiert (10min bei 14000 rpm und 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, die Proteine nochmals kurz abzentrifugiert und TCA-Reste gründlich abgesaugt. Das Pellet wurde in 50µl HU-Puffer aufgenommen.

### **Proteinfällung mit Trichloressigsäure**

Um die Proteinkonzentration einer Lösung zu erhöhen, wurden Proteine mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt und anschließend in einem kleineren Volumen aufgenommen. Dazu wurde die Lösung mit Wasser auf 200µl aufgefüllt und anschließend wurden 20µl 0,15% Natriumdesoxycholat hinzugegeben. Die Probe wurde gut durchmischt und 10min bei RT inkubiert. Es wurden 20µl 72% TCA hinzugegeben, 2min auf Eis inkubiert und die präzipitierten Proteine 15min bei 14000rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) und 4°C abzentrifugiert.

### **Herstellung von nativen Hefe-Extrakten**

Hefezellen einer logarithmisch wachsenden Hefekultur wurden geerntet und einmal mit kaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde in gleichem Volumen gekühlten Lysepuffer aufgenommen und mit Glasperlen (Sigma, 425-600µm) bis zum Meniscus versetzt. Nach mehrfachem Schütteln im Vortex-Schüttler bei 4°C für jeweils 1min wurde die Lyse mikroskopisch überprüft und das Lysat durch ein Loch (27gauge Nadel) am unteren Ende des Eppendorfgefäßes in ein zweites Eppendorfgefäßes zentrifugiert. Für anschließende Immunpräzipitation wurde das Gesamtlisat entweder direkt mit Tensiden solubilisiert und anschließend 15min bei 15000g zentrifugiert. Alternativ, für die Analyse von löslichen Proteinen, wurde zuerst für 15min bei 15000g zentrifugiert und danach der Überstand weiter verwendet.

### **Native Aufreinigung von SUMO-Substraten**

Für die anschließende Aufreinigung wurden alle verwendeten Lösungen filtriert, um Kontaminationen mit fremden Proteinen zu vermeiden. 40g Zellpellet von *ulp1ts* Zellen (spätlogarithmische Zellen, kultiviert bei 23°C), wurden in gleichem Volumen Puffer (150mM NaCl, 50mM Tris/HCl pH 7,4; 6mM EDTA, 20mM NEM, Proteaseinhibitoren) resuspendiert und durch dreimaliges Durchpressen durch eine "french press" lysiert. Nach Abtrennung der Zelltrümmer über Zentrifugation (2min 500g) wurde der Überstand mit Triton-X100 und SDS auf 1% bzw. 0,1% eingestellt und für 30min bei 4°C solubilisiert. Nach 15min 15000g wurde der Überstand mit magnetischen Protein A Perlen versetzt, an die anti-SUMO IgGs gekoppelt wurden (2ml Aufschlammung). Nach Inkubation bei 4°C über Nacht auf einem Drehrad wurden die gebundenen Immunkomplexe 4x mit dem für die Präzipitation verwendeten Puffer gewaschen. Ein weiterer Puffer-Waschschritt mit 300mM NaCl, sowie zwei Waschschritte mit 5mM NH<sub>4</sub>Ac/pH 6,0 erfolgten. Über waschen der Immunkomplexe mit 50mM Tris/Hcl pH 7,4 wurden die Tenside entfernt. Die Immunkomplexe wurden anschließend über drei Elutionen mit 50µl 1% SDS bei 65°C für 10min in Lösung gebracht. Nach Trocknung der Lösung im Vakuum wurden die Proteine in 20µl Wasser/30µl HU-Puffer aufgenommen und auf ein 8-12% SDS-PAGE Gradientengel geladen und über Nacht aufgetrennt. Nach Coomassiefärbung wurden spezifische Banden ausgeschnitten und über MALDI (Toplab, Protana) identifiziert.

### **Denaturierende Aufreinigung von SUMO-Substraten**

Es wurde eine Tandemaufreinigung durchgeführt, die erst His-SUMO-Proteine über denaturierende NiNTA-Chromatographie anreichert und in einem zweiten Schritt über anti-SUMO Immuno-Affinitätschromatographie weiter aufreingt. Dafür wurden 6l Zellen (6000 OD) pelletierte und gewaschene (PBS) Zellen (YCH123: *ulp1ts, pADHHisSMT3::SMT3*) in 160ml 1,85M NaOH/7,5%  $\beta$ -Mercaptoethanol für 20min auf Eis inkubiert. Zur Lyse der Zellen und Präzipitation der Proteine wurden 160ml 50% TCA zugegeben und weitere 20min auf Eis inkubiert. Nach 20min Zentrifugation bei 3500rpm wurde das Pellet 1x in kaltem Wasser gewaschen und anschließend in Puffer A mit der Pipette resuspendiert und 1h auf einem Schüttler bei RT solubilisiert. Nichtlösliche Bestandteile wurden durch 20min Zentrifugation bei 15000g abgetrennt. Der Überstand wurde mit 250 $\mu$ l NiNTA-Perlen (Qiagen) sowie 20mM Imidazol versetzt. Nach Bindung über Nacht an die Perlen wurde aus der Suspension eine Säule gepackt. Nach waschen der Säule mit 20ml Puffer A und 100ml Puffer C erfolgte die Elution mit 2x 2ml PufferC/200mM Imidazol. 1ml des Eluats wurde TCA präzipitiert, während je 1,5ml mit RIPA-Puffer auf je 40ml aufgefüllt wurden. Zur weiteren Aufreinigung erfolgte eine Immunpräzipitation über Nacht mit unspezifischen IgGs oder mit anti-SUMO IgGs (je 1,5ml Aufschlammung, die jeweils an magnetische Protein A Perlen (Dynal) gesättigt gekoppelt wurden) in RIPA-Puffer/20mM NEM. Die Immunkomplexe wurden 4x mit Puffer gewaschen. Tenside wurden über 1x Waschen mit 50mM Tris/HCl pH 8,0 entfernt. Immunkomplexe wurden mit 2x 50 $\mu$ l SDS für 10min bei 65°C eluiert, im Vakuum getrocknet und in 10 $\mu$ l Wasser/25 $\mu$ l HU-Puffer aufgenommen. Nach Denaturierung der Proteine für 10min bei 65°C wurden die Proben auf ein 4-12% NuPAGE Bis-Tris Gel (Invitrogen) aufgetragen und in MOPS Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Coomassiefärbung wurden spezifische Banden ausgeschnitten und über MALDI identifiziert (Protana, Dänemark)

### **Immunpräzipitation von Proteinen**

Durch Immunpräzipitation wurden spezifisch Proteine aus einem Zellextrakt isoliert. Dafür wurde die Proteinlösung in Immunpräzipitationspuffer (IP-Puffer) mit Antikörpern versetzt, die gegen das zu präzipitierende Protein gerichtet waren. Nach Zellyse und Zentrifugation wurde der Überstand mit Tensiden versetzt (je nach Puffer 0,1-1% Triton-X100, bis 0,1% SDS bzw. 0,5% Deoxycholat und solubilisiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand (0,5-1ml) mit Antikörper (1-5 $\mu$ g) versetzt und für 1-4 Stunden bei 4°C auf dem Drehrad (Rotorque) inkubiert. Durch Zugabe von Protein A-Sepharose (Amersham-Pharmacia) wurde der Antigen-Antikörper-Komplex gebunden. Es wurden 30 $\mu$ l einer 1:2 Aufschlammung (im jeweiligen Lysepuffer) Protein A-Sepharose hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Agaroseperlen fünfmal im jeweiligen IP-Puffer gewaschen (zwischendurch je durch einen kurzen Puls in einer Eppendorf Tischzentrifuge sedimentiert). Die Flüssigkeit wurde dann möglichst vollständig abgenommen. Zur Elution der Proteine wurden die Proben mit 10 $\mu$ l 1% SDS in Wasser versetzt. Nach weiterer Zugabe von 15 $\mu$ l HU-Puffer und Denaturierung für 15min bei 65°C konnten die Proben elektrophoretisch aufgetrennt werden und die Immunpräzipitation bzw. Co-Immunpräzipitation von Proteinen immunologisch nachgewiesen werden.



### **Denaturierende NiNTA-Chromatographie von Hefeproteinen**

200 OD Zellen wurden mit 4ml 1,85M NaOH/7,5%  $\beta$ -Mercaptoethanol für 20min auf Eis inkubiert. Zur Lyse der Zellen und Präzipitation der Proteine wurden 4ml 50% TCA zugegeben und weitere 20min auf Eis inkubiert. Nach 15min Zentrifugation bei 15000g wurde der Überstand abgesaugt, mit -20°C Aceton kurz gewaschen, anschließend in Puffer A/0,05% Tween-20 mit der Pipette resuspendiert und 1h auf einem Schüttler bei RT solubilisiert. Nichtlösliche Bestandteile wurden durch 20min Zentrifugation bei 15000g abgetrennt. Der Überstand wurde mit 30 $\mu$ l magnetischen NiNTA Perlen (Qiagen) sowie 20mM Imidazol versetzt. Nach Bindung über Nacht an die Perlen wurden die Proteinkomplexe auf einem Magnetständer pelletiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und 3x mit Puffer A/0,05% Tween-20 und 4x mit Puffer C/0,05% Tween-20 gewaschen. Die Elution erfolgte mit 20 $\mu$ l 1% SDS in Wasser bei 65°C. Nach Trocknung im Vakuum wurden die Proteine in 10+15 $\mu$ l Wasser+HU-Puffer aufgenommen und 10min bei 65°C denaturiert.

### **Herstellung von Antikörpern in Kaninchen**

Für die Herstellung von Seren in Kaninchen, die spezifisch für ein bestimmtes Protein sind, wurden His-markierte Proteine rekombinant aus *E. coli* über denaturierende NiNTA-Chromatographie gereinigt und in PBS gelöst. Für die Immunisierung wurde circa 300 $\mu$ g Protein in 600 $\mu$ l PBS für 10min bei 95°C denaturiert, nach dem Abkühlen mit 600 $\mu$ l Freud'scher Adjuvanz (complete, Sigma) über Sonifizierung bis zur Emulsionsbildung gemischt und anschließend an zehn Punkten subkutan dem Kaninchen gespritzt. Nach sechs Wochen erfolgte die erste Auffrischung (boost), dabei wurde die gleiche Emulsion verwendet (allerdings mit Freud'scher Adjuvanz incomplete, Sigma). Weitere Auffrischungen fanden alle 4 Wochen statt. Nach Erreichen hoher Titer spezifischer Antikörper (zwei Wochen nach Auffrischung, nach 3. bis 5. Auffrischung) wurde das Serum entnommen. Nach 1h bei 37°C und über Nacht bei 4°C und Zentrifugation bei 20000g wurde das Serum bei -80°C gelagert.

### **Affinitätsaufreinigung von Antikörpern**

Hochaffine IgGs aus Kaninchenserum wurden über Immuno-Affinitätschromatographie angereichert. Dafür wurde GST-markiertes Antigen verwendet. Die Aufreinigung erfolgte über zwei hintereinandergeschaltete Säulen. An die erste Säule (Vorsäule) wurde unspezifisches Lysat aus *E. coli* gekoppelt, an die zweite Säule (Hauptsäule) entweder gereinigtes Antigen oder Lysat aus *E. coli*, die das Antigen stark überexprimieren. Nach Applikation des Serums auf die Säulen binden die spezifischen IgGs an die zweite Antigen-Säule und konnten danach spezifisch eluiert werden. Als Säulenmatrix wurde CnBr Sepharose 4CLB (Amersham Pharmacia) verwendet. Die Kopplung der Proteine an die Matrix erfolgte in Kopplungspuffer (100mM NaHCO<sub>3</sub>; 0,5M NaCl pH 8,3) bei 4°C. Proteine wurden vorher gegen den Kopplungspuffer dialysiert. Freie Bindungsstellen wurden mit 0,2M Glycin pH 8,0 für 2h bei RT blockiert. Anschließend wurden die beiden Säulen verbunden und mit verschiedenen Waschschr

vorbereitet (Vorsäule und Hauptsäule: 4 Vol 100mM NaAc pH 4,0; 0,5M NaCl; 2 Vol PBS; 2 Vol PBS/1%SDS, nach einem Durchlauf Säulen 40min bei 65°C denaturieren; 1 Vol PBS/1%SDS; Hauptsäule: 2 Vol PBS/1% Triton-X100, 2 Vol PBS/1% Triton-X100/1% BSA; Vorsäule: 4 Vol PBS/1% Triton-X100)

Die Säulen wurden wieder verbunden. Das Serum wurde für drei langsame Läufe auf die Vorsäule gegeben. Anschließend wurde mit 2Vol PBS gewaschen. Nach Demontage der Vorsäule wurde die Hauptsäule mit 3 Vol PBS/1% Triton-X100 sowie mit 4Vol PBS gewaschen. Anschließend wurde die Säule gekühlt. Die gebundenen spezifischen IgGs wurden dann mit Glycin-Puffer (0,2M Glycin; 1mM EGTA pH 2,5) in mehreren Fraktionen eluiert und sofort in 1M Tris pH 8,0 neutralisiert. Stark bindende IgGs wurden über 4M Guanidiniumchlorid pH 7,0 eluiert. Positive Eluate wurden gepoolt und gegen PBS bei 4°C dialysiert. Die gereinigten IgGs wurden bei -80°C gelagert, oder nach Zusatz von 50% Glycerin und 0,2% BSA bei -20°C.

## 5. Referenzen

al-Khodairy, F., Enoch, T., Hagan, I. M., und Carr, A. M. (1995). The *Schizosaccharomyces pombe* *hus5* gene encodes a ubiquitin conjugating enzyme required for normal mitosis. *J Cell Sci* 108, 475-86.

Amin, N. S., und Holm, C. (1996). In vivo analysis reveals that the interdomain region of the yeast proliferating cell nuclear antigen is important for DNA replication and DNA repair. *Genetics* 144, 479-93.

Ayyagari, R., Impellizzeri, K. J., Yoder, B. L., Gary, S. L., und Burgers, P. M. (1995). A mutational analysis of the yeast proliferating cell nuclear antigen indicates distinct roles in DNA replication and DNA repair. *Mol Cell Biol* 15, 4420-9.

Bachant, J., Alcasabas, A., Blat, Y., Kleckner, N., und Elledge, S. J. (2002). The SUMO-1 isopeptidase *Smt4* Is Linked to Centromeric Cohesion through SUMO-1 Modification of DNA Topoisomerase II. *Mol Cell* 9, 1169-82.

Bartel, B., Wunning, I., und Varshavsky, A. (1990). The recognition component of the N-end rule pathway. *Embo J* 9, 3179-89.

Bartel, P., Chien, C. T., Sternglanz, R., und Fields, S. (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* 14, 920-4.

Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., und Becker, J. (1998). Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280, 275-86.

Bernier-Villamor, V., Sampson, D. A., Matunis, M. J., und Lima, C. D. (2002). Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* 108, 345-56.

Bhaskar, V., Valentine, S. A., und Courey, A. J. (2000). A functional interaction between dorsal and components of the *Smt3* conjugation machinery. *J Biol Chem* 275, 4033-40.

Biederer, T., Volkwein, C., und Sommer, T. (1996). Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* 15, 2069-76.

Biggins, S., Bhalla, N., Chang, A., Smith, D. L., und Murray, A. W. (2001). Genes involved in sister chromatid separation and segregation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 159, 453-70.

Broomfield, S., Hryciw, T., und Xiao, W. (2001). DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 486, 167-84.

Broomfield, S., Chow, B. L., und Xiao, W. (1998). MMS2, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5678-83.

Busch, H., und Goldknopf, I. L. (1981). Ubiquitin - protein conjugates. *Mol Cell Biochem* 40, 173-87.

Chakrabarti, S. R., Sood, R., Nandi, S., und Nucifora, G. (2000). Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13281-5.

Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z. J. (2000). Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103, 351-61.

Desai, S. D., Liu, L. F., Vazquez-Abad, D., and D'Arpa, P. (1997). Ubiquitin-dependent destruction of topoisomerase I is stimulated by the antitumor drug camptothecin. *J Biol Chem* 272, 24159-64.

Desterro, J. M., Rodriguez, M. S., and Hay, R. T. (1998). SUMO-1 modification of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell* 2, 233-9.

Dittmar, G. A., Wilkinson, C. R., Jedrzejewski, P. T., and Finley, D. (2002). Role of a ubiquitin-like modification in polarized morphogenesis. *Science* 295, 2442-6.

Dohmen, R. J., Madura, K., Bartel, B., and Varshavsky, A. (1991). The N-end rule is mediated by the UBC2(RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7351-5.

Dohmen, R. J., Stappen, R., McGrath, J. P., Forrova, H., Kolarov, J., Goffeau, A., and Varshavsky, A. (1995). An essential yeast gene encoding a homolog of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem* 270, 18099-109.

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. *J Cell Sci* 112, 381-93.

Eisenberg, J. C., Ayyagari, R., Gomes, X. V., and Burgers, P. M. (1997). Mutations in yeast proliferating cell nuclear antigen define distinct sites for interaction with DNA polymerase delta and DNA polymerase epsilon. *Mol Cell Biol* 17, 6367-78.

Enenkel, C., Lehmann, A., and Kloetzel, P. M. (1999). GFP-labelling of 26S proteasomes in living yeast: insight into proteasomal functions at the nuclear envelope/rough ER. *Mol Biol Rep* 26, 131-5.

Epps, J. L., and Tanda, S. (1998). The *Drosophila* semushi mutation blocks nuclear import of bicoid during embryogenesis. *Curr Biol* 8, 1277-80.

Everett, R. D., Freemont, P., Saitoh, H., Dasso, M., Orr, A., Katoria, M., and Parkinson, J. (1998). The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms. *J Virol* 72, 6581-91.

Everett, R. D., Lomonte, P., Sternsdorf, T., van Driel, R., and Orr, A. (1999). Cell cycle regulation of PML modification and ND10 composition. *J Cell Sci* 112, 4581-8.

Fabre, F., Magana-Schwencke, N., and Chanet, R. (1989). Isolation of the RAD18 gene of *Saccharomyces cerevisiae* and construction of rad18 deletion mutants. *Mol Gen Genet* 215, 425-30.

Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-6.

Finley, D., Ozkaynak, E., and Varshavsky, A. (1987). The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* 48, 1035-46.

Fogal, V., Gostissa, M., Sandy, P., Zacchi, P., Sternsdorf, T., Jensen, K., Pandolfi, P. P., Will, H., Schneider, C., and Del Sal, G. (2000). Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *Embo J* 19, 6185-95.

Formosa, T., und Alberts, B. M. (1986). DNA synthesis dependent on genetic recombination: characterization of a reaction catalyzed by purified bacteriophage T4 proteins. *Cell* 47, 793-806.

Friedberg, E. C., Walker, G. C., und Siede, W. (1995). *DNA Repair and Mutagenesis*: American Society for Microbiology Press, Washington).

Galan, J. M., und Haguenaer-Tsapis, R. (1997). Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *Embo J* 16, 5847-54.

Game, J. C., und Kaufman, P. D. (1999). Role of *Saccharomyces cerevisiae* chromatin assembly factor-I in repair of ultraviolet radiation damage in vivo. *Genetics* 151, 485-97.

Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M. S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M., und D'Andrea, A. D. (2001). Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 7, 249-62.

Gietz, R. D., und Sugino, A. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74, 527-34.

Glickman, M. H., Rubin, D. M., Fu, H., Larsen, C. N., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Vierstra, R., Baumeister, W., Fried, V., und Finley, D. (1999). Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol Biol Rep* 26, 21-8.

Goehl, M. G., Yochem, J., Jentsch, S., McGrath, J. P., Varshavsky, A., und Byers, B. (1988). The yeast cell cycle gene CDC34 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Science* 241, 1331-5.

Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S. E., Scheffner, M., und Del Sal, G. (1999). Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J* 18, 6462-71.

Grompe, M., und D'Andrea, A. (2001). Fanconi anemia and DNA repair. *Hum Mol Genet* 10, 2253-9.

Guo, A., Salomoni, P., Luo, J., Shih, A., Zhong, S., Gu, W., und Paolo Pandolfi, P. (2000). The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 2, 730-6.

Haas, A. L., Warme, J. V., Hershko, A., und Rose, I. A. (1982). Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J Biol Chem* 257, 2543-8.

Haracska, L., Kondratyck, C. M., Unk, I., Prakash, S., und Prakash, L. (2001). Interaction with PCNA is essential for yeast DNA polymerase eta function. *Mol Cell* 8, 407-15.

Hardeland, U., Steinacher, R., Jiricny, J., und Schar, P. (2002). Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *Embo J* 21, 1456-64.

Hershko, A., und Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-79.

Hershko, A., Heller, H., Elias, S., und Ciechanover, A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* 258, 8206-14.

Hicke, L. (1999). Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol* 9, 107-12.

Hicke, L. (2001). A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* 106, 527-30.

- Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 195-201.
- Ho, J. C., Warr, N. J., Shimizu, H., und Watts, F. Z. (2001). SUMO modification of Rad22, the *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the recombination protein Rad52. *Nucleic Acids Res* 29, 4179-86.
- Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 30, 405-39.
- Hochstrasser, M. (2002). New structural clues to substrate specificity in the "Ubiquitin System". *Mol Cell* 9, 453-4.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-74.
- Hofmann, R. M., und Pickart, C. M. (1999). Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 96, 645-53.
- Howlett, N. G., Taniguchi, T., Olson, S., Cox, B., Waisfisz, Q., De Die-Smulders, C., Persky, N., Grompe, M., Joenje, H., Pals, G., Ikeda, H., Fox, E. A., und D'Andrea, A. D. (2002). Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 297, 606-9.
- Huang, M. E., de Calignon, A., Nicolas, A., und Galibert, F. (2000). POL32, a subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase delta, defines a link between DNA replication and the mutagenic bypass repair pathway. *Curr Genet* 38, 178-87.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., und Ohsumi, Y. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408, 488-92.
- Ishii, K., Arib, G., Lin, C., Van Houwe, G., und Laemmli, U. K. (2002). Chromatin boundaries in budding yeast: the nuclear pore connection. *Cell* 109, 551-62.
- Ishov, A. M., Sotnikov, A. G., Negorev, D., Vladimirova, O. V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E. T., Strauss, J. F., 3rd, und Maul, G. G. (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol* 147, 221-34.
- James, P., Halladay, J., und Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425-36.
- Jentsch, S., und Pyrowolakis, G. (2000). Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol* 10, 335-42.
- Jentsch, S., McGrath, J. P., und Varshavsky, A. (1987). The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature* 329, 131-4.
- Joazeiro, C. A., und Weissman, A. M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102, 549-52.
- Johnson, E. S., und Gupta, A. A. (2001). An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* 106, 735-44.
- Johnson, E. S., und Blobel, G. (1999). Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J Cell Biol* 147, 981-94.
- Johnson, E. S., Schwienhorst, I., Dohmen, R. J., und Blobel, G. (1997). The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *Embo J* 16, 5509-19.

Johnson, R. E., Kondratick, C. M., Prakash, S., and Prakash, L. (1999). hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. *Science* 285, 263-5.

Johnson, R. E., Henderson, S. T., Petes, T. D., Prakash, S., Bankmann, M., and Prakash, L. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* RAD5-encoded DNA repair protein contains DNA helicase and zinc-binding sequence motifs and affects the stability of simple repetitive sequences in the genome. *Mol Cell Biol* 12, 3807-18.

Kahyo, T., Nishida, T., and Yasuda, H. (2001). Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell* 8, 713-8.

Kaiser, P., Flick, K., Wittenberg, C., and Reed, S. I. (2000). Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell* 102, 303-14.

Katzmann, D. J., Babst, M., and Emr, S. D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106, 145-55.

Kawabe, Y., Seki, M., Seki, T., Wang, W. S., Imamura, O., Furuichi, Y., Saitoh, H., and Enomoto, T. (2000). Covalent modification of the Werner's syndrome gene product with the ubiquitin-related protein, SUMO-1. *J Biol Chem* 275, 20963-6.

Kawakami, T., Chiba, T., Suzuki, T., Iwai, K., Yamanaka, K., Minato, N., Suzuki, H., Shimbara, N., Hidaka, Y., Osaka, F., Omata, M., and Tanaka, K. (2001). NEDD8 recruits E2-ubiquitin to SCF E3 ligase. *Embo J* 20, 4003-12.

Kim, Y. H., Choi, C. Y., and Kim, Y. (1999). Covalent modification of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12350-5.

Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* 15, 963-72.

Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O. A., and Palvimo, J. J. (2002). PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol Cell Biol* 22, 5222-34.

Krek, W. (1998). Proteolysis and the G1-S transition: the SCF connection. *Curr Opin Genet Dev* 8, 36-42.

Krishna, T. S., Fenyo, D., Kong, X. P., Gary, S., Chait, B. T., Burgers, P., and Kuriyan, J. (1994). Crystallization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 241, 265-8.

Lam, Y. A., Lawson, T. G., Velayutham, M., Zweier, J. L., and Pickart, C. M. (2002). A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 416, 763-7.

Lammer, D., Mathias, N., Laplaza, J. M., Jiang, W., Liu, Y., Callis, J., Goebel, M., and Estelle, M. (1998). Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin-related protein rub1p affects function of the SCFCdc4 complex. *Genes Dev* 12, 914-26.

Laney, J. D., and Hochstrasser, M. (1999). Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell* 97, 427-30.

Lawrence, C. (1994). The RAD6 DNA repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: what does it do, and how does it do it? *Bioessays* 16, 253-8.

Lawrence, C. W., und Christensen, R. B. (1979). Metabolic suppressors of trimethoprim and ultraviolet light sensitivities of *Saccharomyces cerevisiae* rad6 mutants. *J Bacteriol* 139, 866-87.

Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S. A., Katz, M., Tsygankov, A. Y., Alroy, I., Lavi, S., Iwai, K., Reiss, Y., Ciechanover, A., Lipkowitz, S., und Yarden, Y. (1999). Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell* 4, 1029-40.

Li, C. J., und DePamphilis, M. L. (2002). Mammalian Orc1 protein is selectively released from chromatin and ubiquitinated during the S-to-M transition in the cell division cycle. *Mol Cell Biol* 22, 105-16.

Li, S. J., und Hochstrasser, M. (1999). A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* 398, 246-51.

Li, S. J., und Hochstrasser, M. (2000). The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein. *Mol Cell Biol* 20, 2367-77.

Li, Z., Xiao, W., McCormick, J. J., und Maher, V. M. (2002). Identification of a protein essential for a major pathway used by human cells to avoid UV- induced DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4459-64.

Liakopoulos, D., Büsgen, T., Brychzy, A., Jentsch, S., und Pause, A. (1999). Conjugation of the ubiquitin-like protein NEDD8 to cullin-2 is linked to von Hippel-Lindau tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5510-5.

Liakopoulos, D., Doenges, G., Matuschewski, K., und Jentsch, S. (1998). A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system. *Embo J* 17, 2208-14.

Liberi, G., Chiolo, I., Pelliccioli, A., Lopes, M., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., und Foiani, M. (2000). Srs2 DNA helicase is involved in checkpoint response and its regulation requires a functional Mec1-dependent pathway and Cdk1 activity. *Embo J* 19, 5027-38.

Losko, S., Kopp, F., Kranz, A., und Kolling, R. (2001). Uptake of the ATP-binding cassette (ABC) transporter Ste6 into the yeast vacuole is blocked in the *doa4* mutant. *Mol Biol Cell* 12, 1047-59.

Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., und Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88, 97-107.

Mao, Y., Desai, S. D., und Liu, L. F. (2000). SUMO-1 conjugation to human DNA topoisomerase II isozymes. *J Biol Chem* 275, 26066-73.

Mao, Y., Sun, M., Desai, S. D., und Liu, L. F. (2000). SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4046-51.

Marchetti, M. A., Kumar, S., Hartsuiker, E., Maftahi, M., Carr, A. M., Freyer, G. A., Burhans, W. C., und Huberman, J. A. (2002). A single unbranched S-phase DNA damage and replication fork blockage checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7472-7.

Matunis, M. J., Coutavas, E., und Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 135, 1457-70.

Matuschewski, K., Hauser, H. P., Treier, M., und Jentsch, S. (1996). Identification of a novel family of ubiquitin-conjugating enzymes with distinct amino-terminal extensions. *J Biol Chem* 271, 2789-94.



McDonald, J. P., Levine, A. S., und Woodgate, R. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* RAD30 gene, a homologue of *Escherichia coli* dinB and umuC, is DNA damage inducible and functions in a novel error-free postreplication repair mechanism. *Genetics* 147, 1557-68.

McGrath, J. P., Jentsch, S., und Varshavsky, A. (1991). UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *Embo J* 10, 227-36.

Melchior, F. (2000). SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 591-626.

Meluh, P. B., und Koshland, D. (1995). Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. *Mol Biol Cell* 6, 793-807.

Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M., und Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395, 395-8.

Mo, Y. Y., Yu, Y., Shen, Z., und Beck, W. T. (2002). Nucleolar delocalization of human topoisomerase I in response to topotecan correlates with sumoylation of the protein. *J Biol Chem* 277, 2958-64.

Mossessova, E., und Lima, C. D. (2000). Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol Cell* 5, 865-76.

Müller, S., Hoegel, C., Pyrowolakis, G., und Jentsch, S. (2001). SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 202-10.

Müller, S., und Dejean, A. (1999). Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. *J Virol* 73, 5137-43.

Müller, S., Matunis, M. J., und Dejean, A. (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *Embo J* 17, 61-70.

Ohsumi, Y. (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 211-6.

Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P. P., und Pelicci, P. G. (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 406, 207-10.

Pichler, A., Gast, A., Seeler, J. S., Dejean, A., und Melchior, F. (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 108, 109-20.

Pichler, A., und Melchior, F. (2002). Ubiquitin-Related Modifier SUMO1 and Nucleocytoplasmic Transport. *Traffic* 3, 381-7.

Pickart, C. M. (2000). Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* 25, 544-8.

Pickart, C. M. (1997). Targeting of substrates to the 26S proteasome. *Faseb J* 11, 1055-66.

Prakash, L. (1994). The RAD6 gene and protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann N Y Acad Sci* 726, 267-73.

Prakash, S., Sung, P., und Prakash, L. (1993). DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 27, 33-70.

Robzyk, K., Recht, J., und Osley, M. A. (2000). Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* 287, 501-4.

Rouillon, A., Barbey, R., Patton, E. E., Tyers, M., und Thomas, D. (2000). Feedback-regulated degradation of the transcriptional activator Met4 is triggered by the SCF (Met30) complex. *Embo J* 19, 282-94.

Russell, S. J., Steger, K. A., und Johnston, S. A. (1999). Subcellular localization, stoichiometry, and protein levels of 26 S proteasome subunits in yeast. *J Biol Chem* 274, 21943-52.

Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., und Grosschedl, R. (2001). PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* 15, 3088-103.

Salghetti, S. E., Caudy, A. A., Chenoweth, J. G., und Tansey, W. P. (2001). Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science* 293, 1651-3.

Scheffner, M., Nuber, U., und Huibregtse, J. M. (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 373, 81-3.

Schiestl, R. H., Prakash, S., und Prakash, L. (1990). The SRS2 suppressor of rad6 mutations of *Saccharomyces cerevisiae* acts by channeling DNA lesions into the RAD52 DNA repair pathway. *Genetics* 124, 817-31.

Schmidt, D., und Müller, S. (2002). Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2872-7.

Schule, T., Rose, M., Entian, K. D., Thumm, M., und Wolf, D. H. (2000). Ubc8p functions in catabolite degradation of fructose-1, 6-bisphosphatase in yeast. *Embo J* 19, 2161-7.

Schwab, M., Lutum, A. S., und Seufert, W. (1997). Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. *Cell* 90, 683-93.

Schwarz, S. E., Matuschewski, K., Liakopoulos, D., Scheffner, M., und Jentsch, S. (1998). The ubiquitin-like proteins SMT3 and SUMO-1 are conjugated by the UBC9 E2 enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 560-4.

Seeler, J. S., Marchio, A., Losson, R., Desterro, J. M., Hay, R. T., Chambon, P., und Dejean, A. (2001). Common properties of nuclear body protein SP100 and TIF1alpha chromatin factor: role of SUMO modification. *Mol Cell Biol* 21, 3314-24.

Seufert, W., Futcher, B., und Jentsch, S. (1995). Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* 373, 78-81.

Seufert, W., und Jentsch, S. (1990). Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *Embo J* 9, 543-50.

Shen, Z., Pardington-Purtymun, P. E., Comeaux, J. C., Moyzis, R. K., und Chen, D. J. (1996). UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. *Genomics* 36, 271-9.

Sobko, A., Ma, H., und Firtel, R. A. (2002). Regulated SUMOylation and ubiquitination of DdMEK1 is required for proper chemotaxis. *Dev Cell* 2, 745-56.

Sommer, T., und Jentsch, S. (1993). A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature* 365, 176-9.

Spence, J., Gali, R. R., Dittmar, G., Sherman, F., Karin, M., und Finley, D. (2000). Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell* 102, 67-76.

- Spence, J., Sadis, S., Haas, A. L., und Finley, D. (1995). A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* 15, 1265-73.
- Sternsdorf, T., Jensen, K., und Will, H. (1997). Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *J Cell Biol* 139, 1621-34.
- Strunnikov, A. V., Aravind, L., und Koonin, E. V. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* SMT4 encodes an evolutionarily conserved protease with a role in chromosome condensation regulation. *Genetics* 158, 95-107.
- Sun, Z. W., und Allis, C. D. (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 418, 104-8.
- Suzuki, H., Seki, M., Kobayashi, T., Kawabe, Y., Kaneko, H., Kondo, N., Harata, M., Mizuno, S., Masuko, T., und Enomoto, T. (2001). The N-terminal internal region of BLM is required for the formation of dots/rod-like structures which are associated with SUMO-1. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 322-7.
- Tanaka, K., Nishide, J., Okazaki, K., Kato, H., Niwa, O., Nakagawa, T., Matsuda, H., Kawamukai, M., und 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. *Mol Cell Biol* 19, 8660-72.
- Takahashi, Y., Toh-e, A., und Kikuchi, Y. (2001). A novel factor required for the SUMO1/Smt3 conjugation of yeast septins. *Gene* 275, 223-31.
- Tatham, M. H., Jaffray, E., Vaughan, O. A., Desterro, J. M., Botting, C. H., Naismith, J. H., und Hay, R. T. (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* 276, 35368-74.
- Torres-Ramos, C. A., Prakash, S., und Prakash, L. (2002). Requirement of RAD5 and MMS2 for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 22, 2419-26.
- Torres-Ramos, C. A., Prakash, S., und Prakash, L. (1997). Requirement of yeast DNA polymerase delta in post-replicative repair of UV-damaged DNA. *J Biol Chem* 272, 25445-8.
- Torres-Ramos, C. A., Yoder, B. L., Burgers, P. M., Prakash, S., und Prakash, L. (1996). Requirement of proliferating cell nuclear antigen in RAD6-dependent postreplicative DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9676-81.
- Tsurimoto, T. (1998). PCNA, a multifunctional ring on DNA. *Biochim Biophys Acta* 1443, 23-39.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S., und Rothberg, J. M. (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403, 623-7.
- Ulrich, H. D. (2002). Degradation or maintenance: actions of the ubiquitin system on eukaryotic chromatin. *Eukaryotic cell* 1, 1-10.
- Ulrich, H. D. (2001). The srs2 suppressor of UV sensitivity acts specifically on the RAD5- and MMS2-dependent branch of the RAD6 pathway. *Nucleic Acids Res* 29, 3487-94.
- Ulrich, H. D., und Jentsch, S. (2000). Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *Embo J* 19, 3388-97.

van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D. M., Glickman, M., Fu, H., Coux, O., Wefes, I., Finley, D., und Vierstra, R. D. (1996). The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol Cell Biol* 16, 6020-8.

Varshavsky, A. (1997). The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* 22, 383-7.

Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W. H., Yates, I. J., Koonin, E. V., und Deshaies, R. J. (2002). Role of Rpn11 Metalloprotease in Deubiquitination and Degradation by the 26S Proteasome. *Science* 15, 15.

Vijay-Kumar, S., Bugg, C. E., und Cook, W. J. (1987). Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 194, 531-44.

Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J., und Chen, Z. J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412, 346-51.

West, M. H., und Bonner, W. M. (1980). Histone 2B can be modified by the attachment of ubiquitin. *Nucleic Acids Res* 8, 4671-80.

Wiebel, F. F., und Kunau, W. H. (1992). The Pas2 protein essential for peroxisome biogenesis is related to ubiquitin-conjugating enzymes. *Nature* 359, 73-6.

Wilkinson, K. D., und Hochstrasser, M. (1998). *The deubiquitinating enzymes.*: Plenum Press New York and London).

Xiao, W., Chow, B. L., Broomfield, S., und Hanna, M. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 group is composed of an error-prone and two error-free postreplication repair pathways. *Genetics* 155, 1633-41.

Yeh, E. T., Gong, L., und Kamitani, T. (2000). Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene* 248, 1-14.

Zachariae, W., und Nasmyth, K. (1999). Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* 13, 2039-58.

Zhang, Z., Shibahara, K., und Stillman, B. (2000). PCNA connects DNA replication to epigenetic inheritance in yeast. *Nature* 408, 221-5

## **Danksagung**

*Ich möchte mich an erster Stelle bei Prof. Dr. Stefan Jentsch für seinen Enthusiasmus und seine ständige Gesprächsbereitschaft bedanken. Zudem möchte ich die offene Atmosphäre in seinem Labor hervorheben, die große wissenschaftliche Freiheit ermöglicht und die entscheidende Grundlage dieser Arbeit war.*

*Herrn Prof. Dr. Erich A. Nigg möchte ich für die Begutachtung und sein Interesse an dieser Arbeit danken.*

*Mein besonderer Dank gilt Boris Pfander. Die überaus gute Zusammenarbeit hat wesentlich zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Mein Dank gilt auch Lucian Moldovan, der das Projekt durch seine Studien in höheren Eukaryonten ausgeweitet hat. Weiterhin möchte ich Ulla Cramer danken, die durch ihre vielseitige, technische Unterstützung das Projekt wesentlich beschleunigt hat.*

*Außerdem möchte ich Stefan Müller, Alexander Buchberger, Sigurd Braun und Michael Rape für ihre Gesprächsbereitschaft und Kenntnisse danken, die diese Arbeit wesentlich unterstützt haben.*

*Weiterhin möchte ich allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für ihre große Kollegialität und gute Zusammenarbeit der letzten Jahre danken.*

*Größter Dank auch an Corina und Till, die viel Verständnis für die Besonderheiten einer Doktorarbeitszeit aufbringen mußten.*

*Zuletzt möchte ich mich bei Dirk Bühler bedanken, der mich während der Doktorarbeitszeit persönlich und wissenschaftlich stets bereichert hat.*



# Lebenslauf

*Name:* Carsten Höge  
*Geburtsdatum:* 09. März 1971  
*Geburtsort:* Hamburg

*Schulbildung:* 1977 bis 1981 Grundschule Grumbrechtstraße  
1981-1990 Friedrich-Ebert-Gymnasium  
Hamburg-Harburg

Abitur im Juni 1990

*Arbeitstätigkeit:* August 1990 bis Ende März 1991  
Otto-Versand-Hamburg sowie Beiersdorf AG  
Hamburg

*Universität:* 1991 bis 1997 Freie Universität Berlin  
Studium der Biologie, Chemie und  
Erziehungswissenschaften

Zwischenprüfung in Chemie im Juni 1993  
Vordiplom Biologie im Juni 1994

1995 bis 1996 University of Birmingham (UK),  
Masters of Philosophy in Molekularer und Zellulärer  
Biologie.

1997 Biologiediplom, Freie Universität Berlin.

*Doktorarbeit:* 1998 bis 1999 Zentrum für Molekularbiologie der  
Universität Heidelberg (ZMBH),  
Arbeitsgruppe Prof. Jentsch

1999-2002 Max-Planck-Institut für Biochemie Martinsried.  
Abteilung Molekulare und Zelluläre Biologie  
Prof. Jentsch





# ***RAD6*-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO**

Carsten Hoegge\*, Boris Pfander\*, George-Lucian Moldovan\*, George Pyrowolakis\*† & Stefan Jentsch\*

\* Department of Molecular Cell Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18a, 82152 Martinsried, Germany

The *RAD6* pathway is central to post-replicative DNA repair in eukaryotic cells; however, the machinery and its regulation remain poorly understood. Two principal elements of this pathway are the ubiquitin-conjugating enzymes *RAD6* and the *MMS2*–*UBC13* heterodimer, which are recruited to chromatin by the RING-finger proteins *RAD18* and *RAD5*, respectively. Here we show that *UBC9*, a small ubiquitin-related modifier (SUMO)-conjugating enzyme, is also affiliated with this pathway and that proliferating cell nuclear antigen (PCNA)—a DNA-polymerase sliding clamp involved in DNA synthesis and repair—is a substrate. PCNA is mono-ubiquitinated through *RAD6* and *RAD18*, modified by lysine-63-linked multi-ubiquitination—which additionally requires *MMS2*, *UBC13* and *RAD5*—and is conjugated to SUMO by *UBC9*. All three modifications affect the same lysine residue of PCNA, suggesting that they label PCNA for alternative functions. We demonstrate that these modifications differentially affect resistance to DNA damage, and that damage-induced PCNA ubiquitination is elementary for DNA repair and occurs at the same conserved residue in yeast and humans.

DNA is highly vulnerable to spontaneous and environmental damage in living cells. If not repaired, DNA damage may cause mutation-induced genetic variation, ageing, carcinogenesis, or cell death. Eukaryotic DNA repair pathways are highly conserved from yeast to humans. Three principal pathways are classified according to genetic relations of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) DNA-repair mutants (for reviews see refs 1–3). The *RAD3* group mediates nucleotide excision repair, the *RAD52* group directs double-strand break repair through homologous recombination, whereas the *RAD6* group functions in post-replication repair. Proteins of the *RAD6* group seem to act on the stalled replication machinery that has encountered a damaged template, thereby accomplishing repair and allowing replication to resume<sup>1,4</sup>. This repair can be achieved by at least two different *RAD6*-dependent mechanisms: one mechanism is considered error-prone as it uses specialized translesion polymerases that insert correct or incorrect nucleotides across a damaged site; the other *RAD6*-dependent mode is error-free because it uses the information of the undamaged sister duplex at the replication fork.

The mechanism by which the *RAD6* pathway controls the different modes of post-replication DNA repair has remained enigmatic. Previous work has shown that modification of proteins by conjugation to ubiquitin is pivotal for *RAD6*-dependent DNA repair. *RAD6* itself encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, which attaches ubiquitin to substrate proteins in collaboration with ubiquitin-activating enzyme<sup>5</sup>. Furthermore, two other members of the *RAD6* group, *UBC13* and *MMS2*, form a heterodimeric ubiquitin-conjugating enzyme, which catalyses the formation of non-canonical multi-ubiquitin chains linked via K63 of ubiquitin<sup>6–11</sup>. Both enzymes, *RAD6* and *UBC13*–*MMS2*, are recruited to chromatin by interaction with the RING-finger-containing, DNA-binding proteins *RAD18* and *RAD5*, respectively<sup>9,12</sup>. We have demonstrated previously that the two distinct ubiquitin-conjugating enzymes associate by means of a *RAD18*–*RAD5* interaction, and we proposed that this assembly might modify proteins by K63-linked multi-ubiquitin chains<sup>9</sup>. In contrast to K48-linked multi-ubiquitination, mono-ubiquitination and

modification by K63-linked chains does not generally promote proteasomal degradation, but rather it seems to alter the function of the substrate or to mediate protein–protein interactions<sup>13</sup>. Nevertheless, the key question of how ubiquitination affects DNA repair has not been answered so far, because the proteins relevant to DNA repair that are ubiquitinated by the *RAD6* pathway have remained unidentified.

## Modification of PCNA by SUMO

During a study of the protein modification system that uses the small ubiquitin-related modifier, SUMO, we obtained unexpected insights into the *RAD6* pathway. This type of modification is widespread and affects a large number of cytosolic and nuclear proteins (for reviews see refs 14–16). SUMO, a protein that shares about 18% sequence identity with ubiquitin, has been suggested to mediate protein–protein interaction or to function as a ubiquitin antagonist.

To investigate this modification in yeast we searched for new SUMO substrates. We immuno-purified SUMO–protein conjugates by a two-step protocol and identified the proteins by mass spectrometric analysis of tryptic peptides (Fig. 1a). Peptide masses of one conjugate with a relative molecular mass of 45,000 (*M<sub>r</sub>*, 45K) matched those of tryptic fragments predicted for the gene product of *POL30*; that is, the yeast proliferating cell nuclear antigen PCNA. Further analysis verified that a fraction of the protein is modified by SUMO *in vivo* (Fig. 1b). PCNA, a protein of 29K, is loaded onto DNA strands as a trimeric ring where it functions as a clamp and processivity factor for DNA polymerases<sup>17,18</sup>. It is essential for a variety of S-phase functions including replication, replication-linked repair and silencing. These activities are matched by PCNA levels, which rise at S phase<sup>19</sup>. We synchronized cells using  $\alpha$ -factor and observed that SUMO conjugation to PCNA is regulated by the cell cycle and that it precedes the rise of PCNA during S phase (Fig. 1c). This finding suggests that SUMO modification of PCNA is important for events that take place during S phase.

## Modification sites

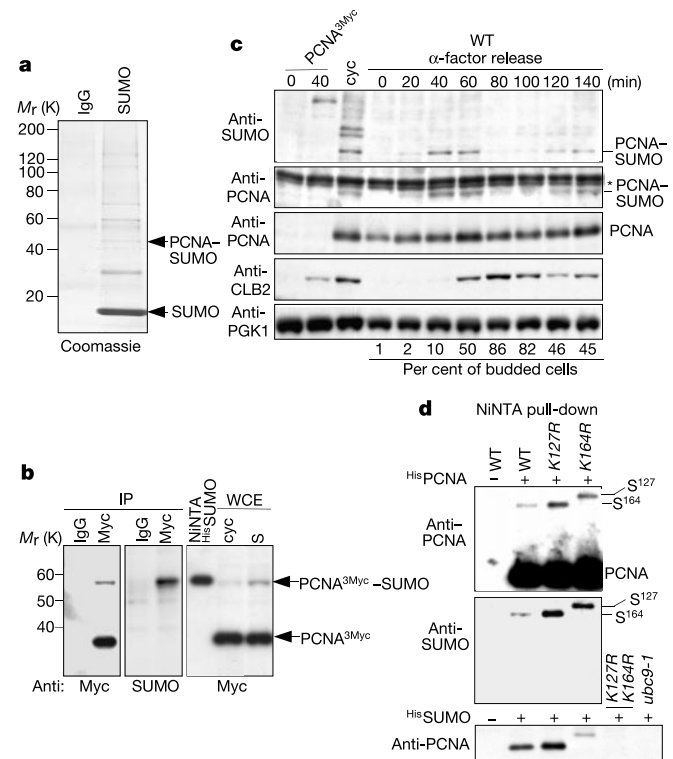
Similarly to ubiquitin, SUMO is conjugated to  $\epsilon$ -amino groups of

† Present address: Biocenter, University of Basel, 4056 Basel, Switzerland.

lysine residues of the target protein<sup>14,15</sup>. To identify the acceptor residue(s) for SUMO conjugation, we changed all 18 lysine residues of yeast PCNA individually to arginine. Only mutants at lysine 127 (K127R) and 164 (K164R) specifically altered the pattern of SUMO conjugates in a total yeast lysate (data not shown). Pull-down experiments using wild-type and mutant PCNA verified that yeast PCNA can be modified by SUMO conjugation at both residues and that a K127R K164R PCNA double mutant is not modified by SUMO to detectable levels (Fig. 1d). K127 lies within a postulated SUMO-modification consensus site ( $\psi$ KxD/E, where  $\psi$  is a hydrophobic residue; ref. 20), but appears to be unique for yeast PCNA. In contrast, K164 is a 'non-consensus' SUMO-conjugation site, yet this site is highly conserved in PCNA from yeast to humans. The

conserved K164 residue seems to be the prominent site for SUMO conjugation, whereas SUMO conjugation at K127 is stimulated when K164 has been experimentally mutated (Fig. 1d). Both modifications can occur on the same molecule, as doubly modified PCNA species can be detected in western blots of PCNA and SUMO (data not shown).

PCNA is also involved in DNA damage response and has been linked to the *RAD6* pathway of post-replicative DNA repair<sup>21</sup>. When we treated cells with 0.02% of the DNA-damaging agent methyl methanesulphonate (MMS), we observed little change in the level of PCNA-SUMO conjugates (Fig. 2a; band S<sup>164</sup>). However, when we applied a lethal dose of MMS (0.3%), there was marked induction of SUMO conjugation of PCNA, in particular at residue K164 (Fig. 2a, b). Thus, SUMO conjugation of PCNA is not triggered exclusively by S-phase events, but also by severe DNA damage.



**Figure 1** PCNA is modified by SUMO in *S. cerevisiae*. **a**, Two-step purification of His-tagged SUMO (<sup>His</sup>SUMO) conjugates involving NiNTA pull-down followed by anti-SUMO affinity chromatography. The 45K PCNA-SUMO conjugate was identified by mass spectrometry. **b**, Anti-PCNA (tagged with a triple Myc epitope, PCNA<sup>3Myc</sup>) immunoprecipitations from a *ulp1ts* strain defective in SUMO deconjugation (IP), NiNTA pull-downs from <sup>His</sup>SUMO-expressing cells under denaturing conditions (NiNTA <sup>His</sup>SUMO), and whole-cell extracts (WCE) of cycling wild-type (WT) cells (cyc) or S-phase cells (S). Proteins were detected by western blotting using antibodies as indicated below. **c**, PCNA SUMO modification is upregulated in S phase. Cultures were synchronized by  $\alpha$ -factor arrest/release, and analysed by western blotting using the indicated antibodies. The identity of PCNA and PCNA-SUMO bands is demonstrated by the corresponding up-shift when Myc-tagged PCNA (PCNA<sup>3Myc</sup>) was expressed as the sole source of PCNA (left two lanes). Relevant parts of the same gel are shown. Levels of PCNA-SUMO peak at 40 min, whereas those of unmodified PCNA peak at 60 min after release from  $\alpha$ -factor arrest. Nonspecific bands are indicated by an asterisk. Cell-cycle stages were monitored by CLB2 cyclin levels, budding index (numbers at bottom), and FACS analysis (not shown). PGK1 served as a loading control. **d**, SUMO modification sites of PCNA. NiNTA pull-down (as above) from cells expressing <sup>His</sup>PCNA (WT), His-tagged PCNA mutants (K127R and K164R) as the sole source of PCNA, or <sup>His</sup>SUMO. Proteins were identified by western blotting as indicated. SUMO is preferentially attached to K164 (S<sup>164</sup>), whereas modification at K127 (S<sup>127</sup>) is induced when K164 is absent (right lane). PCNA is not modified by SUMO when both lysines are absent (K127R K164R) or when a *ubc9-1* strain was used (bottom panel).

**Modification of PCNA by ubiquitin**

We also noticed that treatment of cells with 0.02% MMS resulted in the induction of additional PCNA-specific bands, which were also present in *ubc9-1* mutants defective for SUMO conjugation (Fig. 2a-c; bands U1 and U2). From this finding and the sizes of the proteins we speculated that these species might be PCNA-ubiquitin conjugates. Indeed, as verified by pull-down experiments, we found that PCNA is modified by ubiquitination and that species carrying one, two, three and more ubiquitin moieties can be detected (Fig. 2b-d). Notably, mono- and multi-ubiquitination of PCNA does not seem to occur to detectable levels in untreated cells, or during S phase (Figs 1d and 2a-d), but only after treatment with a sublethal dose of DNA-damaging agents (0.02% MMS; Fig. 2a-d). Ubiquitination of PCNA is absent after treatment with 0.3% MMS for several hours, a condition that induces extensive SUMO conjugation at K164 (Fig. 2a, b). By using PCNA mutants that lacked specific lysine residues we noticed that ubiquitin is attached to residue K164 (Fig. 2b, c). Thus, ubiquitination and the principal type of SUMO conjugation target the same conserved lysine residue of PCNA, yet the two distinct modifications are regulated differentially.

**PCNA is a substrate of the RAD6 pathway**

In view of the results indicating that PCNA is ubiquitinated on DNA damage, we speculated that enzymes of the *RAD6* pathway are involved. Indeed, when we monitored PCNA by western blot analysis we noticed that the ubiquitin modifications of PCNA were completely absent in *rad6* deletion mutants, whereas SUMO modification of PCNA was not affected (Fig. 2c). The same specific defect was observed when we used a mutant that lacked RAD18, a DNA-binding protein that recruits RAD6 to chromatin<sup>12</sup>. Previously, we showed that RAD18 can associate with RAD5, which in turn recruits the heterodimeric UBC13-MMS2 ubiquitin-conjugating enzyme to chromatin, and we proposed that RAD6 and RAD18 might collaborate with UBC13-MMS2 and RAD5 in ubiquitination reactions<sup>9</sup>. In fact, ubiquitination of PCNA was affected equally in *ubc13*, *mms2* and *rad5* mutants (Fig. 2c). Only the multi-ubiquitinated PCNA species (two or more ubiquitin moieties) were absent in these mutants, whereas the mono-ubiquitinated PCNA species (band U1) was still present. As the UBC13-MMS2 complex catalyses multi-ubiquitin chains with K63 linkages<sup>7</sup>, we also looked for PCNA ubiquitination in a strain<sup>22</sup> that expresses ubiquitin solely as a variant that lacks K63 (*ubiK63R*). Indeed, multi-ubiquitination of PCNA was also absent in this strain, whereas mono-ubiquitination still occurred (Fig. 2c, d). Together, these findings are consistent with a model in which DNA damage induces RAD6- and RAD18-dependent mono-ubiquitination of PCNA at K164, and that UBC13-MMS2 and RAD5 are required to attach additional ubiquitin moieties to the conjugate, thereby forming a K63-linked multi-ubiquitin chain (see Supplementary Information, Fig. 1).

Physical interactions

PCNA is loaded onto DNA by a clamp loader and requires homo-trimerization. We noticed that a PCNA mutant protein pol30-52 (ref. 23) that is partially defective in trimerization was much less modified *in vivo* (data not shown). One possible interpretation of this finding is that the modifications take place after trimerization and that DNA-associated enzymes are involved. Indeed, when we tested all enzymatic components of the RAD6 ubiquitination system in yeast two-hybrid assays we discovered that only the DNA-binding proteins RAD18 and RAD5 interact with PCNA (Fig. 2e). Importantly, both proteins contain a RING finger, a hallmark of a class of ubiquitin ligases<sup>24</sup>. This observation, together with our finding that RAD18 and RAD5 mediate PCNA ubiquitination, indicates that the two proteins function as DNA-bound ubiquitin ligases for PCNA.

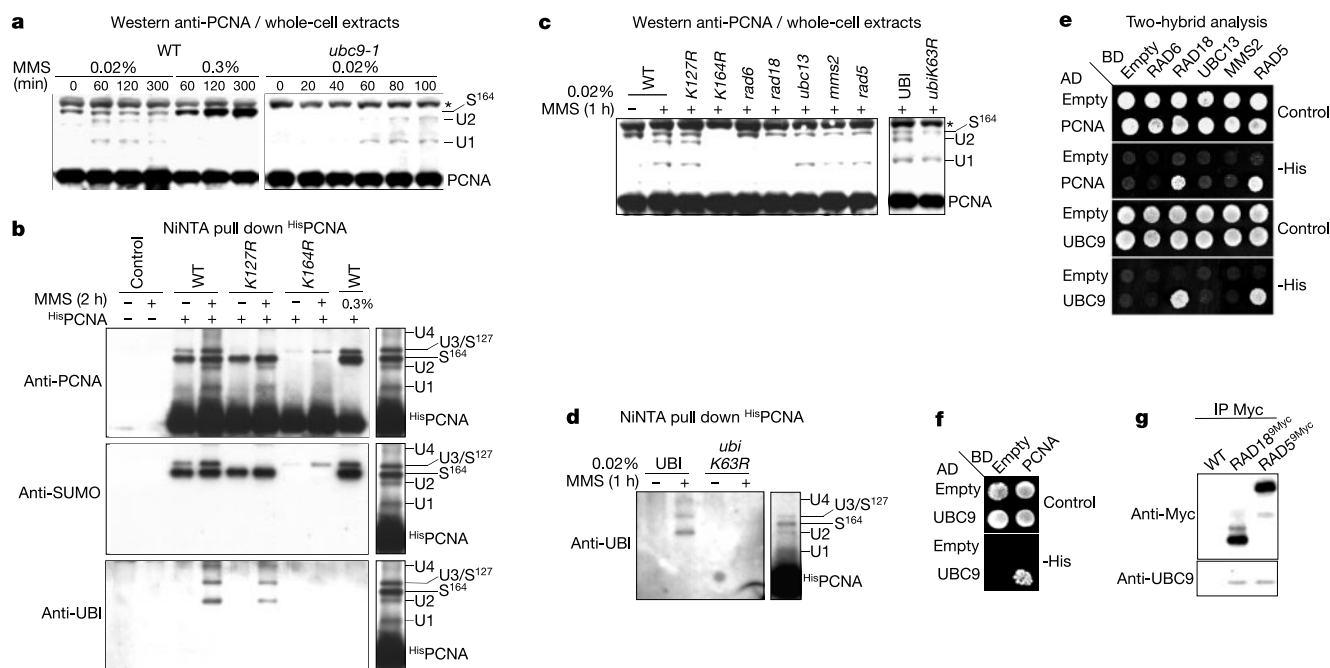
The SUMO-conjugating enzyme UBC9 usually binds substrates directly<sup>16,25</sup>. This is also apparently the case for PCNA, as two-hybrid assays revealed a UBC9–PCNA interaction (Fig. 2f). Of note, UBC9 additionally binds RAD18 and RAD5 (Fig. 2e), and we confirmed these interactions by co-immunoprecipitations (Fig. 2g). This indicates that UBC9 is affiliated with the RAD6 pathway and that enzymes for ubiquitin and SUMO conjugation may communicate in a regulatory unit. Importantly, the observed physical association, together with our finding that ubiquitination and SUMO conjugation targets the same lysine residue, suggests that the distinct modifications label PCNA for specific functions.

Functions

To investigate the significance of our finding that PCNA is a

substrate of the RAD6 DNA repair pathway, we determined PCNA mutant phenotypes. Yeast cells that express, from the original gene locus, PCNA variants lacking either the ubiquitination/SUMO-conjugation site K164 (*pol30-K164R*) or the SUMO-conjugation site K127 (*pol30-K127R*) exhibit no discernible growth defects, indicating that the modifications are not essential for replication (Fig. 3a). However, we observed that *pol30-K164R* cells were highly sensitive to ultraviolet light and MMS. This phenotype was specific for *pol30-K164R* cells, as all of the other 17 lysine mutants of PCNA were not hypersensitive (data not shown). Interestingly, when K164 and K127 were absent simultaneously (*pol30-K164R K127R*), cells were less sensitive than the *pol30-K164R* strain. Thus, we conclude that modification at K164 is crucial for DNA repair, whereas SUMO conjugation at K127 seems to inhibit the DNA repair process.

Notably, deletion mutants of *RAD6*, *RAD18* and *RAD5* are more sensitive to ultraviolet light than the *pol30-K164R* mutant (Fig. 3c; see also Supplementary Information, Fig. 2), indicating that the encoded proteins have additional substrates or functions. This is not surprising as *RAD6* has several cellular roles<sup>26</sup> and *RAD5* is related to SNF2/SWI2 helicases<sup>27</sup>. We found that *pol30-K164R* is epistatic to *mms2* (that is, *mms2* deletion does not confer additional sensitivity to *pol30-K164R*), indicating that K63-linked multi-ubiquitination of PCNA is firmly linked to *MMS2*-dependent DNA repair (Fig. 3c; see also Supplementary Information, Fig. 2). As *ubc13* and *mms2* mutants are specifically defective in error-free repair<sup>6–9</sup>, this finding also demonstrates that K63-linked multi-ubiquitination of PCNA is elementary for this branch of *RAD6*-dependent repair. Moreover, the finding that an *mms2 pol30-K164R* double mutant is more



**Figure 2** Regulation of PCNA SUMO modification and ubiquitination by DNA damage and link to the *RAD6* pathway. **a**, PCNA modifications in WT and *ubc9-1* cells after treatment with MMS (0.02% and 0.3%) at 30 °C. Anti-PCNA western blots identify SUMO-modified (S) and ubiquitinated (U) species. Asterisk, nonspecific band co-migrating with forms U3 and S<sup>127</sup> (see below). **b**, Identification of SUMO-modified and ubiquitinated forms of PCNA after His-PCNA pull-down followed by western blotting. The mono-ubiquitinated form U1 is not recognized by the monoclonal antibody (but see **c** and Supplementary Information, Fig. 1). Strains and conditions are as in Fig. 1d; band assignment is given on the right (U1, mono-ubiquitinated; U2–4, multi-ubiquitinated; S<sup>127</sup> and S<sup>164</sup>, SUMO-conjugated at K127 and K164, respectively). PCNA mutants (*K127R* and *K164R*) are used to show the lysines involved in conjugation. Forms U3 and S<sup>127</sup> migrate together in gels. Ubiquitination

is specifically induced by MMS. **c**, PCNA ubiquitination depends on the *RAD6* pathway. Ubiquitination is absent in *rad6* and *rad18* mutants. Only mono-ubiquitinated PCNA (U1) is detected in *ubc13*, *mms2* and *rad5* (left panel), as well as in cells that express mutant ubiquitin (*ubiK63R*; right panel). SUMO modification is not affected by these *RAD6* pathway mutants. **d**, Multi-ubiquitin chains on PCNA are linked via K63 of ubiquitin. Pull-downs of His-PCNA from WT (UBI) and *ubiK63R* mutant cells followed by anti-ubiquitin western blotting. **e**, **f**, Two-hybrid interactions between UBC9, PCNA and proteins from the *RAD6* pathway. Fusion with either activating domain (AD) or DNA-binding domain (BD) of GAL4 are indicated. **g**, Co-immunoprecipitation of UBC9 (*Y1lac211::GAL-UBC9*) with chromosomally expressed Myc-tagged RAD18 (*RAD18<sup>9myc</sup>*) or RAD5 (*RAD5<sup>9myc</sup>*) detected by anti-UBC9 western blotting.



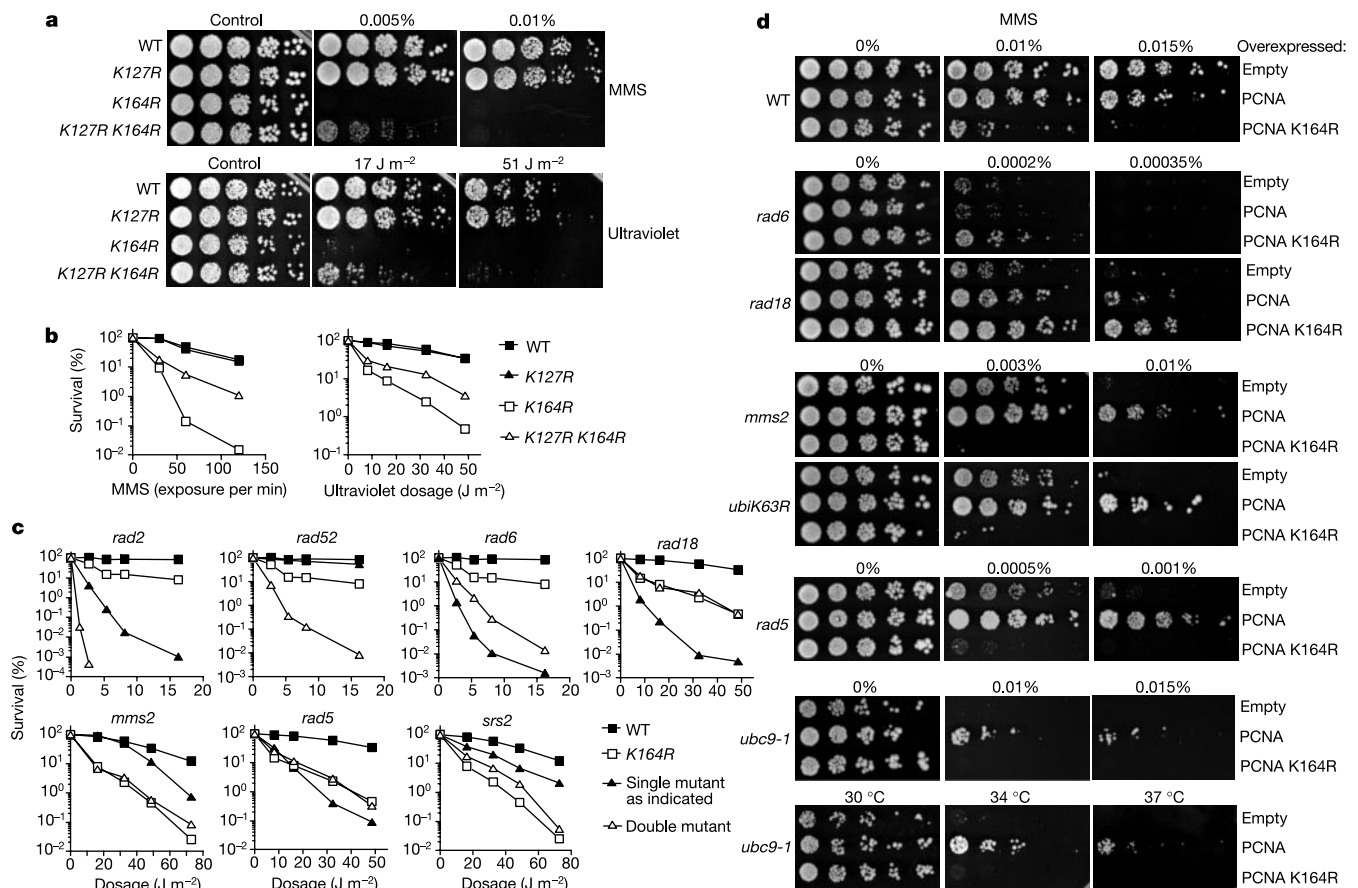
sensitive than the *mms2* single mutant suggests that mono-ubiquitination of PCNA at K164 (which can still occur in *mms2* single mutants) supports DNA damage tolerance, although less efficiently than multi-ubiquitination. We also investigated the effect of an *srs2* mutation on *pol30-K164R* mutant cells. *SRS2* encodes a DNA helicase, and loss of function of this enzyme partially suppresses the ultraviolet sensitivities of mutants defective in *RAD6*-dependent, error-free repair, by channelling repair to the *RAD52* pathway<sup>28–31</sup>. We found a detectable suppression of the sensitivity of *pol30-K164R* mutants by the *srs2* mutation (Fig. 3c), confirming that K63-linked multi-ubiquitination of PCNA is linked to the error-free branch of *RAD6*-dependent DNA repair.

Additional double mutant analysis showed that the *pol30-K164R* mutation strongly enhanced the ultraviolet sensitivities of *rad2* and *rad52* mutants (Fig. 3c), suggesting that the PCNA modifications are relevant neither for *RAD2*-dependent excision repair nor for *RAD52*-dependent double-strand break repair. Interestingly, the ultraviolet sensitivities of *rad6*, *rad18* and *rad5* mutants are partially suppressed by the *pol30-K164R* mutation. As wild-type PCNA, but not PCNA-K164R, can be modified by SUMO at K164 in *rad6*, *rad18* and *rad5* single mutants (Fig. 2c), this finding also points towards a DNA repair inhibitory effect of PCNA modification by SUMO at K164 (in addition to K127; see above) in cells deficient in these enzymes.

Importantly, overexpression of wild-type PCNA renders *mms2* and *rad5* mutants—as well as cells that express a ubiquitin variant that is unable to form K63-linked chains (*ubiK63R*)—less sensitive to MMS (Fig. 3d). We conclude from this finding that K63-linked UBC13–MMS2 and *RAD5*-dependent multi-ubiquitination of PCNA activates the role of PCNA in DNA repair, and that high levels of possibly mono-ubiquitinated PCNA can compensate for a defect in PCNA multi-ubiquitination. Notably, overexpression of *pol30-K164R* does not suppress the sensitivity of these cells but rather seems to be detrimental for repair in these mutant and wild-type cells, indicating that non-ubiquitinated PCNA does not significantly support DNA repair. Indeed, the MMS sensitivities of *rad6* and *rad18* mutants are only barely suppressed by overexpression of wild-type PCNA (which can still be SUMO-conjugated at K164) but are suppressed slightly better by mutant *pol30-K164R*. These findings confirm that ubiquitination of PCNA is elementary for post-replicative DNA repair and indicate that SUMO modification of PCNA at K164 not only prevents PCNA ubiquitination but also inhibits PCNA-dependent DNA repair.

**Human PCNA ubiquitination is linked to DNA damage**

PCNA is a highly conserved protein with residues sharing 35% identity between yeast and human orthologues. Because of this similarity we investigated whether human PCNA is also modified.



**Figure 3** Role of PCNA modifications in DNA repair. **a**, Sensitivity of cells chromosomally expressing WT and mutant PCNA to MMS and ultraviolet light. Fivefold serial dilutions of an equal number of stationary-phase cells were spotted onto plates. DNA damage was induced by either MMS or ultraviolet light. PCNA mutants lacking K127 or K164, or both lysines, were used. **b**, Quantification of survival rates (as above) determined by plating. Values are presented as the percentage of surviving cells after treatment. **c**, Epistatic analysis of the PCNA mutant lacking residue K164 (*pol30-K164R*) with mutants of DNA

repair pathways. Quantification of survival rates after ultraviolet irradiation (as in **b**). Values are from two to four independent experiments with duplicated counts. The genotype to which *pol30-K164R* was crossed is indicated above the panels. **d**, PCNA overexpression from a high-copy plasmid (WT copy was retained in the genome) differentially suppresses MMS sensitivity of *RAD6* pathway mutants. Overexpression of WT PCNA and mutant PCNA (K164R) was compared to control (empty vector). Cells were spotted as above.

We could not detect SUMO modification or ubiquitination of human PCNA in HeLa cells under normal growth conditions. However, when we applied 0.02% MMS to the culture medium, we observed the appearance of an additional PCNA-specific band (Fig. 4a). This protein was verified by western analysis and pull-down experiments to be mono-ubiquitinated PCNA. Notably, the modification site K164 of the *S. cerevisiae* protein is conserved and found at identical positions in PCNA from yeasts, plants and higher eukaryotes, including humans (Fig. 4b). We replaced K164 of human PCNA by an arginine residue and expressed His-tagged forms of mutant and wild-type PCNA in HeLa cells by transfection. We observed that wild-type PCNA, but not mutant PCNA-K164R, was modified by ubiquitination in the presence of MMS. Thus, ubiquitination of PCNA at site K164 is conserved from yeast to mammals and is linked to the DNA damage response.

**Discussion**

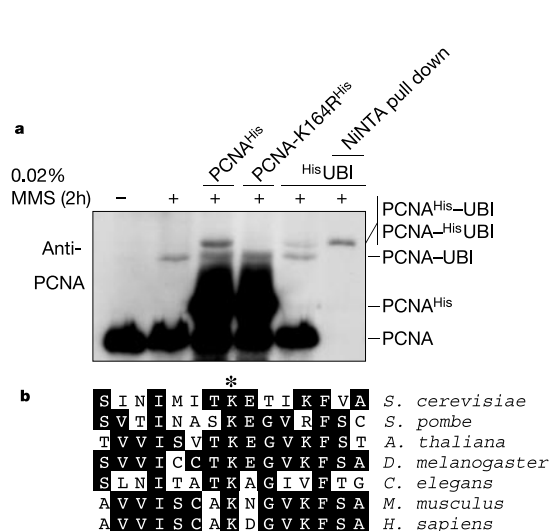
PCNA is positioned at the crossroads of several replication-linked pathways. It is involved in leading and lagging strand DNA synthesis, cell cycle arrest, replication-linked DNA silencing, mismatch repair, nucleotide- and base-excision repair, and post-replicative error-free and error-prone DNA repair<sup>3,17,18,32</sup>. PCNA directly associates with various DNA polymerases and functions as a sliding clamp, thereby stimulating accurate and processive DNA synthesis. In addition, PCNA seems to function as a platform for accessory factors of replication-linked functions. Previous studies have shown that PCNA is controlled by at least two distinct mechanisms. One important principle seems to be regulated loading/unloading of the trimeric PCNA ring on the DNA template by clamp loader (replication factor C). A second mechanism may involve PCNA inhibition through interaction with repressing molecules, the most prominent being the cell cycle checkpoint protein p21 (refs 17, 18).

We have shown that PCNA is also exquisitely modulated by covalent post-translational modifications involving ubiquitin and the ubiquitin-related protein SUMO. PCNA is a target for SUMO modification, mono-ubiquitination, and K63-linked multi-ubiquitination. We identified two target sites for modification: K164, a

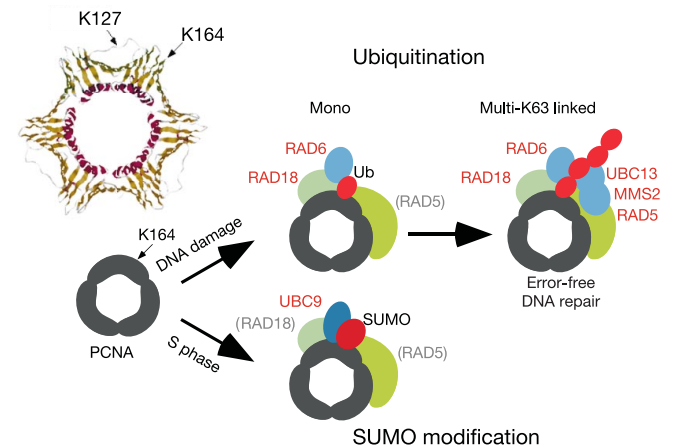
conserved modification site that is both modified by SUMO and ubiquitin, and K127, a yeast-specific site that seems to be exclusively modified by SUMO. Both residues are positioned distally from the encircled DNA on the outside rim of the trimeric PCNA ring<sup>33</sup> (Fig. 5). K164 is located in one of the protruding tips of PCNA, whereas K127 lies within a large loop that connects the two domains of a PCNA monomer. This connecting loop mediates interaction with polymerases (refs 34, 35), suggesting that SUMO conjugation at this site might interfere with polymerase binding.

SUMO modification of PCNA is activated during S phase and modifies predominantly the conserved residue K164 and to a lesser extent K127 of yeast PCNA. Importantly, our data indicate that SUMO conjugation inhibits the role of PCNA in repair and suggests a function in conjunction with normal DNA replication. Modification of PCNA by SUMO is also markedly induced by a lethal concentration of MMS (Fig. 2a), but whether this upregulation is linked to DNA repair or to polymerase stalling is currently unclear. We also noticed that modification of PCNA by SUMO is mediated by SIZ1, a SUMO ligase of the SIZ/PIAS family<sup>36</sup> (see Supplementary Information, Fig. 3). This finding demonstrates that modification of PCNA by SUMO does not support DNA repair because *siz1* mutants are not sensitive to DNA-damaging agents<sup>36</sup>. A possible clue with respect to the function of SUMO-modified PCNA comes from our finding that not only the MMS sensitivity of the *ubc9-1* mutant, but also its growth defect at high temperatures can be suppressed partially by overexpression of wild-type PCNA, but not the K164R mutant (Fig. 3d). This finding emphasizes the crucial importance of PCNA for the SUMO pathway even in the absence of DNA-damaging agents, again pointing to an important role of SUMO-modified PCNA in normal S phase.

Ubiquitination of PCNA is clearly linked to DNA damage and strictly depends on the RAD6 pathway of DNA repair. It specifically targets the conserved K164 residue of yeast and human PCNA. Moreover, we show that PCNA ubiquitination is elementary for RAD6-dependent DNA repair. Previous data have indicated a complex orchestration of RAD6-dependent functions and revealed



**Figure 4** Human PCNA is ubiquitinated at the conserved K164 residue on DNA damage. **a**, Western blot against PCNA from HeLa cells. Cells were either untransfected (two left lanes) or transfected with constructs expressing His-tagged versions of human WT PCNA (PCNA<sup>His</sup>) or K164R mutant PCNA (PCNA-K164R<sup>His</sup>). Cultures were treated with 0.02% MMS for 2 h as indicated. Anti-PCNA antibodies detect endogenous (PCNA) and introduced His-tagged PCNA (PCNA<sup>His</sup>). For the last two lanes, a construct expressing His-tagged UBI was transfected, and samples were loaded on a gel before and after NiNTA pull-down. **b**, K164 is conserved in PCNA from yeast to humans. Shown is an alignment between residues 157 and 171 of yeast PCNA. K164 is marked by an asterisk.



**Figure 5** Model for ubiquitination and SUMO modification of PCNA. The structure of yeast PCNA is derived from ref. 33 (top left). K127 and K164 modification sites are indicated. DNA damage induces mono-ubiquitination of PCNA at K164, which is catalysed by ubiquitin-activating enzyme UBA1 (not shown), RAD6 and RAD18. DNA damage induces nuclear import of UBC13 and MMS2, which are recruited to chromatin by RAD5. The enzyme assembly catalyses K63-linked multi-ubiquitination of PCNA. In the absence of DNA-damaging agents, PCNA is modified by SUMO during S phase, involving SUMO-activating enzymes UBA2/AOS1 (not shown), UBC9, and the SUMO ligase SIZ1 (not shown). UBC9 interacts directly with PCNA and, perhaps transiently, also with RAD18 and RAD5. Enzymes required for the modification reactions are labelled in red; associated proteins are grey and in parentheses. Ubiquitin- and SUMO-conjugating enzymes are in blue; ubiquitin ligases are in green.

distinct pathways for error-free and error-prone modes of repair<sup>4</sup>. These pathways may be subdivided into distinct error-free branches and an error-prone mode that uses the translesion polymerases REV1/Pol $\zeta$  (encoded by *REV3* and *REV7*). Another RAD6/RAD18-dependent translesion polymerase is Pol $\eta$  (encoded by *RAD30*)<sup>8,37–39</sup>. Our findings provide a new conceptual framework for the function of the RAD6 pathway as it suggests that the stalled replication machinery may be switched to different modes of repair through distinct PCNA modifications.

We provide strong evidence that multi-ubiquitination of PCNA at K164 is pivotal for the error-free branch of RAD6-dependent DNA repair. We also show that two ubiquitin-conjugating enzymes, RAD6 and UBC13–MMS2, and two RING-finger ubiquitin ligases, RAD18 and RAD5, are involved in PCNA ubiquitination. Importantly, our findings suggest a mechanism by which these enzymes collaborate in a sequential manner (Fig. 5). Triggered by DNA damage, RAD6 appears to initially mono-ubiquitinate PCNA at residue K164. This reaction additionally requires RAD18, which recruits RAD6 to DNA-bound PCNA. DNA damage also induces nuclear translocation of UBC13 and MMS2, which results in an association of the heterodimeric ubiquitin-conjugating enzyme with chromatin-bound RAD5 (ref. 9). Moreover, through RAD5–RAD18 interaction, UBC13–MMS2 is brought into contact with RAD6. In a second enzymatic reaction, this assembly of two ubiquitin-conjugating enzymes and two ubiquitin ligases (together with ubiquitin-activating enzyme) seems to catalyse the conjugation of additional ubiquitin molecules onto the ubiquitin moiety of mono-ubiquitinated PCNA, thereby forming K63-linked multi-ubiquitin chains. These chains, unlike K48-linked chains, do not promote proteasomal degradation, and, indeed, we found no evidence for accelerated turnover of ubiquitinated PCNA (data not shown). In contrast, our data indicate that K63-linked multi-ubiquitination activates PCNA for being engaged in error-free repair. Post-replicative, error-free repair is thought to involve a transient template switch to the undamaged sister chromatid<sup>3</sup>. An attractive speculation is, therefore, that the ubiquitin chains on PCNA may stimulate interaction of the stalled replication machinery with proteins associated with the undamaged sister duplex. Interestingly, recent studies have indicated that K63-linked multi-ubiquitination involving UBC13–MMS2 can also activate certain protein kinases<sup>40,41</sup>. Moreover, K63-linked multi-ubiquitination has a function in ribosome activity<sup>42</sup> and endocytosis<sup>43</sup>. It will be important to identify the parallels between these roles in order to understand the mechanism through which K63-linked multi-ubiquitin chains function.

Mono-ubiquitination also seems to be relevant for DNA repair (Fig. 3c). Because error-free repair requires K63-linked multi-ubiquitination<sup>7,9,44</sup>, mono-ubiquitination of PCNA is expected to mediate another, possibly error-prone, mode of repair. Perhaps mono-ubiquitinated PCNA binds specific repair factors, such as polymerases involved in translesion synthesis. Mono-ubiquitination of PCNA seems to be prevalent in human HeLa cells, yet multi-ubiquitinated forms can be detected at lower levels (G.-L.M. and S.J., unpublished data). Importantly, mammals have homologues of UBC9, SIZ1, RAD6, RAD18, UBC13, MMS2 and possibly RAD5. Given this conservation, it seems probable that the mechanisms and functions are highly conserved, and, indeed, genetic studies have confirmed that human RAD18 and MMS2 are crucial for DNA repair<sup>45,46</sup>.

This study also revealed an affiliation of the SUMO-modification system with the ubiquitin-conjugating machinery. We have demonstrated that SUMO modification and ubiquitination of PCNA are physically and functionally linked. Importantly, ubiquitination and SUMO modification target the same K164 residue of PCNA, demonstrating that the two modifications are mutually exclusive. SUMO-conjugating enzyme UBC9 not only interacts with PCNA but also with the ubiquitin ligases RAD18 and RAD5; however, this

interaction is not required for SUMO modification of PCNA (Fig. 2c), but it might be crucial for regulation. The most plausible model is that the ubiquitin/SUMO-conjugating enzymes are part of a regulatory switchboard, which directs PCNA for alternative functions. Several previous investigations have provided evidence for a link between SUMO modification and ubiquitination<sup>15</sup>. In cases where these two processes target the same lysine residue, studies suggest that SUMO might function as an antagonist for K48-linked multi-ubiquitination, thereby inhibiting proteasomal degradation of the substrate<sup>47</sup>. Our data suggest that SUMO modification can also antagonize the non-proteolytic role of ubiquitin. Importantly, SUMO modification of PCNA at K164 does not merely block ubiquitination at this site, but it seems to direct the substrate for other functions. As both SUMO modification and ubiquitination are reversible processes<sup>14,15</sup>, a sequential cycle of SUMO modification/ubiquitination for substrates can be envisioned. It seems attractive to speculate that the ubiquitin/SUMO switch discovered here might be a prevalent regulatory mechanism. □

**Methods**

**Yeast techniques and cloning**

The strains that we used (grown at 30 °C, if not stated otherwise) are isogenic to strains described in ref. 9, and have the genotypes as described in the text and figures. Yeast-tagged SUMO was expressed from the *ADH* promoter and the integrative vector *YIplac211*. His-tagged UBI was expressed from a 2 $\mu$  plasmid with *CUP1* promoter by the addition of 100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>. Yeast PCNA (*POL30*) was cloned into the 2 $\mu$ -based plasmid *YEplac195* for overexpression studies or the *YCplac22* centromeric plasmid to create point mutations. Seven His codons were placed between the promoter and open reading frame (ORF) of *POL30* by a polymerase chain reaction (PCR)-based technique to create His-tagged PCNA in *YCplac22*. The shuffle strain *pol30::kanMX4 YCplac33* PCNA was used to create strains that express variants of PCNA or His-tagged PCNA as the only source of PCNA by selection on 5-fluoro-orotic acid. For Fig. 2d we expressed His-tagged PCNA in wild-type (UBI) or *ubiK63R* strain background. PCNA lysine mutants were integrated by homologous recombination into the *POL30* locus. Chromosomally tagged strains and mutants, if not already described<sup>9,48</sup>, were constructed by a PCR-based strategy<sup>49</sup>. The *ubc9-1* mutant strain (Y0233) contains an additional *bar1* knockout. For two-hybrid analysis, complete ORFs of *POL30* and *UBC9* were cloned into pGAD vectors. Assay and other RAD6 pathway clones were described previously<sup>9</sup>. Details of strains and plasmids will be provided on request.

**Protein techniques and antibodies**

Protein conjugates with His-tagged SUMO from 6 litres of cells with an absorbance at 600 nm of 1 (*A*<sub>600–1</sub>) of the *ulp1ts* strain<sup>50</sup> (grown at 23 °C) were purified by NiNTA chromatography under denaturing conditions, diluted 20-fold with buffer as described<sup>20</sup>, and immunopurified by yeast SUMO (SMT3)-specific antibodies or nonspecific immunoglobulin- $\gamma$  (IgG) antibodies crosslinked to magnetic protein A beads (Dynal). Bound proteins were eluted with 1% SDS. Coomassie-stained bands were excised and analysed by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry (Protana). Four peptides of the 45K band matched yeast PCNA (34% coverage). An antibody against yeast PCNA was raised against bacterially expressed His-tagged PCNA from pET28c (Novagen) and affinity purified against PCNA–glutathione S-transferase (GST) expressed from pGEX4 (Amersham Pharmacia). Antibodies against human PCNA (PC10, Abcam), PGK1 (Molecular Probes), ubiquitin, Myc-epitope, UBC9 and CLB2 (all Santa Cruz) were used. Yeast protein extracts were prepared as described<sup>49</sup>. Analytical denaturing NiNTA chromatography/pull-down was done from 0.2 litre of logarithmic cells (*A*<sub>600–1</sub>) as described<sup>20</sup>, but at a small scale. For immunoprecipitation, yeast cells were grown to late logarithmic phase and lysed with glass beads in 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, and protease inhibitors. Cell extracts were incubated with detergent (0.2% Triton X-100, 0.1% SDS) and precleared by centrifugation. Proteins were precipitated with Myc-antibody and protein A Sepharose (Amersham Pharmacia). After extensive washing, proteins were eluted with sample buffer containing 8 M urea.

**Sensitivity and overexpression assays**

For qualitative analysis of sensitivity to MMS or ultraviolet light, stationary-phase cells were either spotted on YPD plates containing MMS or irradiated with ultraviolet light. For quantification, fixed amounts of logarithmic cells were either plated onto YPD plates after incubation with 0.1% MMS for the indicated time, or irradiated with different dosages of ultraviolet light after plating. Colony-forming units were counted after 2–3 days of growth in the dark. Values are averages from two to four experiments. Overexpression analysis was done by spotting serial dilutions onto SC-URA plates containing indicated MMS concentrations.

**Cell cycle analysis**

For cell-cycle synchronization, logarithmic cells grown at 23 °C were arrested in G1 by 10  $\mu$ M  $\alpha$ -factor for 2 h, washed, and resuspended in fresh medium. Aliquots were taken at 20-min intervals and analysed by western blotting. Additionally, 200 cells for each time



point were analysed by microscopic inspection for bud formation.

**Mammalian cell techniques**

Vector for His-tagged PCNA was *pcDNA3.1/GeneStorm* from Invitrogen, and *pMT107* expressing His-tagged UBI was described previously<sup>51</sup>. Cells were transfected with Lipofectamine plus reagent (Invitrogen). NiNTA pull-downs were performed as described<sup>52</sup> but cells were boiled in lysis buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% SDS) and lysates were diluted tenfold in PBS before pull-down.

Received 20 May; accepted 10 July 2002; doi:10.1038/nature00991.

1. Prakash, S., Sung, P. & Prakash, L. DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* **27**, 33–70 (1993).
2. Friedberg, E. C., Walker, G. C. & Siede, W. *DNA Repair and Mutagenesis* (American Society for Microbiology, Washington, 1995).
3. Hoeijmakers, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**, 366–374 (2001).
4. Ulrich, H. D. Degradation or maintenance: actions of the ubiquitin system on eukaryotic chromatin. *Eukaryotic Cell* **1**, 1–10 (2002).
5. Jentsch, S., McGrath, J. P. & Varshavsky, A. The yeast DNA repair gene *RAD6* encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature* **329**, 131–134 (1987).
6. Broomfield, S., Chow, B. L. & Xiao, W. *MMS2*, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 5678–5683 (1998).
7. Hofmann, R. M. & Pickart, C. M. Noncanonical *MMS2*-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* **96**, 645–653 (1999).
8. Xiao, W. *et al.* Genetic interactions between error-prone and error-free postreplication repair pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* **435**, 1–11 (1999).
9. Ulrich, H. D. & Jentsch, S. Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *EMBO J.* **19**, 3388–3397 (2000).
10. Moraes, T. F. *et al.* Crystal structure of the human ubiquitin conjugating enzyme complex, hMms2-hUbc13. *Nature Struct. Biol.* **8**, 669–673 (2001).
11. VanDemark, A. P., Hofmann, R. M., Tsui, C., Pickart, C. M. & Wolberger, C. Molecular insights into polyubiquitin chain assembly: crystal structure of the Mms2/Ubc13 heterodimer. *Cell* **105**, 711–720 (2001).
12. Bailly, V., Lamb, J., Sung, P., Prakash, S. & Prakash, L. Specific complex formation between yeast *RAD6* and *RAD18* proteins: a potential mechanism for targeting *RAD6* ubiquitin-conjugating activity to DNA damage sites. *Genes Dev.* **8**, 811–820 (1994).
13. Pickart, C. M. Ubiquitin in chains. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 544–548 (2000).
14. Melchior, F. SUMO-nonclassical ubiquitin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 591–626 (2000).
15. Müller, S., Hoegge, C., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 202–210 (2001).
16. Hochstrasser, M. New structural clues to substrate specificity in the “ubiquitin system”. *Mol. Cell* **9**, 453–454 (2002).
17. Tsurimoto, T. PCNA binding proteins. *Frontiers Biosci.* **4**, 849–858 (1999).
18. Warbrick, E. The puzzle of PCNA's many partners. *BioEssays* **22**, 997–1006 (2000).
19. Bauer, G. A. & Burgers, P. M. Molecular cloning, structure and expression of the yeast proliferating cell nuclear antigen gene. *Nucleic Acids Res.* **18**, 261–265 (1990).
20. Johnson, E. S. & Blobel, G. Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J. Cell Biol.* **147**, 981–994 (1999).
21. Torres-Ramos, C. A., Yoder, B. L., Burgers, P. M., Prakash, S. & Prakash, L. Requirement of proliferating cell nuclear antigen in *RAD6*-dependent postreplicational DNA repair. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 9676–9681 (1996).
22. Spence, J., Sadis, S., Haas, A. L. & Finley, D. A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol. Cell Biol.* **15**, 1265–1273 (1995).
23. Ayyagari, R., Impellizzeri, K. J., Yoder, B. L., Gary, S. L. & Burgers, P. M. A mutational analysis of the yeast proliferating cell nuclear antigen indicates distinct roles in DNA replication and DNA repair. *Mol. Cell Biol.* **15**, 4420–4429 (1995).
24. Joazeiro, C. A. & Weissman, A. M. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* **102**, 549–552 (2000).
25. Bernier-Villamor, V., Sampson, D. A., Matunis, M. J. & Lima, C. D. Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* **108**, 345–356 (2002).
26. Prakash, L. The *RAD6* gene and protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. NY Acad. Sci.* **726**, 267–273 (1994).
27. Johnson, R. E. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae RAD5*-encoded DNA repair protein contains DNA helicase and zinc-binding sequence motifs and affects the stability of simple repetitive sequences in the genome. *Mol. Cell Biol.* **12**, 3807–3818 (1992).
28. Lawrence, C. W. & Christensen, R. B. Metabolic suppressors of trimethoprim and ultraviolet light sensitivities of *Saccharomyces cerevisiae rad6* mutants. *J. Bacteriol.* **139**, 866–887 (1979).
29. Schiestl, R. H., Prakash, S. & Prakash, L. The *SRS2* suppressor of *rad6* mutations of *Saccharomyces*

- cerevisiae* acts by channeling DNA lesions into the *RAD52* DNA repair pathway. *Genetics* **124**, 817–831 (1990).
30. Ulrich, H. D. The *srs2* suppressor of UV sensitivity acts specifically on the *RAD5*- and *MMS2*-dependent branch of the *RAD6* pathway. *Nucleic Acids Res.* **29**, 3487–3494 (2001).
31. Broomfield, S. & Xiao, W. Suppression of genetic defects within the *RAD6* pathway by *srs2* is specific for error-free post-replication repair but not for damage-induced mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* **30**, 732–739 (2002).
32. Zhang, Z., Shibahara, K. & Stillman, B. PCNA connects DNA replication to epigenetic inheritance in yeast. *Nature* **408**, 221–225 (2000).
33. Krishna, T. S. *et al.* Crystallization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **241**, 265–268 (1994).
34. Amin, N. S. & Holm, C. *In vivo* analysis reveals that the interdomain region of the yeast proliferating cell nuclear antigen is important for DNA replication and DNA repair. *Genetics* **144**, 479–493 (1996).
35. Eissenberg, J. C., Ayyagari, R., Gomes, X. V. & Burgers, P. M. Mutations in yeast proliferating cell nuclear antigen define distinct sites for interaction with DNA polymerase  $\delta$  and DNA polymerase  $\epsilon$ . *Mol. Cell Biol.* **17**, 6367–6378 (1997).
36. Johnson, E. S. & Gupta, A. A. An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* **106**, 735–744 (2001).
37. Cejka, P., Vondrej, V. & Storchova, Z. Dissection of the functions of the *Saccharomyces cerevisiae RAD6* postreplicative repair group in mutagenesis and UV sensitivity. *Genetics* **159**, 953–963 (2001).
38. Xiao, W., Chow, B. L., Broomfield, S. & Hanna, M. The *Saccharomyces cerevisiae RAD6* group is composed of an error-prone and two error-free postreplication repair pathways. *Genetics* **155**, 1633–1641 (2000).
39. Torres-Ramos, C. A., Prakash, S. & Prakash, L. Requirement of *RAD5* and *MMS2* for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **22**, 2419–2426 (2002).
40. Deng, L. *et al.* Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**, 351–361 (2000).
41. Wang, C. *et al.* TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**, 346–351 (2001).
42. Spence, J. *et al.* Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell* **102**, 67–76 (2000).
43. Galan, J. M. & Haguenaer-Tsapis, R. Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J.* **16**, 5847–5854 (1997).
44. Brusky, J., Zhu, Y. & Xiao, W. *UBC13*, a DNA-damage-inducible gene, is a member of the error-free postreplication repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **37**, 168–174 (2000).
45. Tateishi, S., Sakuraba, Y., Masuyama, S., Inoue, H. & Yamaizumi, M. Dysfunction of human *Rad18* results in defective postreplication repair and hypersensitivity to multiple mutagens. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 7927–7932 (2000).
46. Li, Z., Xiao, W., McCormick, J. J. & Maher, V. M. Identification of a protein essential for a major pathway used by human cells to avoid UV-induced DNA damage. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 4459–4464 (2002).
47. Desterro, J. M., Rodriguez, M. S. & Hay, R. T. SUMO-1 modification of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits NF- $\kappa$ B activation. *Mol. Cell* **2**, 233–239 (1998).
48. Seufert, W., Fletcher, B. & Jentsch, S. Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* **373**, 78–81 (1995).
49. Knop, M. *et al.* Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**, 963–972 (1999).
50. Li, S. J. & Hochstrasser, M. A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* **398**, 246–251 (1999).
51. Treier, M., Staszewski, L. M. & Bohmann, D. Ubiquitin-dependent c-Jun degradation *in vivo* is mediated by the  $\delta$  domain. *Cell* **78**, 787–798 (1994).
52. Müller, S. *et al.* c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.* **275**, 13321–13329 (2000).

Supplementary Information accompanies the paper on Nature's website (<http://www.nature.com/nature>).

**Acknowledgements**

We thank U. Cramer for technical assistance and S. Müller and M. Knop for experimental advice and discussions. We also thank P. Burgers, D. Finley, M. Hochstrasser, M. Knop, S. Müller and B. Stillman for plasmids and strains. S.J. is supported by the Max Planck Society, Deutsche Forschungsgemeinschaft and Fonds der chemischen Industrie.

**Competing interests statement**

The authors declare that they have no competing financial interests.

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.J. (e-mail: [jentsch@biochem.mpg.de](mailto:jentsch@biochem.mpg.de)).