

**Regulation der Genomstabilität  
durch SUMO- und Ubiquitin-  
Modifikation von PCNA**

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

vorgelegt von  
Diplom-Biochemiker  
Boris Pfander

September 2005

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, den 12. 09. 2005

Promotionsgesuch eingereicht:	12.09.2005
Tag der mündlichen Prüfung:	08.11.2005
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Stefan Jentsch
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Peter B. Becker

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen März 2001 und September 2005 unter Anleitung von Prof. Dr. Stefan Jentsch am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Wesentliche Teile dieser 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* 419, 135-141.

Pfander, B., Moldovan, G.-L., Sacher, M., Hoege, C., Jentsch, S. (2005). SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* 436, 428-433.

# Inhaltsverzeichnis

<b>I ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II EINLEITUNG .....</b>	<b>2</b>
<b>II.1 Die Proteine der Ubiquitin-Familie.....</b>	<b>2</b>
II.1.1 Das Ubiquitin-Konjugations-System .....	2
II.1.2 Proteasom-abhängige Funktionen von Ubiquitin.....	5
II.1.3 Proteasom-unabhängige Funktionen von Ubiquitin.....	5
II.1.4 Das Konjugations-System von SUMO .....	7
II.1.5 Funktion und Substrate von SUMO .....	9
<b>II.2 DNA-Reparatur .....</b>	<b>11</b>
II.2.1 Postreplikativer Bypass von DNA-Schäden – der <i>RAD6-pathway</i> .....	13
II.2.2 PCNA wird durch den <i>RAD6-pathway</i> ubiquitiniert .....	16
II.2.3 PCNA wird mit SUMO modifiziert .....	18
<b>II.3. Zielsetzung .....</b>	<b>20</b>
<b>III ERGEBNISSE.....</b>	<b>21</b>
<b>III.1 Regulation der Ubiquitin-Modifikation von PCNA durch den <i>RAD6-pathway</i>.....</b>	<b>21</b>
III.1.1 PCNA ist das Ubiquitinierungs-Substrat des <i>RAD6-pathways</i> .....	21
III.1.2 PCNA wird S-Phase spezifisch ubiquitiniert.....	23
III.1.3 <i>RAD18</i> ist der entscheidende Regulator der PCNA-Ubiquitinierung.....	24
<b>III.2 Lokalisierung der PCNA-Modifikationen .....</b>	<b>26</b>
<b>III.3 Regulation der Transläsions-Replikation durch mono-ubiquitiniertes PCNA ....</b>	<b>28</b>
III.3.1 <i>pol30-46</i> ist eine Mutation mit spezifischem Einfluss auf die Multi-Ubiquitinierung.....	29
III.3.2 Die durch DNA-Schäden verursachte Mutagenese ist abhängig von ubiquitiniertem PCNA .....	30
III.3.3 Die PCNA-Monoubiquitinierung ist an der Entstehung von spontanen Mutationen beteiligt .....	31
<b>III.4 Überexpressions-Suppressoren von <i>pol30-K164R</i>.....</b>	<b>33</b>
III.4.1 Dosis-Suppressions- <i>screen</i> .....	33
III.4.2 Analyse der Suppressoren in Bezug auf ihre Bindung an PCNA und modifizierte Formen von PCNA.....	36
III.4.3 Dosis-Suppression von Mutanten des <i>RAD6-pathways</i> .....	37
<b>III.5 Die PCNA SUMOylierung inhibiert Rekombination an der Replikationsgabel durch die Rekrutierung von <i>Srs2</i> .....</b>	<b>39</b>
III.5.1 Die PCNA SUMOylierung inhibiert homologe Rekombination .....	40
III.5.2 SUMOyliertes PCNA kooperiert mit <i>Srs2</i> durch direkte Interaktion.....	45
III.5.3 <i>Srs2</i> besitzt eine C-terminale Interaktionsdomäne für SUMOyliertes PCNA.....	51
III.5.4 SUMO modifiziertes PCNA und <i>Srs2</i> inhibieren gemeinsam die Rekombination von Schwester-Chromatiden.....	55

## **IV DISKUSSION ..... 60**

### **IV.1 Die Ubiquitin-Modifikation von PCNA steuert den *RAD6*-abhängigen Bypass von DNA-Läsionen ..... 60**

IV.1.1 Die Transläsions-Replikation hängt von der Mono-Ubiquitinierung von PCNA ab ..... 60

IV.1.2 Ein fehlerfreier Bypass von DNA-Läsionen wird durch Multi-Ubiquitinierung von PCNA reguliert..... 63

IV.1.3 Regulation der Ubiquitin-Modifikation von PCNA und des replikativen Bypasses von DNA-Läsionen ..... 66

### **IV.2 PCNA-SUMOylierung inhibiert die Rekombination an der Replikationsgabel.... 68**

IV.2.1 *RAD6*- und *RAD52*-abhängige Mechanismen bewirken den Bypass von DNA-Läsionen während der Replikation ..... 69

IV.2.2 SUMO-modifiziertes PCNA rekrutiert Srs2 zur Replikationsgabel ..... 70

IV.2.3 Spezifische Vermittlung von Protein-Protein-Wechselwirkungen – die generelle Funktion von SUMO? ..... 73

## **V MATERIAL UND METHODEN..... 75**

### **V.1 Computeranalysen..... 75**

### **V.2 Mikrobiologische und Genetische Techniken..... 75**

V.2.1 Arbeitstechniken für *E. coli* ..... 75

V.2.2 Arbeitstechniken für *S. cerevisiae* ..... 77

### **V.3 Molekularbiologische Techniken..... 86**

V.3.1 Isolierung von DNA ..... 86

V.3.2 Klonierung von Plasmidkonstrukten ..... 88

V.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ..... 89

### **V.4 Proteinbiochemische Techniken ..... 90**

V.4.1 Gel- und Western-blot Techniken ..... 90

V.4.2 Herstellung von Zellextrakten ..... 92

V.4.3. Aufreinigungen und Bindungsexperimente ..... 92

## **VI LITERATURVERZEICHNIS ..... 96**

### **Abkürzungsverzeichnis**

### **Danksagung**

### **Lebenslauf**

## I Zusammenfassung

Eine akkurate DNA-Replikation ist notwendig, um die Stabilität der genetischen Information zu gewährleisten. Dieser Prozess wird durch DNA-Läsionen erschwert, die durch eine Vielzahl von Ursachen entstehen und häufig nicht vor dem Erreichen der S-Phase repariert werden können. Nicht nur kann durch Läsionen geschädigte DNA häufig nicht dupliziert werden, angehaltene Replikationsgabeln können auch zusammenbrechen und so zu DNA-Strangbrüchen führen.

Die Funktion des *RAD6-pathways* liegt darin, die Umgehung (Bypass) von DNA-Läsionen während der Replikation zu ermöglichen, wodurch eine Toleranz gegenüber Schädigungen der DNA erreicht wird. In dieser Arbeit wurde die Regulation des *RAD6*-vermittelten Bypass von DNA-Läsionen durch posttranslationale Ubiquitin- und SUMO-Modifikationen des Replikationsfaktors PCNA untersucht.

PCNA bildet einen trimeren Ring um die DNA und verstärkt durch Bindung der replikativen Polymerase deren Assoziation zur DNA und somit die Prozessivität der Replikation. Als DNA gebundener Faktor des Replikationskomplexes ohne katalytische Aktivität ist PCNA ideal geeignet, um durch seine Modifikation Replikations-assoziierte Prozesse zu regulieren.

Die Ubiquitinierung von PCNA durch Enzyme des *RAD6-pathways* erfolgt als spezifische Antwort auf DNA-Läsionen während der Replikation und ermöglicht deren Bypass. Dabei bewirken unterschiedliche Ubiquitin-Modifikationen verschiedene Arten des Bypass. Die Mono-Ubiquitin-Modifikation führt zum Einsatz von speziellen Transläsions-Polymerasen, die eine größere Toleranz für geschädigte DNA haben, aber auch für die Entstehung von Mutationen verantwortlich sind. Einen mechanistisch anderen Bypass von DNA-Schäden bewirkt die Modifikation von PCNA mit einer Lysin K63-verknüpften Multi-Ubiquitinkette. Für diesen wird wahrscheinlich der neuereplizierte, unbeschädigte Schwester-Strang als Vorlage benutzt.

Unabhängig von Schädigungen der DNA wird PCNA während der S-Phase zusätzlich mit dem ubiquitin-ähnlichen Protein SUMO modifiziert. Dies führt zu einer Interaktion mit der Helikase Srs2, die als Antagonist zu dem zentralen Rekombinationsprotein Rad51 wirkt. Dadurch wird spezifisch die homologe Rekombination zwischen Schwesterchromatiden an der Rekombinationsgabel inhibiert, nicht jedoch andere Rekombinationsereignisse, wie. z.B. Rekombination zwischen homologen Chromosomen. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass spezifisch die Replikationsgabel durch PCNA-SUMO-Srs2 geschützt wird, um schädliche Rekombination oder Rekombinationsstrukturen zu vermeiden, die mit Replikations-assoziierten Prozessen interferieren.

Ubiquitin- und SUMO-Modifikation regulieren demnach unabhängige Prozesse. Interessanterweise haben diese aber eine verwandte Funktion im Bypass von DNA-Läsionen während der Replikation. Die Inhibition der Schwesterchromatid-Rekombination durch PCNA-SUMO-Srs2 lenkt den Bypass von DNA-Läsionen in einen durch PCNA-Ubiquitinierung gesteuerten Mechanismus.

## II Einleitung

### II.1 Die Proteine der Ubiquitin-Familie

Posttranslationale, kovalente Modifikationen bieten eine schnelle, reversible und energetisch günstige Möglichkeit, die Aktivität von Proteinen zu regulieren. Entsprechend sind Modifikationen wie Phosphorylierung, Glycosylierung, Acetylierung, Methylierung, Lipidierung oder die Modifikation mit Proteinen der Ubiquitinfamilie Bestandteil vieler zellulärer Prozesse.

Bei Ubiquitin-ähnlichen Modifikatoren (*ubiquitin-like*, UBL) handelt es sich um kleine Proteine, die trotz teilweise geringer Sequenzhomologie eine sehr ähnliche, globuläre Struktur (*ubiquitin fold*) aufweisen. Ubiquitin und die meisten UBLs sind innerhalb aller eukaryontischen Organismen konserviert. Sie werden mit Hilfe einer komplexen, zwischen den einzelnen UBLs konservierten, enzymatischen Konjugations-Maschinerie an Substrat-Proteine angeheftet. Hierbei bildet der C-Terminus des UBL eine Iso-Peptid-Bindung mit einem Lysin des Substrats.

Die klassische Funktion von Ubiquitin besteht in der Vermittlung der Degradation des Substrats durch das Proteasom (s. II.1.2). Allerdings bewirken andere Formen der Ubiquitin-Modifikation keinen Abbau, sie vermitteln vielmehr Protein-Protein-Wechselwirkungen (s. II.1.3). Gleiches gilt für die Konjugation von UBLs, durch die ebenfalls Wechselwirkungen des Substrats reguliert werden. Das UBL Rub1 (Nedd8)<sup>1</sup> zeigt starke Ähnlichkeit zu Ubiquitin und steht auch funktionell mit diesem in Verbindung, da es eine Gruppe von Ubiquitin-Ligasen reguliert. Smt3 (SUMO) wird wie Ubiquitin mit einer großen Zahl von Substraten konjugiert und ist funktionell entsprechend vielfältig (s. II.1.5). Atg12 und Atg8, das mit Phosphatidylethanolamin konjugiert wird, haben ihre Funktion in der Regulation der Autophagie. ISG15, FAT10, Urm1 und MNSF sind Ubiquitin-ähnliche Proteine, deren Funktion bislang kaum erforscht ist (Jentsch und Pyrowolakis, 2000; Schwartz und Hochstrasser, 2003).

#### II.1.1 Das Ubiquitin-Konjugations-System

Ubiquitin ist ein in allen eukaryontischen Zellen hochkonserviertes Protein mit einer Größe von 76 Aminosäuren. Die Konjugation von Ubiquitin wird

---

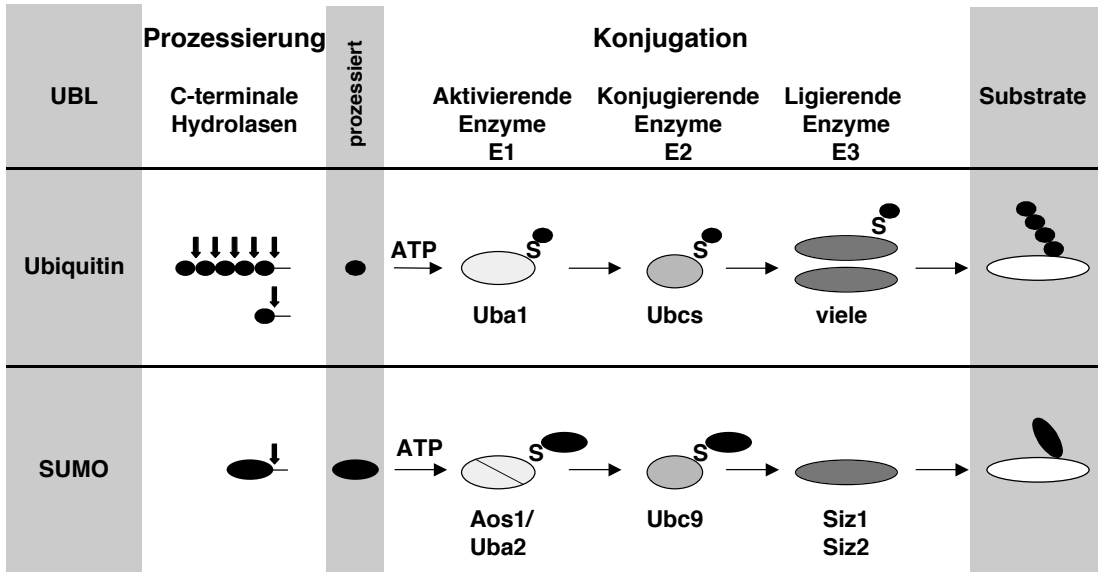
<sup>1</sup> Namen von Genen oder Proteinen beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf *Saccharomyces cerevisiae*.

durch eine Enzymkaskade bewerkstelligt, die mit jeder Ebene durch eine größere Anzahl von beteiligten Faktoren an Spezifität gewinnt (Pickart, 2001). In *Saccharomyces cerevisiae* existiert ein ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1, Uba1), welches essentiell und an allen Ubiquitinierungsprozessen beteiligt ist. Der Familie der ubiquitin-konjugierenden Enzyme (E2, Ubc's) gehören elf Proteine an, von denen nur Cdc34 lebensnotwendig ist. Die E2-Enzyme weisen einen gewissen Grad an Spezifität für bestimmte zelluläre Prozesse auf, entscheidend für die Substratspezifität sind jedoch die Ubiquitin-Ligasen (E3), welche direkt mit dem Substrat wechselwirken und somit ein Ubiquitinierungs-Signal, d.h. ein Sequenzmotif oder eine Modifikation, erkennen können. Entsprechend der Vielfalt an Substraten existieren zahlreiche Ubiquitin-Ligasen. Ein wiederholtes Durchlaufen der Ubiquitinierungs-Reaktion und Konjugation mit dem bereits angehängten Ubiquitinrest führt zur Bildung einer Ubiquitinkette (Multiubiquitinierung). Dieser Prozess wird teilweise von speziellen Ubiquitin-Ligasen (E4) unterstützt.

Um Ubiquitin für die Konjugation zu aktivieren, ist Energie in Form von ATP notwendig. Diese wird zur Bildung eines Ubiquitinadenylats benutzt, eine Reaktion, die durch das E1-Enzym katalysiert wird. Hierauf folgt der Transfer des Ubiquitins auf einen konservierten Cysteinrest im aktiven Zentrum des E1. Die Ausbildung eines solchen Thioesters erfolgt unter Abspaltung von AMP. In einer Transesterifizierungsreaktion wird Ubiquitin dann auf ein E2-Enzym übertragen. Erneut wird ein Thioester mit einem Cystein gebildet. Dieses bildet das katalytische Zentrum der UBC-Domäne (*ubiquitin conjugating enzyme*), welche charakteristisch für die Familie der ubiquitin-konjugierenden Enzyme ist. Von hier wird das Ubiquitin entweder im Falle von HECT (*homologous to E6-AP C-terminus*) Ubiquitin-Ligasen erst auf einen Cysteinrest des E3-Enzyms und dann auf das Substrat übertragen oder unter Mitwirkung einer RING-finger-Ubiquitin-Ligase direkt mit dem Substrat konjugiert.

Häufig wird eine spezifische Sequenz (*degron*) des Substrats durch die Ubiquitin-Ligase erkannt, z.B. die *destruction box* von Cyclinen. Ebenso ist eine Regulation der Ubiquitinierung durch andere Signaltransduktionswege und damit verbundene posttranslationalen Modifikationen möglich. Beispiele hierfür sind phosphorylierte PEST-Sequenzen oder die Hydroxyprolin Modifikation von hsHIF1 $\alpha$ . Um ihre Funktion, die Rekrutierung des Substrats zur Konjugationsmaschinerie, zu erfüllen, haben sich teilweise multimere Ligase-Komplexe wie der APC/C (*anaphase-promoting complex*) oder der SCF-Komplex (Skp1-Cullin-F-box) entwickelt. Diese bestehen aus Substrat-bindenden und strukturellen Untereinheiten sowie aus RING-Finger Proteinen (Laney und Hochstrasser, 1999; Pickart, 2001).





**Abb. 1: Übersicht der Konjugations-Systeme von Ubiquitin und SUMO**

Für die spezifische Konjugation von Ubiquitin und SUMO ist eine konservierte Enzymkaskade aus aktivierenden, konjugierenden und ligierenden Enzymen notwendig. Enzyme, die mit einem „S“ gekennzeichnet sind, bilden mit dem UBL einen Thioester. Vor der Konjugation muss das UBL-Vorläufer-Protein durch proteolytische Prozessierung aktiviert werden.

Bei der Ubiquitin-Modifikation wird das C-terminale Glycin von Ubiquitin mit der ε–Aminogruppe eines Lysins des Substrats zu einer Isopeptidbindung verknüpft. Ubiquitin kann dabei nicht nur mit Lysinen des Substrats verknüpft werden, sondern auch mit internen Lysinen eines bereits konjugierten Ubiquitins, so dass sich eine Ubiquitinkette bildet. Abhängig davon, welches der sieben Lysine in Ubiquitin verwendet wird, entstehen verschiedene Ketten, welche durch spezifische Bindeproteine erkannt werden und so unterschiedliche Funktionen vermitteln. Am häufigsten sind K48-verknüpfte Ketten, die zum proteasomalen Abbau des Substrats führen, sowie K63-verknüpfte Ketten, die unabhängig vom Proteasom wirken (Pickart und Fushman, 2004).

Ubiquitinierung ist ein reversibler Prozess. Die Rückreaktion wird durch deubiquitinierende Enzyme (*deubiquitinating enzyme*, DUB) katalysiert (Amerik und Hochstrasser, 2004). Dies schafft weitere Möglichkeiten zur Regulation. Durch die Assoziation von DUBs mit dem Proteasom wird außerdem gewährleistet, dass Ubiquitin vor der Hydrolyse des Substrats entfernt und so vor der Degradation geschützt wird. Eine weitere Aufgabe von DUBs liegt in der Freilegung des für die Konjugation notwendigen Doppel-Glycin-Motivs in der hydrolytischen Spaltung von Ubiquitin-Vorläufern, die als

Proteinfusionen von Ubiquitin mit sich selbst oder ribosomalen Proteinen synthetisiert werden.

### *II.1.2 Proteasom-abhängige Funktionen von Ubiquitin*

Die Markierung zum proteasomalen Abbau des Substrats stellt die bekannteste Funktion von Ubiquitin dar. Das 26S-Proteasom ist ein in Eukaryonten hochkonservierter, multikatalytischer Protease-Komplex. Strukturell besteht dieser aus der katalytischen Untereinheit (20S), die durch eine tonnenförmige Struktur die Proteolyse von der Umgebung isoliert, und einer oder zwei regulatorischen (19S) Untereinheiten, welche die Entfaltung des Substrats und dessen Eintritt in den katalytischen Kern regulieren (Bochtler et al., 1999; Voges et al., 1999). Die Funktion des Proteasoms liegt zum einen im Abbau von nicht funktionellen, falsch gefalteten Proteinen. Zum anderen werden Proteine gezielt durch den proteasomalen Abbau reguliert z.B. nach Änderung der Umweltbedingungen oder während des Zellzyklus.

Als Signal für den Abbau des Substrats dienen Ubiquitin-Ketten, welche über das interne Lysin K48 oder K29 verbunden sind. Zur Erkennung dieser Ketten existieren Rezeptoren oder *escort*-Faktoren, welche die Prozesse der Ubiquitinierung und des Abbaus durch das Proteasom verbinden. Während Rpt5 und Rpn10 Bestandteile der regulatorischen Untereinheit des Proteasoms sind, existieren mit Dsk2 und Rad23 auch freie Rezeptoren, die über ihre UBL-Domäne transient mit dem Proteasom interagieren können (Madura, 2004). Die unmittelbare Funktion der Ubiquitin-Modifikation im proteasomalen Abbau ist die Vermittlung einer spezifischen Protein-Protein-Interaktion von Substrat und Rezeptor und somit ähnlich der Funktion von Ubiquitin oder auch SUMO in proteasom-unabhängigen Prozessen.

### *II.1.3 Proteasom-unabhängige Funktionen von Ubiquitin*

Die Modifikation von Proteinen mit nur einem Ubiquitin (Mono-Ubiquitinierung) oder einer über Lysin K63 verknüpften Multi-Ubiquitinkette führt nicht zum proteasomalen Abbau. Allerdings scheint der prinzipielle Wirkmechanismus, die Vermittlung von Interaktionen mit anderen Proteinen, ähnlich dem von K48-verknüpften Ubiquitinketten zu sein.

Die Endozytose und der intrazelluläre Vesikeltransport sind Prozesse, welche durch Ubiquitinierung reguliert werden. In *S. cerevisiae* dient Ubiquitin als Signal für die Internalisierung von Transmembranproteinen an der Plasmamembran (Haglund et al., 2003; Hicke und Dunn, 2003; Dupre et al., 2004). Hier wurden sowohl Monoubiquitinierung als auch kurze K63-

verknüpfte Ubiquitinketten beobachtet. Diese Modifikation rekrutiert zytoplasmatische Endozytose-Proteine der Epsin- oder Eps15-Familie, welche durch Ubiquitin bindende Domänen wie UIM (*ubiquitin interacting motif*) und UBA (*ubiquitin associated domain*) charakterisiert sind. In Säugetierzellen existieren zusätzliche Internalisierungssignale, wie di-Leucin- oder Tyrosin-Motive. Zwar werden einige Plasmamembranproteine ebenfalls ubiquitiniert, dies ist aber nicht immer für ihre endozytotische Aufnahme notwendig.

Der Weitertransport einiger, endozytotisch aufgenommener Transmembranproteine zu Lysomen bzw. zur Vakuole (*S. cerevisiae*) wird ebenfalls durch Ubiquitin gesteuert (Katzmann et al., 2002; Raiborg et al., 2003). Die Modifikation reguliert dabei die Sortierung der Substratproteine in multivesikuläre Endosomen. Ubiquitin-bindende Proteine wirken hierbei erneut als Adaptoren zwischen dem ubiquitinierten Protein und der Sortierungs-Maschinerie.

Der zentrale Transkriptionsfaktor der Entzündungsantwort menschlicher Zellen, NF- $\kappa$ B, wird auf vielfältige Weise durch Ubiquitin reguliert (Sun, L. und Chen, 2004). Mehrere vorgeschaltete Regulatoren, wie TRAF2 (*TNF-receptor associated factor*), TRAF6 und NEMO werden nach Stimulus durch Interleukin 1 oder TNF (*tumor necrosis factor*) mit einer K63-Ubiquitinkette modifiziert und bewirken hierdurch eine Aktivierung der I $\kappa$ B-Kinase. Diese phosphoryliert nun den Inhibitor von NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , worauf dieser mit einer K48-Ubiquitinkette modifiziert und proteasomal abgebaut wird. Auf diese Weise spielen unterschiedliche Ubiquitin-Modifikationen an mehreren Stellen der Signalkaskade eine Rolle und bewirken eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B.

Weiterhin werden mehrere Chromatin-assoziierte Funktionen durch Ubiquitin reguliert, ohne den Abbau der Substratproteine zu bewirken. Histone können Substrate für Monoubiquitinierung sein, in *S. cerevisiae* ist Histon 2B das einzig bekannte Substrat. Diese Modifikation ist für die Methylierung von Histon 3 notwendig und über diese am *Silencing* der Telomere aber auch promoter-spezifisch an einer Aktivierung der Transkription beteiligt (Sun, Z. W. und Allis, 2002). Die Aktivität einiger Transkriptionsfaktoren wird durch Mono-Ubiquitinierung gesteuert. Während Met4 durch die Modifikation inaktiviert wird (Kaiser et al., 2000), gibt es andererseits klare Hinweise auf eine aktivierende Funktion von Ubiquitin. So ist zum Beispiel ein artifizierender Transkriptionsfaktor (Fusion der DNA-Bindedomäne von LexA mit der Aktivierungsdomäne von VP16) nur dann aktiv, wenn er ubiquitiniert wird oder eine Ubiquitin-Fusion trägt (Salghetti et al., 2001).

Die Proteine hsFANCD2 und PCNA, die eine Funktion in der DNA-Reparatur haben, werden in Abhängigkeit von DNA-Schäden mit Mono-

Ubiquitin bzw. einer K63-verknüpften Ubiquitinkette modifiziert (Garcia-Higuera et al., 2001; Hoege et al., 2002). Durch diese Modifikationen wird eine Aktivierung der Reparatur-Funktionen beider Proteine bewirkt (s. II.2.2). Weiterhin wurden K6-verknüpfte, durch hsBRCA1-hsBARD1 gebildete Ubiquitin-Ketten beschrieben, die möglicherweise ebenfalls eine Funktion in der zellulären Antwort auf DNA-Schäden haben. Ein Substrat neben einer Auto-Ubiquitinierung von BRCA1 ist bislang unbekannt (Wu-Baer et al., 2003; Morris und Solomon, 2004; Nishikawa et al., 2004).

#### *II.1.4 Das Konjugations-System von SUMO*

Das Ubiquitin-ähnliche Protein SUMO weist lediglich 18% Sequenz-Identität im Vergleich zu Ubiquitin auf, hat aber eine homologe Tertiärstruktur. Unterschiede liegen in der Oberflächenladung und dem aus der globulären Struktur hervortretenden Aminoterminus von SUMO. Während in Vertebraten vier SUMO-Gene existieren (SUMO1, -2, -3 und -4), besitzen Invertebraten nur ein SUMO-Gen (Smt3). SUMO wird nach einem der Ubiquitin-Konjugation analogen Mechanismus mit Substratproteinen verknüpft (Muller et al., 2001; Johnson, 2004). Die für die Konjugation notwendigen Proteine (Ulp1, Aos1, Uba2, Ubc9) und SUMO selbst sind in *S. cerevisiae* lebensnotwendig. Konditionale Mutanten arretieren unter nicht-permissiven Bedingungen in der Mitose.

SUMO wird als Vorläuferprotein translatiert und wird durch Ulp1-katalysierte Spaltung prozessiert, so dass am C-Terminus die GG-Sequenz freigesetzt wird, über die SUMO mit Proteinen konjugiert werden kann (Li, S. J. und Hochstrasser, 1999). Das SUMO-aktivierende Enzym funktioniert analog zum Ubiquitin-aktivierenden Enzym (Uba1), allerdings wird es durch das Heterodimer Aos1/Uba2 gebildet. Während Aos1 homolog zum Aminoterminus von Uba1 ist, zeigt Uba2 Homologie zum Carboxyterminus von Uba1 und enthält auch das katalytische Cystein, durch das ein Thioester mit SUMO ausgebildet wird (Johnson et al., 1997).

Lediglich ein E2-Enzym, Ubc9, katalysiert die Konjugation von SUMO. Ubc9 besitzt eine UBC-Domäne und ist entsprechend homolog zu ubiquitin-konjugierenden Enzymen. Möglicherweise wird die Spezifität für SUMO durch eine positive Oberflächenladung von Ubc9 bewirkt (Johnson und Blobel, 1997; Schwarz et al., 1998). Ein prinzipieller Unterschied zwischen den SUMO- und Ubiquitin-Systemen besteht in der Substraterkennung. Ubc9 interagiert mit den meisten Substraten direkt, ohne eine SUMO-Ligase zu benötigen. Dabei werden häufig Lysine des Substratproteins mit SUMO modifiziert, die Teil der  $\Psi$ KxE/D Konsensus-Sequenz sind ( $\Psi$  steht für eine

aliphatische Aminosäure). Diese Stelle des Substrats kann durch das aktive Zentrum von Ubc9 gebunden werden (Bernier-Villamor et al., 2002). Da dieses Motiv sehr häufig ist, müssen allerdings weitere Kriterien zur Substraterkennung existieren.

Entsprechend gibt es im Vergleich mit Ubiquitin auch Unterschiede auf der Stufe der E3-Ligasen. Diese sind häufig für die SUMO-Modifikation nicht essentiell, sondern lediglich förderlich, da Ubc9 mit dem Substrat direkt interagieren kann. In *S. cerevisiae* sind nur drei Proteine dieser Aktivität bekannt, Siz1, Siz2 und Mms21, die alle zur Familie der PIAS-Proteine (*protein inhibitor of activated STAT*) gehören. Charakteristisch für diese Proteine ist eine Siz/PIAS RING-Domäne, die verwandt zur RING-Domäne von Ubiquitin-Ligasen ist und die Interaktion mit Ubc9 vermittelt (Hochstrasser, 2001; Johnson und Gupta, 2001; Takahashi et al., 2001a; Takahashi et al., 2001b). Neben den homologen PIAS Proteinen wurden im höheren Eukaryonten zwei weitere Proteine mit SUMO-Ligase Eigenschaften gefunden, RanBP2 und Pc2 (Pichler et al., 2002; Kagey et al., 2003). Beide Proteine besitzen keine Homologie zu anderen E3-Ligasen.

Die Modifikation mit SUMO ist ein reversibler Prozess, dessen Rückreaktion von SUMO-dekonjugierenden Enzymen katalysiert wird. In *S. cerevisiae* kommen zwei solche Enzyme vor, die sich in ihrer Lokalisation unterscheiden. Ulp1, welches auch das SUMO Vorläuferprotein prozessiert, ist am NPC (*nuclear pore complex*) lokalisiert, Ulp2 befindet sich im Zellkern (Li, S. J. und Hochstrasser, 1999; Li, S. J. und Hochstrasser, 2000). SUMO-dekonjugierende Enzyme der ULP-Familie sind Cystein-Proteasen, die interessanterweise weder Sequenz- noch strukturelle Ähnlichkeit zu Ubiquitin-dekonjugierenden Enzymen aufweisen. Inwiefern SUMO-Substrate über die Dekonjugation reguliert werden, ist derzeit unklar. Aufgrund der geringen Mengen an nicht konjugiertem SUMO in der Zelle ist die Dekonjugation für die Funktion von SUMO wichtig, was auch anhand der Phänotypen von Mutanten ersichtlich wird: *ULP1* ist lebensnotwendig; *ulp2Δ* Mutanten sind zwar lebensfähig, zeigen aber verlangsamtes Wachstum, Chromatindefekte und erhöhte Sensitivität gegen DNA-Schäden.

Analog zu Ubiquitin kann auch SUMO über interne Lysine zu Ketten verknüpft werden. Zwar wurde dies sowohl für SUMO-2 und SUMO-3 in höheren Eukaryonten als auch für Smt3 in *S. cerevisiae* beobachtet, diese Ketten bilden aber nur einen kleinen Teil der Gesamtpopulation und ihre Funktion ist bislang unklar (Tatham et al., 2001; Bylebyl et al., 2003).

### II.1.5 Funktion und Substrate von SUMO

Die Konsequenzen der Modifikation eines Proteins mit SUMO sind nur im Einzelfall verstanden. Generell scheint sie die Interaktionen des Substrats mit anderen Proteinen zu regulieren. Dementsprechend existieren Proteine, welche SUMO bzw. SUMO modifizierte Proteine binden können. Mehrere SUMO-bindende Proteine weisen eine kurze Sequenz auf, für die in einem Fall gezeigt wurde, dass sie die Interaktion mit SUMO vermittelt, und die deshalb als SUMO interagierendes Motiv (SIM) bezeichnet wird (Minty et al., 2000; Song et al., 2004; Hannich et al., 2005). Das Vorkommen eines solchen Motivs in den PIAS-E3-Ligasen legt für diese Proteine eine zusätzliche, der Konjugation nachgeschaltete Funktion nahe.

Die Zahl der erforschten Substrate in höheren Eukaryonten ist verglichen mit *S. cerevisiae* deutlich höher. Proteomische Ansätze zur Aufreinigung von SUMO Substraten in unterschiedlichen Organismen lieferten zahlreiche mögliche Substrate, was die Vermutung nahe legt, dass die Modifikation mit SUMO ein ähnlich häufiger Prozess wie Ubiquitinierung ist (Li, T. et al., 2004; Panse et al., 2004; Vertegaal et al., 2004; Zhou et al., 2004; Denison et al., 2005; Hannich et al., 2005; Rosas-Acosta et al., 2005; Wykoff und O'Shea, 2005). Wie auch für andere posttranslationale Modifikationen ist die Funktion von SUMO stets im Kontext der Funktion des Substrats zu sehen. Da mittlerweile viele Substrate bekannt sind, wird sich im folgenden auf einige Fälle beschränkt, welche am besten die prinzipiellen Mechanismen und Funktionen der SUMO-Modifikation wiedergeben.

Die meisten Substrate von SUMO haben ihre Funktion im Zellkern. Wichtige Ausnahmen bilden aber die Septin-Proteine, die in *S. cerevisiae* den filamentösen kontraktile Ring am *bud neck* bilden, sowie  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , das in Säugetierzellen als Inhibitor des für die Entzündungsreaktion wichtigen Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B fungiert (Desterro et al., 1998; Johnson und Blobel, 1999). Die SUMO-Modifikation von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  ist interessanterweise antagonistisch zu dessen Ubiquitinierung, welche am gleichen Lysinrest erfolgt, und blockiert so den Abbau durch das Proteasom.

Eine Funktion von SUMO scheint im Transport von Proteinen zwischen Zellkern und Zytoplasma zu liegen. Ein Beispiel hierfür ist das häufigste SUMO Substrat in Säugetierzellen RanGAP1, das GTP aktivierende Enzym des Kernimport-Faktors Ran (Matunis et al., 1996; Mahajan et al., 1997). Die Modifikation mit SUMO bewirkt die Bildung eines ternären Komplexes aus SUMO-RanGAP1, dem E3-Faktor RanBP2 und Ubc9. (Mahajan et al., 1998; Matunis et al., 1998; Saitoh et al., 1998). Dieser SUMOylierungs-Komplex

lokalisiert im Folgenden zur zytoplasmatischen Seite der Kernpore. An der nukleären Seite der Kernpore befinden sich wiederum Enzyme mit SUMO-dekonjugierender Aktivität (Takahashi et al., 2000; Zhang et al., 2002). Weitere Studien mit SUMOylierungs-Mutanten von *S. cerevisiae* und *D. melanogaster* sprechen weiterhin für eine generelle Funktion von SUMO-Konjugation und Dekonjugation im nukleozytoplasmatischen Transports, der genaue Mechanismus ist aber noch nicht aufgeklärt (Epps und Tanda, 1998; Stade et al., 2002).

In Säugetierzellen korreliert die Lokalisation von bestimmten SUMO-Substraten in PML-*nuclear bodies*, subnukleären Proteinstrukturen, mit ihrer SUMO Modifikation. Die SUMOylierung von PML ist dabei für den Aufbau dieser Strukturen notwendig (Kamitani et al., 1998; Muller et al., 1998; Ishov et al., 1999). Andere Proteine lokalisieren in Abhängigkeit von PML-SUMO zu diesen Strukturen und werden dort ebenfalls mit SUMO modifiziert. Die SUMO-Modifikation dieser Proteine ist nicht für ihre Lokalisation notwendig, sondern bedingt sekundäre Protein-Protein-Interaktionen (Seeler et al., 2001).

Ein weiterer Prozess, der durch SUMO-Modifikationen gesteuert wird, ist die Transkription; durch SUMO Modifikation von Regulatorproteinen erfolgt dabei in der Regel eine Inaktivierung. (Gill, 2004; Muller et al., 2004). Da die Repression des Zielgens teilweise durch artifizielle Fusionen von SUMO und Transkriptionsfaktor erreicht werden kann, liegt die Funktion von SUMO offensichtlich in der allgemeinen Rekrutierung von inhibitorischen Faktoren z.B. Histon-Deacetylasen zum Promoter des Zielgens (Girdwood et al., 2003). Eventuell folgt die Regulation aber einem komplexeren Mechanismus: SUMO-abhängiges *silencing* geht häufig einher mit der Rekrutierung des Transkriptionsfaktors zu *nuclear bodies*, zu denen wiederum auch Histon-Deacetylasen lokalisieren (Khan et al., 2001). Dies legt die Existenz eines transkriptionellen Korepressor-Komplexes nahe, welcher mit *nuclear bodies* assoziiert ist. Eine prinzipielle Ausnahme bildet die SUMO-Modifikation von Steroidhormon-Rezeptoren, da diese aktivierend auf die Transkription wirkt (Kotaja et al., 2002).

Die letzte Gruppe der SUMO Substrate hat ihre Aufgabe in der Erhaltung der Genomstabilität (s. I.2). SUMO-Substrate sind in unterschiedlichen DNA-Reparatur Prozessen zu finden: spRad22 vermittelt homologe Rekombination, hsWRN und hsBLM sind zwei negative Regulator der Rekombination, hsTDG ist an Basen-Exzisions-Reparatur beteiligt und Topoisomerasen katalysieren die Änderung des topologischen Zustandes der DNA (Kawabe et al., 2000; Mao et al., 2000a; Mao et al., 2000b; Ho et al., 2001; Bachant et al., 2002; Hardeland et al., 2002; Mo et al., 2002; Eladad et al., 2005). Auch die transkriptionelle Antwort auf DNA-Schäden wird durch SUMO reguliert, wie

sich aus Substraten wie hsp53, hsMdm2 und hsPML schließen lässt. (Sternsdorf et al., 1997; Rodriguez et al., 1999; Muller et al., 2000; Fuchs et al., 2002). Analog zur Rolle der *nuclear bodies* bei der Transkription erscheint es plausibel, dass die SUMO-Modifikation durch die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen am Aufbau von *repair foci* bzw. der Lokalisation von Faktoren in diese beteiligt sind. Hierbei handelt es sich um durch die Lokalisierung von zahlreichen Reparaturproteinen charakterisierte, subnukleäre Strukturen, in denen DNA-Reparatur-Prozesse stattfinden. Weiterhin scheint die SUMO-Modifikation sowohl bei Topoisomerasen, als auch bei p53 und Mdm2 für die intranukleäre Lokalisation, in diesem Fall für die Verteilung zwischen Nukleolus und Nukleoplasma, wichtig zu sein.

Ein interessantes Beispiel für ein Substrates, bei dem die SUMO-Modifikation eine Konformationsänderung bewirkt, ist das DNA-Reparatur-Enzyme TDG in Säugetierzellen. Dieses Protein katalysiert die Hydrolyse von TG oder UG Basen-Fehlpaarungen. Um zu verhindern, dass die reaktive, basenlose Stelle freiliegt, bevor nachgeschaltete Proteine rekrutiert worden sind, hat TDG eine hohe Affinität für das Hydrolyseprodukt. SUMO-Modifikation bewirkt die Dissoziation von TDG und Hydrolyseprodukt über eine konformationelle Änderung. Entscheidend für diese ist das Vorliegen eines SUMO-bindenden Motifs und einer Konjugationsstelle in einem Protein (Hardeland et al., 2002; Baba et al., 2005; Steinacher und Schar, 2005).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass vor allem nukleäre Prozesse durch SUMO-Modifikation reguliert werden. Diese scheint primär durch spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen und einer eventuell damit verbundenen Relokalisation zu wirken. Ein einheitliches Modell bezüglich der generellen Funktion der Modifikation mit SUMO fehlt jedoch bislang.

## II.2 DNA-Reparatur

Die Bewahrung der genetischen Information ist eine entscheidende Aufgabe für jede Zelle. Die DNA, der Träger dieser Information, kann jedoch durch unterschiedliche Einflüsse (z.B. UV-Licht, reaktive Sauerstoffverbindungen) geschädigt werden. Aus diesem Grund besitzt die Zelle zahlreiche Proteine, die DNA-Schäden beseitigen (DNA-Reparatur) und die Zelle an das Vorhandensein von Schäden anpassen (*DNA damage checkpoint*).

Schädigung der DNA kann zu unterschiedlichen Läsionen führen, von denen einige wichtige im Folgenden aufgeführt sind. Die Spaltung des Phosphodiester-Rückgrats führt zu Einzelstrang- oder Doppelstrangbrüchen. UV-Licht ermöglicht die Bildung von Cyclobutan-Strukturen aus benachbarten



Pyrimidin-Basen. Basen können weiterhin methyliert, oxidiert, deaminiert oder vom Phosphat-Rückgrat abgespalten werden. Schließlich ist eine Verknüpfung beider Stränge über kovalente Bindung eines Basenpaares möglich (ISCL – *interstrand crosslink*).

Entsprechend der Vielzahl von DNA-Schädigungen existieren unterschiedliche, vernetzte DNA-Reparatur-Mechanismen, die vorallem durch genetische Untersuchungen in *S. cerevisiae* charakterisiert wurden. Läsionen, die nur einen DNA-Strang betreffen, werden in der Regel durch das Ausschneiden des betroffenen Bereiches und dessen Neusynthese auf der Vorlage des unbeschädigten Strangs beseitigt. Nach Größe des ausgeschnittenen Bereiches unterscheidet man zwischen Basen-Exzisions-Reparatur (BER) und Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER). Läsionen, die nur eine Base betreffen, sowie Fehlpaarungen (*mismatch*) können durch das Ausschneiden einer Base, anschließende endonukleolytische Spaltung und Auffüllen der Lücke durch Polymerase  $\beta$  repariert werden (BER). Die NER-Maschinerie entfernt den die Läsion umgebenden Bereich und ist deshalb an eine größere Zahl von Läsionen angepasst. Zwei prinzipielle Wege existieren für die Erkennung: Während die Sensor-Proteine der sogenannten globalen NER vor allem Läsionen entdecken, die sich auf die Paarung der Basenpaare auswirken, erkennen nachgeschaltete NER-Proteine auch durch Läsionen angehaltene RNA-Polymerase II-Moleküle (*transcription-coupled repair* – TCR). Durch diese Verbindung von Transkription und Reparatur bei TCR wird die Effizienz der Exzisions-Reparatur erhöht (Hoeijmakers, 2001).

Doppelstrangbrüche können in Gegenwart eines homologen Chromosoms durch homologe Rekombination (*RAD52-pathway*) repariert werden (Symington, 2002). Weiterhin ist eine potentiell mutagene, direkte Verknüpfung der Enden der beiden Bruchstücke möglich (*non-homologous end-joining* – NHEJ) (Lieber et al., 2003).

Bestimmte Reparatur-Enzyme dienen nur der Reparatur eines speziellen Schadens. Beispiele sind die Photolyase, die eine photochemisch aktivierte Reversion von UV-Licht induzierten Pyrimidin-Dimeren katalysiert, oder die O<sup>6</sup>-Methylguanin-Methyltransferase, welche O<sup>6</sup>-Methylguanin-Basen repariert.

Ein wichtiger Prozess der DNA-Reparatur wird durch den *RAD6-pathway* vermittelt. Durch diesen wird während der Replikation der Bypass von DNA-Läsionen ermöglicht, die nicht vorher erkannt und entfernt wurden (s. II.2.1). Da keine Schäden beseitigt werden, handelt es sich genaugenommen nicht um eine Reparatur der DNA, sondern um eine Anpassung an das Vorhandensein von DNA-Schäden.

Unter dem Begriff *DNA damage checkpoint* fasst man allgemein das zelluläre Programm zusammen, das für die Erkennung von DNA-Schäden

sorgt und die zelluläre Antwort hierauf reguliert (Melo und Toczyski, 2002; Osborn et al., 2002; Kastan und Bartek, 2004). Bislang ist noch nicht vollkommen verstanden, wie *checkpoint*-Proteine die unterschiedlichen DNA-Läsionen erkennen und in der Folge eine einheitliche Antwort auslösen können. Wahrscheinlich wird über *checkpoint*-Sensoren Einzelstrang-DNA erkannt, die mit dem Einzelstrang-bindenden Protein RPA (*replication protein A*) komplexiert ist (Zou und Elledge, 2003; Zou et al., 2003; Lucca et al., 2004). Diese entsteht beispielsweise im ersten Schritt der Reparatur von Doppelstrangbrüchen und begrenzt während der Replikation. Wird die Replikationsgabel durch eine DNA-Läsion gestoppt, vergrößern sich die Einzelstrang-RPA-Abschnitte, eine Interaktion dieser Strukturen mit *checkpoint*-Sensoren kann so die Erkennung von vielfältigen DNA-Läsionen ermöglichen (Muzi-Falconi et al., 2003; Pasero et al., 2003). Neben den Mec1- und Tel1-Protein-Kinase-Komplexen (Homologe von hsATR, hsATM – *ataxia telangiectasia related/ mutated*) fungiert ein PCNA-ähnlicher Komplex (Rad17, Mec3, Ddc1) als Sensor. Dieser bindet wahrscheinlich mit Hilfe eines speziellen *clamp loader*-Komplexes (Rad24, Rfc2-5) DNA an der geschädigten Stelle (Parrilla-Castellar et al., 2004). Über den Sensoren nachgeschaltete Kinasen läuft eine Phosphorylierungskaskade ab, welche schließlich über *checkpoint*-Kinasen wie Rad53 oder Chk1 die Phosphorylierung von Effektormolekülen bewirkt. Beispiele für Phosphorylierungssubstrate sind RPA, die Histon-2A-Variante hsH2AX (H2A in *S. cerevisiae*), die Cdk-aktivierende Proteinphosphatase spCdc25 sowie Rad55, das an der homologen Rekombination beteiligt ist. Nur teilweise beeinflussen die *checkpoint*-Effektoren die DNA-Reparatur und –Replikation direkt, z.B. durch Stabilisierung angehaltener Replikationsgabeln, sie regulieren viele Reparatur-Proteine auch auf der Ebene der Transkription.

Die bekannteste Konsequenz eines aktiven *checkpoints* ist ein Arrest des Zellzyklus. Dieser kann vor dem Eintritt in die S-Phase oder die Mitose erfolgen. Der *checkpoint* kann auch eine Verlangsamung der S-Phase bewirken, um eine Reparatur von DNA-Schäden zu ermöglichen.

### II.2.1 Postreplikativer Bypass von DNA-Schäden – der RAD6-pathway

Manche DNA-Läsionen persistieren bis zur S-Phase, da sie entweder vorher nicht von DNA-Reparatur-Enzymen erkannt wurden oder die Reparatur nicht ausreichend effizient ablief. Diese Schäden können während der DNA-Replikation zu einem Anhalten (*stalling*) der Replikationsgabeln führen, da die DNA-Polymerasen einen beschädigten Parentalstrang meist aus sterischen

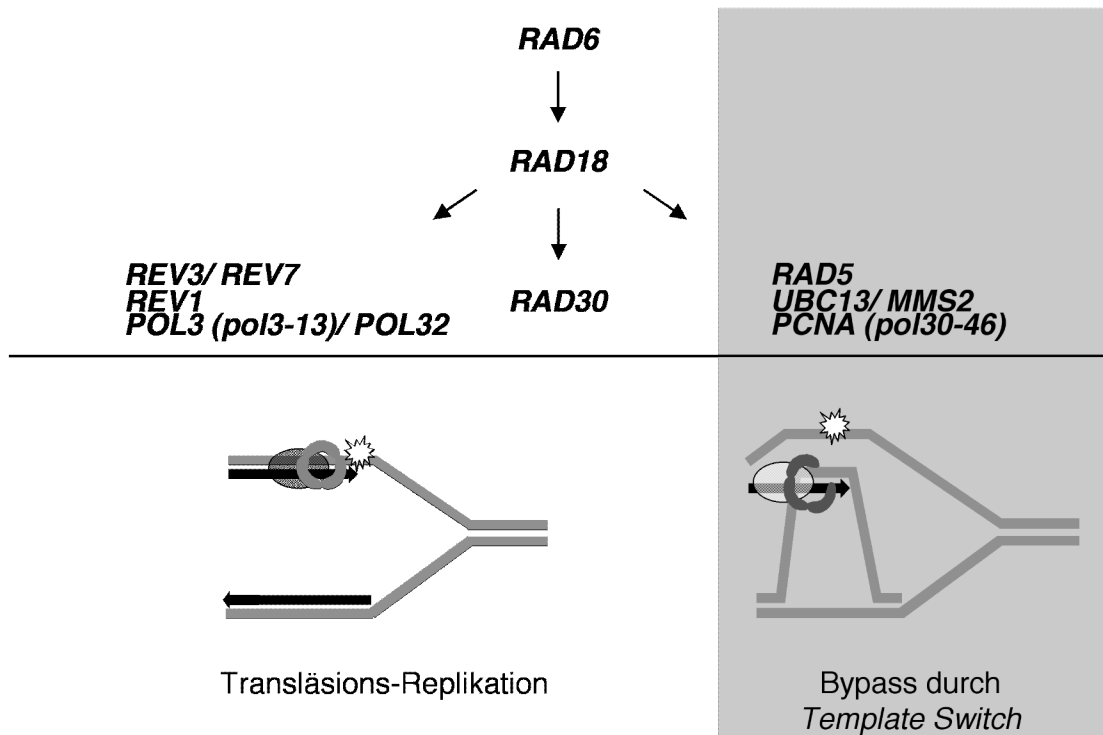
Gründen nicht als Vorlage benutzen können. Um die Replikation fortzusetzen, muss also die blockierende Läsion repariert oder umgangen werden. Dies ist nicht nur für eine Fortsetzung der Replikation notwendig, sondern auch, da ein dauerhaftes *stalling* zu einem Zusammenbruch der Replikationsgabel und in der Folge zu DNA-Strangbrüchen führen kann (Barbour und Xiao, 2003; Smirnova und Klein, 2003). Unterschiedliche Reparatursysteme können in eukaryontischen Zellen einen solchen Bypass ermöglichen.

Bereits prokaryontische Organismen besitzen Mechanismen, um DNA-Schäden während der Replikation zu tolerieren (Goodman, 2002). Im Rahmen der SOS-Antwort werden neben anderen Reparatur-Genen die DNA-Polymerasen Pol II, Pol IV und Pol V, sogenannte Transläsions-Polymerasen, transkriptionell induziert. Diese Polymerasen sind durch eine geringe Prozessivität und Genauigkeit charakterisiert, zeigen aber Toleranz gegenüber einem beschädigten Parentalstrang und ermöglichen so die Replikation über eine DNA-Läsion hinweg. Dieser Mechanismus kann jedoch zur Entstehung von Mutationen führen, da die Information vom Parentalstrang nicht exakt übertragen wird. Deshalb bezeichnet man Transläsions-Polymerasen als fehlerbehaftet (*error prone*). In Eukaryonten existieren mehrere Transläsions-Polymerasen der Y- (Pol  $\eta$ / Rad30, sowie Rev1) und B-Familie (Pol  $\zeta$ / Rev3, Rev7).

Die wichtigsten Toleranz-Mechanismen in eukaryontischen Zellen werden durch Proteine des *RAD6-pathways* vermittelt, zu denen die angesprochenen Transläsions-Polymerasen gehören. Charakterisiert wurde dieser vor allem durch genetische Untersuchung in *S. cerevisiae*. Mutanten dieses Reparaturwegs zeigen eine Hypersensitivität gegenüber unterschiedlichen DNA-schädigenden Agenzien und erhöhte Rekombinationsraten, allerdings – zumindest teilweise – stark reduzierte Mutationsraten nach DNA Schäden. Durch Epistasis-Analyse von Mutanten wurde eine funktionelle Hierarchie innerhalb des *RAD6-pathways* aufgestellt. *RAD6* und *RAD18* sind dabei für alle Aktivitäten essentiell (Prakash, L., 1981).

Die Gruppe der Transläsions-Polymerasen bilden zwei Arme des *RAD6-pathways*. Im Gegensatz zu Prokaryonten arbeiten sie nicht unabhängig, sondern sind in ihrer Aktivität von *RAD6* und *RAD18* reguliert (Xiao et al., 2000; Rattray und Strathern, 2003; Prakash, S. et al., 2004). Die durch sie katalysierte Transläsions-Replikation ist für die Mehrzahl der durch DNA-Schäden erworbenen Mutationen verantwortlich (*error prone*). Strukturell unterscheiden sich Transläsions-Polymerasen von replikativen Polymerasen durch eine weniger stringente Passform (*fit*) für die Basen des *template*-Strangs und das einzubauende Desoxynukleotid. Dabei ist es von der Art der Läsion abhängig, ob die Transläsions-Polymerase eine Mutation verursacht.

Durch UV-Licht verursachte cis-syn Thymidin-Dimere, die lediglich zu einer leichten Verzerrung der DNA führen, können beispielsweise von Pol  $\eta$  ohne Mutationen (*error free*) repliziert werden (McDonald et al., 1997; Trincao et al., 2001). Häufig können Polymerasen zwar die Base gegenüber einer Läsion einfügen, die entstandene Fehlpaarung kann jedoch nicht verlängert werden. Dies wird durch eine zweite, nachgeschaltete Transläsions-Polymerase, in der Regel Pol  $\zeta$ , katalysiert. Neben diesen spezialisierten Transläsions-Polymerasen ist offensichtlich auch die replikative Polymerase  $\delta$  zu einem Bypass von bestimmten Läsionen befähigt, da sowohl ein Allel der essentiellen katalytischen Untereinheit (*pol3-13*) wie auch die Deletionsmutante der accessorische Untereinheit (*pol32*) in den *RAD6-pathway* eingeordnet wurden (Giot et al., 1997; Huang et al., 2000).



**Abb. 2: Funktionelle Einteilung des *RAD6-pathways* aufgrund genetischer Daten:** Der *RAD6-pathway* kann in Genprodukte unterteilt werden, welche den fehler-behafteten (*error prone*), sowie den fehlerfreien (*error-free*, grau unterlegt) Bypass von DNA-Läsionen während der Replikation vermitteln. Alle Arme hängen dabei von *RAD6* und *RAD18* ab. Unten sind schematische Darstellungen abgebildet, wie ein ein Bypass einer DNA-Läsion ablaufen könnte. Bei dem fehlerbehafteten Bypass (links) wird die Replikation nach der Rekrutierung einer Transläsions-polymerase über die DNA-Läsion hinweg fortgesetzt. Ein fehlerfreier Bypass (rechts) könnte hingegen durch den Austausch des beschädigten DNA-Strangs durch den unbeschädigten, neusynthetisierten Tochter-Strang ermöglicht werden (*template switch*). Dieser könnte dann als Vorlage für die Replikationsmaschinerie dienen.

Weiterhin existiert ein zweiter Mechanismus, der einen Bypass von DNA-Läsionen ermöglicht, ohne dass dabei Mutationen entstehen. Ein solcher Bypass ist prinzipiell möglich, wenn unter Entkopplung der Synthese von *leading* und *lagging* Strängen der neusynthetisierte Tochterstrang als Vorlage benutzt wird (Higgins et al., 1976). An diesem fehlerfreien Bypass (*error-free*) sind *RAD5*, *UBC13* und *MMS2* beteiligt (Broomfield et al., 1998; Brusky et al., 2000; Ulrich und Jentsch, 2000; Xiao et al., 2000). Auch PCNA (s. I.2.2 PCNA wird durch den *RAD6-pathway* ubiquitiniert) wurde über ein Allel (*pol30-46*) genetisch in diesen Zweig eingeordnet (Torres-Ramos et al., 1996).

Die Komponenten dieses Reparaturweges interagieren nicht nur genetisch, sondern auch physikalisch: Rad18 bildet einen Komplex mit Rad6 (Bailly et al., 1994) und Rad5 bindet an Ubc13-Mms2 (Ulrich und Jentsch, 2000). Dabei sind Rad18 und Rad5 für die Rekrutierung der jeweiligen Faktoren zu Chromatin verantwortlich. Durch eine Interaktion von Rad18 mit Rad5 kann ein Komplex gebildet werden, der alle fünf Proteine enthält.

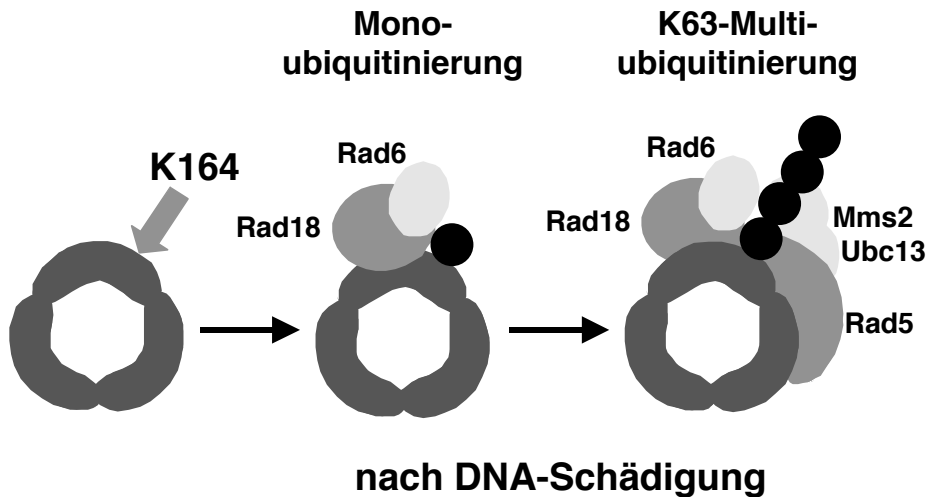
### II.2.2 PCNA wird durch den *RAD6-pathway* ubiquitiniert

Die Proteine des *Rad6-pathways* und besonders der fehlerfreien Untergruppe sind eng mit dem Ubiquitin-System verknüpft. Rad6 ist ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (Jentsch et al., 1987). Ubc13-Mms2 bilden einen heterodimeren E2-Komplex, der Lysin K63-verknüpfte Ubiquitin-Ketten bildet (Hofmann und Pickart, 1999). Die jeweiligen chromatin-assoziierten Bindepartner Rad18 und Rad5 besitzen eine RING-Domäne und können somit als E3-Ligasen fungieren. Entsprechend lag die Spekulation nahe, dass Proteine durch Enzyme des *RAD6-pathways* ubiquitiniert werden (Johnson et al., 1992; Bailly et al., 1994). Insbesondere könnte ein Komplex aus allen Enzymen eine K63-verknüpfte Kette mit einem Substrat konjugieren. Ein Substrat konnte jedoch lange Zeit nicht gefunden werden.

Als durch den *RAD6-pathway* ubiquitiniertes Substrat konnte PCNA identifiziert werden<sup>2</sup> (Hoegge et al., 2002). Dieses Protein bildet einen homotrimeren Ring (*clamp*), der in Abhängigkeit von Replikationsfaktor C (RFC) auf die DNA geladen wird. Dort assoziiert PCNA mit replikativen Polymerasen und erhöht deren Prozessivität, eine für die Replikation essentielle Funktion.

---

<sup>2</sup> Obwohl dieses Ergebnis Teil dieser Arbeit ist, wird die Modifikation hier zur Verdeutlichung des Mechanismus von *RAD6*-vermitteltem Bypass von DNA-Läsionen beschrieben.



**Abb. 3: PCNA ist das Ubiquitinierungs-Substrat des *RAD6-pathways*:** Nach DNA-Schädigung wird PCNA an Lysin K164 mono-ubiquitiniert. Diese Modifikation wird durch Rad6 und Rad18 katalysiert. Zusätzlich wird PCNA am gleichen Lysin durch eine K63-verknüpfte Multi-Ubiquitin-Kette modifiziert, was die gemeinsame Aktivität von Rad6, Rad18, Rad5 und Ubc13-Mms2 erfordert. Die Ubiquitinierung von PCNA ist ein in Eukaryonten konservierter Mechanismus: Auch humanes PCNA wird nach DNA Schäden an dem gleichen, konservierten Lysin modifiziert. Entsprechend scheint auch hier der *RAD6-pathway* den Bypass von Läsionen während der Replikation durch Ubiquitin-Modifikation von PCNA zu steuern.

Die Ubiquitin-Modifikation von PCNA wird durch Zugabe von DNA-schädigenden Substanzen wie dem methylierenden MMS (Methyl-Methansulfonat) oder dem UV-Mimetikum 4-NQO (4-Nitroquinolin-1-oxid) induziert. Lediglich das Lysin K164 wird mit Ubiquitin modifiziert. Dieses liegt in einer *loop* zwischen zwei  $\beta$ -Faltblättern an der DNA-abgewandten Seite. Es kann einerseits eine Monoubiquitin-Modifikation tragen, die durch Rad6 und Rad18 katalysiert wird. Durch das Zusammenwirken dieser Enzyme mit Rad5 und Ubc13-Mms2 kann andererseits auch eine K63-verknüpfte Multiubiquitin-Kette gebildet werden (**Abb. 3**). Die Interaktion des Ubiquitinierungs-Komplexes mit PCNA wird dabei durch die beiden Chromatin-assoziierten E3-Ligasen Rad5 und Rad18 vermittelt.

PCNA Mutanten, die nicht mit Ubiquitin modifiziert werden können, zeigen eine Hypersensitivität gegenüber UV-Licht und MMS und verhalten sich erwartungsgemäß epistatisch zu Mutanten des *RAD6-pathways*. Eine phänotypische Analyse wird durch die zusätzliche Modifikation des gleichen Lysins durch SUMO erschwert (s. I.2.3 PCNA wird durch SUMO modifiziert).

Der Vergleich von Phänotypen der Doppelmutanten (z.B. *rad18 pol30-K164R* gegenüber *pol30-K164R*) zeigte, dass PCNA das essentielle Substrat für Rad18, Rad5, und Ubc13-Mms2 ist, während nicht alle Funktionen von Rad6 PCNA-abhängig sind. Aus dieser genetischen Analyse läßt sich somit

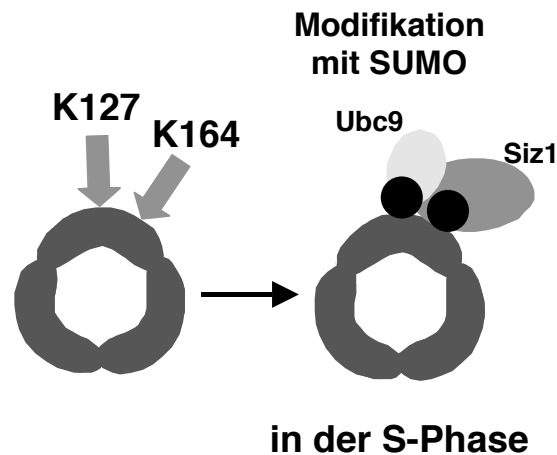
folgern, dass ubiquitiniertes PCNA, wahrscheinlich durch spezifische Interaktion mit nachgeschalteten Faktoren den Bypass von DNA-Läsionen ermöglicht. Insbesondere scheint die Multi-Ubiquitinierung von PCNA den fehlerfreien Bypass zu regulieren.

Die Ubiquitinierung von PCNA ist ein in Eukaryonten konservierter Mechanismus: Auch humanes PCNA wird nach DNA-Schäden an dem gleichen, konservierten Lysin modifiziert. Entsprechend scheint auch hier der *RAD6-pathway* den Bypass von Läsionen während der Replikation durch Ubiquitin-Modifikation von PCNA zu steuern.

### *II.2.3 PCNA wird mit SUMO modifiziert*

PCNA wird neben Ubiquitin auch von einem zweiten UBL, SUMO, modifiziert (Hoegge et al., 2002). Diese Modifikation erfolgt spezifisch in der S-Phase, was für eine Funktion während der DNA-Replikation spricht. Die SUMO-Modifikation ist allerdings nicht essentiell für die Replikation, da nicht-modifizierbare PCNA-Mutanten lebensfähig sind. Im Gegensatz zur Ubiquitinierung erfolgt diese Modifikation unabhängig von exogenen DNA Schäden, lässt sich aber durch lethale Konzentration von DNA-schädigenden Agenzien stark induzieren.

Für die SUMO-Modifikation wird interessanterweise das gleiche Lysin (K164) verwendet, das auch der Akzeptor für Ubiquitin ist. Dieses Lysin fällt nicht in die Konsensus-Sequenz, welche für SUMO-Akzeptorlysine beschrieben wurde (s. II.1.4 SUMO). Allerdings wird außerdem ein zweites Lysin (K127) mit SUMO modifiziert, welches in einer Konsensus-Sequenz liegt. Neben der einfachen, unabhängigen Modifikation beider Lysine, kann auch eine gleichzeitige Modifikation an beiden Lysin von PCNA erfolgen.



**Abb. 4: PCNA wird in der S-Phase mit SUMO modifiziert:** PCNA besitzt zwei SUMOylierungs-Stellen (K127, K164), die spezifisch während der S-Phase modifiziert werden. Hierfür werden Ubc9 und Siz1 benötigt.

Bislang wurde diese Modifikation von PCNA nur in *S. cerevisiae* nachgewiesen, was entweder für eine für diesen Organismus spezifische Funktion oder für alternative Mechanismen sprechen könnte, welche die Funktion von SUMOyliertem PCNA in anderen Organismen übernehmen. Interessanterweise interagiert das SUMO-konjugierende Enzym Ubc9 mit Rad18 und Rad5, welche als E3-Ligasen die Ubiquitinierung von PCNA katalysieren. Demzufolge ist es denkbar, dass ein Komplex aus sämtlichen Modifikationsenzyme existiert, welcher als molekularer Schalter funktioniert, der durch verschiedene Modifikationen PCNA zu unterschiedlichen Funktionen steuert.



## II.3. Zielsetzung

Nach der Entdeckung der Ubiquitin- und SUMO-Modifikation von PCNA und deren prinzipieller Funktion in der DNA-Reparatur (Hoege et al., 2002) war eine genaue Charakterisierung der Wirkmechanismen dieser Modifikationen im Kontext der DNA-Reparatur Ziel dieser Arbeit.

Die Ubiquitinierung von PCNA bewirkt den Bypass von DNA-Läsionen während der Replikation. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, durch welche nachgeschalteten Faktoren dies geschieht. Insbesondere sollte untersucht werden, ob Transläsions-Polymerasen mit ubiquitiniertem PCNA funktionell kooperieren. Diese Proteine wurden genetisch in den *RAD6-pathway* eingeordnet und interagieren mit PCNA. Eine Funktion zusammen mit ubiquitiniertem PCNA war allerdings zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt.

Auch die Modifikation von PCNA mit SUMO beeinflusst die DNA-Reparatur. Vergleicht man die Sensitivität von Hefe-Stämmen, in denen PCNA nicht ubiquitiniert werden kann (z.B. *rad18*), mit Stämmen, die zusätzlich einen Defekt in der SUMO Modifikation von PCNA aufweisen (*rad18 pol30-K164R*), so erweisen sich letztere als weniger sensitiv. SUMO-modifiziertes PCNA wirkt sich unter diesen Bedingungen also negativ auf die Toleranz von DNA-Schäden aus. Es sollte herausgefunden werden, welche Art von DNA-Reparatur inhibiert wird und ob ein Zusammenhang zu dem durch Ubiquitinierung von PCNA vermittelten Bypass von DNA-Schäden besteht. Außerdem sollte der molekulare Mechanismus der Wirkungsweise von SUMO-modifiziertem PCNA untersucht werden.

Neben diesen beiden gezielten Ansätzen wurde in einem *Screen* nach Genen gesucht, die unter Überexpression zu einer Suppression des Hypersensitivitäts-Phänotyps von *pol30-K164R*-Mutanten gegenüber DNA-Schädigungen führen. Da in diesem Mutanten PCNA nicht ubiquitiniert wird, kann eine solche Dosis-Suppression prinzipiell auf zwei unterschiedlichen Wegen entstehen. Zum einen ist es möglich, dass die Funktion des *RAD6-pathways* wieder hergestellt wird, der Suppressor also ein der PCNA-Ubiquitinierung nachgeschalteter Faktor ist. Zum anderen könnten auch Faktoren aus anderen Reparaturwegen gefunden werden, welche unabhängig vom *RAD6-pathway* den Bypass von Läsionen ermöglichen.

### III Ergebnisse

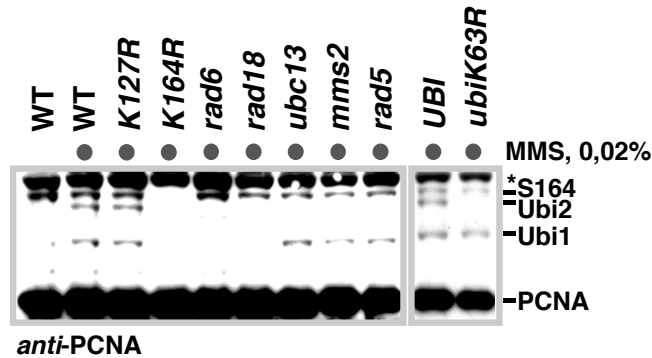
#### III.1 Regulation der Ubiquitin-Modifikation von PCNA durch den *RAD6-pathway*

##### III.1.1 PCNA ist das Ubiquitinierungs-Substrat des RAD6-pathways

Während der Charakterisierung der SUMO-Modifikation (s. II.2.3) von PCNA wurde in Zusammenarbeit mit Carsten Hoege entdeckt, dass PCNA nach Schädigungen der DNA eine weitere posttranslationale Modifikation erfährt. Durch chromatographische Anreicherung von PCNA und den modifizierten Formen und nachfolgenden *western-blot* mit einem *anti-Ubiquitin*-Antikörper konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei dieser durch DNA-Schädigung induzierten Modifikation um Ubiquitin handelt. Interessanterweise betrifft die Ubiquitinierung das gleiche Lysin (K164), das auch die Haupt-SUMOylierungs-Stelle ist. Dabei existieren verschiedene ubiquitinierte Formen mit unterschiedlichem gelelektrophoretischen Laufverhalten, die einer Modifikation durch ein Ubiquitin-Protein oder einer Kette von zwei bis fünf Ubiquitinen entsprechen (Hoege et al., 2002).

Die Induktion der Ubiquitinierung durch DNA-Schädigungen sprach für eine Beteiligung an einem DNA-Reparatur- oder *checkpoint*-Prozess. Bereits zuvor wurde PCNA mit DNA-Reparatur in Verbindung gebracht. Über die Mutante *pol30-46* wurde PCNA eine Funktion im *RAD6-pathway* zugeordnet (Torres-Ramos et al., 1996). Außerdem ist PCNA an diversen Reparatur-Vorgängen, welche eine Neusynthese eines DNA-Stranges erfordern (Nukleotid-Exzisions-Reparatur, homologe Rekombination), sowie der *Mismatch*-Reparatur beteiligt (Tsurimoto, 1999).

Da die Ubiquitinierung eines bis zu diesem Zeitpunkt unbekanntes Substrats für die Aktivität des *RAD6-pathways* entscheidend ist (s.II.2.2), wurde überprüft, ob PCNA dieses Ubiquitinierungs-Substrat ist. Hiefür wurden unterschiedliche Mutanten der Ubiquitinierungs-Enzyme des *RAD6-pathways* untersucht. Wie aus **Abb. 6** hervorgeht, zeigen sowohl *rad6*- als auch *rad18*-Mutanten einen vollständigen Verlust der Ubiquitinierung. Für PCNA muss Rad6 somit als Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) und Rad18 über seine RING-Finger-Domäne als Ubiquitin-Ligase (E3) fungieren. Mutanten des heterodimeren E2-Komplexes Ubc13-Mms2 und der E3-Ligase Rad5 zeigten einen Verlust der di- und multi-ubiquitinierten Formen, während mono-ubiquitiniertes PCNA nicht beeinflusst wurde.



**Abb. 6: Mutanten des *RAD6*-pathways zeigen Defekte in der Ubiquitinierung von PCNA.** Nach Schädigung der DNA durch Zugabe von 0,02% MMS wird PCNA an Lysin K164 ubiquitiniert. Aufgrund des unterschiedlichen elektrophoretischen Laufverhaltens lassen sich verschiedene ubiquitinierte Formen nachweisen. Ubi1 entspricht mono-ubiquitiniertem PCNA, Ubi2 ist eine di-Ubiquitin-Modifikation, die kürzeste und am stärksten ausgeprägte Form der über das interne Ubiquitin-Lysin K63 verknüpften Ubiquitin-Kette an PCNA. *rad6*- und *rad18*-Mutanten zeigen keine PCNA-Ubiquitinierung. In *rad5*-, *ubc13*-, *mms2*- und *ubiK63R*-Zellen fehlt spezifisch die K63-verknüpfte Ubiquitin-Kette an PCNA, während die monoubiquitinierte Form unbeeinflusst ist. Der Nachweis von PCNA und modifiziertem PCNA erfolgte im *anti*-PCNA-western-blot von Zellextrakten, die unter denaturierenden Bedingungen hergestellt wurden.

Dementsprechend bewirken Rad5, und Ubc13-Mms2 spezifisch eine Modifikation von PCNA mit einer Ubiquitin-Kette. Da Ubc13-Mms2 *in vitro* freie, K63-verknüpfte Ubiquitin-Ketten bilden (Hofmann und Pickart, 1999), wurde überprüft, ob PCNA mit einer solchen Kette konjugiert wird. Dass es sich bei der Multi-Ubiquitin-Modifikation von PCNA tatsächlich um eine K63-verknüpfte Ubiquitin-Kette handelt, konnte mit einem Hefestamm gezeigt werden, der nur eine *K63R*-Mutante von Ubiquitin exprimiert und keine PCNA-Multi-Ubiquitinierung aufwies.

Analog zu anderen mono- oder K63-multi-ubiquitinierten Substraten sind die ubiquitinierten Formen von PCNA stabil und werden nicht abgebaut. Über den UV-Sensitivitäts-Phänotyp der *pol30-K164R*-Mutante, in der PCNA an Lysin K164 weder mit Ubiquitin noch mit SUMO modifiziert werden kann, wurde die Auswirkung fehlender PCNA-Modifikationen auf *RAD6*-vermittelte Toleranz von DNA-Schäden untersucht. Die Hypersensitivität von *pol30-K164R* wurde durch zusätzliche Mutation von *RAD18*, *RAD5* oder *MMS2* nicht erhöht (Hoege et al., 2002). Entsprechend ist die Ubiquitinierung von PCNA die entscheidende Funktion dieser Proteine in der DNA-Reparatur und stellt somit das zentrale Ereignis im *RAD6*-pathway dar. Erwartungsgemäß bildet *RAD6* hier eine Ausnahme, da es offensichtlich weitere Substrate hat z.B. Histon 2B (Robzyk et al., 2000). Aufgrund dieser zusätzlichen Substrate

weist die *rad6*-Mutante einen stärker ausgeprägten Hypersensitivitäts-Phänotyp gegenüber DNA-Schädigungen auf.

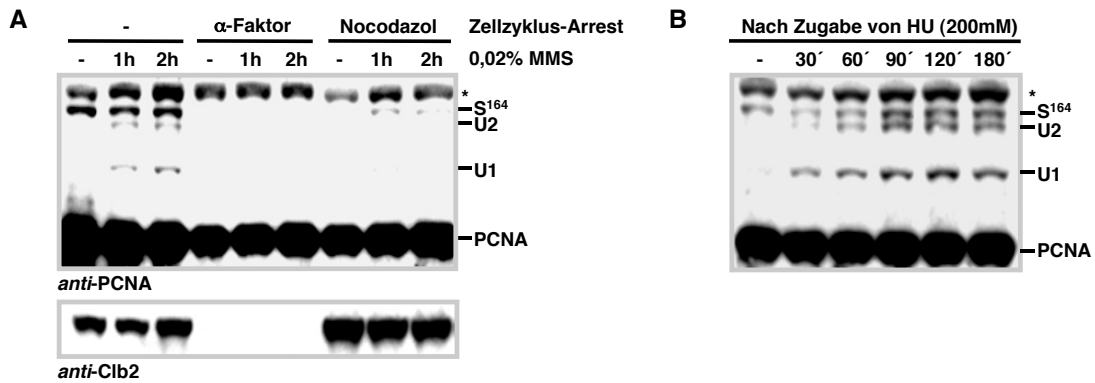
Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass PCNA durch Enzyme des *RAD6-pathways* ubiquitiniert wird und dass diese Ubiquitinierung für den durch den *RAD6-pathway* vermittelten Bypass von DNA-Läsionen während der Replikation notwendig ist. Wie genauer in Abschnitt III.3 ausgeführt wird, legt die Existenz von zwei *RAD6*-abhängigen Ubiquitin-Modifikationen und zwei unterschiedlichen *RAD6*-abhängigen Bypass-Mechanismen ein Modell nahe, nach dem mono-ubiquitiniertes PCNA zu Transläsions-Replikation und K63-multi-ubiquitiniertes PCNA zu einem fehlerfreien Bypass von DNA-Läsionen führt.

### *III.1.2 PCNA wird S-Phase spezifisch ubiquitiniert*

Nach dem gängigen Modell, bewirkt der *RAD6-pathway* Toleranz gegenüber bestimmten DNA-Läsionen, indem er während der Replikation den Bypass von Läsionen ermöglicht, welche die Replikationsgabel blockieren (Barbour und Xiao, 2003; Smirnova und Klein, 2003). Zu diesem Modell haben genetische Untersuchungen mit Mutanten des *RAD6-pathways* geführt, die Defekte bei der Replikation in Gegenwart von DNA-Läsionen aufweisen (Prakash, L., 1981). Weiterhin spricht die Einordnung von Transläsions-Polymerasen in den *RAD6-pathway* für dessen grundsätzliche Funktion im Bypass von DNA-Läsionen

Nach diesem Modell sollte PCNA spezifisch während der S-Phase und in Abhängigkeit von DNA-Schäden ubiquitiniert werden. Um dies zu überprüfen, wurden zyklisch wachsende Hefezellen mit solchen verglichen, die entweder durch  $\alpha$ -Faktor in der G1-Phase des Zellzyklus oder durch Nocodazol in G2 arretiert waren. Wie aus **Abb. 6a** zu erkennen, zeigten Zellen, die außerhalb der S-Phase im Zellzyklus arretiert sind, keine Ubiquitinierung von PCNA nach Induktion von DNA-Schäden. Weiterhin ließ sich die Ubiquitinierung auch durch Zugabe von Hydroxyurea (HU) auslösen (**Abb. 6b**). Hydroxyurea wirkt S-Phase-spezifisch, da es zur Depletion der Desoxynukleotide und damit zu einem verstärkten *stalling* von Replikationsgabeln führt.

Somit sind beide post-translationalen Modifikationen von PCNA, Ubiquitinierung und SUMOylierung, durch den Zellzyklus reguliert und nur während der DNA-Replikation zu finden.

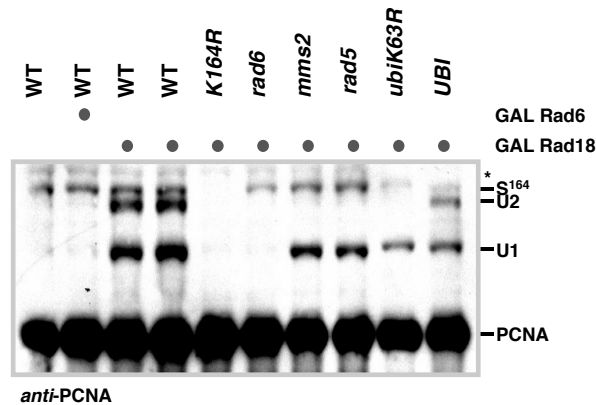


**Abb. 6: PCNA-Ubiquitinierung beschränkt sich auf Zellen mit DNA-Schäden in der S-Phase:** **A**, Durch Zugabe von 0,02% MMS zu Zellen, welche in G1 durch  $\alpha$ -Faktor, in G2 durch Nocodazol oder nicht arretiert wurden, erfolgte eine Induktion von DNA-Schäden. **B**, Die PCNA-Ubiquitinierung wird ebenfalls durch Zugabe von Hydroxyurea (HU, 200mM) zum Wachstumsmedium induziert. **A-B**, PCNA und modifiziertes PCNA wurden durch *anti-PCNA-western-blot* von denaturierten Zell-extrakten visualisiert. Der Zellzyklus-Arrest (**A**) wurde durch *western-blot* gegen das mitotische Cyclin Clb2 überprüft. PCNA-Modifikationen: U1– Mono-Ubiquitin an K164, U2- K63-verknüpftes Di-Ubiquitin an K164, S<sup>164</sup>– SUMOylierung an K164. Der Stern kennzeichnet eine kreuzreaktive Bande.

### III.1.3 RAD18 ist der entscheidende Regulator der PCNA-Ubiquitinierung

Die Ubiquitinierung von PCNA ist offensichtlich streng reguliert und wird nur durch DNA-Läsionen in der S-Phase induziert. Dabei wird die enzymatische Maschinerie des *RAD6-pathways* benötigt. In weiteren Experimenten wurde untersucht, wie die Regulation dieser Modifikation auf zellulärer Ebene abläuft und ob die Modifikation von der DNA-Schädigung entkoppelt werden kann. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche Proteine wie Rad6, Rad18 oder Rad5 unter der Kontrolle des *GAL*-Promotors überexprimiert.

Die Überexpression von Rad18 bewirkt, im Gegensatz zu Rad6 oder Rad5, eine signifikante Ubiquitinierung von PCNA (**Abb. 7**). Hierbei wurden sowohl Mono- als auch K63-Di-Ubiquitinierung beobachtet. Beide Modifikationen wurden in einem ähnlichen Verhältnis induziert, wie es auch bei Zugabe von DNA-schädigenden Substanzen beobachtet wurde.



**Abb. 7: Überexpression von Rad18 bewirkt PCNA-Ubiquitinierung:** Rad18 oder Rad6 (Kontrolle) wurden von einem integrativen Plasmid unter Kontrolle des *GAL*-Promotors in den angegebenen Stämmen exprimiert. Die Proben sind denaturierte Protein-Extrakte von Zellen, die nicht mit DNA-schädigenden Agenzien behandelt wurden. PCNA und modifiziertes PCNA wurden durch einen *anti*-PCNA-western-blot visualisiert. PCNA-Modifikationen: U<sub>1</sub>– Mono-Ubiquitin an K164, U<sub>2</sub>– K63-verknüpftes Di-Ubiquitin an K164, S<sup>164</sup>– SUMOylierung an K164. Der Stern kennzeichnet eine kreuzreaktive Bande

Durch Überexpression von Rad18 lassen sich also Wirkung (PCNA-Ubiquitinierung) und Ursache (DNA-Schaden) entkoppeln. Durch die *RAD18*-Überexpression in unterschiedlichen Mutanten wurde klar, dass das benutzte Lysin, die Art der Ubiquitin-Modifikation (Mono und K63-Multi) und die hierfür notwendigen Enzyme identisch zu der durch DNA-Läsionen induzierten Modifikation sind.

Aus diesem Ergebnis folgt, dass die Interaktion von Rad18 mit PCNA wahrscheinlich der regulierende Schritt für die Modifikation ist. Die anderen Modifikations-Enzyme werden zwar benötigt, stehen aber offensichtlich in ungeschädigten Wildtyp-Zellen mit ausreichender Aktivität zur Verfügung. Ob durch Rad18-Überexpression PCNA unspezifisch ubiquitiniert wird oder die Replikationsgabel angehalten wird, bleibt unklar. Wahrscheinlich bewirkt eine größere Menge von Rad18, das zum Chromatin lokalisiert (Bailly et al., 1994), eine verstärkte, eventuell deregulierte Interaktion mit PCNA.

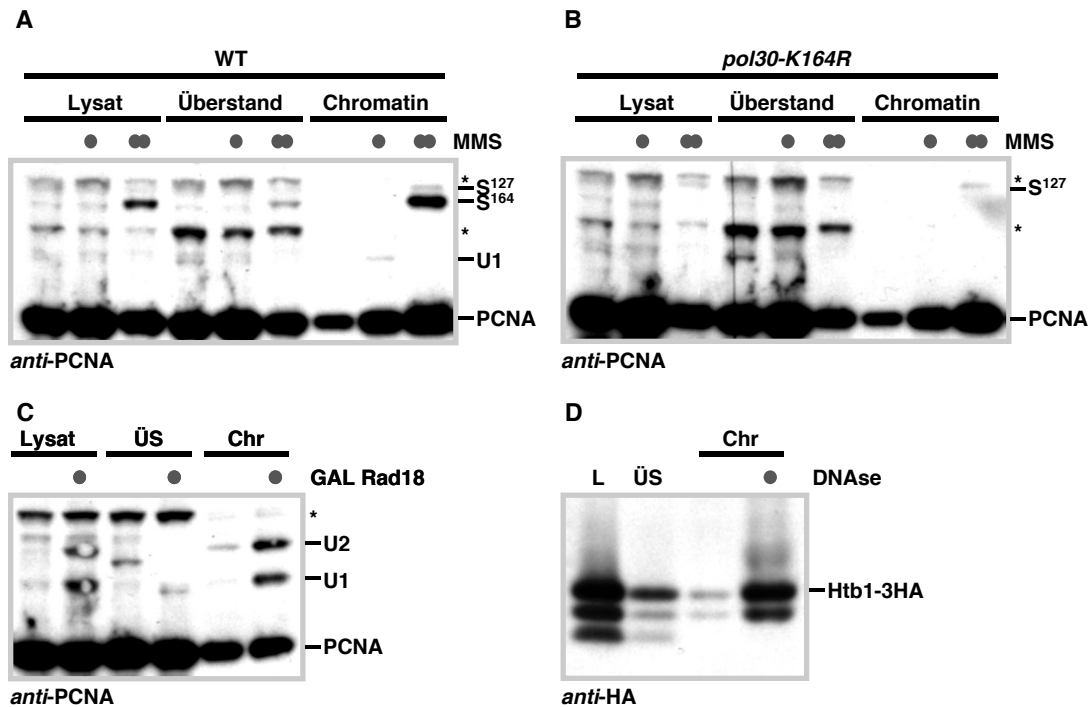
### III.2 Lokalisierung der PCNA-Modifikationen

Eine weitere grundlegende Frage, die in dieser Arbeit untersucht werden sollte, betrifft die Lokalisierung von modifiziertem PCNA. Assoziiert modifiziertes PCNA mit Chromatin oder liegt es nukleoplasmatisch vor? Hierfür wurde eine Methode etabliert, um chromatin-assoziierte Proteine von anderen zu trennen. Durch zwei unterschiedliche Methoden wurde das Chromatin als unlösliches Material aus einem Zellextrakt mit nicht-ionischen Detergenzien gewonnen. Aus diesem Pellet wurden chromatin-assoziierte Proteine durch Verdau der DNA mit DNase oder der Nukleosomen durch Nuklease freigesetzt (Liang und Stillman, 1997; Kai et al., 2001). In einem dritten Experiment wurden Proteine durch Formaldehyd kovalent mit der DNA verknüpft (*crosslink*) und das Chromatin durch eine isopyknische Cäsiumchlorid Gradientenzentrifugation aufgereinigt (Orlando et al., 1997; Ulrich und Jentsch, 2000).

Die Aufreinigung von Chromatin als TritonX-100 unlösliche Fraktion aus Spheroplasten und anschließende Solubilisierung durch Verdau der DNA mit DNase war unaufwendig und lieferte für Histon 2b (**Abb. 8d**) das erwartete Ergebnis: der Großteil von Histon 2b wurde in der Chromatin-Fraktion gefunden. Im Vergleich mit dem Zellysate wurde eine geringere Menge in der Chromatin-Fraktion gefunden, da der Verdau mit DNase chromatin-assoziierte Proteine nur zu einem Teil solubilisierter.

In diesen Experimenten liegt nur ein Teil von PCNA chromatin-assoziiert vor (**Abb. 8a-c**). PCNA Moleküle, die an der Replikation beteiligt sind, sollten aber chromatin-assoziiert vorliegen. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass sich in einer asynchronen Kultur immer nur ein Teil der Zellen in der S-Phase befindet. Entsprechend wurde in synchronisierten Zellen ein Maximum an chromatin-gebundenen PCNA erreicht, wenn diese in S-Phase waren (Daten nicht gezeigt). Mit verstärkter Schädigung der DNA ließ sich eine verstärkte Chromatin-Assoziation von PCNA feststellen (**Abb. 8a-b**).

In diesem Experiment waren die ohnehin geringen Menge an modifiziertem PCNA in den Spheroplasten-Lysaten stark vermindert, wahrscheinlich aufgrund der Aktivität dekonjugierender Enzyme. PCNA-SUMO konnte deshalb in nicht-geschädigten Zellen nicht untersucht werden. Wurde diese Modifikation jedoch experimentell durch Behandlung der Zellen mit einer lethalen Dosis MMS (0,3%) stark induziert, so konnte nachgewiesen werden, dass der überwiegende Anteil von SUMO-modifiziertem PCNA Chromatin-Assoziation aufweist. Nur ein geringer Teil befand sich im löslichen Überstand (**Abb. 8a-b**).



**Abb. 8: Ubiquitin- und SUMO-modifiziertes PCNA assoziiert mit Chromatin:** Für die Aufreinigung von Chromatin wurden Spheroplasten benutzt, welche durch Zugabe von 1% TritonX-100 lysiert wurden. Chromatin wurde im unlöslichen 10000g-Pellet gefunden und aus diesem durch DNase (100u, 30min, 4°C) gelöst. Die Chromatin-Fraktion ist um Faktor 5 stärker konzentriert als das Lysat (L) oder der Überstand (ÜS). **A-C**, PCNA und modifiziertes PCNA wurden in einem *anti-PCNA-western-blot* detektiert. PCNA-Modifikationen: U1– Mono-Ubiquitin an K164, U2– K63-verknüpftes Di-Ubiquitin an K164, S<sup>164</sup>– SUMOylierung an K164, S<sup>127</sup>– SUMOylierung an K127. Der Stern kennzeichnet eine kreuzreaktive Bande.

**A,B**, Chromatin-Bindung von PCNA aus WT- oder *pol30-K164R*-Zellen, die nicht oder mit 0,02% (●) bzw. 0,3% MMS (●●) behandelt wurden. PCNA, wie auch SUMO-modifizierte Spezies finden sich nach Behandlung mit 0,3% MMS zum Großteil in der Chromatin-Fraktion. **C**, Chromatin-Bindung von ubiquitiniertem PCNA wurde in einem Hefe-Stamm untersucht, der Rad18 unter der Kontrolle des GAL-Promoters überexprimiert. Hier befinden sich Ubiquitin-Konjugate von PCNA ausschließlich in der Chromatin-Fraktion. **D**, Als Kontrolle für die Anreicherung von Chromatin wurde ein Hefe-Stamm benutzt, der Htb1 (Histon 2b) als Fusion mit einem 3HA-Epitop exprimiert. Das Fusionsprotein wurde durch anti-HA-western-blot detektiert und war fast vollständig Chromatin-assoziiert.

Eine ähnliche Problematik bestand auch für die Detektion von ubiquitiniertem PCNA. Wurden DNA-Schäden durch 0,02% MMS induziert, so konnte im Gegensatz zu denaturierenden Zellextrakten in den für dieses Experiment benutzten Zellextrakten ubiquitiniertes PCNA kaum nachgewiesen werden. In der Chromatin-Fraktion war lediglich eine schwache Bande zu sehen, welche mono-ubiquitiniertem PCNA entspricht. Anders verhielt es sich, wenn durch Rad18-Überexpression die Ubiquitin-Modifikation ausgelöst wurde: Unter



diesen Bedingung wurden die PCNA-Ubiquitin-Konjugate ausschließlich Chromatin-assoziiert gefunden (**Abb. 8c**).

In Übereinstimmung mit der genetischen Analyse legt dieses Experiment nahe, dass chromatin-gebundenes PCNA modifiziert wird oder aber nach der Modifikation an Chromatin bindet und dort seine Funktion erfüllt.

### **III.3 Regulation der Transläsions-Replikation durch mono-ubiquitiniertes PCNA**

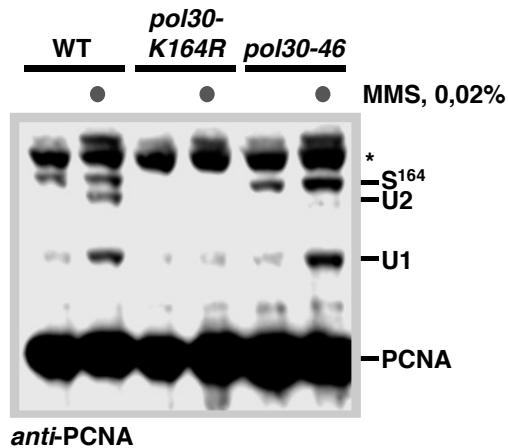
Der *RAD6-pathway* bewirkt zwei mechanistisch unterschiedliche Wege, um den Bypass von DNA-Läsionen zu ermöglichen, durch die Replikationsgabeln blockiert werden (s. II.2.1). Diese Läsionen können einerseits umgangen werden, ohne dass Mutationen erzeugt werden. Bewirkt wird dies durch die Komponenten des fehlerfreien Zweigs des *RAD6-pathways*, welche die Modifikation von PCNA mit einer K63-verknüpften Ubiquitin-Kette katalysieren. Wie hierdurch mechanistisch ein Bypass ermöglicht wird, ist allerdings unklar. Andererseits ist ein Bypass durch Transläsions-Polymerasen möglich (Transläsions-Replikation).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob mono-ubiquitiniertes PCNA eine Rolle in der Transläsions-Replikation spielt. Mehrere Hinweise deuteten auf diese Funktion hin (Hoegge et al., 2002): *mms2*-Mutanten, die lediglich Defekte in der Multi-Ubiquitinierung von PCNA aufweisen, sind weniger sensitiv gegenüber DNA-schädigendem UV-Licht als eine PCNA-Mutante, die nicht mehr ubiquitiniert wird (*pol30-K164R*). Dies weist daraufhin, dass mono-ubiquitiniertes PCNA eine von K63-multiubiquitiniertem PCNA differenzierbare Funktion in der DNA-Reparatur hat. Weiterhin hängt die Funktion von Transläsions-Polymerasen von Rad6 und Rad18 ab, welche sowohl für Mono- als auch für die K63-Multiubiquitinierung von PCNA essentiell sind. Zumindest für Rad18 ist PCNA das einzige phänotypisch relevante Substrat. Dementsprechend sollten alle Rad18-abhängigen Prozesse, also auch die Transläsions-Replikation, auch von PCNA abhängen.

### III.3.1 *pol30-46* ist eine Mutation mit spezifischem Einfluss auf die Multi-Ubiquitinierung

Bereits in früheren genetischen Studien wurde PCNA über eine Mutation, *pol30-46*, eine Funktion im *RAD6-pathway* zugeordnet (Torres-Ramos et al., 1996). Da diese Mutante keinen Defekt in UV-induzierter Mutagenese (s.III.3.2) aufwies und sich nicht-epistatisch mit einer *rev3*-Mutation verhielt, wurde PCNA in den fehlerfreien und nicht in den fehlerbehafteten Arm des *RAD6-pathways* eingeordnet. Diese Ergebnisse stehen also scheinbar im Widerspruch zu einem Modell, nach dem die Mono-Ubiquitinierung von PCNA in Zusammenhang mit Transläsions-Polymerasen steht.

Das *pol30-46*-Allel trägt vier Mutationen gegenüber der Wildtyp-Sequenz von PCNA, EDDE104,105,256,257AAAA, und entstammt einer systematischen Studie von Mutationen saurer oder alkalischer Aminosäuren von PCNA (Ayyagari et al., 1995). Da das Akzeptorlysin für die Ubiquitin-Modifikation von PCNA (K164) durch diese Mutationen nicht direkt beeinflusst ist, erschien es möglich, dass die Modifikation von mutiertem PCNA nicht oder nur begrenzt beeinträchtigt wird. Dies wurde mit einem *anti-PCNA-western-blot* untersucht, für den PCNA Ubiquitinierung in WT-, *pol30-46*- oder als Kontrolle *pol30-K164R*-Hefezellen durch Zugabe von 0,02% MMS zum Wachstumsmedium induziert wurde.

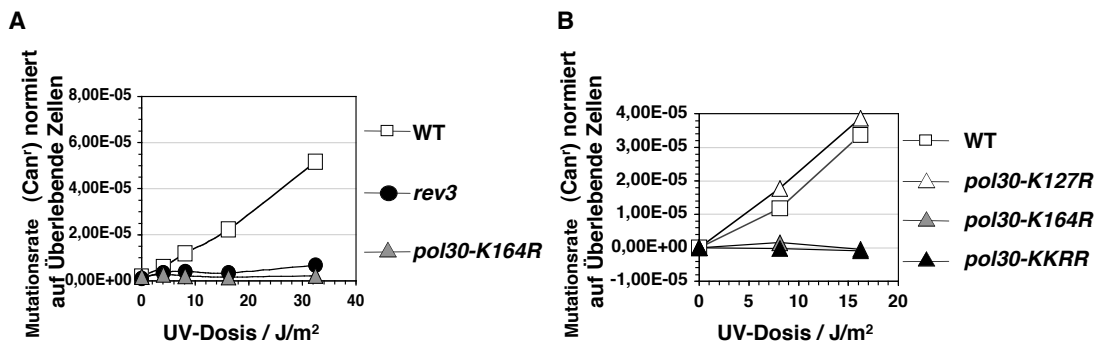


**Abb. 9: In *pol30-46* Mutanten wird PCNA nicht mit K63-Ubiquitinketten modifiziert:** Modifiziertes PCNA in WT-, *pol30-K164R*- und *pol30-46*-Stämmen wurde nach der Induktion von DNA-Schäden durch Zugabe von 0,02% MMS im *anti-PCNA-western-blot* von denaturierenden Zellextrakten nachgewiesen. U1– Mono-Ubiquitin an K164, U2– K63-verknüpftes Di-Ubiquitin an K164, S<sup>164</sup>– SUMOylierung an K164. Der Stern kennzeichnet eine kreuzreaktive Bande.

Wie in **Abb. 9** zu erkennen, kann in der *pol30-46*-Mutante PCNA nicht mit einer K63-Ubiquitinkette modifiziert werden. Die Mono-Ubiquitin- und auch die SUMO-Modifikation hingegen sind unbeeinträchtigt. Dieses Ergebnis korreliert mit der genetischen Einordnung von *pol30-46* in den fehlerfreien Arm des *RAD6-pathways*. Es handelt sich um eine Mutante, in der lediglich die Multi-Ubiquitinierung gestört ist, welche den fehlerfreien Bypass vermittelt. Die *pol30-46*-Mutante ist also in Einklang mit einem Modell, nach dem die Mono-Ubiquitin Modifikation von PCNA den fehlerbehafteten Bypass vermittelt.

### III.3.2 Die durch DNA-Schäden verursachte Mutagenese ist abhängig von ubiquitiniertem PCNA

Der Bypass von DNA-Läsionen durch Transläsions-Replikation kann Mutationen bewirken. Tatsächlich entsteht der Großteil der Mutationen in *S. cerevisiae* auf diese Weise. Am besten untersucht ist die Mutagenese nach Bestrahlung mit UV-Licht. Dieses verursacht hauptsächlich Cyclobutan-Dimere und (6-4)-Photoprodukte aus benachbarten Pyrimidin-Basen. Derartige Läsionen wirken sich auf die Geometrie der DNA aus, ohne dass hierdurch die Basenpaarung oder das *stacking* von Basen eines Stranges beeinflusst wird. Rad30 (Pol  $\eta$ ) besitzt eine erhöhte Toleranz gegenüber solchen geometrischen Störungen und kann deshalb durch diese Läsionen replizieren, ohne dabei Mutationen einzubauen (Washington et al., 2000; Washington et al., 2001; Yu, S. L. et al., 2001). *rad30*-Mutanten zeigen dementsprechend keine Effekte auf die Mutageneserate nach UV-



Bestrahlung.

#### Abb. 10: *pol30-K164R* zeigt keine durch DNA-Schäden induzierte Mutagenese:

Dargestellt sind die Mutationsraten von WT, *rev3*- oder *pol30*-Mutanten nach Bestrahlung mit der angegebenen Dosis UV-Licht. Durch Ausbringen auf Platten mit Canavanin (60  $\mu$ g/ml) wurden Vorwärts-Mutationen im *CAN1*-Gen bestimmt. Die Überlebensraten nach UV-Licht-Bestrahlung wurden bestimmt und zur Normierung der Mutationsfrequenzen auf überlebende Zellen benutzt. Abgebildet sind Mittelwerte aus vier Experimenten (A) oder Werte aus einem Experiment (B).

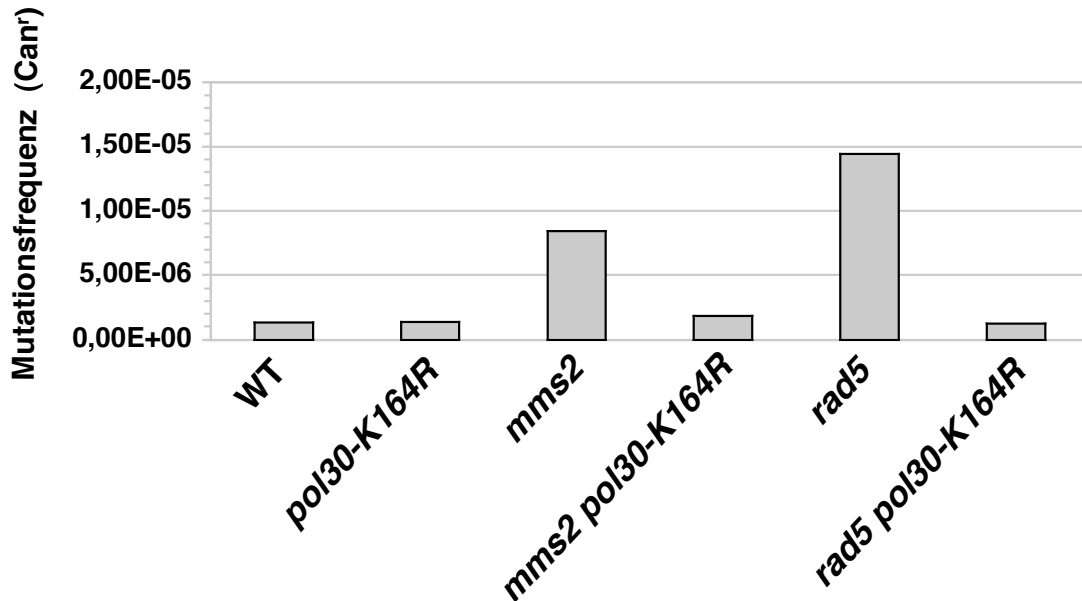
Im Gegensatz hierzu führen Mutationen in *REV1*, Pol  $\delta$  (*pol3-13*, *pol32*) oder Pol  $\zeta$  (*rev3*, *rev7*) zu einer Reduktion dieser Mutationsrate (Lawrence und Christensen, 1976; Giot et al., 1997; Huang et al., 2000). Besonders Pol  $\zeta$  ist in diesem Zusammenhang wichtig, da es als zweite, nachgeschaltete Polymerase die Basen-Fehlpaarung weiterverarbeitet, welche durch Transläsions-Replikation einer anderen Polymerase entstanden ist. Entsprechend zeigen *rev3*-Mutanten im Gegensatz zu Wildtyp so gut wie keine durch UV-Licht induzierte Mutagenese.

Um zu überprüfen, ob ubiquitiniertes PCNA eine Rolle bei der Transläsions-Replikation spielt, wurden die Mutageneseraten nach Bestrahlung mit UV-Licht bestimmt. Hierfür wurde die Inaktivierung von Can1 gemessen, die durch eine Vielzahl von Mutationen im *CAN1*-Lokus erfolgen kann und zu einer Resistenz gegenüber Canavanin führt (s.V.2.2). Nach **Abb. 10a** zeigt eine *PCNA*-Mutante, welche nicht ubiquitiniert werden kann (*pol30-K164R*), keine durch UV-Licht induzierte Mutagenese. Zwar wird durch diese Mutation auch die *PCNA*-SUMOylierung an Lysin K164 verhindert, die SUMOylierung scheint jedoch keinen Einfluss auf die durch UV-Licht bedingte Mutagenese zu haben, da weder die Mutation des zweiten Akzeptor-Lysins, K127, noch eine Mutation der SUMO-Ligase *SIZ1* einen Einfluss hatten (**Abb. 10b** und Daten nicht gezeigt). Weiterhin zeigten Mutanten, welche lediglich Defekte in der Multi-Ubiquitinierung von *PCNA* haben (*pol30-46*, *mms2*), eine normale Induktion von Mutationen nach DNA-Schäden (Torres-Ramos et al., 1996; Brusky et al., 2000). Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass spezifisch die mono-ubiquitinierte Form von *PCNA* an dem mutagenen Bypass von DNA-Läsionen beteiligt ist und hierbei unter anderem mit Pol  $\zeta$  kooperiert.

### *III.3.3 Die PCNA-Monoubiquitinierung ist an der Entstehung von spontanen Mutationen beteiligt*

Das Auftreten von spontanen Mutationen hat im Vergleich zur UV-induzierten Mutagenese vielfältigere Ursachen. Die Transläsions-Replikation ist zwar die Hauptursache, daneben treten jedoch auch allgemeine Replikationsfehler und Mutationen durch Fehler anderer Reparaturmechanismen (z.B. *Mismatch*-Reparatur) auf. Spontane Mutationen werden zum Großteil durch unterschiedliche DNA-Läsionen ausgelöst. Entsprechend sind ca. 50-75% aller spontanen Mutationen von Pol  $\zeta$  abhängig.

Ein Merkmal von Mutanten des fehlerfreien Arms des *RAD6*-pathways (*rad5* oder *mms2*) ist eine erhöhte Zahl spontaner Mutationen.



**Abb. 11: Die Mutationsfrequenz von Mutanten im fehlerfreien Bypass wird durch *pol30-K164R* supprimiert:** Die basale Mutationsfrequenz im *CAN1*-Gen wurde für jeden der angegebenen Hefe-Stämme aus acht unabhängigen Kulturen durch Plattieren auf Canavanin-Medium (60µg/ml) bestimmt. *pol30-K164R* zeigt keine Unterschiede zu WT, unterdrückt aber den Mutator-Phänotyp von *mms2* oder *rad5*.

Dies wird durch eine verstärkte Transläsions-Replikation in diesen Mutanten erklärt. Die Übernahme der Funktion durch den fehlerbehafteten Arm des *RAD6-pathways* hat somit einen Hypermutator-Phänotyp zur Folge. Entsprechend lässt sich die Suppression dieses Phänotyps durch *rev3*-Mutanten beobachten (Liefshitz et al., 1998).

*pol30-K164R*-Mutanten zeigten im Gegensatz zu Mutanten, welche lediglich Defekte in der Multiubiquitinierung haben (z.B. *rad5*, *mms2*) keinen Hypermutator-Phänotyp (**Abb. 11**). Zusätzlich wurde die erhöhte Mutationsrate in *rad5* oder *mms2* durch *pol30-K164R* unterdrückt. In diesen Zellen, in denen PCNA nicht multi-ubiquitiniert werden kann, wirkt sich also die Verhinderung der Mono-Ubiquitinierung von PCNA (durch *pol30-K164R*) genauso aus wie die Deletion der katalytischen Untereinheit von Pol ζ, *REV3* (Liefshitz et al., 1998).

Diese Resultate (**Abb. 9-11**) zeigen, dass die Mono-Ubiquitinierung von PCNA, die durch Rad18 und Rad6 katalysiert wird, für die Transläsions-Replikation essentiell ist. Im Gegensatz hierzu vermittelt die K63-verknüpfte Multiubiquitinierung offensichtlich den fehlerfreien Bypass von Läsionen. Aufgrund der identischen Phänotypen in Bezug auf induzierte sowie spontane Mutagenese erscheint es wahrscheinlich, dass mono-ubiquitiniertes PCNA mit Polymerase ζ kooperiert. Epistasis-Analyse mit *rad30*-Mutanten legen

nahe, dass auch Polymerase  $\eta$  nach einem gleichen Mechanismus arbeitet (C. Hoegel, unveröffentlichte Daten).

Mechanistisch sind mehrere Modelle denkbar. So könnte die Mono-Ubiquitinierung von PCNA Transläsions-Polymerasen zu einer durch eine DNA-Läsion angehaltenen Replikationsgabel rekrutieren oder spezifisch aktivieren. Ebenso ist es möglich, dass diese Modifikation die Assoziation mit der replikativen Polymerase beendet und so erst die Voraussetzung für eine Transläsions-Replikation schafft (s. IV.1).

### III.4 Überexpressions-Suppressoren von *pol30-K164R*

Da in *pol30-K164R*-Mutanten PCNA nicht ubiquitiniert wird und dementsprechend der *RAD6*-vermittelte Bypass von DNA-Schäden nicht funktioniert, sind diese Mutanten hypersensitiv gegenüber DNA-Schäden. Dies sollte ausgenutzt werden, um nach Dosis-Suppressoren zu suchen, also Proteinen, die unter Überexpression den Sensitivitäts-Phänotyp ganz oder teilweise aufheben. Prinzipiell kann dies auf zwei unterschiedlichen Wegen zustande kommen. Einerseits kann die Funktion des *RAD6-pathways* wieder hergestellt werden, der Suppressor wäre dann wahrscheinlich ein Protein, das der PCNA-Ubiquitinierung nachgeschaltet ist und unter normalen, nicht jedoch unter Überexpressions-Bedingungen von dieser Modifikation abhängt. Andererseits ist es auch möglich, dass der Suppressor einen alternativen Bypass von Läsionen ermöglicht, also außerhalb des *RAD6-pathways* wirkt.

Neben diesen Überexpressions-Suppressoren sind bislang zwei weitere Suppressoren bekannt, die jedoch durch einen Aktivitätsverlust (*loss of function*) wirken. Sowohl die Deletion von *SRS2* als auch Mutanten, in denen PCNA nicht SUMOyliert werden kann, bewirken eine solche Suppression. In diesen Mutanten wird ein zum *RAD6-pathway* alternativer Bypass von Läsionen benutzt (s. III.5).

#### III.4.1 Dosis-Suppressions-screen

In dem folgenden Dosis-Suppressions-screen wurde der *pol30-K164R*-Stamm mit einer genomischen Plasmid-Bibliothek transformiert, so dass jeweils unterschiedliche Proteine aufgrund der hohen Kopienzahl des Bibliothek-Plasmids überexprimiert wurden. In mehreren Schritten (**Abb. 12a**) wurden Suppressoren identifiziert, welche ein Wachstum bei unterschiedlichen Konzentrationen an MMS ermöglichten. Aus diesen wurden die Plasmide

isoliert und das Ergebnis durch eine erneute Transformation verifiziert. Die verbliebenen Plasmid-Klone wurden mittels PCR überprüft, um festzustellen, ob sie für PCNA kodierten. Gleiche Plasmid-Klone wurden weiterhin durch Restriktionsanalyse eliminiert und die verbleibenden Klone durch Sequenzierung bestimmt.

Die Ergebnisse des Screens sind in **Abb. 12b** tabellarisch dargestellt. Erwartungsgemäß wurde mit Abstand am häufigsten *POL30* selbst und *YAP1* gefunden. Letzteres wirkt wahrscheinlich indirekt, da es sich hier um den zentralen Transkriptionsfaktor der zellulären Antwort auf oxidativen Stress handelt (Toone et al., 2001). Alle weiteren Suppressoren führten nur zu einer begrenzten Verminderung der Hypersensitivität gegenüber MMS und wurden entsprechend seltener und nur bei Selektion mit einer niedrigeren MMS-Konzentration gefunden.

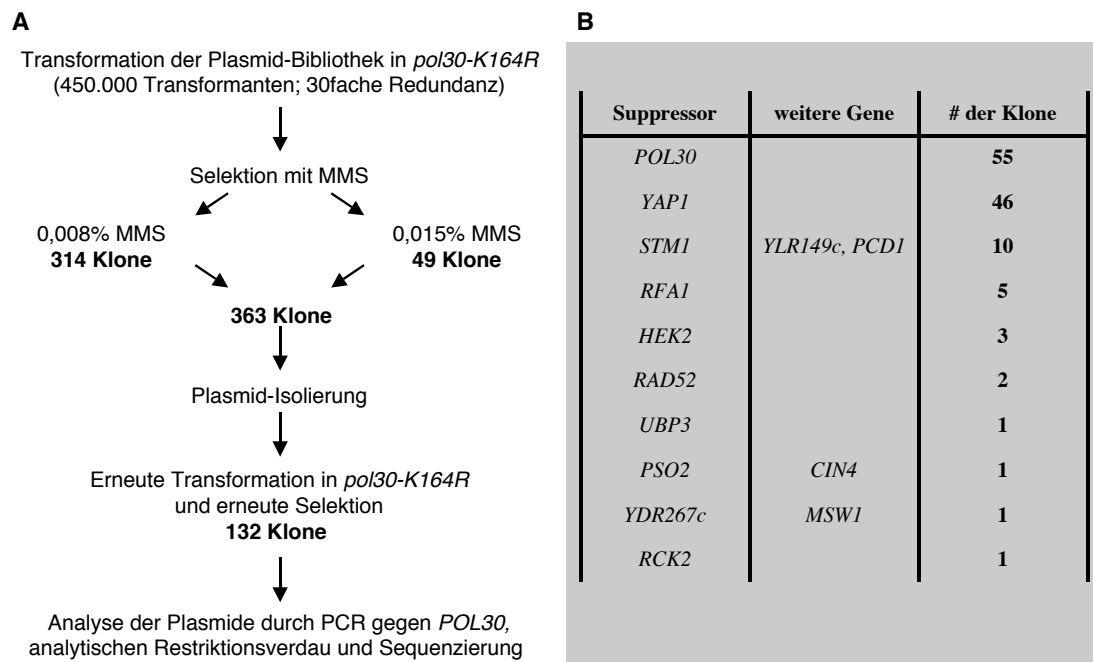
Im Nachfolgenden wurden Überexpressions-Konstrukte hergestellt, die lediglich das Gen des isolierten Suppressors ohne mögliche Mutationen enthielten. Diese wurden auf ihre Eigenschaft getestet, die Hypersensitivität von *pol30-K164R* zu reduzieren. Zwei Gene, *YDR267c* und *RCK2*, erfüllten dieses Kriterium nicht, so daß mit ihnen nicht weiter gearbeitet wurde.

Insgesamt wurden sechs Gene als Dosis-Suppressoren von *pol30-K164R*-Mutanten weiter charakterisiert. Rad52 spielt eine wichtige Rolle als Mediator der homologen Rekombination. Es ist für jeden Rekombinationsprozess essentiell und wirkt nach der Resektion von Doppelstrangbrüchen indem es Rad51 zu Einzelstrang-DNA rekrutiert (Symington, 2002).

*RFA1* kodiert für die große Untereinheit des Replikations-Protein A (RP-A). Hierbei handelt es sich um das Einzelstrang-DNA bindende Protein in Eukaryonten, welches essentiell für die Replikation ist und weitere Funktionen im *DNA-damage-checkpoint* und der DNA-Reparatur besitzt (Wold, 1997).

Stm1 hat aufgrund seiner Interaktion mit Cdc13 wahrscheinlich eine Funktion in der Replikation von Telomeren (Hayashi und Murakami, 2002). Außerdem wurde Stm1 *in vitro* als Bindungspartner von speziellen DNA-Strukturen gefunden (Frantz und Gilbert, 1995; Nelson et al., 2000). Hierbei handelt es sich um Helices aus drei oder vier DNA-Strängen (Purin-Triplex-DNA, G4-Helix).

Pso2 ist essentiell für die Reparatur spezieller, sehr toxischer DNA-Läsionen, bei denen beide DNA-Stränge kovalent verknüpft sind (*interstrand crosslinks*). Wie Pso2 bei diesem komplexen Reparaturvorgang wirkt, ist bislang noch nicht genau verstanden (Brendel et al., 2003).



**Abb. 12: Ergebnisse des Dosis-Suppressions-screens:** **A**, Flussdiagramm des Screens; der Hefestamm *pol30-K164R* wurde mit der L9-Plasmid-Bibliothek transformiert (Labor M. Hall). Die Transformationseffizienz wurde auf 450.000 Transformanten bestimmt, was einer 30fachen Redundanz entspricht. Suppressoren wurden durch Replikaplattierung auf Medium mit unterschiedlicher MMS-Konzentration selektioniert. Aus 363 Klonen wurde das Plasmid isoliert und nach erneuter Transformation getestet, ob es jeweils die Sensitivität von *pol30-K164R* retten kann. 132 positive Plasmid-Klone wurden durch PCR auf *POL30* getestet. Dabei exprimierten alle 49 Klone, welche auf der höheren MMS-Konzentration wuchsen, PCNA. Die restlichen Plasmide wurden durch Restriktionsverdau und Sequenzierung analysiert. **B**, Tabellarische Darstellung der gefundenen Dosis-Suppressoren. In der Regel befand sich jeweils nur ein vollständiges Gen auf dem Plasmid. Für *STM1* konnten andere auf den Plasmiden kodierte Gene ausgeschlossen werden, da unterschiedliche, nur partiell überlappende, Plasmid-Klone gefunden wurden. Aufgrund bekannter Funktionen von *CIN4* und *MSW1* außerhalb der DNA-Reparatur erscheint ein Einfluß dieser Gene unwahrscheinlich.

Ubp3 ist ein Ubiquitin-dekonjugierendes Enzym, welches bisher funktionell im Kontext der Transkription und des Vesikel-Transports eingeordnet wurde (Moazed und Johnson, 1996; Cohen et al., 2003; Auty et al., 2004). Ubp3 könnte ein Regulator der Ubiquitin-Modifikation von PCNA sein (s. III.4.2), bei einem Ubiquitin-dekonjugierenden Enzym würde man jedoch eine negative Wirkung auf die von PCNA-Ubiquitinierung abhängende DNA-Reparatur erwarten. Weiterhin fehlt die Ubiquitinierung in der *pol30-K164R*-Mutante, so dass die Überexpression von Ubp3 nicht nur durch eine Regulation der PCNA-Ubiquitinierung wirken kann.

Auch für Hek2 war bislang nur eine Funktion in der Transkription bekannt (Denisenko und Bomsztyk, 2002). Ähnlich wie bei *YAP1* ist es bei Hek2 und

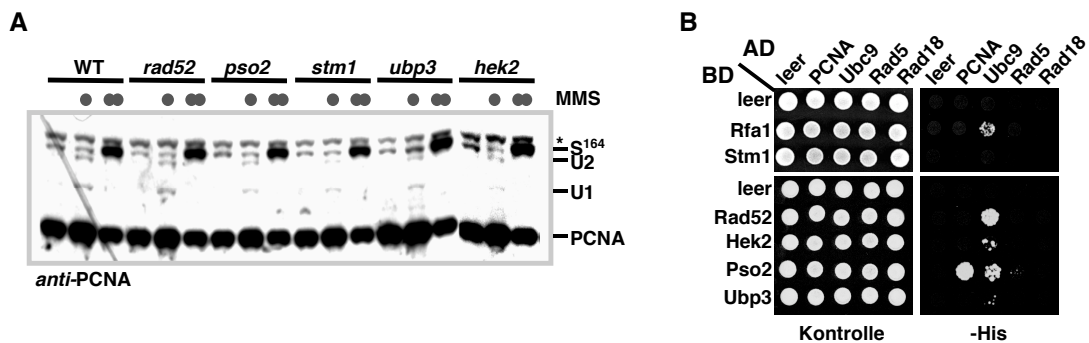


Ubp3 somit möglich, dass sie indirekt über die transkriptionelle Aktivierung anderer Gene wirken.

### III.4.2 Analyse der Suppressoren in Bezug auf ihre Bindung an PCNA und modifizierte Formen von PCNA

Eine mögliche Erklärung für die Suppression des Phänotyps der *pol30-K164R*-Mutante wäre, dass es sich bei den Suppressoren um Faktoren handelt, die der PCNA-Ubiquitinierung direkt nachgeschaltet wirken. Dies könnten Proteine sein, die mit ubiquitiniertem PCNA interagieren. Unter Überexpressionsbedingungen könnte dann die Interaktion mit PCNA, welches nicht modifiziert ist, ausreichen, um die Reperatur-Funktion zu ermöglichen.

In diesem Fall könnte die Überexpression Auswirkungen auf die Menge an ubiquitiniertem PCNA haben, wenn diese Spezies durch die Interaktion z.B. vor dekonjugierenden Enzymen geschützt werden. Ein solcher Effekt wurde für die Interaktion von SUMO-modifiziertem PCNA und Srs2 entdeckt (s. III.5). Es zeigte sich aber, dass weder die Deletion der Suppressoren, noch deren Überexpression zu einer Veränderung der PCNA-Modifikationen führte (**Abb. 13a** und Daten nicht gezeigt).



**Abb. 13: Einfluß der Dosis-Suppressoren auf die Modifikation von PCNA sowie die Interaktion mit PCNA:** **A**, PCNA-Modifikationen in Mutanten der Suppressoren. Zellen wurden nicht oder mit 0,02% MMS (●) bzw. 0,3% MMS (●●) behandelt. PCNA und modifiziertes PCNA wurden in einem *anti-PCNA-western-blot* detektiert. PCNA-Modifikationen: U1– Mono-Ubiquitin an K164, U2– K63-verknüpftes Di-Ubiquitin an K164, S<sup>164</sup>– SUMOylierung an K164. Der Stern kennzeichnet eine kreuzreaktive Bande. **B**, *Two-hybrid*-Analyse mit PCNA, Ubc9, Rad5, Rad18 und den Dosis-Suppressoren. Die entsprechenden Proteine wurden als Fusion mit der Aktivierungs- (AD) oder DNA-Bindedomäne (BD) des Transkriptionsfaktors GAL4 exprimiert. Interaktionen wurden auf Platten ohne Histidin (-His) visualisiert.

Interaktoren von ubiquitiniertem PCNA sollten mit Ubiquitin interagieren. Eine Interaktion mit PCNA erscheint ebenfalls wahrscheinlich, da so Spezifität gewährleistet werden könnte. Aus diesem Grund wurden die Suppressor-Proteine mit Hilfe der *two-hybrid*-Technik auf Interaktion mit PCNA getestet (**Abb. 13b**).

In diesem Experiment interagierte lediglich Pso2 mit PCNA, das somit ein möglicher Kandidat für einen PCNA-nachgeschalteten Reparatur-Faktor ist. Die anderen Suppressoren interagierten nicht mit PCNA. Der fehlende Nachweis einer Interaktion im *two-hybrid* kann aber auch eine Reihe von technischen Gründen haben, z.B. kann das Fusionsprotein falsch gefaltet oder falsch lokalisiert sein. Zumindest die Fusionen mit Rfa1 und Rad52 scheinen aber funktionell zu sein, da für diese Proteine eine Interaktion mit Ubc9 nachgewiesen werden konnten.

Es erschien weiterhin möglich, dass ein der PCNA-Ubiquitinierung nachgeschalteter Faktor mit Elementen der Konjugationsmaschinerie, also Rad18 oder Rad5, interagiert. Allerdings zeigten die Suppressor-Proteine weder zu Rad18 noch zu Rad5 eine Interaktion im *two-hybrid*-System.

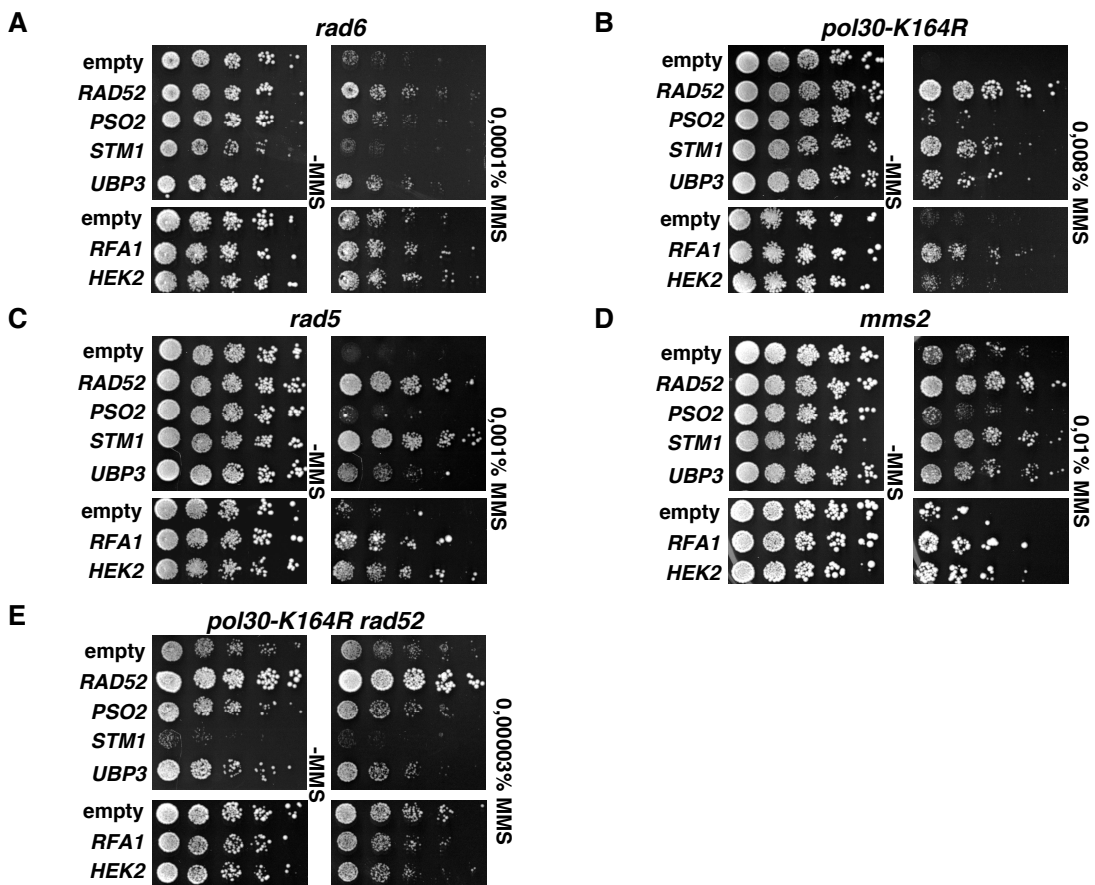
Insgesamt sprechen diese Daten also eher dafür, dass die Suppressoren die *pol30-K164R*-Mutante retten, indem sie einen alternativen Bypass von Läsionen ermöglichen und nicht im *RAD6-pathway* wirken. Eine Ausnahme könnte Pso2 bilden, das direkt mit PCNA interagiert. Auch Pso2 zeigt allerdings keine bevorzugte Interaktion mit ubiquitiniertem PCNA (Daten nicht gezeigt). Insgesamt legen diese Ergebnisse nahe, dass keine Faktoren gefunden wurden, die der Ubiquitin-Modifikation von PCNA nachgeschaltet wirken. Dementsprechend ist wahrscheinlich die Modifikation von PCNA für die Funktion solcher Faktoren essentiell.

### *III.4.3 Dosis-Suppression von Mutanten des RAD6-pathways*

Es wurde weiterhin untersucht, ob die gefundenen Dosis-Suppressoren nur spezifische Defekte der *pol30-K164R*-Mutante oder allgemein Mutanten des *RAD6-pathways* supprimieren. Neben *pol30-K164R* und *rad6* wurden *rad5* und *mms2* benutzt, die auf den fehlerfreien Bypass wirken (s. Abb. 14a-d). Generell werden auch diese Mutanten in ihren Sensitivitäten gegenüber DNA-Schäden supprimiert, die gefundenen Gene können also allgemein Defekte im replikativen Bypass von Läsionen kompensieren. Erneut verhielt sich Pso2 abweichend von den anderen Suppressoren: durch Pso2-Überexpression wurden spezifisch Mutanten gerettet, die auch Defekte in der Transläsions-

Replikation aufweisen (*rad6*, *pol30-K164R*). *mms2*- oder *rad5*-Mutanten, die lediglich Defekte im fehlerfreien Bypass aufwiesen, blieben unbeeinflusst.

Rad52 war der stärkste in diesem Screen gefundene Dosis-Suppressor. Diese Ergebnis ist von besonderer Bedeutung, da es zeigt, dass Zellen, in denen PCNA nicht modifiziert werden kann, DNA-Schäden durch Aktivierung eines Rad52-abhängigen Reparaturmechanismus überleben können. Aufgrund dieser mit dem RAD6-pathway überlappenden Funktion, erscheint es plausibel, dass hier ebenfalls einen Bypass von Läsionen während der Replikation ermöglicht wird.

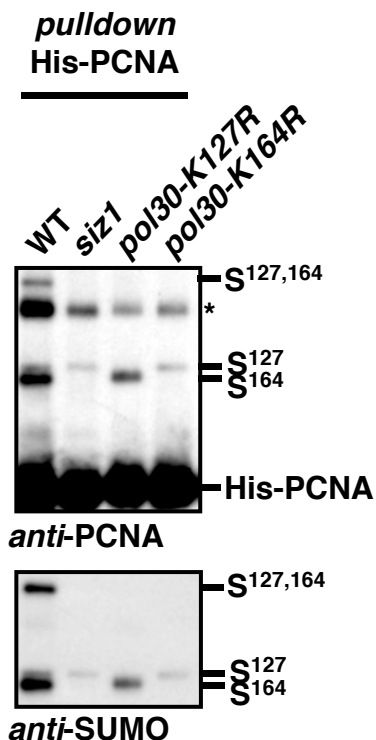


**Abb. 14: Einfluss der Dosis-Suppressoren auf Mutanten des RAD6-pathways:** A-E, Die Hefemutanten *rad6* (A), *pol30-K164R* (B), *rad5* (C), *mms2* (D) und *pol30-K164R rad52* (E) wurden mit Konstrukten zur Überexpression des jeweiligen Dosis-Suppressors transformiert. Serielle Verdünnungen dieser Stämme wurden auf Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen von MMS getüpfelt und drei Tage bei 30°C inkubiert. *Stm1* Überexpression ist in *pol30-K164R rad52* bereits ohne zusätzliche DNA-Schäden toxisch und führt in *rad6*-Mutanten zu erhöhter Sensitivität. Das verwendete *PSO2*-Konstrukt zeigt, verglichen mit dem im Screen isolierten, deutlich schwächere Effekte. Dies könnte mit einer niedrigeren Expression aufgrund verkürzter Promotor- und Terminator-Regionen zusammenhängen.

In einem weiteren Experiment (**Abb. 14e**) wurde überprüft, ob auch die anderen Suppressoren wirken, indem sie Rekombination aktivieren. Hierfür wurde die Doppelmutante *pol30-K164R rad52* benutzt, in der zusätzlich zu den PCNA-Modifikationen auch jegliche Rekombination inaktiviert ist. Außer *RAD52* konnte keiner der Suppressoren den Phänotyp dieser Mutante retten. Hieraus wurde gefolgert, dass eine Aktivierung des rekombinativen Bypass der Suppression zu Grunde liegt.

### III.5 Die PCNA SUMOylierung inhibiert Rekombination an der Replikationsgabel durch die Rekrutierung von Srs2

PCNA wird in *S. cerevisiae* neben Ubiquitin auch mit SUMO modifiziert. Wie in Abschnitt II.2.3 beschrieben, erfolgt diese Modifikation in der S-Phase, an zwei unterschiedlichen Lysinen (K127 und K164) und unabhängig von DNA-Schäden. Durch genetische Experimente konnte die SUMO-Modifikation von PCNA mit DNA-Reparatur in Verbindung gebracht werden (Hoege et al., 2002): Im Hintergrund von Mutanten, die Defekte im *RAD6-pathway*, also der PCNA-Ubiquitinierung haben, wirkt sich die SUMO-Modifikation schädlich auf die Toleranz von DNA-Schäden aus.



**Abb. 15: Siz1 vermittelt die PCNA-SUMOylierung an K164:** PCNA und modifiziertes PCNA wurden durch NiNTA-*pull-down* von His-PCNA angereichert und im *western-blot* mit *anti-PCNA*-, bzw. *anti-SUMO*-Antikörpern nachgewiesen. Wildtyp PCNA wies einfache SUMO-Modifikationen an K127 (S127) und K164 (S164) auf. Außerdem existiert doppelt modifiziertes PCNA (S127,164). *siz1*-Mutanten zeigten lediglich eine Modifikation an K127. Als Kontrolle dienten die entsprechenden Lysin-Mutanten. Der Stern markiert eine kreuzreaktive Bande.

Da die Ubiquitinierung und ein Großteil der SUMOylierung das gleiche Lysin betreffen, wurden *rad18*-Mutanten verwendet, um gezielt den Einfluss der Ubiquitinierung zu untersuchen. *RAD18* ist einerseits für die Ubiquitinierung von PCNA essentiell, andererseits gibt es kein anderes Substrat, das zum Phänotyp beiträgt. Ähnliche Mutanten wurden für die Untersuchung der SUMO-Modifikation gesucht, welche von *UBC9* und *SIZ1* abhängt. Beide Enzyme haben aber zusätzliche Substrate (Johnson und Gupta, 2001). In Bezug auf die SUMOylierung von PCNA zeigten *siz1*-Mutanten keine Modifikation von K164 (**Abb. 15**). Die Modifikation an K127 hingegen ist unabhängig von *SIZ1*, wahrscheinlich da die Modifikationsstelle die  $\Psi$ KxD/E-Konsensus-Sequenz für SUMOylierung aufweist. Die SUMOylierung an diesem Lysin verläuft überwiegend unabhängig von einem E3-Enzym, da Ubc9 direkt mit dieser Sequenz interagieren kann (Bernier-Villamor et al., 2002).

Diesen Daten entsprechend verhält sich die *siz1 rad18*-Mutante, die keine Ubiquitinierung und SUMOylierung an K164 aufweist, in ihrer Sensitivität gegenüber DNA-Schäden identisch zu *pol30-K164R* oder *rad18 pol30-K164R* (vgl. **Abb 15b** und **Abb15d**). In Bezug auf die DNA-Reparatur ist PCNA also das einzige relevante Substrat von Siz1. Entsprechend kann eine *siz1*-Mutante benutzt werden, um spezifische Effekte zu untersuchen, welche durch die fehlende SUMOylierung an K164 entstehen.

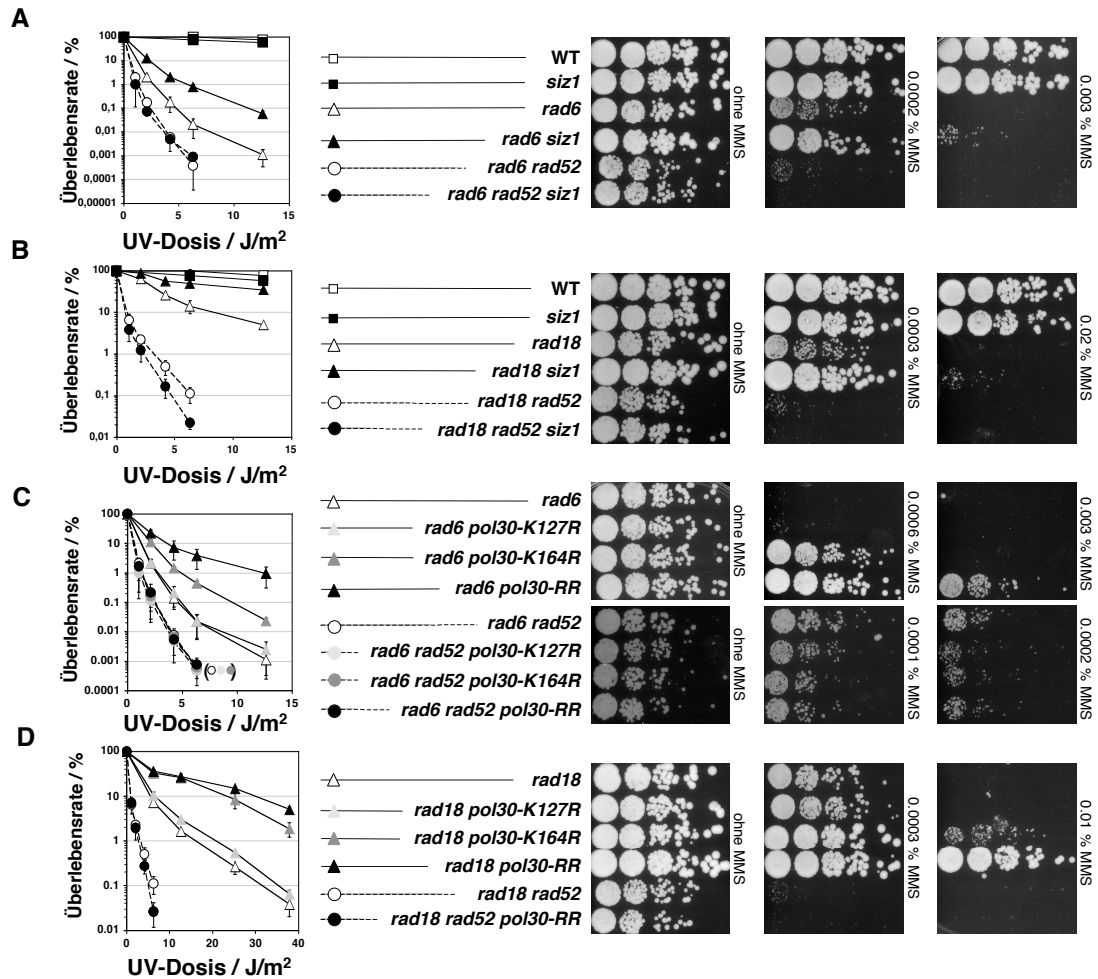
### *III.5.1 Die PCNA SUMOylierung inhibiert homologe Rekombination*

Die funktionelle Charakterisierung der PCNA-SUMO-Modifikation in Bezug auf DNA-Reparatur-Prozesse war ein Schwerpunkt dieser Arbeit. Für diese Analyse wurde die Sensitivität von unterschiedlichen Hefe-Mutanten gegenüber UV-Strahlung quantitativ in Form von Überlebensraten erfasst. Zusätzlich wurde die Sensitivität gegenüber der DNA-alkylierenden Substanz MMS semi-quantitativ mit einem Wachstumstest bestimmt.

In Analogie zu früheren Ergebnissen (Hoege et al., 2002; Stelter und Ulrich, 2003), zeigte die *siz1*-Mutante eine Suppression des Phänotyps von Mutanten des *RAD6-pathways* (**Abb. 16**). Dies gilt sowohl für Mutanten (*rad6*, *rad18*), in denen PCNA nicht ubiquitiniert wird, als auch für Mutanten (*rad5*, *mms2*), welche einen spezifischen Defekt in der Multiubiquitinierung und somit im fehlerfreien Bypass von DNA-Läsionen haben (**Abb. 18a,b**).

Da *rad6*- und *rad18*-Mutanten keine Ubiquitinierung von PCNA aufweisen, beeinflusst in diesem Hintergrund die Mutation des K164-Akzeptorlysins allein die Funktion der SUMOylierung. Die Hypersensitivität von *rad18*-Mutanten

wird durch *siz1* und *pol30-K164R* wie erwartet zu gleichem Ausmaß supprimiert (**Abb. 16a-d**). Die zusätzliche Mutation von Lysin K127 bewirkte eine geringe, zusätzliche Suppression (**Abb. 16c**). SUMOylierung an beiden Lysinen wirkt also additiv. Weiterhin scheint der Suppressions-Phänotyp proportional zu der Menge an SUMOylierung zu sein, da Mutation des schwächer modifizierten Lysins K127 nur einen vergleichsweise geringen Effekt hatte.



**Abb. 16: Die Suppression der Hypersensitivität gegenüber DNA-Schäden von Mutanten des *RAD6*-pathways durch Mutanten mit gestörter PCNA-SUMOylierung hängt von *RAD52* ab:** A-D, die Sensitivität der angegebenen Hefe-Mutanten gegenüber UV-Licht wurde quantitativ als Überlebensrate nach Bestrahlung mit einer bestimmten Menge UV-Licht ermittelt (links). Abgebildet sind Mittelwerte von drei bis sieben unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Zusätzlich wurde die Sensitivität dieser Mutanten gegenüber MMS bestimmt (rechts). Hierfür wurde das Wachstum einer seriell verdünnten Hefekultur auf Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen von MMS bestimmt.

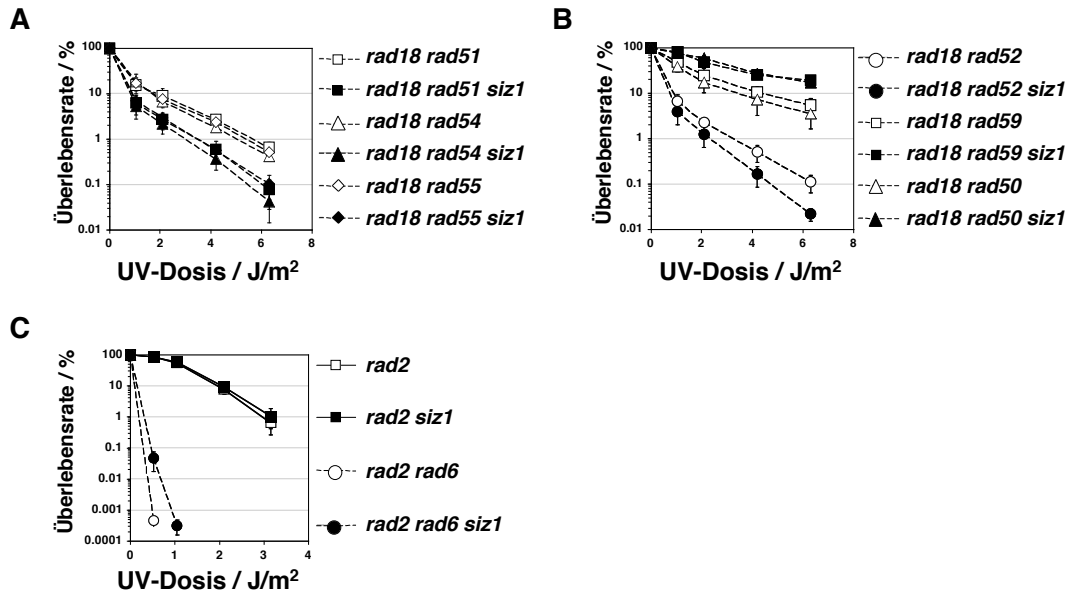
Die Suppression wurde weder im Wildtyp-Hintergrund noch in Mutanten anderer DNA-Reparaturwege (*RAD2* oder *RAD52*, **Abb. 17c**, **Abb. 18c**) beobachtet. Deshalb ist die SUMOylierung spezifisch dann inhibitorisch für die DNA-Reparatur, wenn der *RAD6-pathway* durch Mutation inaktiviert wurde. Entsprechend muss die SUMO-Modifikation einen Reparaturweg inhibieren, der in Mutanten des *RAD6-pathways* aktiv wird, d.h. überlappende Funktionen zum *RAD6*-vermittelten Bypass besitzt.

Überexpression von *RAD52* kann die Hypersensitivität von Mutanten des *RAD6-pathways* supprimieren (s. III.4.3). Zellen, in denen PCNA nicht ubiquitiniert werden kann, können also durch Aktivierung eines *RAD52*-abhängigen Bypass DNA-Schäden überleben. Deshalb erschien es wahrscheinlich, dass es sich bei dem alternativen Reparaturweg, der durch PCNA-SUMOylierung inhibiert wird, um homologe Rekombination handelt.

Um dies zu überprüfen, wurden die entsprechenden Experimente im *rad52*-Hintergrund wiederholt. In diesem Hintergrund wurde keine Suppression des Phänotyps von *rad6*- oder *rad18*-Mutanten durch *siz1* oder Lysin-Mutanten von PCNA beobachtet (**Abb. 16a-d**). Die Suppression erfordert also einen funktionellen *RAD52-pathway*. Entsprechend muss der Bypass, welcher durch PCNA-SUMOylierung inhibiert wird, über Rad52 verlaufen.

Bei diesem Bypass kann es sich um homologe Rekombination handeln oder um eine spezielle Funktion von Rad52. Um dies zu klären, wurde die Suppression der Hypersensitivität von *rad18* durch *siz1* in weiteren Mutanten des *RAD52-pathways* untersucht (**Abb. 17**). Neben Rad52 sind die Rekombinase Rad51, die DNA-abhängige Helikase Rad54 und das Rad55/Rad57-Dimer, das neben Rad52 als Mediator fungiert, für die zentrale Rekombinationsaktivität verantwortlich (Symington, 2002). Mit den entsprechenden Mutanten wurden identische Effekte wie mit *rad52* beobachtet (**Abb. 17a**). Der durch SUMOylierung von PCNA inhibierte Bypass von DNA-Schäden ist also von allen klassischen Rekombinationsfaktoren abhängig.

Im Gegensatz hierzu ist der Bypass nicht vom Mre11-Rad50-Xrs2-Komplex abhängig (**Abb. 17b**), einem Nuklease-Komplex der als Rekombination-vorgeschalteter Faktor in der Resektion der DNA-Strangenden bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen fungiert. Genausowenig wurde eine Abhängigkeit von Rad59 beobachtet (**Abb. 17b**), einem Rad52-Homolog, das wahrscheinlich *RAD51*-unabhängige Rekombination vermittelt (Symington, 2002).

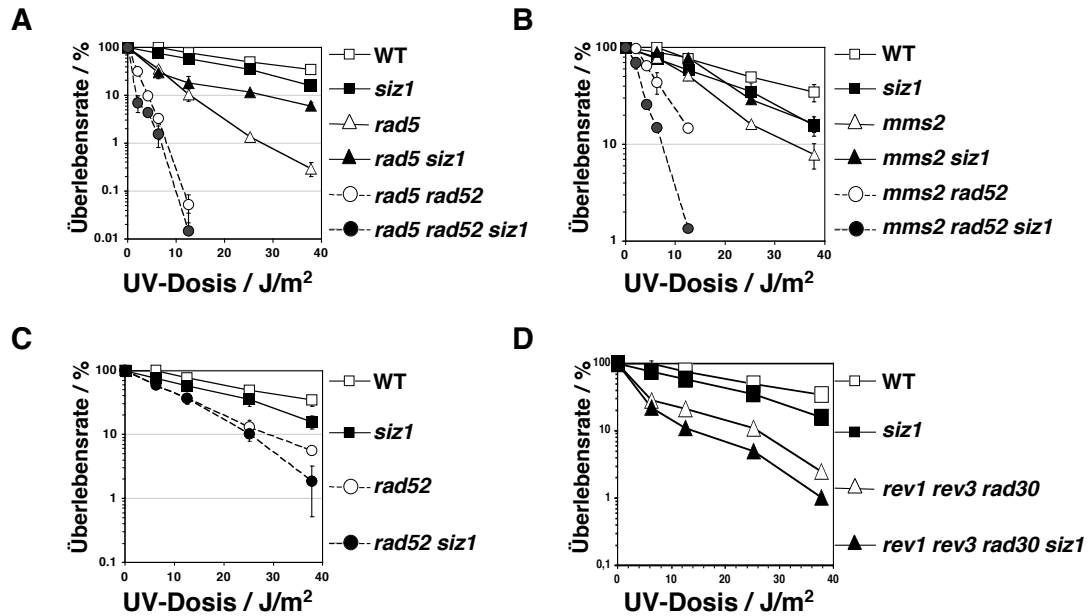


**Abb. 17: Suppression der Sensitivität von *rad18* durch *siz1* erfordert die zentralen Komponenten der homologen Rekombination: A-C**, die Sensitivität der angegebenen Hefe-Mutanten gegenüber UV-Licht wurde quantitativ als Überlebensrate nach Bestrahlung mit UV-Licht bestimmt, wie für Abb. 16 beschrieben.

Dass die Suppression des Phänotyps von *RAD6-pathway*-Mutanten durch Mangel an PCNA-SUMOylierung spezifisch Rekombination benötigt, wurde mit einer *rad2*-Mutante gezeigt, in der keine Nukleotid-Exzisions-Reparatur möglich ist. Eine *rad6 rad2*-Mutante zeigt eine ausgeprägte Hypersensitivität gegenüber UV-Licht, die Suppression des *rad6*-Phänotyps durch *siz1*-Mutation ist aber nicht beeinträchtigt (**Abb. 17c**).

Wie aus **Abb. 18a-b** zu erkennen, werden auch Mutanten, in denen lediglich der fehlerfreie Arm des *RAD6-pathways* inaktiv ist (*rad5* oder *mms2*), durch *siz1* gerettet. Diese Suppression ist gleichfalls von Rad52 abhängig. Auch dies ist durch den alternativen, rekombinativen, durch PCNA-SUMOylierung inhibierten Bypass zu erklären. Im Gegensatz hierzu wird die Sensitivität einer Mutante (*rev1 rev3 rad30*), in der alle drei Transläsions-Polymerasen des fehlerbehafteten Arms des *RAD6-pathways* deletiert sind, durch *siz1* nicht supprimiert. Bei einem nicht-funktionierenden Bypass durch Transläsions-Replikation wird also der rekombinative Bypass nicht benutzt. Ein Erklärungsansatz wäre, dass nur der fehlerfreie und der rekombinative Bypass überlappende Funktionen haben, während der fehlerbehaftete Bypass durch Transläsions-Polymerasen alleine steht, da z.B. unterschiedliche Substrate existieren.





**Abb. 18:** Die Sensitivitäten von Mutanten im fehlerfreien Zweig des *RAD6*-pathways werden im Gegensatz zu Mutanten der Transläsions-Polymerasen durch *siz1* vermindert. Diese Suppression ist abhängig von *RAD52*: A-D, die Sensitivität der angegebenen Hefe-Mutanten gegenüber UV-Licht wurde quantitativ als Überlebensrate nach Bestrahlung mit UV-Licht bestimmt, wie in Abb. 16 beschrieben.

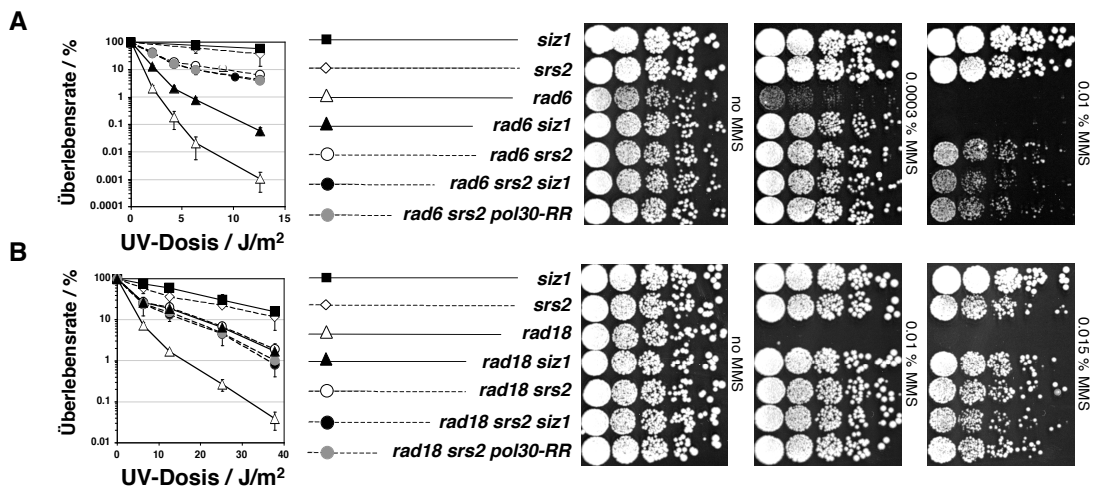
Dagegen spricht, dass der fehlerfreie und der fehlerbehaftete Bypass funktionell zum Teil redundant sind. Entsprechend erscheint es wahrscheinlicher, dass in *rev1 rev3 rad30* der fehler-freie Arm des *RAD6*-pathways kompensieren kann und deshalb der rekombinative Bypass nicht verstärkt benutzt wird.

In Mutanten des *RAD6*-pathways wird durch Mutation von *siz1* oder *PCNA*-Lysin-Mutanten eine Verminderung der Sensitivität gegenüber DNA-Schäden beobachtet. Wie beschrieben führt die Mutation des *RAD52*-pathways zur Aufhebung dieses Effektes. In solchen Doppelmutanten führt die fehlende *PCNA*-SUMOylierung zu einer geringen, aber signifikanten Erhöhung der Sensitivität gegenüber DNA-Schäden (**Abb. 16b,d, Abb. 17a, Abb. 18a-c**). Neben der Inhibition des *RAD52*-abhängigen Bypass scheint die *PCNA*-SUMOylierung also noch eine weitere Funktion zu haben. Auffällig ist, dass diese Effekte in Doppelmutanten mit *rad18*, *rad5* und *mms2* ausgeprägt sind, während sie hingegen in Doppelmutanten mit *rad6* wahrscheinlich aufgrund der sehr hohen Sensitivität dieses Stammes kaum zu beobachten sind (**Abb. 16a,c**).

### III.5.2 SUMOyliertes PCNA kooperiert mit Srs2 durch direkte Interaktion

Die Funktion der SUMO-Modifikation von PCNA zeigt starke Parallelen zu der bereits bekannten Funktion von Srs2, das als negativer Regulator von homologer Rekombination wirkt. *srs2*-Mutanten zeigen einen sehr ähnlichen Phänotyp: Sie vermindern die Sensitivität von *RAD6-pathway*-Mutanten in Abhängigkeit von homologer Rekombination (Lawrence und Christensen, 1979; Schiestl et al., 1990; Aboussekhra et al., 1992; Palladino und Klein, 1992). Durch biochemische Untersuchungen wurde weiterhin herausgefunden, dass Srs2 den Rekombinationsprozess inhibiert, indem es Rad51-DNA-Filamente auflöst (Krejci et al., 2003; Veaute et al., 2003).

Durch genetische Experimente wurde überprüft, ob Srs2 und die SUMO-Modifikation von PCNA Rekombination unabhängig voneinander inhibieren oder ob beide funktionell kooperieren. Hierfür wurden im *rad6*- oder *rad18*-Hintergrund Mutanten mit Defekten in der SUMOylierung von PCNA mit *srs2* kombiniert (**Abb. 19**). Durch die fehlende PCNA-SUMOylierung wurde keine zusätzliche Suppression, verglichen mit *srs2*-Mutanten, erreicht. Srs2 und PCNA-SUMOylierung verhalten sich also epistatisch, d.h. es liegt eine funktionelle Kooperation vor.

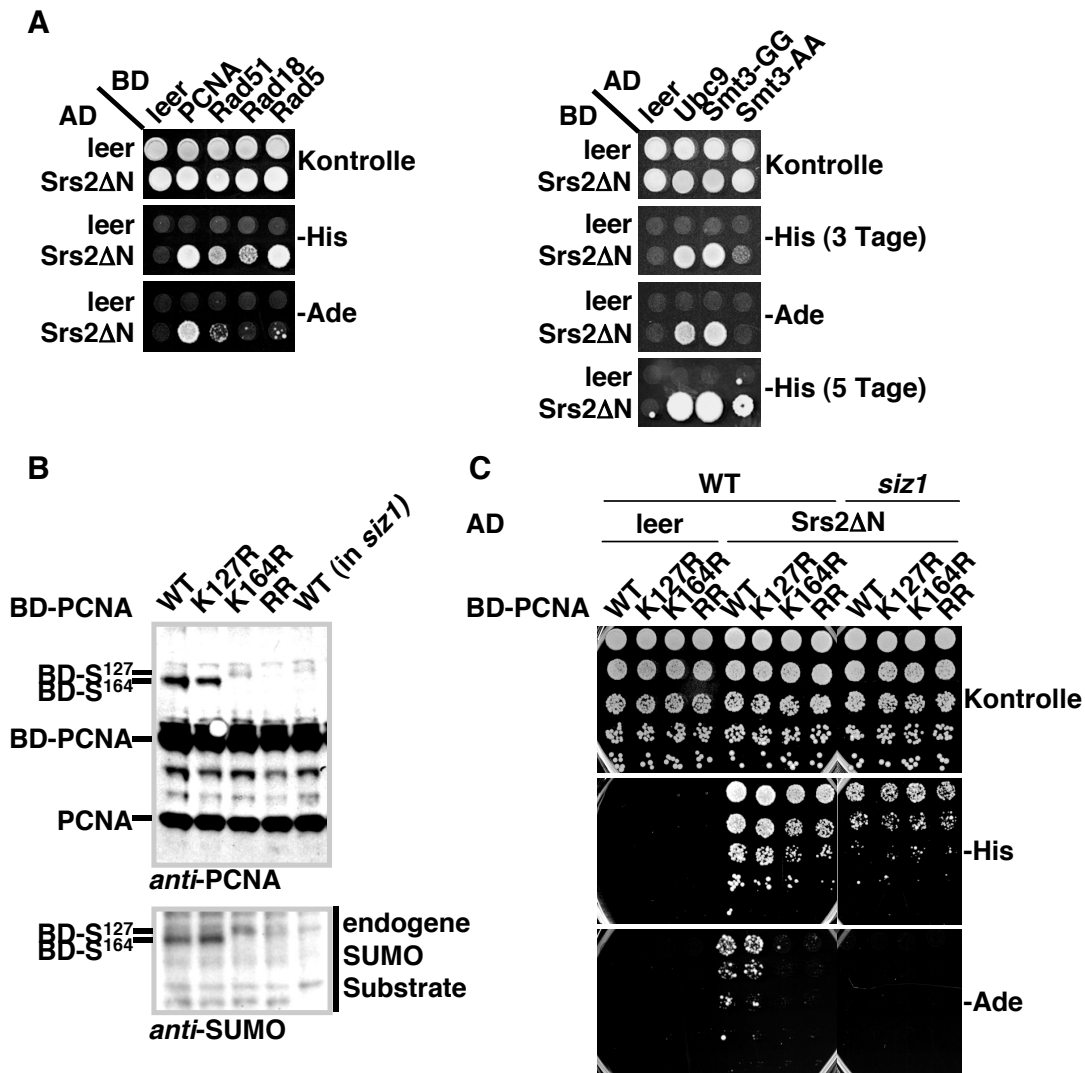


**Abb. 19: Mutanten mit Defekten in der SUMOylierung von PCNA verhalten sich epistatisch zu *srs2* in Hinsicht auf die Suppression von *RAD6-pathway*-Mutanten: A-B, die Quantifizierung der Sensitivitäten der angegebenen Hefe-Mutanten gegenüber UV-Licht und die Sensitivitäten gegenüber MMS wurden bestimmt, wie in Abb. 16 beschrieben.**

Während *rad18 srs2*, *rad18 siz1*, *rad18 srs2 siz1* und *rad18 srs2 pol30-RR* praktisch identische Phänotypen haben (**Abb. 19b**), werden *rad6*-Mutanten stärker durch *srs2* als durch Defekte in der SUMOylierung von PCNA supprimiert (**Abb. 19a**). Die Defekte dieser Mutante werden also durch zwei Mechanismen gerettet; beide sind abhängig von *SRS2*, aber nur einer von der PCNA-SUMOylierung. Wie zuvor beobachtet (z.B. in *rad18 rad52* Mutanten) führen Defekte in der SUMOylierung von PCNA zu einer geringen zusätzlichen Hypersensitivität gegenüber DNA-Schäden, die unabhängig von den *RAD6*- und *RAD52-pathways* ist. Mit diesem Effekt lässt sich auch die geringe zusätzliche Sensitivität von *srs2 siz1* oder *srs2 pol30-RR*-Doppelmutanten gegenüber *srs2* Mutanten im *rad6*- oder *rad18*-Hintergrund erklären.

Aufgrund dieser genetischen Interaktion wurde im Folgenden untersucht, ob auch eine physikalische Interaktion besteht. Ein Konstrukt, welches den gesamten Srs2-ORF enthält, ist im *two-hybrid*-System nicht funktionell. Dies liegt wahrscheinlich an der sehr niedrigen Expression des Fusionsproteins (Krejci et al., 2003). Aus diesem Grund wurde ein N-terminal trunkiertes Srs2-Fragment benutzt (Srs2 $\Delta$ N), dem die Helikase-Domäne (AS 1-782) fehlt. Dieses Fragment interagiert mit Rad51 (Krejci et al., 2003) und unterschiedlichen Faktoren des *RAD6-pathways*: Rad18, Rad5 und vor allem PCNA (**Abb. 20a**). Weiterhin konnte eine Bindung an SUMO nachgewiesen werden. Hierbei war eine deutlich stärkere Interaktion mit der konjugierbaren Wildtyp-Form (Smt3-GG) im Vergleich zu einer im C-terminalen, für die Konjugation essentiellen Doppel-Glycin-Motif mutierten Form zu beobachten (Smt3-AA, **Abb. 20a**).

Im *western-blot* ist zu erkennen, dass auch das PCNA-BD-Fusionsprotein durch SUMO modifiziert wird (**Abb. 20b**). Für die Modifikation werden die gleichen Lysine benutzt und auch die Abhängigkeit der Konjugation von Siz1 bleibt bestehen. Aus diesem Grund war es möglich, eine SUMO-Abhängigkeit der Interaktion zwischen PCNA und Srs2 zu untersuchen. Durch Einführen von Mutationen der SUMO-Akzeptorlysine kann die Interaktion mit Srs2 schrittweise reduziert werden (**Abb. 20c**). Gleichermaßen ist die Interaktion im *siz1*-Hintergrund reduziert. Die Interaktion mit Srs2 verhält sich somit proportional zu der durch die jeweilige Mutation bewirkten Reduktion der PCNA-SUMOylierung. Mit nicht-modifiziertem PCNA konnte auch noch eine schwache Interaktion nachgewiesen werden, so dass die SUMO-Modifikation demnach für eine Verstärkung dieser Wechselwirkung verantwortlich ist.

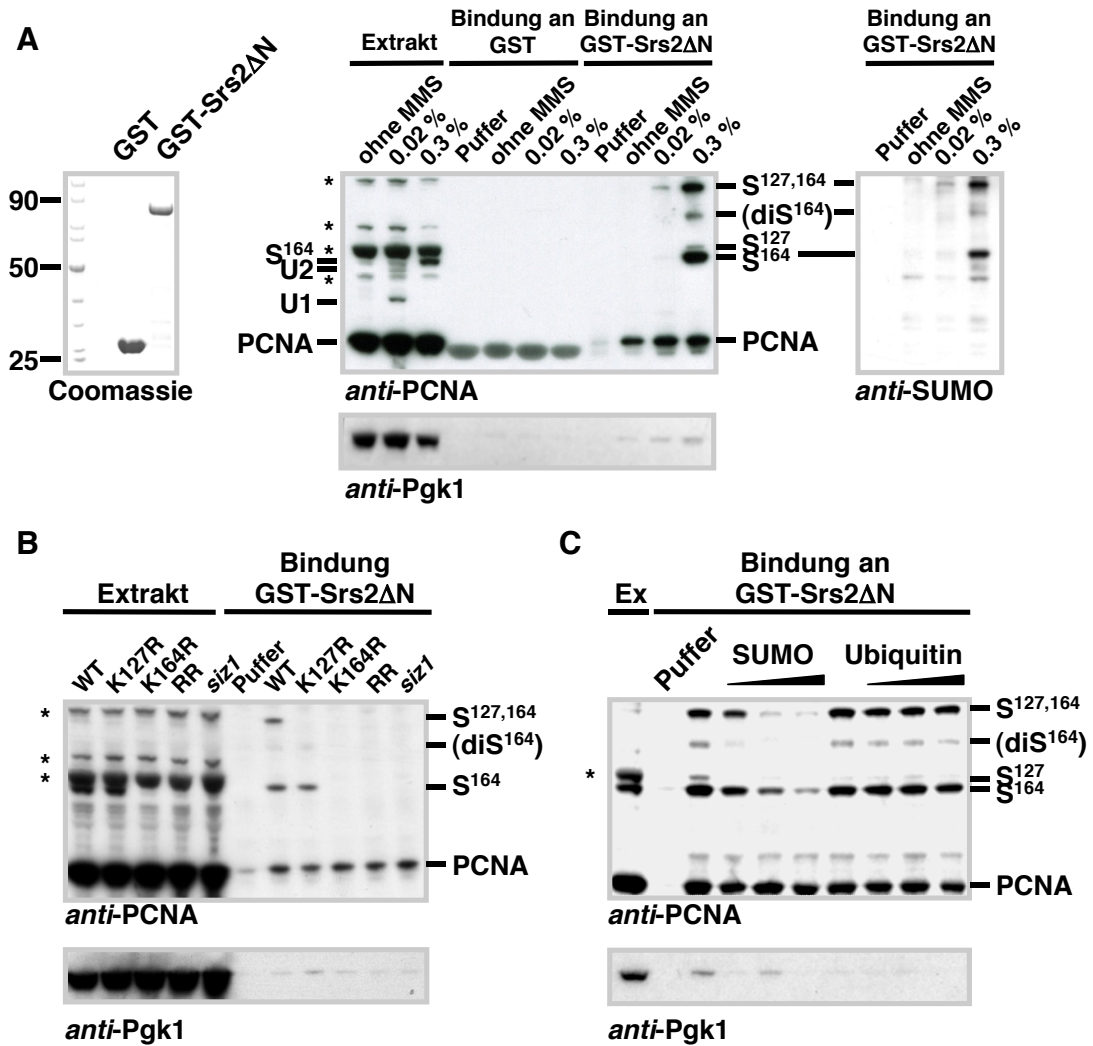


**Abb. 20: Srs2 interagiert im *two-hybrid*-System bevorzugt mit SUMO-modifiziertem PCNA:** **A**, Ein N-terminal trunkiertes Srs2-Fragment (Srs2ΔN, AS 783-1174) wurde als Fusion mit der Aktivierungsdomäne (AD) oder der DNA-Bindedomäne (BD) des Transkriptionsfaktors GAL4 exprimiert. Die Interaktionen wurden mit den komplementären Konstrukten beobachtet, welche die Fusionsproteine mit PCNA, Rad51, Rad18 und Rad5 (links) oder Ubc9 und Smt3 (rechts) exprimierten. Interaktionen wurden durch Wachstum auf Selektionsmedium (-His, -Ade) nachgewiesen. **B**, Das BD-PCNA-Fusionsprotein wird an K164 (BD-S<sup>164</sup>, abhängig von Siz1) und an K127 (BD-S<sup>127</sup>) mit SUMO modifiziert. Die hier benutzten Zellen exprimierten neben dem PCNA-Fusionsprotein noch zusätzlich AD-Srs2ΔN. **C**, *Two-hybrid*-Interaktion von PCNA Lysinmutanten mit AD-Srs2ΔN in Wildtyp- oder *siz1*-Zellen. Die Durchführung erfolgte wie in A, für eine semi-quantitative Analyse wurde für jede Interaktion eine Verdünnungsreihe ausgetüpfelt.

Um diese Beobachtungen zu bestätigen, wurden *in vitro*-Bindungsexperimente durchgeführt. Hierzu wurde Srs2 $\Delta$ N in *E. coli* mit einem N-terminalen GST-*tag* exprimiert und aufgereinigt (**Abb. 21a**). Als Kontrolle für die Bindungsexperimente diente GST. Um die Bindung von PCNA oder SUMOyliertem PCNA zu untersuchen, wurden Hefeextrakte eingesetzt. Unter den nativen Lysebedingungen ging ein Großteil der SUMO-modifizierten Spezies verloren, sofern diese nicht durch Zugabe von 0,3% MMS zum Wachstumsmedium induziert wurden. Auch in diesem Experiment interagierte Srs2 mit PCNA; die SUMO-modifizierten Formen wurden allerdings bevorzugt gebunden (**Abb. 21a**). Durch den Vergleich von eingesetztem und an GST-Srs2 gebundenem Material wurde klar, dass die Affinität der Bindung von unmodifiziertem PCNA zu PCNA, welches an K164 oder K127 mit SUMO modifiziert ist, ansteigt. Insbesondere wurde eine hochaffine Bindung zu der doppelt modifizierten PCNA-Form beobachtet. Dass es sich bei den gebundenen Formen um PCNA-SUMO handelt, wurde durch einen *anti-SUMO-western-blot* (**Abb. 21a**) sowie durch den Einsatz von PCNA-Lysinmutanten (**Abb. 21b**) verifiziert. Im Material, das von GST-Srs2 $\Delta$ N gebunden wurde, wurde auch eine zusätzliche, K164-abhängige SUMO-modifizierte PCNA-Spezies entdeckt, welche in Extrakten nicht detektierbar war. Wahrscheinlich handelt es sich bei dieser um eine Di-SUMO-Kette. Eine Bindung von Srs2 an ubiquitinierte PCNA-Formen wurde nicht beobachtet (**Abb. 21a**, 0,02% MMS).

Die SUMO-, nicht aber die Ubiquitin-Modifikation ist somit für die Interaktion zwischen Srs2 und PCNA wichtig. In Übereinstimmung hierzu läßt sich die Bindung von Srs2 an SUMOyliertes PCNA durch einen Überschuß an SUMO, aber nicht durch entsprechende Mengen an Ubiquitin kompetitieren (**Abb. 21c**).

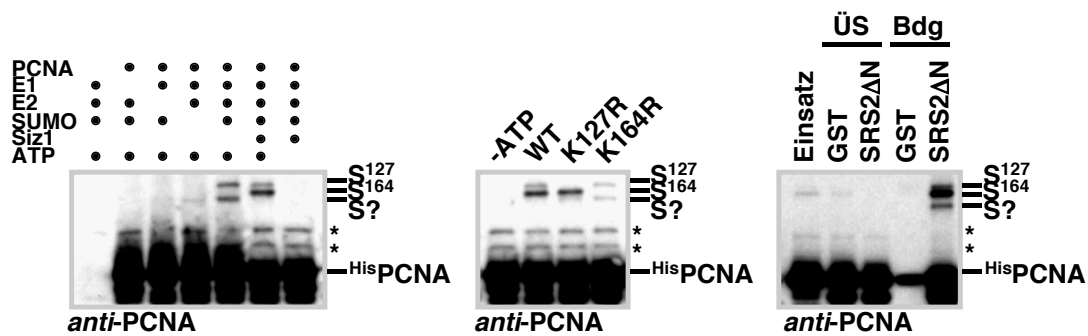
Da in diesen Experimenten mit Zellextrakten prinzipiell eine Vermittlung der Interaktion durch andere Proteine möglich ist, wurde das Bindungsexperiment mit einer *in vitro*-SUMOylierungsreaktion als Ausgangsmaterial wiederholt. Auch in diesen *in vitro*-Experimenten wurden die Lysine K127 und K164 von PCNA modifiziert, die auch *in vivo* verwendet werden (**Abb. 22**).



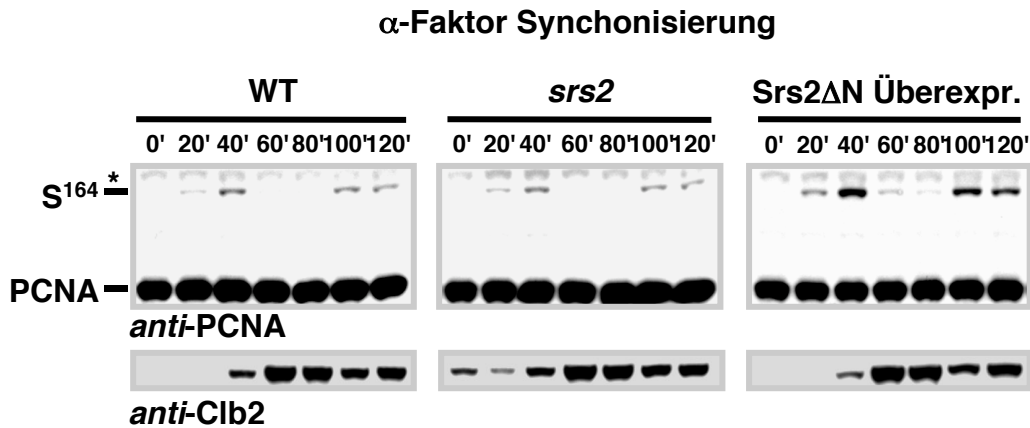
**Abb.20: Srs2 interagiert bevorzugt mit SUMO-modifiziertem PCNA aus Zell-extrakten:** **A**, Bindungsexperiment aus Extrakten von Wildtyp-Zellen, die ohne oder mit MMS (0,02% oder 0,3%) behandelt wurden. **B**, Extrakte wurden aus WT, *siz1*- oder PCNA Lysin-Mutanten nach Behandlung mit 0,3% MMS gewonnen. **C**, Bindungsexperiment wie in **A** oder **B**; Die Bindung wurde durch Zugabe von gereinigtem SUMO oder Ubiquitin zum Zellextrakt kompetitiert. Die Konzentrationen dieser Proteine entsprachen dabei 0, 4, 40 und 400  $\mu$ M. **A-C**, Für diese Bindungsexperimente wurde bakteriell exprimiertes, aufgereinigtes GST und GST-Srs2 $\Delta$ N eingesetzt. Für jeden Ansatz wurden dabei die gleichen Mengen eingesetzt, welche im Coomassie-gefärbten Gel (**A**) zu sehen sind. An GST-Srs2 $\Delta$ N gebundene Proteine wurde im *anti*-PCNA oder *anti*-SUMO-western-blot nachgewiesen. Dabei sind unmodifiziertes PCNA (PCNA), ubiquitinierte (U1,U2) und SUMOylierte (S) Formen zu erkennen. Kreuzreaktive Proteine des Extrakts sind durch einen Stern gekennzeichnet. Zur Kontrolle der Spezifität der Interaktion diente ein *western-blot* mit *anti*-Pgk1-Antikörper.

Weiterhin hängt die Modifikation von K164, nicht aber von K127 von der SUMO-Ligase Siz1 ab. In Abwesenheit von Siz1 wird ein weiteres Akzeptor-lysin modifiziert, was zu einer Modifikation führt, die *in vivo* nicht vorkommt und durch ihr elektrophoretisches Laufverhalten unterschieden werden kann. Nach Inkubation mit GST-Srs2 $\Delta$ N wurde auch in diesem *in vitro*-System eine präferentielle Bindung von SUMOyliertem PCNA gefunden (**Abb. 22**). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Interaktion zwischen SUMOyliertem PCNA und Srs2 direkt ist.

Diese Schlussfolgerung wird durch den Befund unterstützt, dass durch die Überexpression eines C-terminalen Srs2-Fragments die Menge an SUMOyliertem PCNA *in vivo* erhöht werden kann (**Abb. 23**). Eine naheliegende Interpretation dieses Effekts ist, dass das Srs2-Fragment SUMOyliertes PCNA bindet und so vor der Aktivität von SUMO-Hydrolasen schützt.



**Abb. 22: *in vitro*-SUMOylierung von PCNA und Bindung an GST-Srs2 $\Delta$ N:** Rekombinante, aufgereinigte Proteine wurden eingesetzt, um PCNA mit SUMO zu modifizieren. Hierfür waren neben PCNA das heterodimere Aos1/Uba2 (E1), Ubc9 (E2), Smt3-GG (SUMO) und Siz1 notwendig. Die Reaktion wurde unter den in der Material und Methoden-Sektion angegebenen Bedingungen durchgeführt. Lysin K127 (S<sup>127</sup>) und K164 (S<sup>164</sup>) werden wie *in vivo* modifiziert. In Abwesenheit von Siz1 wird ein weiteres Akzeptorlysin benutzt (S?), dessen Modifikation *in vivo* nicht nachgewiesen werden konnte. Die Spezifität der Reaktion wurde durch Auslassen von Faktoren (links) oder durch Benutzung von Lysin-Mutanten (Mitte) überprüft. Vor der Bindung an GST-Srs2 $\Delta$ N (rechts) wurde der Ansatz verdünnt und mit Apyrase behandelt, um durch die ATP-Depletierung die SUMOylierungsaktivität zu reduzieren. GST-Srs2 $\Delta$ N bindet an PCNA und mit erhöhter Affinität an SUMOylierte Formen. PCNA und modifiziertes PCNA wurden in einem *anti*-PCNA-western-blot detektiert.



**Abb. 23: Die Menge an SUMOyliertem PCNA wird durch Srs2 beeinflusst:** Überexpression des C-terminalen Srs2-Fragments (Srs2 $\Delta$ N), das an SUMOyliertes PCNA bindet, führt zu einer Zunahme der Menge an SUMOyliertem PCNA. Die zellzyklus-spezifische Regulation der SUMO-Modifikation wird hierdurch nicht beeinflusst. Für dieses Experiment wurden die Zellen mit  $\alpha$ -Faktor arretiert und dann in einen synchronen Zellzyklus entlassen. Dies wurde mittels *anti-Clb2-western-blot* überprüft. Der Nachweis von unmodifiziertem und an Lysin K164 SUMOyliertem PCNA (S<sup>164</sup>) erfolgte im *anti-PCNA-western-blot*.

Die prinzipielle Zellzyklus-Regulation der SUMOylierung ist jedoch unabhängig von Srs2 (**Abb. 23**). Deshalb kann eine vorgeschaltete, regulierende Rolle von Srs2 ausgeschlossen werden.

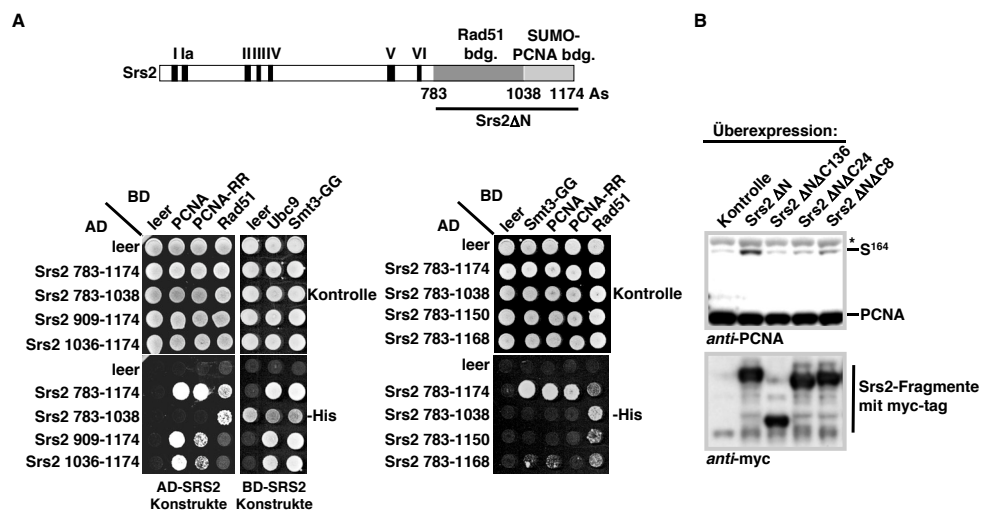
Da das N-terminal trunkierte Srs2-Fragment PCNA mit hoher Affinität band, die für die antirekombinatorische Funktion notwendige Helikase-Domäne jedoch fehlte, könnte die Überexpression dieses Fragments dominant negativ auf die Funktionen von Srs2 wirken. Nach dieser Hypothese sollte eine Suppression des Phänotyps von *rad18*-Mutanten erwartet werden. Dies wurde jedoch nicht beobachtet, die Sensitivität dieser Mutanten wurde eher noch erhöht (Daten nicht gezeigt), was nur mit einer gesteigerten Funktion von Srs2 zu erklären ist. Diese liegt möglicherweise in der Fähigkeit des trunkierten Srs2 begründet, mit dem endogenen Srs2 zu interagieren (Daten nicht gezeigt). Entsprechend kommt es durch Überexpression von Srs2 $\Delta$ N wahrscheinlich sogar zu einer verstärkten Rekrutierung von Srs2 an die Replikationsgabel.

### III.5.3 Srs2 besitzt eine C-terminale Interaktionsdomäne für SUMOyliertes PCNA

Die ATPase-Funktion von Srs2 wird durch den N-Terminus (AS 1-783) des Proteins vermittelt, wo sich die Helikase-Homologie-Boxen befinden (**Abb. 24a**). Sowohl die Bindung an Rad51 als auch an SUMOyliertes PCNA wird



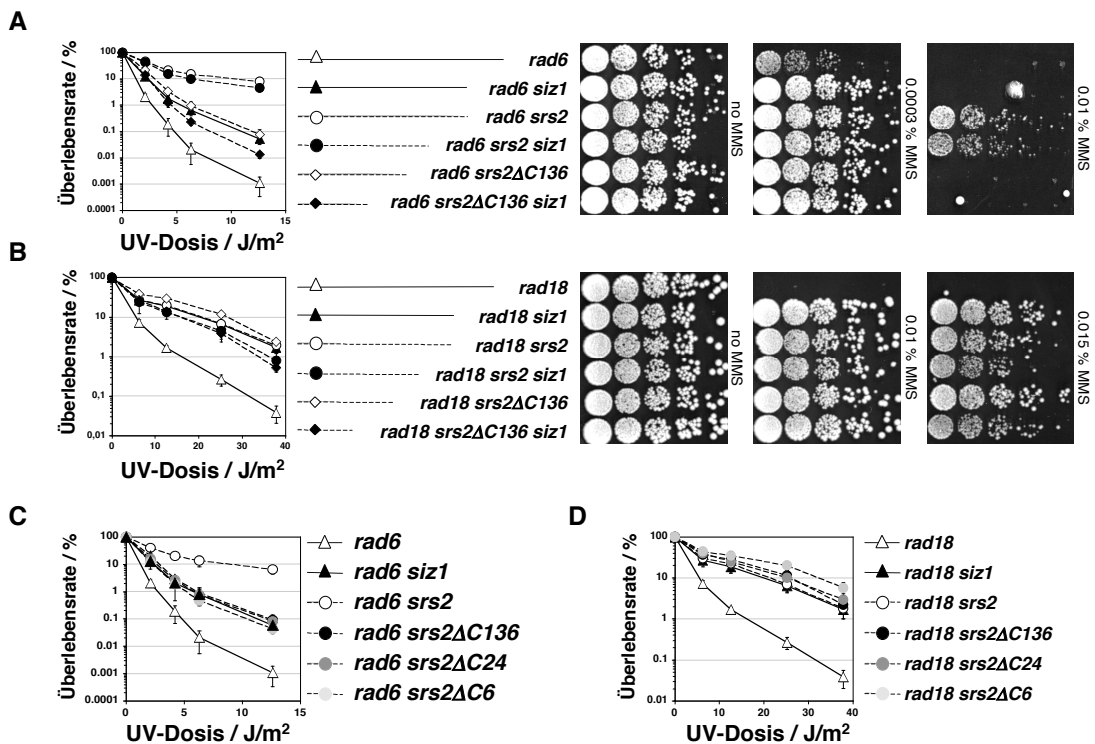
durch den C-Terminus des Proteins vermittelt. Um herauszufinden, ob die gleiche Bindestelle benutzt wird oder ob separate Binde-Domänen existieren, wurden weitere Fragmente des C-Terminus von Srs2 im *two-hybrid*-Experiment eingesetzt. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass ein Srs2-Fusionsprotein der Aminosäuren 783-1038 mit Rad51, nicht aber mit SUMOyliertem PCNA interagiert (**Abb. 24a**). Umgekehrt interagiert ein Fragment der C-terminalen 138 Aminosäuren mit PCNA und SUMO, nicht aber mit Rad51 (**Abb. 24a**). Diese Ergebnisse zeigen, dass neben der Bindungsstelle für Rad51 (AS 783-1038) eine separate Binde-Domäne für SUMOyliertes PCNA existiert, welche am C-terminalen Ende von Srs2 liegt (AS 1038-1174).



**Abb. 24: Srs2 besitzt eine C-terminale Interaktionsdomäne für SUMOyliertes PCNA:** **A**, Domänen-Analyse mit Hilfe von verkürzten Srs2-Fusionsproteinen im *two-hybrid*-System. Srs2-Fragmente wurden als Fusion mit der Aktivierungsdomäne (AD) oder DNA-Bindedomäne (BD) des Transkriptionsfaktor GAL4 exprimiert. Die Interaktionen mit den jeweils komplementären PCNA-, Rad51-, Ubc9- oder Smt3-GG-Konstrukten wurde durch Wachstum auf Selektionsmedium (-His) nachgewiesen. Hieraus ergibt sich für Srs2 ein Aufbau aus drei Domäne: C-terminale PCNA-SUMO-Interaktionsdomäne, mittlere Domäne, welche die Interaktion mit Rad51 vermittelt, und N-terminale Helikase-Domäne (Aboussekhra et al., 1992). **B**, Stabilisierung von SUMOyliertem PCNA durch Überexpression von unterschiedlich trunkierten Srs2-Konstrukten (Srs2-Fragmente:  $\Delta$ N=783-1174,  $\Delta$ N $\Delta$ C136 =783-1038,  $\Delta$ N $\Delta$ C24 =783-1150,  $\Delta$ N $\Delta$ C6 =783-1164). Der Nachweis von unmodifiziertem und an Lysin K164 SUMOyliertem PCNA (S<sup>164</sup>) erfolgte im *anti*-PCNA-western-blot. Die Expression der unterschiedlichen Srs2-Fragmente wurde durch Fusion eines 3myc-Epitops und Detektion im *anti*-myc-western-blot überprüft.

Im Falle C-terminaler Deletionen führte bereits eine Deletion von nur sechs Aminosäuren zu einem Verlust der Bindung an SUMO oder PCNA (**Abb. 24a**). Man kann davon ausgehen, dass die eingesetzten Fusionsproteine nicht allgemein missgefaltet sind, da sie mit Rad51 interagieren können. Die Verwendung von kürzeren Fragmenten gab keine weiteren Erkenntnisse, so dass unklar bleibt, ob in Srs2 eventuell zwei unterscheidbare Interaktionsstellen für SUMO und PCNA existieren oder ob nur eine spezifische Bindungsstelle für SUMOyliertes PCNA existiert.

Die C-terminale Bindungsstelle für SUMOyliertes PCNA ist auch *in vivo* notwendig. Im Gegensatz zur Überexpression des Srs2 $\Delta$ N-Fragments, welches PCNA bindet, bewirken die carboxyterminal trunkierten Versionen dieses Fragments keine Stabilisierung der SUMO-Modifikation von PCNA (**Abb. 24b**).



**Abb. 25: PCNA-SUMO-Mutanten und Mutanten der entsprechenden Bindungsstelle im C-Terminus von Srs2 ( $\Delta$ C) verhalten sich identisch in der Suppression der Sensitivität von *RAD6*-pathway-Mutanten: A-D, die Quantifizierung der Sensitivitäten der angegebenen Hefe-Mutanten gegenüber UV-Licht und die Sensitivitäten gegenüber MMS wurden bestimmt wie in Abb. 16 beschrieben.**

Diesen Bindungsdaten zu Folge sollten *srs2*-Mutanten, die Trunkierungen im C-terminalen Bereich aufweisen, also nicht mehr an SUMOyliertes PCNA binden können, einen ähnlichen Phänotyp aufweisen wie *siz1*-Mutanten, in denen PCNA nicht mehr SUMOyliert werden kann. Aus diesem Grund wurde die Suppression des Phänotyps von *rad6*- und *rad18*-Mutanten durch Trunkierungsmutanten von *SRS2* untersucht. Die Hypersensitivität gegenüber DNA-Schäden von *rad18*-Mutanten wird durch *siz1*, *srs2* oder *SRS2*-Allele, die C-terminal trunkiertes Srs2 exprimierten (*srs2ΔC163*, *srs2ΔC24* und *srs2ΔC6*) zu gleichem Ausmaß und epistatisch supprimiert (**Abb. 25b,d**).

Dass C-terminale Trunkierungs-Mutanten von Srs2 sich identisch wie Mutanten verhalten, in denen PCNA nicht SUMOyliert werden kann, wird noch deutlicher im *rad6*-Hintergrund. Hier führt die Mutation von *SRS2* verglichen z.B. mit *siz1* zu einer stärkeren Verminderung der Hypersensitivität gegenüber DNA-Schäden. Wie in Abschnitt III.5.1 beschrieben, kann dies mit einer zusätzlichen, von der PCNA-SUMOylierung unabhängigen Rolle von Srs2 interpretiert werden. Im Unterschied hierzu zeigen C-terminale Mutanten von *SRS2* den identischen Effekt wie *siz1* (**Abb. 25a,c**).

Bei den Trunkierungsmutanten ist zu berücksichtigen, dass der C-Terminus von Srs2 zusätzlich zu der Interaktionsstelle für SUMOyliertes PCNA ein potentiell Kern-Lokalisations-Signal (NLS) beinhaltet (Rong und Klein, 1993). Falls diese Sequenz für die Kern-Lokalisation von Srs2 essentiell ist, dann sollten sich entsprechende Deletionsmutanten unabhängig von der Bindung an SUMOyliertes PCNA wie eine *srs2*-Nullmutante verhalten. Mehrere Hinweise sprechen jedoch dafür, dass dieses potentielle NLS für die Kernlokalisierung von Srs2 nicht essentiell ist. Der Phänotyp der *SRS2*-Trunkierungsmutanten ist nicht von der NLS abhängig (vgl. *srs2ΔC136*- NLS fehlt- mit *srs2ΔC6*- NLS vorhanden). Außerdem verhalten sich die Trunkierungen von *SRS2* in mehreren Sensitivitäts- und Rekombinationsexperimenten (**Abb. 25a, Abb. 26, Abb. 27b,c**) unterschiedlich im Vergleich zur *srs2*-Nullmutante. Die Phänotypen von *SRS2*-Trunkierungsmutanten korrelieren also mit der mangelnden Interaktion mit SUMOyliertem PCNA und nicht mit der Deletion einer potentiellen NLS-Sequenz.

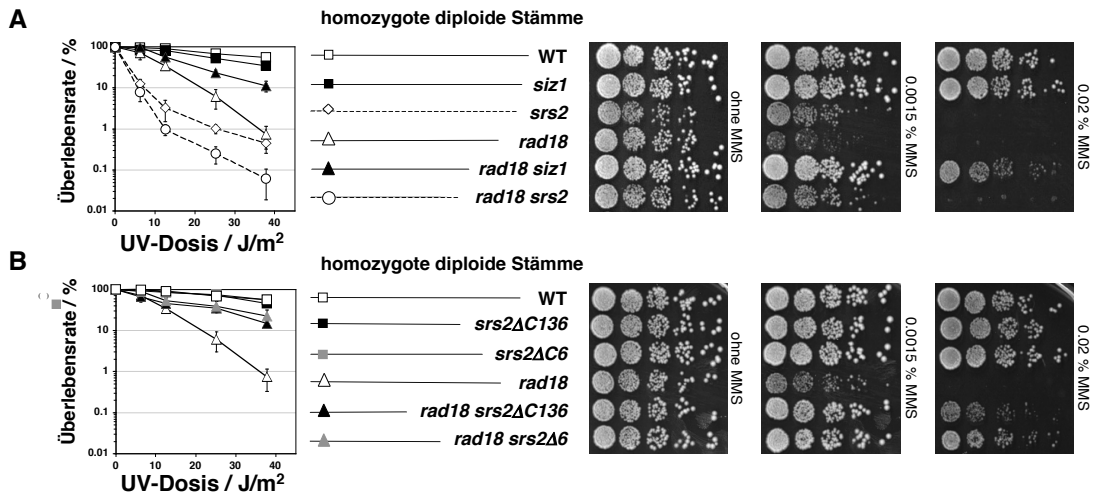
Zusammenfassend lässt sich somit eine klare Korrelation zwischen der physikalischen Wechselwirkung von SUMO-modifiziertem PCNA mit Srs2 einerseits und den Phänotypen andererseits feststellen. Diese Phänotypen entstehen aufgrund der Inhibition von *RAD52*-abhängiger Rekombination, die als zum *RAD6-pathway* alternativer Läsions-Bypass fungiert.

### III.5.4 SUMO modifiziertes PCNA und Srs2 inhibieren gemeinsam die Rekombination von Schwester-Chromatiden

Die genetische wie auch physikalische Interaktion von Srs2 legt folgendes Arbeitsmodell nahe: PCNA-SUMOylierung, die spezifisch während der S-Phase am Chromatin auftritt, rekrutiert Srs2 zur Replikationsgabel. Dort bewirkt Srs2 eine Inhibition der homologen Rekombination.

Um zu überprüfen, ob es sich um einen allgemeinen Mechanismus zur Vermeidung von interferierender Rekombination während der Replikation handelt, wurden die Sensitivitäts-Experimente mit diploiden Zellen wiederholt. In diploiden Zellen befindet sich die Rekombination unter einer besonderen Kontrolle. Dies ist durch das Vorhandensein von zwei homologen Chromosomen bedingt. Wahrscheinlich aus diesem Grund zeigen im Unterschied zu haploiden Mutanten diploide, homozygote *srs2*-Mutanten eine starke Hypersensitivität gegenüber DNA-Schäden (Aboussekhra et al., 1992). Im Gegensatz hierzu sind homozygote Mutanten, in denen nur die von der PCNA-SUMOylierung abhängige Funktion von Srs2 gestört ist (*siz1* oder *srs2 $\Delta$ C*), kaum sensitiv gegenüber UV-Licht oder MMS. Da analog zu der Situation in haploiden Zellen die Hypersensitivität einer homozygoten *rad18*-Mutante durch diese Mutationen unterdrückt wurden (**Abb. 26a-b**), handelt es sich bei der durch PCNA-SUMO und Srs2 vermittelten Inhibition der Rekombination um einen allgemeiner Mechanismus, der zwischen haploiden und diploiden Zellen konserviert ist. Weiterhin hat Srs2 auch Funktionen, die nicht von der PCNA-SUMOylierung abhängen. Dies zeigt sowohl das Experiment mit diploiden Hefezellen (**Abb. 26**) als auch die Suppression des Phänotyps von haploiden *rad6*-Mutanten durch *srs2*, die teilweise PCNA-SUMO-unabhängig verläuft (**Abb. 19a, Abb. 25a,c**).

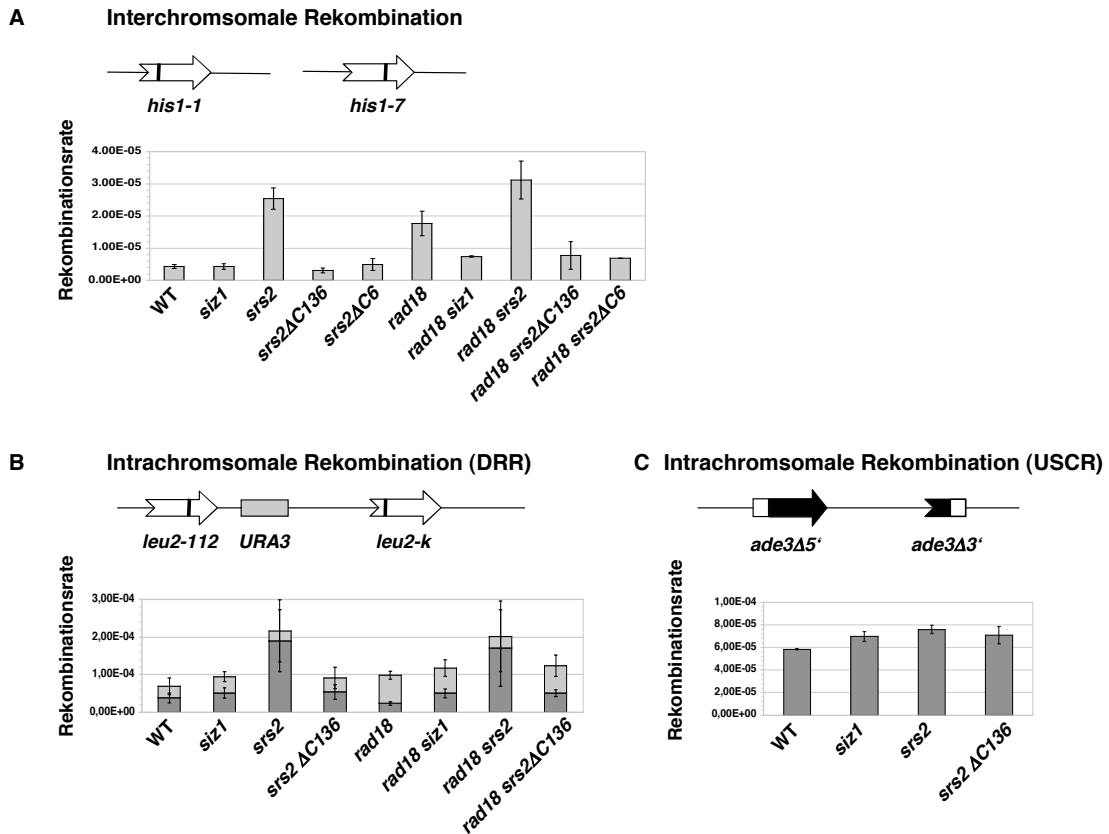
Auch wurde im Gegensatz zu *srs2 sgs1*-Doppelmutanten keine synthetische Lethalität zwischen *sgs1* und *siz1* beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die synthetische Lethalität von *srs2 sgs1* entsteht durch missregulierte, toxische Rekombinationsereignisse oder -intermediate, welche in Abwesenheit der inhibitorisch wirkenden Proteine Srs2 und Sgs1 auftreten. Sgs1 wirkt sonst als negativer Regulator von Rekombination, indem es im Zusammenspiel mit Topoisomerase III (Top3) *Holliday-junctions* entfernt und so der Bildung von *crossovers* entgegenwirkt (Gangloff et al., 2000; Ira et al., 2003).



**Abb. 26: Der PCNA-SUMO-Srs2-pathway zur Inhibition des RAD52-abhängigen Läsions-Bypass ist auch in diploiden Zellen aktiv: A-B**, die Quantifizierung der Sensitivitäten der angegebenen Hefe-Mutanten gegenüber UV-Licht und die Sensitivitäten gegenüber MMS wurden bestimmt wie in Abb. 16 beschrieben.

Nach diesen Daten sollte SUMOyliertes PCNA kein allgemeiner Inhibitor von homologer Rekombination sein, sondern spezifisch auf einen Rekombinationsprozess wirken, der ähnlich wie der *RAD6-pathway* den Bypass von DNA-Läsionen ermöglicht, also wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Replikationsgabel steht.

In Übereinstimmung mit diesem Modell wurde weder für *srs2ΔC* noch für *siz1* in diploiden Hefezellen eine verstärkte Rekombination zwischen homologen Chromosomen gefunden (**Abb. 27a**). Der PCNA-SUMO-Srs2-*pathway* wirkt also nicht inhibitorisch auf Rekombination zwischen homologen Chromosomen. Somit besteht also erneut ein Unterschied zur allgemeinen Funktion von Srs2, da in *srs2*-Nullmutanten die interchromosomale Rekombination hochreguliert ist. Im *rad18*-Hintergrund wird der Hyperrekombinations-Phänotyp durch *siz1*- und *srs2ΔC*-Mutanten sogar unterdrückt (**Abb. 27a**). Eine plausible Interpretation dieses Befundes ist, dass es *rad18*-Mutanten nicht oder nur sehr eingeschränkt möglich ist, DNA-Läsionen während der Replikation zu überwinden (*RAD6-pathway* ist aufgrund der Mutation inaktiv, der rekombinative Bypass ist durch den PCNA-SUMO-Srs2-Komplex inhibiert). Dies führt anschließend zu einem Anstieg der Rekombination mit dem homologen Chromosom, welche wiederum nicht durch PCNA-SUMO-Srs2 inhibiert ist.

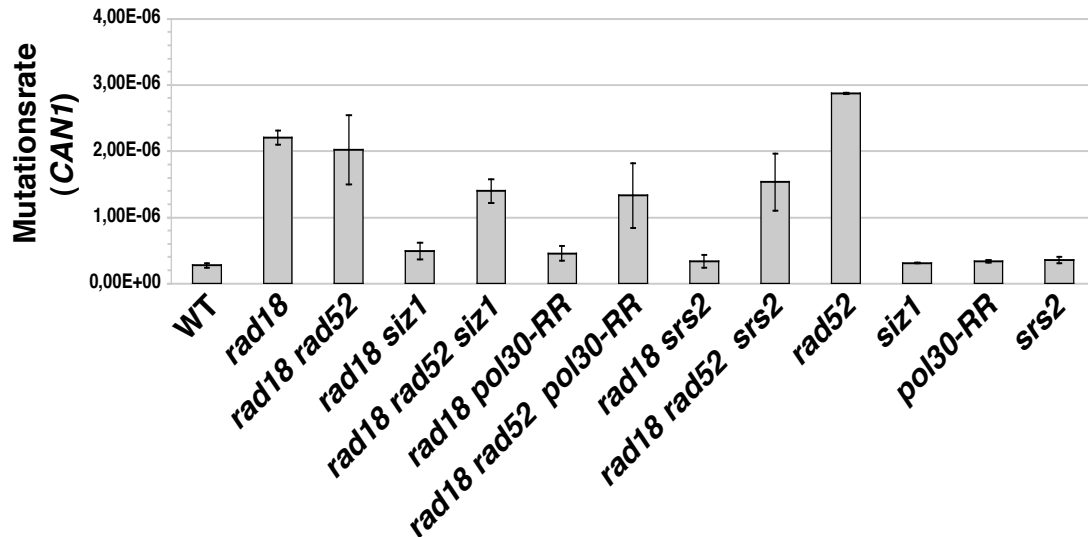


**Abb. 27: Einfluß der PCNA-SUMOylierung und Srs2 auf die Rekombination zwischen homologen Chromosomen und Schwesterchromatiden:** Die Rekombination wurde in den abgebildeten Systemen untersucht. Rekombination zwischen zwei nicht-funktionalen Allelen eines Auxotrophiemarkers erlaubt das Wachstum auf entsprechendem Selektionsmedium. Die Rekombinationsraten wurden durch Fluktuationsanalyse bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus zwei bis vier unabhängigen Fluktuationstest mit Standardabweichung. In den schematischen Darstellungen repräsentieren Pfeile die im Experiment untersuchten Gene. Weiße Flächen markieren die zwischen den beiden Allelen homologen Sequenzbereiche. Schwarz repräsentiert Bereiche, in denen keine Rekombination stattfinden kann, da sie nur in einem der beiden Allele vorhanden sind (Mutationen, deltiterte Sequenzen). **A**, Rekombination zwischen homologen Chromosomen wurde in diploiden Zellen für die *his1-1/his1-7* Heteroallele untersucht. Die Rekombinationsraten wurden um die durch Mutationen bedingte Reversion bereinigt, welche in den entsprechenden homozygoten Zellen bestimmt wurde. **B**, Intrachromosomale Rekombination wurde im *direct repeat*-System untersucht. Die Rekombination zwischen den *leu2-112* und *leu2-k*-Heteroallelen kann in Genkonversion (Erhaltung des *URA3*-Markers, dunkle Balken) und rekombinationsbedingte Deletion (*URA3* geht verloren, helle Balken) unterteilt werden. **C**, In diesem *direct repeat*-System werden durch die Benutzung von zwei trunkierten *ade3*-Allelen keine Intrachromatid-Rekombinationsereignisse detektiert, da eine solche Reaktion zu einer Zirkularisierung des entsprechenden Bereiches führt. Entsprechend werden nur Ereignisse gemessen, die zwischen Schwesterchromatiden stattfinden. Damit es zur Rekombination der Heteroallele kommt, müssen die beiden Schwesterchromatiden ungleich ausgerichtet sein (*unequal sister chromatid recombination*).

Diese Daten legen nahe, dass der PCNA-SUMO-Srs2-Komplex spezifisch Rekombination zwischen den durch die Replikation entstehenden Schwester-Chromatiden inhibiert. Zwei unterschiedliche Systeme wurden benutzt, um die Rekombinationsraten zwischen Schwesterchromatiden zu untersuchen. Die benutzten Systeme bestehen im Prinzip aus einer Wiederholung von zwei nicht-funktionalen Allelen in direkter Abfolge (*direct repeat*) auf dem gleichen Chromosom (Palladino und Klein, 1992; Ben-Aroya et al., 2003). Durch Rekombination kann ein funktionales Allel des Reporters hergestellt werden. In diesem System wird Rekombination detektiert, wenn sie zwischen den Schwesterchromatiden abläuft, die hierfür unsymmetrisch ausgerichtet sein müssen (*unequal sister chromatid recombination*), oder wenn sie nach einer *loop*-Bildung innerhalb einer Chromatide abläuft (Intrachromatid-Rekombination, im System von **Abb. 27c** nicht möglich). Die Rekombinationsraten in den benutzten *direct-repeat*-Systemen sind in *srs2ΔC*-Mutanten oder *siz1*-Mutanten mit defekter PCNA-SUMOylierung erhöht (**Abb. 27b-c**). Eine zusätzliche Erhöhung war in Kombination mit *rad18*-Mutanten zu beobachten (**Abb. 27b**). Dieses Experiment legt nahe, dass tatsächlich die Rekombination zwischen Schwester-Chromatiden, welche wahrscheinlich in Verbindung mit Replikation auftritt, spezifisch durch den PCNA-SUMO-Srs2-Komplex inhibiert wird.

In dem in **Abb. 27b** benutzten System ist zwischen den beiden *leu2*-Heteroallelen noch ein *URA3*-Marker inseriert. Dadurch lässt sich zwischen Genkonversions-Ereignissen, die den *URA3*-Marker erhalten, und der mit Rekombination verknüpfter Deletion des Markers unterscheiden. In *srs2*-Mutanten findet sich eine besonders starke Erhöhung der Genkonversion. Eine Interpretation liefert eine weitere Funktion von Srs2 in der Regulation von späten rekombinativen Ereignissen und somit der Länge der durch Rekombination ausgetauschten DNA-Sequenz (Aguilera und Klein, 1988). Wie in **Abb. 27b** zu erkennen, hängt auch diese Funktion von Srs2 nicht von der PCNA-SUMOylierung ab.

Im Widerspruch mit den Ergebnissen dieser Arbeit steht ein alternatives Modell für die Funktion der SUMO-Modifikation von PCNA. Aufgrund der Suppression des Mutatorphänotyps von *rad18* durch *siz1*, wurde die SUMOylierung von PCNA mit der Rekrutierung von Transläsions-Polymerasen, also dem fehlerbehafteten Arm des *RAD6-pathways* in Verbindung gebracht (Stelter und Ulrich, 2003).



**Abb. 28: Der Mutator-Phänotyp von *rad18*-Mutanten hängt von der PCNA-SUMOylierung und von *Srs2* ab:** In unterschiedlichen Hefestämmen wurden Mutationsereignissen im *CAN1*-Genlokus bestimmt. Diese wurden durch Wachstum der Zellen auf Medium mit Canavanin detektiert. Mutationsraten wurden durch einen Fluktuationstest ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte von zwei bis sechs unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen als Fehlerbalken.

Da allerdings dieser Effekt nicht im Wildtyp-Hintergrund, sondern lediglich in Mutanten beobachtet wurde, in denen PCNA nicht ubiquitiniert werden kann, entsteht er möglicherweise indirekt durch fehlerhafte Replikation oder Transläsionsreplikation, wenn der *RAD6-pathway* durch Mutation inaktiviert wurde, der rekombinative Bypass aber durch den PCNA-SUMO-Srs2-Komplex inhibiert ist. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde beobachtet, dass der Mutator-Phänotyp von *rad18* durch *siz1*, *pol30-RR* und *srs2* supprimiert wird (**Abb. 28**). Weiterhin kann eine zusätzliche Mutation von *RAD52* diesen Effekt zum Großteil revertieren (**Abb. 28**). Dies zeigt, dass eine aktivierte Rekombination in den Mutanten des PCNA-SUMO-Srs2-*pathways* für die Suppression der Mutationsraten von *rad18* verantwortlich ist und keine direkte Beteiligung von PCNA-SUMO an Transläsions-Replikation.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass SUMO-modifiziertes PCNA Srs2 während der Replikation durch direkte physikalische Interaktion rekrutiert, um die Rekombination zwischen den entstehenden Schwester-Chromatiden zu inhibieren. Als Konsequenz hieraus hängt der Bypass von Läsionen während der Replikation zu einem Großteil vom *RAD6-pathway* ab, dessen Funktion durch die Ubiquitin-Modifikationen von PCNA vermittelt wird.



## IV Diskussion

In dieser Arbeit wurden die posttranslationalen Ubiquitin- und SUMO-Modifikationen des Replikationsfaktors PCNA untersucht. PCNA ist als essentielles Protein der Replikation ohne katalytische Aktivität sehr gut geeignet, als Bindungs-Plattform für Proteine mit replikations-assoziierten Funktionen zu dienen. Die Interaktion von solchen Proteinen wird zumindest zum Teil durch drei unterschiedliche posttranslationale Modifikationen von PCNA reguliert. Während zwei unterschiedliche Ubiquitin-Modifikationen, Mono-Ubiquitin und eine K63-verknüpfte Multi-Ubiquitin-Kette, den Bypass von DNA-Läsionen während der Replikation vermitteln, wird ein anderer DNA-Reparatur-Prozess, die Rekombination der Schwesterchromatiden, durch PCNA-SUMO inhibiert.

### IV.1 Die Ubiquitin-Modifikation von PCNA steuert den *RAD6*-abhängigen Bypass von DNA-Läsionen

Die Ubiquitinierung von PCNA ist das zentrale Ereignis des *RAD6-pathways* und löst entsprechend den Bypass von DNA-Läsionen während der Replikation aus. Zwei verschiedene Ubiquitin-Modifikationen bewirken dabei zwei unterschiedliche Bypass-Mechanismen. Die durch Rad6 und Rad18 katalysierte Mono-Ubiquitinierung vermittelt Replikation durch Transläsions-Polymerasen. Die Lysin K63-verknüpfte Multi-Ubiquitinkette, für die neben Rad6 und Rad18 auch Rad5 und Mms2-Ubc13 notwendig sind, bewirkt hingegen einen alternativen Bypass, bei dem wahrscheinlich der neusynthetisierte Schwesterstrang als Vorlage für die Replikation benutzt wird. Dieser Mechanismus erlaubt einen fehlerfreien Bypass bei dem keine Mutationen erzeugt werden. Im Gegensatz dazu steht die Transläsions-Replikation, durch die potentiell Mutationen entstehen, weshalb ein solcher Bypass als fehlerbehaftet bezeichnet wird.

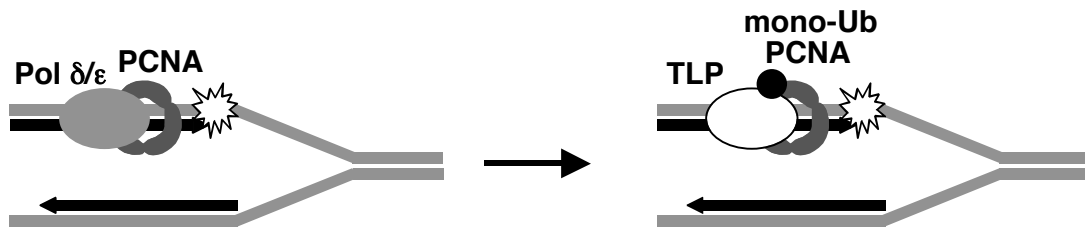
#### *IV.1.1 Die Transläsions-Replikation hängt von der Mono-Ubiquitinierung von PCNA ab*

Die Funktion der Mono-Ubiquitinierung wurde in dieser Arbeit mittels genetischer Experimente charakterisiert. Da die Transläsions-Replikation des fehlerbehafteten Arms des *RAD6-pathways* für die Entstehung der meisten Mutationen verantwortlich ist, zeigen entsprechende Mutanten, z.B. die Deletion der katalytischen Untereinheit der Transläsions-Polymerase  $\zeta$ ,

(*rev3*), reduzierte Mutagenese-Raten (Quah et al., 1980; Liefshitz et al., 1998; Xiao et al., 2000). In Bezug auf diesen Phänotyp verhalten sich *pol30-K164R*-Mutanten, in denen PCNA nicht ubiquitiniert werden kann, identisch. Zum einen zeigen sie keine Induktion von Mutationen durch Bestrahlung mit UV. Zum anderen wird durch *pol30-K164R* die basale Mutationsrate von *rad5*- oder *mms2*-Mutanten unterdrückt, die sonst durch eine verstärkte Aktivität von fehlerbehafteten Bypass-Mechanismen in diesen Mutanten des fehlerfreien Arms entsteht. Zusammen mit der Epistasis von *rad18* zu *pol30-K164R* zeigen diese Daten, dass die PCNA-Ubiquitinierung für die fehlerbehaftete Transläsions-Replikation essentiell ist. Die identischen Mutagenese-Phänotypen von *rev3*- und *pol30-K164R* (*phenocopy*) sind mit einer funktionellen Kooperation von Polymerase  $\zeta$  und ubiquitiniertem PCNA zu interpretieren.

Die Aktivität von Polymerase  $\eta$  lässt sich nicht durch UV-induzierte Mutagenese bestimmen, da diese Transläsions-Polymerase fähig ist, den Großteil der durch UV-Licht induzierten DNA-Läsionen fehlerfrei zu replizieren (Washington et al., 2000; Trincao et al., 2001). Die Analyse der UV-Sensitivität von *rad30*- und *pol30-K164R* zeigte jedoch, dass auch die Funktion von Polymerase  $\eta$  von PCNA abhängt (C. Hoege, unveröffentlichte Daten). Dass die Mono-Ubiquitinierung von PCNA für Transläsions-Replikation entscheidend ist und weder Multi-Ubiquitinierung noch SUMOylierung, welche ebenfalls das Lysin K164 betreffen, wurde durch weitere Mutagenese-Phänotypen offensichtlich. Weder *mms2*- noch *pol30-46*-Mutanten, in denen spezifisch die Multi-Ubiquitinierung von PCNA fehlt, zeigen eine Reduktion in der durch UV-induzierten Mutagenese (Torres-Ramos et al., 1996; Broomfield et al., 1998). Gleiches gilt für *siz1*-Mutanten, die spezifisch Defekte in der SUMOylierung von PCNA aufweisen. Das Ergebnis, nach dem für den Bypass von DNA-Läsionen durch die Transläsions-Polymerasen  $\zeta$  und  $\eta$  spezifisch die Mono-Ubiquitin-Modifikation von PCNA wichtig ist, wurde parallel durch ähnliche Experimente in einer anderen Arbeitsgruppe erhalten (Stelter und Ulrich, 2003).

Aufgrund des Mechanismus der Transläsions-Replikation erscheint es plausibel, dass die Mono-Ubiquitinierung von PCNA am Austausch der replikativen Polymerase durch eine Transläsions-Polymerase beteiligt ist (*polymerase switch*, **Abb. 29**). Möglicherweise erfolgt dieser aufgrund von unterschiedlichen Affinitäten der Polymerasen zu PCNA und mono-ubiquitiniertem PCNA.



**Abb. 29: Die Mono-Ubiquitinierung bewirkt den Austausch der DNA-Polymerase:** Nach dem hier abgebildeten Modell wird PCNA mono-ubiquitiniert, wenn es während der Replikation auf eine DNA-Läsion stößt. Diese Modifikation bewirkt den Austausch der replikativen Polymerase (Pol  $\delta$  oder Pol  $\epsilon$ ) gegen eine Transläsions-Polymerase (TLP: Pol  $\eta$ , Rev1 oder Pol  $\zeta$ ), welche in der Lage ist, eine beschädigte DNA-Vorlage zu replizieren. Ein solcher Mechanismus ist gleichermaßen für die Replikation von *leading*- wie *lagging*-Strang denkbar.

Mit einem solchen Mechanismus übereinstimmend wurde in menschlichen Zellen eine spezifische Interaktion zwischen mono-ubiquitiniertem PCNA und Polymerase  $\eta$  beobachtet (Kannouche et al., 2004; Watanabe et al., 2004). Die Spezifität wird dabei wahrscheinlich durch zwei Interaktionsdomänen von Polymerase  $\eta$  erreicht. In der Sequenz von Polymerase  $\eta$  finden sich ein PCNA-Interaktionsmotif einerseits und eine zur Ubiquitin-bindenden CUE-Domäne homologe Sequenz andererseits, durch welche die Interaktion mit mono-ubiquitiniertem PCNA erreicht werden könnte (Kannouche et al., 2004).

Der *polymerase switch* ist wahrscheinlich ein komplexes Ereignis, da mehrere Transläsions-Polymerasen hieran beteiligt sind. In *S. cerevisiae* sind drei, in *H. sapiens* fünf dieser spezialisierten Polymerasen bekannt (Ratray und Strathern, 2003). Alle Transläsions-Polymerasen interagieren mit PCNA und ihre Aktivität wird somit höchstwahrscheinlich durch Modifikation von PCNA reguliert. Bislang ist nicht verstanden, wie die Rekrutierung der unterschiedlichen Polymerasen zu bestimmten DNA-Läsionen reguliert wird. Die Modifikation von PCNA ist für die Rekrutierung möglicherweise nicht alleine ausschlaggebend, da zumindest in höheren Eukaryonten auch eine direkte Interaktion zwischen Rad18 und Polymerase  $\eta$  nachgewiesen wurde (Watanabe et al., 2004). In diesem Zusammenhang ist interessant, ob und wie die Dekonjugation von PCNA reguliert wird, da hierdurch wieder eine replikative Polymerase aktiviert und so die normale Replikation fortgeführt werden könnte.

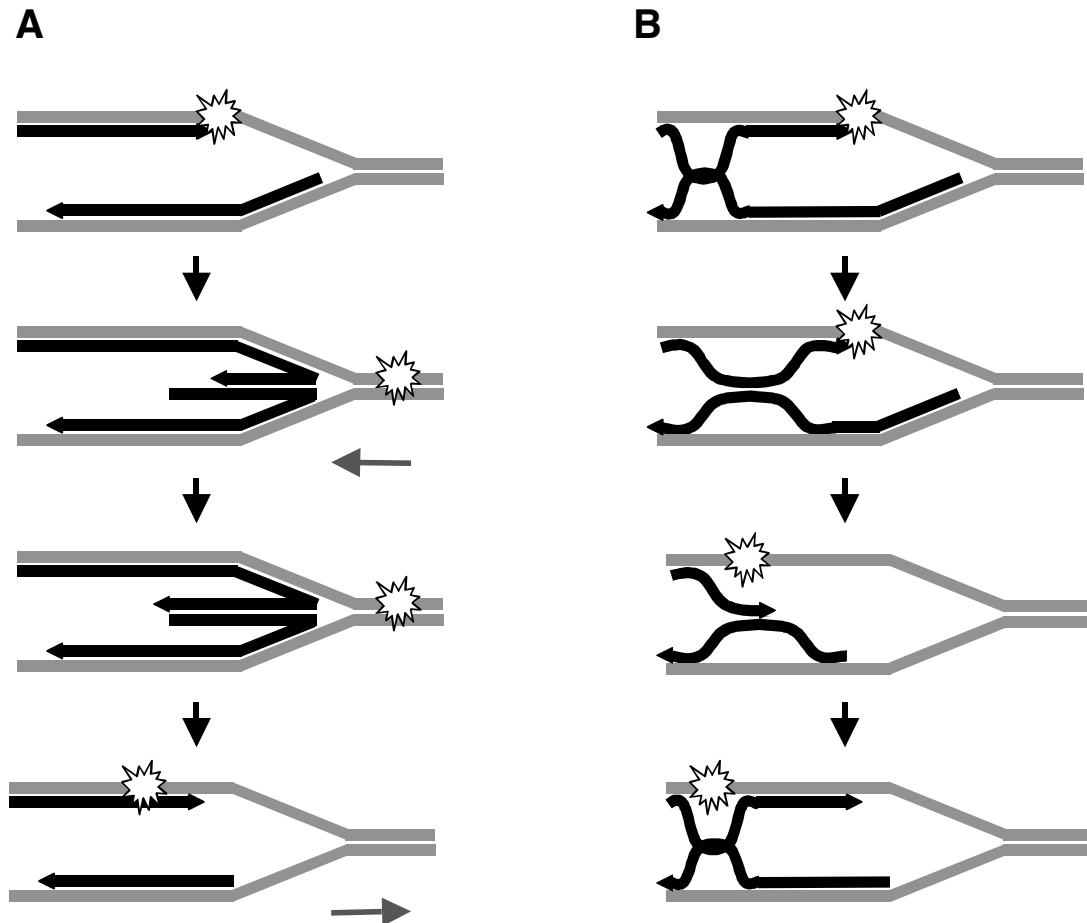
Häufig kooperieren mehrere Polymerasen in der Transläsions-Replikation, vor allem Polymerase  $\zeta$  arbeitet in der Regel als zweite, nachgeschaltete Transläsions-Polymerase, da sie Fehlpaarungen verlängern kann, die im ersten Schritt am Ort der DNA-Läsion entstanden sind (Prakash, S. et al.,

2004). Ob die Rekrutierung einer nachgeschalteten Transläsions-Polymerase ebenfalls durch PCNA-Ubiquitinierung erfolgt oder ob nachgeschaltete Transläsions-Polymerasen durch direkte Interaktion mit der ersten Transläsions-Polymerase rekrutiert werden, ist bislang ebenfalls unklar.

#### *IV.1.2 Ein fehlerfreier Bypass von DNA-Läsionen wird durch Multi-Ubiquitinierung von PCNA reguliert*

Der Mechanismus, nach dem der durch multi-ubiquitiniertes PCNA regulierte fehlerfreie Bypass abläuft, ist bislang nicht aufgeklärt. Die Einführung von Mutationen kann aber nur dann verhindert werden, wenn statt des beschädigten Parentalstrangs der unbeschädigte, neusynthetisierte Tochterstrang der Schwesterchromatide als Vorlage benutzt wird (Higgins et al., 1976). Aufgrund von Experimenten mit *E. coli* wurden hierfür unterschiedliche Modelle vorgeschlagen, welche allerdings eine Beteiligung des Rad51-homologen Rekombinations-Proteins RecA voraussetzen (Cox, 2002; McGlynn und Lloyd, 2002). Aufgrund genetischer Daten ist jedoch klar, dass Rekombinationsproteine am RAD6-abhängigen fehlerfreien Bypass nicht beteiligt sind. In **Abb. 30** sind zwei Modelle dargestellt, wie ein *template-switch* ohne RAD51-abhängige Abläufe wie die Invasion eines doppelsträngigen DNA-Abschnitts (*Bildung eines D-loops*) ablaufen könnte (Higgins et al., 1976).

Nachdem die Replikation eines Stranges durch eine DNA-Läsion angehalten wurde, kann es zu einer Regression der Replikationsgabel und damit verbundenem *annealing* der freien Enden der Tochterstränge kommen, so dass sich eine *Holliday-Junction*-Struktur bildet (*chickenfoot*). Die Replikation des von der DNA-Läsion betroffenen Tochterstranges könnte dann mit dem anderen Tochterstrang als Vorlage wieder aufgenommen werden. Eine Rückbildung des *chickenfoot*s durch *branch migration* wäre aufgrund des negativen *supercoilings* der DNA begünstigt und würde zur Wiederherstellung der Replikationsgabel führen. Danach könnte die Replikation normal fortgesetzt werden.



**Abb. 30: Zwei Modelle für einen fehler-freien Bypass von DNA-Läsionen nach einem *template-switch*-Mechanismus: A**, Nach dem *chickenfoot*-Modell (Higgins et al., 1976) erfolgt bei Anhalten der Replikation eine Revertierung und Verschiebung der Replikationsgabel, wobei sich unter *annealing* der beiden neusynthetisierten Tochter-Stränge eine *Holliday-Junction* ausbildet (*chickenfoot*). Durch eine neu-gestartete Replikation könnte die DNA-Schädigung unter Benutzung des komplementären Tochter-Stranges umgangen werden (*template switch*). Eine erneute, möglicherweise spontan ablaufende Verschiebung dieser Struktur (*branch migration*) führt zur Wiederherstellung einer normalen Replikationsgabel. **B**, Nach dem Hemikatenan-Modell (Liberi et al., 2005) ist ein Bypass durch während der Replikation spontan gebildete Hemikatenan-Strukturen (SCJ) der neureplizierten Tochterstränge möglich. Diese Strukturen folgen der Replikationsgabel, so dass ein *stalling* der Replikationsgabel auch ein Stoppen der Hemikatenan-Region bewirkt. Diese könnten den Keim für eine Paarung der neusynthethsierten Stränge bilden. Bei einem Neustart der Replikation in dieser Region wäre so ein *template switch* erreicht. Im abschliessenden Schritt muss die normale Struktur der Replikationsgabel wiederhergestellt werden. **A,B**, In beiden Modellen würde der *template switch* in einer zur Zeit unbekanntenen Weise von der Multi-Ubiquitinierung von PCNA abhängen. PCNA und die replikative Polymerase wurden zur Vereinfachung nicht dargestellt, sie befinden sich jeweils am Ort der Pfeilspitze. Zusätzliche Pfeile unter der Abbildung deuten eine *branch migration* der Replikationsgabel bzw. der *Holliday-Junction* an.

Am Bypass von DNA-Läsionen könnten auch Hemikatenan-Strukturen (auch: *sister chromatid junction*, SCJ) beteiligt sein (Lopes et al., 2003). Hierbei handelt es sich um Verschlingungen der DNA-Tochterstränge, die während der Replikation zu beobachten sind. An der Stelle einer DNA-Läsion könnte die Hemikatenan-Region ausgedehnt werden, so dass es zu einer komplementären Paarung der Tochterstränge kommt. Durch Bildung einer solche Pseudo-Doppel-*Holliday-Junction* könnte ein *template-switch* ermöglicht werden. Solche Strukturen sind beobachtet worden (Liberi et al., 2005); Diese sind in ihrer Formation allerdings von Rekombinations- und *checkpoint*-Proteinen abhängig und somit wahrscheinlich nicht Teil von *RAD6*-abhängigen Mechanismen.

Neben dem generellen Mechanismus ist ebenfalls unklar, wie die Ubiquitinierung von PCNA bei diesem Prozess wirkt. Da sowohl mono-ubiquitiniertes PCNA als auch PCNA-SUMO die Rekrutierung spezifischer Faktoren bewirken, liegt es nahe, dass multi-ubiquitiniertes PCNA ebenfalls einen spezifischen Interaktionspartner hat. Aufgrund der genetischen Daten sind Rekombinations-Proteine auszuschliessen, da entsprechende Mutanten nicht in epistatischer Beziehung zum *RAD6-pathway* stehen.

Eine der Multi-Ubiquitinierung nachgeschaltete Funktion könnte Rad5 haben, das neben der RING-Finger-Domäne auch noch eine zu Snf2 homologe ATPase-Domäne besitzt (Johnson et al., 1994). Rad5 könnte einerseits die Modifikation von PCNA bewirken und andererseits mit der entstandenen multi-ubiquitinierten Form interagieren und dann über eine ATPase/Helikase-Funktion an den für einen fehlerfreien Bypass notwendigen Umstrukturierungen der Replikationsgabel beteiligt sein. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass ein Allel von Histon 2b (*htb1-3*) in den fehlerfreien Arm des *RAD6-pathways* eingeordnet wurde und sich in Bezug auf Hypersensitivität gegenüber UV-Licht epistatisch zu *rad5*, nicht aber zu *ubc13* verhält (Martini et al., 2002).

Da bislang keine weitere Mutantes aus dem fehlerfreien Arm des *RAD6-pathways* gefunden wurde, ist es möglich, dass durch die Multiubiquitin-Modifikation von PCNA kein neuer Faktor zur Replikationsgabel rekrutiert wird, sondern dass multi-ubiquitiniertes PCNA direkt eine Umordnung des Replikationskomplexes und somit eine Regression der Replikationsgabel sowie einen *template-switch*-Bypass ermöglicht.

### IV.1.3 Regulation der Ubiquitin-Modifikation von PCNA und des replikativen Bypasses von DNA-Läsionen

Eine wesentliche, bislang ungeklärte Frage betrifft die Regulation der Ubiquitinierung von PCNA und somit des Läsions-Bypasses. Bislang ist weder bekannt, wie die geschädigte DNA erkannt wird, noch, ob vorgeschaltete Faktoren zur Erkennung von DNA-Schäden existieren. Aufgrund der großen Zahl unterschiedlicher DNA-Läsionen erscheint es unwahrscheinlich, dass diese durch ein spezifisches Sensorprotein gebunden werden, welches dann die Ubiquitinierung auslöst. In Einklang hiermit erfolgt PCNA-Ubiquitinierung nach unterschiedlichen DNA-Schädigungen, welche z.B. durch das DNA-methylierende Agenz MMS oder das UV-Mimetikum 4-NQO verursacht werden. Gemeinsam haben diese Läsionen, dass sie kein Substrat für die replikativen Polymerasen sind und so zu einem Anhalten des Polymerase-Komplexes oder der ganzen Replikationsgabel führen. Entsprechend wird das Signal für den *RAD6-pathway* wahrscheinlich durch dieses *stalling* und möglicherweise den damit verbundenen Veränderungen des Replikationskomplexes gebildet. Da PCNA Teil dieses Komplexes ist, könnten das PCNA-Molekül an einer angehaltenen Replikationsgabel sogar selbst das Signal für seine Modifikation geben. Der hier vorgeschlagene Mechanismus ist analog zur Erkennung von DNA-Läsionen durch *checkpoint*-Proteine während der S-Phase. Der Auslöser ist hier wahrscheinlich ebenfalls ein *stalling* der Replikationsgabel, das wahrscheinlich zu einer Vergrößerung der durch RPA gebundenen DNA-Einzelstrang-Abschnitte führt, an die *checkpoint*-Sensoren binden (Zou und Elledge, 2003; Zou et al., 2003; Lucca et al., 2004). Auch im Falle von TCR (*transcription-coupled repair*) bildet eine angehaltene Polymerase, RNA-Polymerase II, das Signal für das Vorliegen geschädigter DNA (Hoeijmakers, 2001).

Bislang konnte kein direkter Zusammenhang zwischen *checkpoint* und der PCNA-Ubiquitinierung hergestellt werden. Einerseits konnte PCNA in *checkpoint*-Mutanten wie *mec1-1* oder *rad53* noch modifiziert werden, andererseits ist die PCNA-Ubiquitinierung für die Signaltransduktion des *checkpoints* (gemessen als Phosphorylierung von Rad53) nicht notwendig (Daten nicht gezeigt). Trotzdem ist es wahrscheinlich, dass der *RAD6*-abhängige Bypass von DNA-Läsion zumindest indirekt durch den *checkpoint* beeinflusst wird, da dieser eine Stabilisierung der Replikationsgabel in Gegenwart von DNA-Läsionen bewirkt (Lopes et al., 2001; Tercero und Diffley, 2001). Diese Stabilisierung wird wahrscheinlich ebenfalls durch post-translationale Modifikation von Proteinen des Replikationskomplexes erreicht.

Interessanterweise kann die Abhängigkeit der PCNA-Ubiquitinierung von DNA-Schäden durch Überexpression von Rad18 aufgehoben werden. Hierdurch wird eine Entkopplung von DNA-Schaden und PCNA-Ubiquitinierung erreicht. Rad18 ist somit ein Schlüssel-Regulator im *RAD6-pathway*. Es ermöglicht nicht nur die Chromatin-Lokalisierung von Rad6 und wirkt als Ubiquitin-Ligase für PCNA, sondern scheint aufgrund dieser Daten auch spezifisch an der Erkennung von PCNA beteiligt zu sein, das sich an der Stelle einer DNA-Läsion befindet.

Die Interaktion von Rad18 mit PCNA ist wahrscheinlich das entscheidende regulatorische Ereignis für die Ubiquitinierung von PCNA. Da sowohl Rad18 als auch die ubiquitinierten Formen von PCNA Chromatin-assoziiert sind, könnte Rad18 PCNA an einem Replikationskomplex am Ort einer DNA-Läsion binden und dort dessen Modifikation bewirken. Wie die Spezifität von Rad18 für solche PCNA-Moleküle erreicht wird, ist unklar. Möglicherweise kompetitiert Rad18 mit anderen Komponenten der Replikations-Maschinerie, z.B. der Polymerase. Eine Veränderung im Replikationskomplex beim Auftreffen auf eine DNA-Läsion könnte dann die Bindung von Rad18 erlauben. Nach diesem Modell käme es bei der Überexpression von Rad18 auch abseits von DNA-Läsionen zu einer Bindung an PCNA. Dies würde eine Erklärung für die beobachtete, konstitutive Ubiquitinierung von PCNA unter der Überexpression von Rad18 geben.

In den bisher untersuchten, menschlichen Tumorzelllinien wurde nach DNA-Schädigungen durch MMS oder UV in erster Linie mono-ubiquitiniertes PCNA nachgewiesen (Hoegel et al., 2002; Kannouche et al., 2004). Entsprechend lässt sich daraus schließen, dass bei DNA-Läsionen während der S-Phase in diesen Zellen vor allem Transläsions-Replikation benutzt wird. Während dieser Prozess das Risiko von neuen Mutationen birgt, so liegen seine Vorteile verglichen mit einem *template-switch* darin, dass der Bypass unter Erhaltung der normalen Struktur der Replikationsgabel möglich ist und wahrscheinlich mit einer höheren Geschwindigkeit ablaufen kann.

Unklar bleibt, wie die wechselseitige Regulation der beiden prinzipiellen Arme des *RAD6-pathways* abläuft. Da in Hefezellen durch unterschiedliche DNA-Schädigungen sowohl die Mono-Ubiquitin-Modifikation als auch die Multi-Ubiquitin-Kette induziert werden, ist auszuschließen, dass die beiden Mechanismen jeweils nur bei spezifischen DNA-Läsionen fungieren. Auch zeigen genetische Daten eine klare, funktionelle Redundanz zwischen den beiden Armen des *RAD6-pathways*. Dementsprechend können offensichtlich beide Mechanismen den Bypass der meisten DNA-Läsionen ermöglichen. Hieraus folgt aber auch eine Konkurrenz beider Mechanismen. Wie die Entscheidung getroffen wird, ob ein bestimmtes PCNA-Molekül mono- oder



multi-ubiquitiniert wird, ist bislang unklar. Möglicherweise haben die Mechanismen eine Präferenz für DNA-Läsionen auf dem *leading-* bzw. *lagging*-DNA-Strang, welche nach einem unterschiedlichen Mechanismus repliziert werden.

## IV.2 PCNA-SUMOylierung inhibiert die Rekombination an der Replikationsgabel

PCNA wird spezifisch in der S-Phase, jedoch unabhängig von DNA-Schädigungen durch SUMO modifiziert, was für diese Modifikation eine Funktion in einem Replikations-assoziierten Prozess nahelegt (Hoege et al., 2002). In dieser Arbeit konnte durch genetische Experimente gezeigt werden, dass die SUMOylierung von PCNA eine Inhibition homologer Rekombination bewirkt. Dabei besteht eine Spezifität bezüglich eines Rekombinationsprozesses, der einen Bypass von DNA-Läsionen während der Replikation ermöglicht und somit eine ähnliche Funktion wie der *RAD6-pathway* hat. Experimente, in denen unterschiedliche Rekombinationsvorgänge untersucht wurden, zeigten, dass die Inhibition spezifisch auf Rekombination zwischen den Schwester-Chromatiden wirkt, die mechanistisch mit der Replikation gekoppelt ist. Biochemische und genetische Daten zeigen, dass SUMOyliertes PCNA die Rekombination reguliert, in dem ein anti-rekombinatorischer Faktor, Srs2, durch spezifische Interaktion mit PCNA-SUMO zur Replikationsgabel rekrutiert wird. Die Funktion dieser durch PCNA-SUMO-Srs2 bewirkten Inhibition von Rekombination an der Replikationsgabel liegt möglicherweise darin, eine Interferenz des Rekombinations-Prozesses oder bestimmter Rekombinations-Strukturen mit Replikations-assoziierten Abläufen zu verhindern. Eine weitere Folge dieser Inhibition liegt darin, dass der Bypass von DNA-Läsionen nicht durch Rekombinationsvorgänge, sondern durch den *RAD6-pathway* und somit PCNA-Ubiquitinierung erfolgt. Es liegt somit eine funktionelle Kooperation zwischen den unterschiedlichen PCNA-Modifikationen vor, was auch in der physikalischen Interaktion der Modifikations-Enzyme Ubc9, Rad18 und Rad5 deutlich wird.

Interessanterweise betreffen die Ubiquitin- und ein Großteil der SUMO-Modifikation das gleiche Lysin von PCNA, sie schließen sich somit gegenseitig aus. Dies legt einen funktionelle Antagonismus der beiden Modifikationen nahe, der jedoch nicht beobachtet wurde. Ein Erklärungsansatz liegt darin, dass PCNA ein Trimer bildet. Würden beide Modifikationen jeweils nur eine Untereinheit betreffen, dann könnte ein PCNA-Trimer sowohl SUMOyliert als auch ubiquitiniert sein. Eine zweite Möglichkeit könnte darin liegen, dass

beide Modifikationen nur transient auftreten, so dass eine Inhibition zeitlich sehr eng begrenzt ist. Dies könnte durch rasche Zyklen von Konjugation und Dekonjugation erreicht werden. Eine dritte, ähnliche Erklärung wäre durch das Vorliegen einer Kopplung der beiden Modifikationssysteme gegeben, so dass z.B. ein während der Replikation SUMOyliertes PCNA-Molekül an der Stelle einer DNA-Schädigung erst deSUMOyliert und dann ubiquitiniert wird. Die Interaktion von Ubc9 mit Rad18 und Rad5 könnte für eine solche Kopplung der Modifikationen sprechen (Hoege et al., 2002).

#### *IV.2.1 RAD6- und RAD52-abhängige Mechanismen bewirken den Bypass von DNA-Läsionen während der Replikation*

Ein Hinweis, dass neben *RAD6*-abhängigen Mechanismen auch homologe Rekombination einen Bypass von DNA-Läsionen während der Replikation bewirken kann, wurde durch die Suppression der Hypersensitivität von Mutanten im *RAD6-pathway* durch Überexpression von *RAD52* geliefert. Aus diesem Ergebnis folgt, dass zumindest eine partielle funktionelle Überlappung dieser unterschiedlichen Reparatur-Mechanismen bestehen muss.

Die einfachste Erklärung für die beobachtete Verminderung der Hypersensitivität gegenüber DNA-Schäden von Mutanten des *RAD6-pathways* durch zusätzliche Mutationen, welche die SUMOylierung von PCNA beeinträchtigen, wird deshalb durch eine Aktivierung eines solchen alternativen Bypass-Mechanismus gegeben. In dieser Arbeit konnte bewiesen werden, dass PCNA-SUMO homologe Rekombination inhibiert. Durch weitere genetische Experimente konnte dieser Rekombinations-Prozess genauer charakterisiert werden. Dabei wurde die inhibitorische Funktion von PCNA-SUMO auf einen Rekombinations-Prozess eingegrenzt, der spezifisch zwischen den Schwesterchromatiden abläuft. An diesem sind alle Proteine beteiligt, welche für die zentrale Strangaustausch-Reaktion notwendig sind (Rad51, Rad52, Rad54, Rad55/57).

In allen Modellen für einen rekombinativen Bypass unter Benutzung der Schwesterchromatide wird der geschädigte Vorlagen-Strang durch einen *template-switch* umgangen, so dass eine Ähnlichkeit zu dem durch PCNA-Multi-Ubiquitinierung vermittelten Mechanismus besteht. Bisher ist unklar, wodurch sich diese beiden, durch verschiedene Proteine vermittelten Abläufe unterscheiden.

Eine Möglichkeit wäre, dass die Revertierung der angehaltenen Replikationsgabel zu einer *chickenfoot*-Struktur und die DNA-Synthese ähnlich wie beim *RAD6*-abhängigen *template switch* ablaufen (s.IV.1.2), es dann aber nicht zu einer Rückbildung einer normalen Replikationsgabel

kommt, sondern in einer Strang-Austausch-Reaktion eine Doppel-*Holliday-Junction* gebildet wird (Cox, 2002; McGlynn und Lloyd, 2002). Diese müsste in einem weiteren Schritt gespalten werden, um eine Fortführung der Replikation zu gewährleisten. Andererseits ist es möglich, dass dem Rekombinations-Prozess eine nukleolytische Spaltung entweder der Replikationsgabel oder des *chickenfoots* vorgeschaltet ist, wodurch ein Doppelstrangbruch-Intermediat entstehen würde. Nach Resektion des Doppelstrangbruchs könnte dann eine Strangaustausch-Reaktion stattfinden; die Replikation dieser *D-loop*-Struktur könnte dann ebenfalls einen Bypass der Läsion bewirken. Eine dritte Möglichkeit ist, dass der Läsions-Bypass durch eine Ausdehnung von spontan während der Replikation entstehenden Hemikatenan-Strukturen zu Pseudo-Doppel-*Holliday-Junctions* ermöglicht wird (**Abb 30b**). Solche Strukturen werden in Abhängigkeit von Rad51 während der Replikation in der Gegenwart von DNA-Schädigungen gebildet, konnten bislang aber nur in *sgs1*-Mutanten nachgewiesen werden (Liberi et al., 2005).

Der rekombinative Bypass verläuft erwartungsgemäß unabhängig von Rad59, einem Rekombinations-Protein, das in einen Rad51-unabhängigen Prozess der Doppelstrangbruch-Reparatur eingeordnet wurde. Dieses *single strand annealing* (SSA) ist beim Vorliegen von repetitiven Sequenzen wichtig, wo es nach der Resektion des Doppelstrangbruchs zum *annealing* von homologen Sequenzen kommen kann (Symington, 2002). Am Bypass durch Rekombination gleichfalls unbeteiligt ist der MRX-Komplex (Mre11, Rad50, Xrs2), der in mehreren frühen Abläufen der Reparatur von Doppelstrangbrüchen eine Rolle spielt und dabei einerseits eine bislang nicht vollkommen verstandene Funktion in der Resektion von Doppelstrangbrüchen hat, andererseits an dem *checkpoint-signalling* beteiligt ist (Symington, 2002).

#### IV.2.2 SUMO-modifiziertes PCNA rekrutiert Srs2 zur Replikationsgabel

Die von PCNA-SUMO abhängige Inhibition der Rekombination von Schwesterchromatiden wird durch Srs2 vermittelt. Srs2 besitzt eine 3'-5'-Helikase-Aktivität und wirkt als Inhibitor der Rekombination, indem es die für den Rekombinations-Prozess entscheidenden Rad51-Nukleoprotein-Filamente zerstört. In biochemischen Experimenten interagierte Srs2 mit einer erhöhten Affinität mit PCNA, wenn PCNA durch SUMO modifiziert war. Dies liegt in einer C-terminalen Domäne begründet, die sowohl die Bindung zu PCNA als auch zu SUMO vermittelt. Durch ein *in vitro*-System mit aufgereinigten Komponenten konnte weiterhin bewiesen werden, dass PCNA-SUMO und Srs2 direkt interagieren. Zusätzlich ergaben genetische

Experimente, dass die Interaktion mit Srs2 entscheidend für die Inhibition von Rekombination durch PCNA-SUMO ist. In diesen verminderten Mutanten mit Defekten in der PCNA-SUMOylierung die Hypersensitivität von *rad6* oder *rad18* epistatisch mit *srs2*- oder *srs2 $\Delta$ C* –Mutanten, denen die C-terminale PCNA-SUMO-Bindedomäne fehlte. In allen Mutanten kam es somit zu der gleichen Aktivierung des alternativen, rekombinationsabhängigen Bypass. Wie in IV.2.1 ausgeführt, handelt es sich bei diesem um die Rekombination der Schwesterchromatiden an der Replikationsgabel.

Diese Daten legen nahe, dass SUMO-modifiziertes PCNA Srs2 zur Replikationsgabel rekrutiert. Dort inhibiert Srs2 dann Rekombination, indem es der Bildung von Rad51-Filamenten an einzelsträngigen Abschnitten der DNA entgegenwirkt. In Übereinstimmung mit diesem Modell wurde in einer parallel publizierten Arbeit gezeigt, dass in Chromatin-Immunopräzipitations-Experimenten Srs2 in Abhängigkeit von PCNA-SUMO mit Chromatin spezifisch dort assoziiert, wo DNA repliziert wird (Papouli et al., 2005). Aufgrund fehlender SUMO-Modifikation von PCNA in *siz1*-Mutanten assoziiert Srs2 erwartungsgemäß vermindert und Rad51 entsprechend verstärkt mit der Replikationsgabel (Papouli et al., 2005).

Bislang ist nicht verstanden, warum Rekombination oder Rekombinationsstrukturen an der Replikationsgabel inhibiert werden. Es erscheint plausibel, dass dies notwendig ist, um einen einwandfreien Ablauf der Replikation oder Replikations-assoziierten Prozessen zu gewährleisten. Fehlende PCNA-SUMOylierung führt nicht zu globalen Replikationsdefekten, die sich z.B. in Kältesensitivität oder einer verlängerten S-Phase ausdrücken würden. Deshalb könnte es möglich sein, dass die Replikation nur an bestimmten Stellen gestört ist, wo sie z.B. aufgrund der Chromatin-Struktur behindert ist. Auf der anderen Seite ist es möglich, dass Rekombinationsabläufe Replikations-assoziierte Prozesse behindern. Ein solcher Prozess könnte z.B. der Aufbau von Schwester-Chromatid-Kohäsion sein, da hierfür nach derzeitigen Modellen die Struktur der Replikationsgabel sowie PCNA wichtig sind (Uhlmann, 2004).

Andererseits ist es möglich, dass die Inhibition der Rekombination an der Replikationsgabel keine konstitutive Funktion während der Replikation hat, sondern nur dann wichtig wird, wenn DNA-Schädigungen vorliegen. Somit bestünde die Aufgabe von PCNA-SUMO primär darin, den Bypass von DNA-Läsion durch einen *RAD6*-abhängigen Mechanismus und nicht durch Rekombination zu begünstigen. Dass der *RAD6*-vermittelte Bypass gegenüber Rekombinations-vermitteltem Bypass Vorteile hat, zeigt sich darin, dass auch eine Aktivierung der Rekombination (z.B. durch *siz1* oder *RAD52*-Überexpression) in *RAD6-pathway*-Mutanten nur eine partielle Verminderung

der Hypersensitivität bewirkt. Rekombination kann dementsprechend ein Fehlen des *RAD6-pathways* nicht vollständig kompensieren.

In diesem Zusammenhang ist interessant, wie die SUMOylierung von PCNA reguliert wird. Bislang ist weder bekannt, welchem Mechanismus die SUMOylierung folgt, noch, ob jedes an der Replikation beteiligte PCNA-Molekül modifiziert wird. Möglich wäre z.B., dass an der Replikation beteiligte PCNA-Moleküle nur in bestimmten DNA-Regionen SUMOyliert werden, welche aufgrund von Homologien anfällig gegenüber Rekombination sind (z.B. rDNA-Regionen).

Der hier beschriebene Mechanismus basiert ausschliesslich auf Daten aus genetischen und biochemischen Experimenten mit der Bäcker-Hefe *S. cerevisiae*. Deshalb stellt sich die Frage, inwiefern ähnliche Mechanismen in anderen Organismen zu finden sind. In höheren Eukaryonten konnte bislang weder die SUMO-Modifikation von PCNA nachgewiesen werden noch existiert ein zu Srs2 homologes Protein, obwohl es auch hier anti-rekombinatorische Proteine wie RecQ-Helikasen gibt. Wahrscheinlich wird in höheren Eukaryonten die Rekombination auf einer anderen Ebene reguliert, was sich in generell niedrigeren Rekombinationsraten niederschlägt. Deshalb ist ein besonderer Mechanismus zum Schutz der Replikationsgabel möglicherweise nicht in dem Maße notwendig, wie in *S. cerevisiae*. Das für die Initiation der Rekombination entscheidende Rad51-Protein befindet sich in höheren Eukaryonten in einem Komplex mit BRCA2 (Davies et al., 2001; Pellegrini und Venkitaraman, 2004; Galkin et al., 2005). Dies reguliert die Aktivität von Rad51 und damit der Rekombination. BRCA2 kann dabei sowohl inhibitorisch als auch aktivierend auf Rad51 wirken. Diese Regulation der Rekombination ist offensichtlich kritisch, da Mutationen in BRCA2 zu einer Vermehrung von Chromosomen-Aberationen (*gross chromosomal rearrangements*, GCR) und zur Entstehung von Tumoren führen (Yu, V. P. et al., 2000). In Bezug auf die Regulation von Rad51 scheint es bereits in *S. pombe* mechanistische Unterschiede zu geben. Ob PCNA in dieser Spezies mit SUMO modifiziert ist, wurde bislang noch nicht untersucht. In diesem Organismus existiert ein homologes Protein zu Srs2, diesem fehlt aber die C-terminale Domäne, welche in *S. cerevisiae* die Interaktion zu PCNA-SUMO vermittelt. Entsprechend wurde in genetischen Experimenten keine Suppression von *rhp6* (*S. pombe*-Homolog von *rad6*) durch *srs2* gefunden (Doe und Whitby, 2004). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass Srs2 in *S. pombe* ein Paralog besitzt, Fdh1, das auch in höheren Eukaryonten konserviert ist und einen Teil der Funktionen von Srs2 übernehmen könnte.

### *IV.2.3 Spezifische Vermittlung von Protein-Protein-Wechselwirkungen – die generelle Funktion von SUMO?*

Nur für wenige SUMO-Substrate ist die Funktion der Modifikation ähnlich gut verstanden wie im Fall von PCNA. Aufgrund des Wissens über die Funktion der unterschiedlichen Ubiquitin-Modifikationen erscheint es sehr wahrscheinlich, dass die generelle Funktion von SUMO in der Vermittlung von spezifischen Protein-Protein-Wechselwirkungen liegt und dadurch die Funktion des Substrats beeinflusst wird (Relokalisierung, Aktivierung der Transkription, etc., s. I.1.5). In Analogie zu Ubiquitin sollten Proteine, welche mit SUMO-modifizierten Substraten interagieren, durch SUMO-Interaktions-Motive oder –Domänen gekennzeichnet sein.

Bisher ist nur eine solche SUMO-Bindedomäne (SIM) bekannt, ein kurzes Sequenzmotif aus mehreren aliphatischen und sauren Aminosäuren (hhhxxxnnn, dabei steht h für eine aliphatische, x für eine beliebige und n für eine saure Aminosäure). Diese Sequenz wurde als erstes in hsPM-Scf75 und später in mehreren anderen SUMO-bindenden Proteinen entdeckt (Minty et al., 2000; Song et al., 2004; Hannich et al., 2005). In Srs2 konnte keine Sequenz entdeckt werden, welche den SIM-Konsensus erfüllt. Durch Benutzung von Trunkierungen konnte eine Interaktionsdomäne auf den C-terminus von Srs2 (AS: 1038-1174) eingeschränkt werden. Durch diesen Bereich werden sowohl die Bindung an SUMO als auch an PCNA vermittelt. Da eine Deletion der sechs C-terminalen Aminosäuren dieses Abschnitts bereits einen Verlust der Interaktion mit PCNA-SUMO bewirkt, könnte ein SUMO-interagierendes Motif am extremen C-Terminus von Srs2 liegen. Interessanterweise befindet sich hier eine kurze Abfolge von vier aliphatischen und einer sauren Aminosäure.

Ob Srs2 auch mit anderen SUMO-Konjugaten assoziiert, ist unklar. Zwar interagierte GST-Srs2 $\Delta$ N mit anderen SUMO-Konjugaten, wie in einem SUMO-*western-blot* deutlich wurde (Daten nicht gezeigt), die Affinität war allerdings im Vergleich zu PCNA deutlich vermindert. Ebenso konnte die Interaktion von PCNA-SUMO und Srs2 mit nicht-konjugiertem SUMO kompetitiert werden, hierfür war allerdings ein relativ hoher Überschuss an SUMO notwendig. Diese Daten sprechen dafür, dass Srs2 nur eine niederaffine Bindestelle für SUMO besitzt. Aufgrund dieser niedrigen Affinität ist die gleichzeitige Interaktion von SUMO-bindendem Protein mit dem modifizierten Substrat für eine spezifische Interaktion notwendig.

Das Prinzip, nach dem durch die Kombination von zwei Interaktionen niedriger Affinität eine spezifische, hochaffine Interaktion zwischen SUMO-Substrat und nachgeschaltetem Interaktionspartner entsteht, wurde auch bei

unterschiedlichen Ubiquitinierungs-Substraten gefunden (Hicke et al., 2005). Im Fall von mono-ubiquitinierten oder SUMOylierten Proteinen bindet der nachgeschaltete Faktor dabei an die Modifikation und das Substrat. Abgewandelt ist dieses Prinzip auch beim proteasomalen Abbau zu finden, hier ist keine Interaktion mit dem Substrat-Anteil zu beobachten, dafür aber mehrere schwache Interaktionen mit unterschiedlichen Ubiquitin-Proteinen aus der Ubiquitin-Kette, so dass eine Spezifität für bestimmte Ubiquitin-Ketten gewährleistet wird. Zusammenfassend kann das Erreichen einer hochaffinen Interaktion zwischen modifiziertem Substrat und Bindeprotein durch mehrere niederaffine Interaktionen als fundamentaler Wirkmechanismus von post-translationalen Ubiquitin- und SUMO-Modifikationen angesehen werden.

## V Material und Methoden

Die nachfolgenden mikrobiologischen, molekularbiologischen und biochemischen Methoden richten sich im wesentlichen nach Standardprotokollen (Sambrock et al., 1989; Ausubel et al., 1994) und nach den Angaben der Hersteller. In fast allen der unten beschriebenen Methoden wurden entionisiertes, steriles Wasser, sterile Lösungen und sterile Gefäße eingesetzt.

Soweit nicht anders vermerkt, wurden analysenreine Chemikalien und Reagenzien der Firmen Amersham-Pharmacia, Applied Biosystems, Biomol, Biorad, Difco, Fluka, Invitrogen, Kodak, Merck, New England Biolabs, Promega, Roth, Roche, Riedel de Haen, Serva oder Sigma verwendet.

### V.1 Computeranalysen

Datenbank-Recherchen (Sequenzsuche, Sequenzvergleiche sowie Literatur-Recherchen) wurden mit Hilfe des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und der *Saccharomyces Genome Database* (<http://www.yeastgenome.org/>) durchgeführt. Für Sequenzanalysen (Erstellen von Restriktionskarten, Auswertung von DNA-Sequenzierungen, Vergleiche von Proteinsequenzen und Design von *primern*) wurde das Programmpaket DNA-Star (DNA Star Inc.) verwendet. Filme von Western-Blots wurden mit einem Scanner (AGFA Arcus II) digitalisiert und mit dem Programm Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.) bearbeitet. Die Erstellung von Texten, Tabellen und Abbildungen erfolgte mit Hilfe der Programme des Microsoft Office Pakets (Microsoft Corp.).

### V.2 Mikrobiologische und Genetische Techniken

#### V.2.1 Arbeitstechniken für *E. coli*

##### ***E. coli* Stämme**

XL1-Blue: hsd R17 rec A1 endA1 gyrA46 thi-1 sup E44 relA1 lac  
[F' pro AB lacI<sup>q</sup>Δ M15 Tn10(Tet<sup>r</sup>)] (Stratagene)  
BL21(DE3)/RIL: B F<sup>-</sup> ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm+ Tet<sup>r</sup> galλ (DE3) EndA  
Hte [argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>] (Stratagene)

##### ***E. coli* Vektoren**

pet28a-c (Novagen)  
pet21a (Novagen)  
pGEX-4T1-3 (Amersham)  
pQE32 (Qiagen)



### ***E. coli* Plasmidkonstrukte**

pGex4T1-SRS2 $\Delta$ N wurde durch Subklonierung des SRS2-Fragments aus pGADC2-SRS2 $\Delta$ N hergestellt. pet28c-POL30 wurde durch PCR hergestellt. Lysin-Mutanten wurden in diesem Konstrukt unter Benutzung der entsprechenden pGAD-C2-Konstrukte und einer internen Sall-Schnittstelle erzeugt. Expressionskonstrukte für Ubc9 und Smt3 entstammen früheren Studien der Arbeitsgruppe, das entsprechende Siz1-Konstrukt dem Labor Johnson (Johnson und Gupta, 2001).

### ***E. coli* Medien**

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 wurden mit der Ausnahme von Kulturen zur Proteinexpression bei 37°C geschüttelt (200 rpm) und Ausstrichkulturen auf Agarplatten bei 37°C inkubiert. Antibiotika für die Selektion von transformierten Bakterien wurden in einer Konzentration von 50 $\mu$ g/ml (Ampicillin), 24 $\mu$ g/ml (Chloramphenicol) bzw. 30 $\mu$ g/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 einer Woche bei 4°C gelagert. Für die langfristige Lagerung wurden stationäre Flüssigkulturen pelletiert, in 15% Glycerol resuspendiert und bei -80°C eingefroren.

### **Herstellung kompetenter Bakterien**

Es wurden sowohl chemisch-kompetente als auch elektro-kompetente Zellen verwendet. In beiden Fällen wurde aus einer Einzelkolonie des entsprechenden *E. coli* -Stamms eine Übernacht-Kultur in Flüssigmedium hergestellt. Mit 10ml dieser Kultur wurde 1l LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlung der Kultur in Eiswasser (1 h) wurden die Zellen durch Zentrifugation (5min, 5000g, 4°C) geerntet. Alle weiteren Schritte wurden im Kühlraum unter Verwendung von vorgekühlten, sterilen Materialien und Lösungen durchgeführt. Für die Herstellung von elektro-kompetenten Zellen wurde das Zellpellet in 1l Wasser resuspendiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und der Wasch-Schritt mit 0,5l Glycerin (10% v/v) wiederholt. Die Zellen wurden in 20ml Glycerin (10% v/v) resuspendiert und erneut durch Zentrifugation geerntet. Schließlich wurden die Zellen in 3ml Glycerin (10% v/v) resuspendiert, in 100 $\mu$ l-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Für die Herstellung chemisch-kompetenter Zellen wurde das Zellsediment in 200 ml kalten MgCl<sub>2</sub>-Lösung (100mM) vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden erneut sedimentiert, in 400ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung (100mM) resuspendiert, für 20min in Eiswasser abgekühlt und erneut abzentrifugiert. Die kompetenten Zellen wurden

schließlich in 20ml 10% Glycerin mit 100mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen und in 100µl-Aliquots bei -80°C gelagert.

### **Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen**

Kurz vor der Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Für eine Elektroporation wurden ca. 10ng Plasmid bzw. 2µl eines gegen Wasser dialysierten Ligationsansatzes mit 25µl der elektrokompotenten Zellen gemischt. Die Suspension wurde in eine Elektroporations-Küvette (0,1cm Spaltbreite) mit einem Puls von 1,8kV und 25µF bei einem Widerstand von 200Ω elektroporiert. Unmittelbar nach dem elektrischen Puls wurden die Zellen in 1ml 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 kompetenten Zellen mit ca. 10ng Plasmid gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 20sec bis 1,5min bei 42°C und einer anschließenden Abkühlung für 2min auf Eis wurden die Bakterien in 1ml LB-Medium (ohne Antibiotika) aufgenommen. Nach einer Inkubation von 60min bei 37°C wurde die Zellsuspension auf Selektionsplatten ausgestrichen. Die Transformationsplatten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

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

Für die Expression rekombinanter Proteine wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3)/RIL benutzt. In der Regel wurden Kulturen mit einem Volumen von 1l oder 5ml für Testversuche benutzt. Diese wurden mit einer 1:100 Verdünnung einer Übernacht-Kultur inokuliert. Bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 wurde die Expression durch IPTG Zugabe (1mM Endkonzentration) bei RT, 30°C oder 37°C induziert. Die IPTG-Induktion erfolgte in der Regel für 3-6h. Es wurden Proben vor oder nach der Induktion entnommen, um die Expression zu überprüfen. Für die Reinigung wurden die Zelle abzentrifugiert (10min, 5000g, 4°C), einmal in kaltem PBS gewaschen und nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

## *V.2.2 Arbeitstechniken für S. cerevisiae*

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

pYCplac33, pYCplac22, pYIplac211, pYIplac128, pYEplac181, pYEplac195 (Gietz und Sugino, 1988)

pGBT9, pGAD424 (Bartel et al., 1993)

pGAD-C, pGBD-C (James et al., 1996)

pSEY8 (Ausgangsvektor für die benutzte Überexpressions-Bibliothek)

**S.cerevisiae Stämme**

<b>Name</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
DF5	<i>trp1-1 ura3-52 his3Δ200 leu2-3,11 lys2-801</i>	(Finley et al., 1987)
Y0018	<i>rad6::HIS3</i>	(Hoege et al., 2002)
Y0352	<i>rad18::LEU2</i>	(Ulrich und Jentsch, 2000)
Y1222	<i>rad5::kanMX6</i>	(Hoege et al., 2002)
Y0617	<i>mms2::HIS3</i>	(Ulrich und Jentsch, 2000)
Y0406	<i>ubc13::HIS3</i>	(Ulrich und Jentsch, 2000)
Y0766	<i>ubiΔ pUB100 pGPD-Ubi1-tail pUB39 LYS2-pCUP UBI</i>	(Spence et al., 1995)
Y0767	<i>ubiΔ pUB100 pGPD-Ubi1-tail pUB39 LYS2-pCUP UBIK63R</i>	(Spence et al., 1995)
Y1190	POL30	(Hoege et al., 2002)
Y1191	<i>pol30-K127R</i>	(Hoege et al., 2002)
Y1192	<i>pol30-K164R</i>	(Hoege et al., 2002)
Y1194	<i>pol30-K127,164R</i>	(Hoege et al., 2002)
YBP036	<i>pol30-46</i>	diese Arbeit
YBP211	<i>rev3::</i>	diese Arbeit
Y1229	<i>mms2::HIS3 pol30-K164R</i>	(Hoege et al., 2002)
Y1226	<i>rad5::KanMx6 pol30-K164R</i>	(Hoege et al., 2002)
Y0723	<i>rad52::URA3</i>	(Hoege et al., 2002)
YBP151	<i>pso2::KanMx6</i>	diese Arbeit
Eurofan	<i>stm1::KanMx6</i>	(Giaever et al., 2002)
Eurofan	<i>ubp3::KanMx6</i>	(Giaever et al., 2002)
Eurofan	<i>hek2::KanMx6</i>	(Giaever et al., 2002)
YBP249	<i>siz1::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
YBP270	<i>rad6::HIS3 siz1::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
YBP266	<i>rad6::HIS3 rad52::URA3</i>	diese Arbeit
YBP261	<i>rad6::HIS3 rad52::URA3 siz1::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
YBP268	<i>rad18::LEU2 siz1::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
YBP267	<i>rad18::LEU2 rad52::URA3</i>	diese Arbeit
YBP259	<i>rad18::LEU2 rad52::URA3 siz1::HIS3MX6*</i>	diese Arbeit
YBP298	<i>rad6::HIS3 pol30-K127R::kanMX6*</i>	diese Arbeit
YBP299	<i>rad6::HIS3 pol30-K164R::kanMX6*</i>	diese Arbeit
YBP300	<i>rad6::HIS3 pol30-KK127,164RR::kanMX6*</i>	diese Arbeit
YBP301	<i>rad6::HIS3 rad52::URA3 pol30-K127R::kanMX6*</i>	diese Arbeit
YBP302	<i>rad6::HIS3 rad52::URA3 pol30-K164R::kanMX6*</i>	diese Arbeit
YBP303	<i>rad6::HIS3 rad52::URA3 pol30-KK127,164RR::kanMX6*</i>	diese Arbeit
YBP304	<i>rad18::LEU2 pol30-K127R::kanMX6*</i>	diese Arbeit
YBP305	<i>rad18::LEU2 pol30-K164R::kanMX6*</i>	diese Arbeit
YBP306	<i>rad18::LEU2 pol30-KK127,164RR::kanMX6*</i>	diese Arbeit
YBP309	<i>rad18::LEU2 rad52::URA3 pol30-KK127,164RR::kanMX6*</i>	diese Arbeit
YBP352	<i>rad18::LEU2 rad50::kanMX6</i>	diese Arbeit
YBP353	<i>rad18::LEU2 rad51::kanMX6</i>	diese Arbeit
YBP354	<i>rad18::LEU2 rad54::kanMX6</i>	diese Arbeit
YBP355	<i>rad18::LEU2 rad59::kanMX6</i>	diese Arbeit
YBP356	<i>rad18::LEU2 rad55::kanMX6</i>	diese Arbeit
YBP363	<i>rad18::LEU2 siz1::HIS3MX6 rad50::kanMX6</i>	diese Arbeit
YBP364	<i>rad18::LEU2 siz1:: kITRP1 rad51::kanMX6</i>	diese Arbeit
YBP365	<i>rad18::LEU2 siz1:: kITRP1 rad54::kanMX6</i>	diese Arbeit
YBP366	<i>rad18::LEU2 siz1::HIS3MX6 rad59::kanMX6</i>	diese Arbeit
YBP367	<i>rad18::LEU2 siz1:: kITRP1 rad55::kanMX6</i>	diese Arbeit
YBP272	<i>srs2::kITRP1</i>	diese Arbeit
YBP288	<i>rad6::HIS3 srs2::kITRP1</i>	diese Arbeit
YBP290	<i>rad6::HIS3 srs2::kITRP1 siz1::kanMX6</i>	diese Arbeit
YBP344	<i>rad6::HIS3 srs2::kITRP1 pol30-KK127,164RR::kanMX6*</i>	diese Arbeit
YBP284	<i>rad18::LEU2 srs2::kITRP1</i>	diese Arbeit
YBP286	<i>rad18::LEU2 srs2::kITRP1 siz1::kanMX6</i>	diese Arbeit
YBP345	<i>rad18::LEU2 srs2::KITRP1 pol30-KK127,164RR::kanMX6*</i>	diese Arbeit
YBP348	<i>rad18::LEU2 srs2::KITRP1 rad52::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
YBP374	<i>srs2ΔC136::KanMX6</i>	diese Arbeit

Name	Genotyp	Referenz
YBP375	<i>siz1::HIS3MX6 srs2ΔC136::KanMX6</i>	diese Arbeit
YBP376	<i>rad6::HIS3 srs2ΔC136::KanMX6</i>	diese Arbeit
YBP377	<i>rad6::HIS3 siz1::HIS3MX6 srs2ΔC136::KanMX6</i>	diese Arbeit
YBP378	<i>rad18::LEU2 srs2ΔC136::KanMX6</i>	diese Arbeit
YBP379	<i>rad18::LEU2 siz1::HIS3MX6 srs2ΔC136::KanMX6</i>	diese Arbeit
YBP253	<i>rad5::kanMX6 siz1::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
YBP265	<i>rad5::kanMX6 rad52::URA3</i>	diese Arbeit
YBP243	<i>rad5::kanMX6 rad52::URA3 siz1::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
YBP251	<i>mms2::HIS3 siz1::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
YBP263	<i>mms2::HIS3 rad52::URA3</i>	diese Arbeit
YBP257	<i>mms2::HIS3 rad52::URA3 siz1::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
YBP255	<i>rad52::URA3 siz1::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
YBP292	<i>pol30-K127R::HIS3MX6*</i>	diese Arbeit
YBP293	<i>pol30-K164R::HIS3MX6*</i>	diese Arbeit
YBP294	<i>pol30-KK127,164RR::HIS3MX6*</i>	diese Arbeit
YBP316	<i>rad52::URA3 pol30-K127R::HIS3MX6*</i>	diese Arbeit
YBP317	<i>rad52::URA3 pol30-K164R::HIS3MX6*</i>	diese Arbeit
YBP318	<i>rad52::URA3 pol30-KK127,164RR::kanMX6*</i>	diese Arbeit
Y0628	<i>rad2::URA3</i>	(Hoege et al., 2002)
YBP334	<i>rad2::URA3 siz1::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
YBP332	<i>rad2::URA3 rad6::HIS3</i>	diese Arbeit
YBP333	<i>rad2::URA3 rad6::HIS3 siz1::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
YBP280	<i>rad5::kanMX6 srs2::klTRP1</i>	diese Arbeit
YBP282	<i>rad5::kanMX6 srs2::klTRP1 siz1::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
YBP274	<i>srs2::klTRP1 siz1::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
YBP346	<i>rad6::HIS3 srs2::klTRP1 pol30-K127R::kanMX6*</i>	diese Arbeit
YBP347	<i>rad6::HIS3 srs2::klTRP1 pol30-K164R::kanMX6*</i>	diese Arbeit
YBP380	<i>rad6::HIS3 srs2ΔC24::KanMX6</i>	diese Arbeit
YBP381	<i>rad6::HIS3 srs2ΔC6::KanMX6</i>	diese Arbeit
YBP382	<i>rad18::LEU2 srs2ΔC24::KanMX6</i>	diese Arbeit
YBP383	<i>rad18::LEU2 srs2ΔC6::KanMX6</i>	diese Arbeit
YLM231	<i>pol30::kanMX6 YCplac22<sup>His</sup>POL30</i>	diese Arbeit
YLM232	<i>pol30::kanMX6 YCplac22<sup>His</sup> pol30-K127R</i>	diese Arbeit
YLM233	<i>pol30::kanMX6 YCplac22<sup>His</sup> pol30-K164R</i>	diese Arbeit
YLM196	<i>pol30::kanMX6 siz1::HIS3MX YCplac22<sup>His</sup>POL30</i>	diese Arbeit
Y1210	<i>srs2::HIS3</i>	(Hoege et al., 2002)
Y0708	<i>his1-1/his1-1</i>	diese Arbeit
Y0709	<i>his1-7/his1-7</i>	diese Arbeit
Y0710	<i>his1-1/his1-7</i>	diese Arbeit
Y0711	<i>his1-1/his1-1 rad18::LEU2/rad18::LEU2</i>	diese Arbeit
Y0712	<i>his1-7/his1-7 rad18::LEU2/rad18::LEU2</i>	diese Arbeit
Y0713	<i>his1-1/his1-7 rad18::LEU2/rad18::LEU2</i>	diese Arbeit
YMS33	<i>his1-1/his1-1 siz1::klTRP1/siz1::klTRP1</i>	diese Arbeit
YMS33	<i>his1-1/his1-7 siz1::klTRP1/siz1::klTRP1</i>	diese Arbeit
YMS33	<i>his1-7/his1-7 siz1::klTRP1/siz1::klTRP1</i>	diese Arbeit
YMS33	<i>his1-1/his1-1 srs2::klTRP1/srs2::klTRP1</i>	diese Arbeit
YMS33	<i>his1-1/his1-7 srs2::klTRP1/srs2::klTRP1</i>	diese Arbeit
YMS33	<i>his1-7/his1-7 srs2::klTRP1/srs2::klTRP1</i>	diese Arbeit
YMS39	<i>his1-1/his1-1 siz1::klTRP1/siz1::klTRP1</i>	diese Arbeit
YMS39	<i>his1-7/his1-7 siz1::klTRP1/siz1::klTRP1</i>	diese Arbeit
YMS39	<i>his1-1/his1-7 siz1::klTRP1/siz1::klTRP1</i>	diese Arbeit
YMS39	<i>his1-1/his1-1 srs2::klTRP1/srs2::klTRP1</i>	diese Arbeit
YMS39	<i>his1-7/his1-7 srs2::klTRP1/srs2::klTRP1</i>	diese Arbeit
YMS39	<i>his1-1/his1-7 srs2::klTRP1/srs2::klTRP1</i>	diese Arbeit
YMS47	<i>his1-1/his1-1 srs2ΔC136::kanMX6/srs2ΔC136::kanMX6</i>	diese Arbeit
YMS47	<i>his1-7/his1-7 srs2ΔC136::kanMX6/srs2ΔC136::kanMX6</i>	diese Arbeit
YMS47	<i>his1-1/his1-7 srs2ΔC136::kanMX6/srs2ΔC136::kanMX6</i>	diese Arbeit
YMS47	<i>his1-1/his1-1 srs2ΔC6::kanMX6/srs2ΔC6::kanMX6</i>	diese Arbeit
YMS47	<i>his1-7/his1-7 srs2ΔC6::kanMX6/srs2ΔC6::kanMX6</i>	diese Arbeit

Name	Genotyp	Referenz
YMS48	<i>his1-1/his1-7 srs2ΔC6::kanMX6/srs2ΔC6::kanMX6</i>	diese Arbeit
YMS48	<i>his1-1/his1-1 srs2ΔC136::kanMX6/srs2ΔC136::kanMX6</i>	diese Arbeit
YMS48	<i>his1-7/his1-7 srs2ΔC136::kanMX6/srs2ΔC136::kanMX6</i>	diese Arbeit
YMS48	<i>his1-1/his1-7 srs2ΔC136::kanMX6/srs2ΔC136::kanMX6</i>	diese Arbeit
YMS48	<i>his1-1/his1-1 srs2ΔC6::kanMX6/srs2ΔC6::kanMX6</i>	diese Arbeit
YMS48	<i>his1-7/his1-7 srs2ΔC6::kanMX6/srs2ΔC6::kanMX6</i>	diese Arbeit
YMS48	<i>his1-1/his1-7 srs2ΔC6::kanMX6/srs2ΔC6::kanMX6</i>	diese Arbeit
YBP396	<i>leu2-112::URA3::leu2-k †</i>	diese Arbeit
YBP397	<i>leu2-112::URA3::leu2-k siz1::HIS3MX6 †</i>	diese Arbeit
YBP398	<i>leu2-112::URA3::leu2-k srs2::HIS3MX6 †</i>	diese Arbeit
YBP399	<i>leu2-112::URA3::leu2-k srs2ΔC136::HIS3MX6 †</i>	diese Arbeit
YBP400	<i>leu2-112::URA3::leu2-k rad18::kanMX6 †</i>	diese Arbeit
YBP401	<i>leu2-112::URA3::leu2-k rad18::kanMX6 siz1::HIS3MX6 †</i>	diese Arbeit
YBP402	<i>leu2-112::URA3::leu2-k rad18::kanMX6 srs2::HIS3MX6 †</i>	diese Arbeit
YBP403	<i>leu2-112::URA3::leu2-k rad18::kanMX6 srs2ΔC136::HIS3MX6 †</i>	diese Arbeit
YBP342	<i>siz1::kanMX6 †</i>	diese Arbeit

\* Diese Stämme enthalten einen *HIS3MX6* bzw. *kanMX6* Marker, welcher zwischen die Loci YBR088C (*POL30*) and YBR089C-A integriert wurde. Durch diese Integration wurden weder Wachstum noch die Sensitivität auf Schädigungen der DNA beeinflusst.

† Alle Stämme sind isogen zu DF5 (Finley et al., 1987), mit Ausnahme von YBP342, der ein Derivat von PJ69 ist (James et al., 1996) und YBP396 bis YBP403, die isogen zu W303 RAD5+ sind (Palladino und Klein, 1992).

### ***S.cerevisiae* Plasmidkonstrukte**

Zur Analyse von *two-hybrid*-Interaktionen wurden die entsprechenden ORF durch PCR aus genomischer Hefe-DNA amplifiziert und *in frame* mit der Aktivierungs- bzw. DNA-Bindedomäne von GAL4 in pGAD-C- bzw. pGBD-C-Vektoren eingefügt. *Two-hybrid*-Konstrukte, welche PCNA oder Lysin-Mutanten von PCNA enthielten, wurden durch PCR kloniert, bei der als Vorlage entweder DNA mit Wildtyp-Sequenz oder mit Sequenz der entsprechenden Mutante verwendet wurde. Das pGAD-C2-SRS2ΔN-Konstrukt entstammt einer Plasmidbibliothek. Dieses Konstrukt diente als Ausgangspunkt für weitere Trunkierungen, diese wurden über interne Schnittstellen oder mittels PCR kloniert oder durch das Einfügen eines STOP-Codons mittels zielgerichteter Mutagenese hergestellt. Zur konstitutiven Überexpression von Srs2ΔN wurde dieses Fragment mitsamt eigenem Terminator in einen Yiplac211-Vektor eingesetzt, der einen ADH-Promotor sowie die Sequenz eines *3myc-tags* enthielt. C-terminale Trunkierungen wurden in diesem durch Einfügen von STOP-Codons mittels zielgerichteter Mutagenese erzeugt. YEplac181-RAD52, PSO2, STM1 und HEK2 wurden entweder mittels PCR hergestellt oder aus pSEY8-Bibliotheks-Konstrukten über interne Schnittstellen subkloniert. Weitere benutzte Plasmidkonstrukte entstammen vorangegangenen Studien in der Arbeitsgruppe (Ulrich und Jentsch, 2000; Hoege et al., 2002).

### ***S.cerevisiae* Überexpressions-Bibliothek**

Um Überexpressions-Suppressoren der Hefe-Mutante *pol30-K164R* zu ermitteln, wurde die L9-Bibliothek (Labor M. Hall) benutzt. Deren Ausgangs-Plasmid ist pSEY8, das durch seinen *2 $\mu$ -origin* in hoher Kopienzahl in der Hefe gehalten wird. In diesen Vektor wurde partiell Sau3A-verdaute genomische Hefe-DNA kloniert, welche mit einer geringen Konzentration Ethyl-Methansulfonat mutagenisiert worden war. Die Fragmente sollten eine Größe zwischen 4 und 10kB haben. Insgesamt besteht die Bibliothek aus 14000 individuellen Klonen.

### ***S. cerevisiae* Medien**

YPD-Medium/ (Platten)

1% Hefeextrakt

2% Bacto-Pepton

2% D-(+)-Glukose

(2% Agar)

YPD G418 Platten/ YPD MMS-Platten

YPD Medium mit 2% Agar wurde nach dem Aufkochen auf 50°C abgekühlt, dann erfolgte die Zugabe von 200mg/l G418 als Pulver bzw. flüssiges MMS.

SC-Medium/ (Platten)

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% Agar)

### **Kultivierung von Hefen**

Flüssigkulturen wurden mit frisch gewachsenen Hefen von Platten- ausstrichen angeimpft. Es wurde stets mit Flüssigkulturen gearbeitet, welche aus einer frischen Übernacht-Kultur verdünnt wurden. Das Wachstum erfolgte in der Regel bei 30°C; für temperatursensitive Mutanten wurde die Wachstumstemperatur variiert. Die Zelldichte wurde photometrisch bestimmt und die Zellzahl kalkuliert ( $OD_{600} = 1$  entsprechen circa  $1,5 \times 10^7$  Zellen/ml). Für kurze Zeit (1-2 Monate) wurden Hefen auf Platten bei 4°C gelagert. Für die Langzeit-Aufbewahrung wurde eine stationäre Kultur mit Glycerin (15% Endkonzentration) versetzt und bei -80°C aufbewahrt.

### **Herstellung kompetenter Hefezellen**

Hefezellen wurden aus einer Übernacht-Kultur auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 inokuliert und bei 30°C bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5-0,7 kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (500g, 5min, RT) geerntet, mit sterilem Wasser und SORB (100mM LiOAc, 10mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA, pH 8,0, 1M Sorbitol) sterilisiert durch Filtration gewaschen und in 360 $\mu$ l SORB pro 50ml Zellkultur resuspendiert. Nach Zugabe von 40 $\mu$ l Träger-DNA (Lachssperma-DNA, 10mg/ml, Invitrogen), wurden die Zellen aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

### **Transformation von Hefezellen**

Für die Transformation von PCR-Produkten bzw. Plasmid-DNA wurden 50  $\mu$ l bzw. 10  $\mu$ l kompetente Zellen verwendet. Hierfür wurde zu den kompetenten Hefezellen die zu transformierende DNA (PCR-Fragment, linearisierter Vektor oder Plasmid) gegeben und gut gemischt. Diese Suspension wurde in 6 Vol PEG (100mM LiOAc, 10mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA, pH 8,0, 40% PEG-3350, sterilisiert durch Filtration) aufgenommen und bei RT für 30min inkubiert. Nach der Zugabe von DMSO (Endkonzentration 10%) wurde der Ansatz für 15min bei 42°C inkubiert, anschließend zentrifugiert (2-3min bei 400g), in 100  $\mu$ l Wasser aufgenommen und auf Selektionsmedium ausplattiert. Bei Benutzung der Resistenz gegen das Antibiotikum G418 erfolgte zuvor eine dreistündige Inkubation der transformierten Zellen in YPD. Außerdem war in diesem Fall eine Replika-Plattierung der Transformationsplatte auf eine weitere Selektionsplatte notwendig, um den Hintergrund zu reduzieren.

### **Genomische Integration mittels homologer Rekombination**

Lineare DNA wurde transformiert, um eine Integration in das Genom durch homologe Rekombination zu erreichen. Die YIplac-Plasmide (Gietz und Sugino, 1988) enthalten lediglich Auxotrophiemarker und keine autonomen Replikationselemente. Das untersuchte Gen wurde in die *multiple cloning site* hinter (*downstream*) einen Hefepromotor kloniert, der die konstitutive oder konditionale Expression des Gens ermöglichte. Für die Transformation wurde das Plasmid im Markergen linearisiert. Über die entstandenen Enden konnte die Integration in die entsprechenden homologen Bereiche im Genom durch homologe Rekombination erfolgen.

Die Gendeletion oder das Einfügen eines Epitop-*Tags* erfolgte über eine PCR-Strategie (Longtine et al., 1998; Knop et al., 1999). Circa 50 Basenpaare korrespondierend zu der Sequenz des Promotors vor dem Start-Codon bzw. des Terminators nach dem Stop-Codon wurden als Oligonukleotide synthetisiert. An beide *primer* wurde eine Standardsequenz angefügt, mit der eine Deletionskassette (Longtine et al., 1998) über PCR amplifiziert wurde. Das PCR-Produkt wurde gefällt (s. V.3.1) und in kompetente Hefezellen transformiert. Rekombinationsereignisse wurden über Integration eines Auxotrophie- bzw. Resistenzmarkers selektiert. Die Gendeletion wurde mittels PCR (s. V.3.3) und über Analyse des Phänotyps verifiziert. Das Einfügen eines Epitop-*tags* am C-terminalen Ende des zu analysierenden Gens erfolgte mit einer ähnlichen Strategie unter der Benutzung von Epitop-*tag*-Kassetten (Knop et al., 1999). Hierfür wurden Oligonukleotid-Sequenzen gewählt, die Homologie mit dem C-Terminus des *open reading frames* (ORF), sowie des 3' untranslatierten Bereiches besitzen. Der Nachweis der entstandenen Fusionsproteine erfolgte im *western-blot* mit Antikörpern, welche gegen das Epitop gerichtet waren.

### **Analyse des *mating type* von haploiden *S. cerevisiae***

Für die Analyse des Konjugationstyps (*mating type*) wurden die Testerstämme RC634a und RC75-7 $\alpha$  verwendet. Diese Stämme sind jeweils gegenüber dem anderen *mating type*-Pheromon hypersensitiv. 50  $\mu$ l einer wässrigen Zellsuspension jedes Testerstammes wurden mit 5ml einer

geschmolzenen, einprozentigen Agarlösung, die auf 45°C abgekühlt war, vermischt und als Top-Agar auf eine YPD-Platte gegossen. Die zu testenden Stämme wurden nach Erstarren des Agars als Replika auf den hergestellten Top-Agar plattiert. Nach 1 bis 2 Tagen Inkubation bildeten sich aufgrund der Hypersensitivität Halos aus. Dabei kam es jeweils dann zur Ausbildung eines Halo um die zu testende Kolonie, wenn der Testerstamm den reziproken Konjugationstyp besaß. Diploide Zellen bildeten mit beiden Testerstämmen keinen Halo aus, da sie kein *mating type*-Pheromon sekretieren.

### **Kreuzung von haploiden *S. cerevisiae* Stämmen**

Zwei haploide Stämme von unterschiedlichem *mating type* (MAT $\alpha$  und MAT $a$ ) wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase inkubiert. Gleiche Zellmengen wurden gemischt und 10 $\mu$ l hiervon 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) identifiziert und mit dem Mikromanipulator (Singer MSM Systems) isoliert werden. Enthielten die Ursprungsstämme unterschiedliche Auxotrophiemarker, wurden die Zellen alternativ auf die entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen und diploide Zellen durch ihr Wachstum selektiert.

### **Sporulation und Tetradenanalyse von diploiden *S. cerevisiae***

Diploide Hefezellen (500 $\mu$ l) einer stationären Kultur (Wachstum für mindestens 36h) wurden durch Zentrifugation (3min, 500g) geerntet, vierfach mit sterilem Wasser gewaschen und in 4ml Sporulationsmedium (1,5% Kaliumacetat) aufgenommen. Die Zellen wurden drei Tage bei 23°C geschüttelt. 10 $\mu$ l der sporulierten Zellen wurden mit 10 $\mu$ l Zymolyase-20T-Lösung (0,9M Sorbitol, 0,1M EDTA, 0,1M Tris-HCl, pH 8,0, 50mM DTT, 0,5mg/ml Zymolyase 20T (ICN Biochemicals)) gemischt und 10min bei RT verdaut. Hieraus wurden die Tetraden mit Hilfe eines Mikromanipulators (Singer MSM System) ausgelegt. Das Wachstum der Sporen erfolgte für zwei bis drei Tage ohne Selektion, anschließend wurde eine Replika-Plattierung auf Selektionsplatten durchgeführt.

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

Protein-Protein-Interaktionen wurden durch das *two-hybrid*-System getestet. Die zu untersuchenden Proteine wurden am N-Terminus mit der DNA-Binde- bzw. Aktivierungsdomäne von GAL4 fusioniert. Diese Fusionskonstrukte wurden gleichzeitig im Hefestamm PJ69-7a (James et al., 1996) exprimiert. Im Fall einer Interaktion zwischen den beiden Proteinen führte dies zur Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsaktivators und Expression eines Reportergens, das unter der Transkriptionskontrolle von GAL4 lag. Als Reportergen dienten die HIS3- und ADE2-Gene, so dass die Hefe-Zellen bei einer positiven Interaktion auf entsprechendem Selektionsmedium wachsen konnten.



### **Synchronisation des Zellzyklus von *S. cerevisiae***

In Gegenwart des *mating*-Pheromons  $\alpha$ -Faktor arretieren MATa-Hefezellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Für die Zellzyklus-Synchronisation wurden Zellen im logarithmischen Wachstum ( $OD_{600} < 0,6$ ) durch Zugabe von  $\alpha$ -Faktor ( $10 \mu\text{M}$ ) arretiert. Der Arrest erfolgte bei  $30^\circ\text{C}$  für 2-3h und wurde mikroskopisch kontrolliert. Die Zellen wurden zentrifugiert (5min, 500g, RT), gewaschen und in neues Medium überführt, um sie aus der G1-Phase zu entlassen. Die Zellen wurden bei RT geschüttelt; Proben wurden nach jeweils 20min entnommen. Um die Phase des Zellzyklus zu bestimmen, wurde die Expression von Clb2 durch *western-blot* überwacht.

Außerdem wurden Hefezellen in bestimmten Phasen des Zellzyklus synchronisiert, ohne sie danach zu entlassen. In der G1-Phase erfolgte dies durch  $\alpha$ -Faktor ( $10 \mu\text{M}$ ), in G2/M wurden sie durch Nocodazol ( $15 \mu\text{g/ml}$ ) arretiert. Hierfür wurden Zellen für 2-3h mit der entsprechenden Substanz bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert.

### **Phänotyp-Analyse durch Wachstumstest**

Für diese Arbeit wurden unterschiedliche Hefestämme auf ihre Sensitivität gegenüber der DNA-alkylierenden Substanz MMS getestet. Hierzu wurden serielle Verdünnungen von Hefekulturen auf Platten getüpfelt, welche unterschiedliche Konzentrationen MMS enthielten. Dies erlaubte durch den Vergleich des Zellwachstums bei gleicher ursprünglicher Zellzahl eine zuverlässigere Aussage als z.B. das Ausstreichen von Einzelkolonien. In diesen Versuchen wurden stationäre Hefekulturen eingesetzt. Die Kulturen wurden in sterilem Wasser auf eine  $OD_{600}$  von 0,5 (entspricht etwa  $7 \times 10^6$  Zellen) eingestellt und in fünf Schritten jeweils 1:5 verdünnt. Jeweils  $5\mu\text{l}$  der letzten fünf Verdünnungen wurden nebeneinander auf Platten getüpfelt, welche unterschiedliche Konzentrationen MMS enthielten und in der Regel drei Tage bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert. Das Austüpfeln gleicher Zellzahlen wurde durch eine Kontrollplatte überprüft, welche kein MMS enthielt.

### **Bestimmung von Überlebensraten nach UV-Licht Bestrahlung**

Der Hypersensitivitäts-Phänotyp gegenüber UV-Licht wurde durch quantitative Bestimmung der Überlebensraten von Hefestämmen nach UV-Bestrahlung ermittelt. Hierfür wurden Hefezellen aus einer frischen Übernacht-Kultur in Wasser verdünnt und in einer der UV-Sensitivität angepassten Konzentration auf YPD-Platten ausplattiert. Danach wurden diese unterschiedlich lang mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254nm im Dunkeln bestrahlt (Intensität von  $0,21\text{J/m}^2/\text{s}$ ; Handlampe, Vetter GmbH). Nach der Bestrahlung wurden die Platten für 3 Tage im Dunkeln bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend die Anzahl der Kolonien ausgezählt. Das Verhältnis der Anzahl von Kolonien auf unbehandelten Platten gegenüber bestrahlten Platten bildete die Überlebensrate. Für jeden Zeitpunkt wurden Duplikate angefertigt. Die Ergebnisse aus drei bis sieben unabhängigen Experimenten wurden gemittelt und die Standardabweichung bestimmt.

### **Qualitativer UV-Gradienten Überlebenstest**

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

### **Bestimmung der Mutationsraten**

Der *CAN1*-Genlokus wurde benutzt, um den Phänotyp von Hefestämmen in Bezug auf Entstehung von Mutationen zu bestimmen. Dieses Gen kodiert für eine Arginin-Permease, welche für die Aufnahme von Arginin und dem toxischen, strukturell analogen Canavanin essentiell ist. Entsprechend sind *can1*-Mutanten resistent gegen Canavanin und können auf dem benutzten Medium wachsen (SC-Arg +60µg/ml Canavanin). Für dieses Experiment wurden Kulturen mit einer geringen Zellzahl inokuliert, welche keine Mutanten beinhalten sollte (1:20000 Verdünnung einer Übernacht-Kultur), und bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Ein Teil dieser Kultur wurde zur Bestimmung der Mutationsfrequenz auf beschriebene Selektionsplatten ausgebracht. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Plattierung einer Verdünnung auf SC- oder YPD-Platten. Die Platten wurden drei Tage bei 30°C inkubiert. Danach wurden Canavanin-resistente Kolonien (Mutanten), sowie die Kolonien auf den Kontrollplatten ausgezählt. Die Mutationsfrequenzen wurden für zehn unabhängige Kulturen bestimmt und hieraus die Mutationsrate mittels eines Fluktuationstests bestimmt (Rosche und Foster, 2000). Hierfür wurde die Zahl der Mutanten aus jedem Ansatz auf die durchschnittliche Zellzahl der Kulturen normiert und aus der Verteilung der Zahl der Mutanten mit einem *maximum likelihood*-Ansatz die wahrscheinlichste Mutationsrate ermittelt. Aus mindestens zwei unabhängigen Fluktuationstests wurde die Mutationsrate gemittelt und die Standardabweichung bestimmt.

Es wurden ebenfalls die Mutationsraten nach Bestrahlung mit UV-Licht bestimmt. Hierfür wurden Zellen auf Canavanin-Selektionsplatten und zu Bestimmung der Überlebensraten auf Kontrollplatten ausgebracht. Diese Platten wurden einerseits mit UV-Licht bestrahlt, andererseits ohne Bestrahlung als Kontrolle belassen. Die Durchführung der UV-Bestrahlung erfolgte wie unter (Bestimmung von Überlebensraten nach DNA-Schädigung) beschrieben. Aus dem Verhältnis von Kolonien auf der bestrahlten gegenüber der unbestrahlten Platte wurde die Überlebensrate errechnet. Die Frequenz der induzierten Mutationen wurde aus der Zahl der Klone auf der bestrahlten Selektionsplatte im Verhältnis zur Zahl der überlebenden Zellen (Gesamtzahl der Zellen multipliziert mit Überlebensrate) errechnet. Mit Hilfe der unbestrahlten Selektionsplatte wurde die basale Mutationsfrequenz gebildet.

### **Bestimmung der Rekombinationsraten**

Die Häufigkeit von bestimmten Rekombinationsereignissen lässt sich mit Hilfe genetisch veränderter Tester-Stämme bestimmen. Diese besitzen im Prinzip zwei unterschiedliche, nicht-funktionale Allele eines Gens an

unterschiedlichen Stellen im Genom integriert. Durch Rekombination kann aus diesen das funktionale Wildtyp-Allel entstehen. In der Regel werden Auxotrophie-Marker verwendet, so daß sich Rekombinationsereignisse leicht durch entsprechendes Mangelmedium selektieren lassen.

In dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Systeme benutzt. Zum einen wurde die interchromosomale Rekombination in diploiden Zellen untersucht. Dafür wurden Zellen benutzt welche das *his1-1*-Allel auf einer Kopie von Chromosom 5 und das *his1-7*-Allel auf dem homologen Chromosom trugen. Um lediglich die interchromosomale Rekombinationsrate zu bestimmen, wurde die Reversionsraten von entsprechenden *his1-1* bzw. *his1-7* homozygoten Stämmen abgezogen. Weiterhin wurde in zwei unterschiedlichen Systemen die intrachromosomale Rekombination zwischen *direct repeats* untersucht. Einerseits wurden *leu2-112::URA3::leu2-k* (Palladino und Klein, 1992) Stämme benutzt. Durch Plattieren auf SC-Leu bzw. SC-Leu-Ura ist dabei eine Unterscheidung zwischen Rekombinationsereignissen möglich, die das *URA3*-Gen erhalten (Genkonversion) oder deletieren. Im Prinzip können Rekombinationsereignisse, die mit diesem Experiment untersucht werden, zwischen den Schwesterchromatiden oder innerhalb einer Chromatide ablaufen. Dies ist beim letzten benutzten Testerstamm, der einen *ade3Δ5'::ade3Δ' direct repeat* (Ben-Aroya et al., 2003) enthält, anders: Hier ist Rekombination nur zwischen den Schwesterchromatiden möglich, die dafür ungleich angeordnet sein müssen (ungleiche Schwesterchromatid-Rekombination, USCR).

Die Bestimmung der Rekombinationsraten erfolgte analog der Bestimmung der Mutationsraten durch Fluktuations-Analyse. Es wurden entweder Kulturen mit einer geringen Zellzahl (1:20000 Verdünnung einer Übernacht-Kultur) inokuliert und bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase inkubiert oder es wurde mit einer kompletten, logarithmisch wachsenden Einzelkolonien von einer Platte gearbeitet. Ein Teil der Zellen wurde zur Bestimmung der Rekombinationsfrequenz plattiert. Durch Plattieren einer Verdünnung auf eine Kontrollplatte wurde die gesamte Zellzahl der Kultur oder Kolonie bestimmt. Die Platten wurden zwei bis drei Tage bei 30°C inkubiert. Danach wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Insgesamt wurden für jeden Stamm zehn unabhängige Kulturen benutzt und hieraus die Rekombinationsrate mittels eines Fluktuationstests bestimmt (s. Bestimmung der Mutationsraten). Aus mindestens zwei unabhängigen Fluktuationstests wurde die Rekombinationsrate gemittelt und die Standardabweichung bestimmt.

## V.3 Molekularbiologische Techniken

### V.3.1 Isolierung von DNA

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

Plasmid-DNA wurde mit den Kits der Firmen Qiagen (Plasmid Mini Kit) oder Macherey-Nagel (Nucleospin Plasmid Quick Pure) nach Angaben des

Herstellers isoliert. Kleine Mengen DNA (Miniprep) wurden aus 4ml, größere Mengen (Maxiprep) aus 500ml Übernacht-Kultur gewonnen.

### **Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae***

Plasmide wurden, z.B. während des Überexpressions-Suppressions-screens, aus *S. cerevisiae* isoliert und in *E. coli* amplifiziert. Hierfür wurde eine Hefekolonie in 50 $\mu$ l Lysepuffer (1mM EDTA, 1% SDS, 10mM Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert, 50 $\mu$ l Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol-Gemisch (25:25:1, Roth) zugegeben und mit Glasperlen (Sigma, 425-600 $\mu$ m) bis zur Flüssigkeitsoberfläche aufgefüllt. Diese Mischung wurde 1 bis 2 Minuten mit dem Vortexer gemischt und 3min mit einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. 0,5 $\mu$ l des wässrigen Überstands wurden in *E. coli* transformiert.

### **Isolierung von chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae***

Als Vorlage zur Amplifikation von Hefe-Genen mittels PCR wurde isolierte, chromosomale DNA benutzt. Als Ausgangsmaterial diente eine stationäre Hefe-Kultur (10ml). Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (3000g, 5min), einmal mit Wasser gewaschen und in 200 $\mu$ l Lyse-Puffer (100mM NaCl, 1mM EDTA, 2% Triton X-100, 1% SDS, 10mM Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert. Hierzu wurde 200 $\mu$ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (25:25:1, Roth) und 300mg Glasperlen (Sigma, 425-600 $\mu$ m) gegeben und 5min mit dem Vortexer gemischt. Anschließend wurde 200 $\mu$ l TE-Puffer (1mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 8,0) dazugegeben, das Gemisch für 5min bei 14000rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, und der wässrige Überstand in ein neues Gefäß überführt. Durch Zugabe von 1ml reinem Ethanol wurden die Nucleinsäuren gefällt. Diese wurden kurz abzentrifugiert (12000g, 3min) und in 400 $\mu$ l TE-Puffer mit 3 $\mu$ l RNase A-Lösung (10mg/ml) gelöst. Die RNA wurde 5min bei 37°C verdaut, die verbleibende Nucleinsäure erneut mit 10 $\mu$ l NH<sub>4</sub>OAc und 1ml reinem Ethanol gefällt, kurz abzentrifugiert und in 50 $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260nm bestimmt. Die Ausbeute betrug 10 bis 20 $\mu$ g.

### **Präzipitation von DNA**

Für die Ethanol-Fällung wurden 1/10 Vol 3M Natriumacetat (pH 4,8) und 2,5Vol Ethanol zu der DNA-Lösung gegeben. Nach 30min Inkubation des Ansatzes bei -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.

### **Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Bestimmung der Konzentration von DNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$ nm. Für Doppelsträngige DNA entspricht dabei  $OD_{260}=1$  einer Konzentration von 50 $\mu$ g/ml.

### V.3.2 Klonierung von Plasmidkonstrukten

#### **Restriktionsverdau von DNA**

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen wurde nach den allgemein üblichen Vorschriften (Sambroek et al., 1989) und den Empfehlungen des Herstellers (NEB) durchgeführt. Es wurden in der Regel 5 bis 10U Enzyme pro 1 $\mu$ g DNA eingesetzt. Die Restriktionsansätze wurden mindestens 30min für analytische und >2h für präparative Zwecke bei der für das jeweilige Enzym geeigneten Temperatur inkubiert. Um während der Ligation eine Rezirkularisierung des Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Enden der Vektor-DNA dephosphoryliert. Dies erfolgte durch Zugabe von 5 bis 10U *Calf Intestinal Phosphatase* (NEB) zum Restriktionsansatz und halbstündiger Inkubation bei 37°C.

#### **Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA**

Für analytische und präparative Isolierungen von DNA-Fragmenten wurden 0,8 bis 2%ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in TBE-Puffer (90mM Tris-Base, 90mM Borsäure, 2,5mM EDTA) aufgekocht, nach Abkühlung mit Ethidiumbromid (0,5 $\mu$ g/ml) versetzt und in Flachkammern mit Kämmen für die Geltaschen gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt (0,5% SDS, 0,25% OrangeG, 25% Glycerol, 25mM EDTA, pH 8,0) und bei einer Spannung von 120V in TBE-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid mit DNA wurden DNA-Fragmente auf einem UV-Illuminator (IDA) sichtbar gemacht und photographiert. Durch die parallele Auftrennung eines Größenmarkers (1kb DNA-Ladder, Invitrogen) wurde die Länge der DNA-Fragmente ermittelt.

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

Die zu isolierenden DNA-Fragmente wurden unter langwelligem UV-Licht (324nm) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die DNA wurde mit Hilfe von Kits der Firmen Qiagen (QIAExII, QIAquick Gel Extraction Kit) oder Macherey-Nagel (Nucleospin Extract II) nach den Angaben des Herstellers aus dem Gelstück isoliert und in einem geeigneten Volumen EB-Puffer (10mM Tris-HCl, pH 8,5) eluiert.

#### **Ligation von DNA**

Die Mengenverhältnisse der für die Ligrationsreaktion eingesetzten DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen abgeschätzt. Für die Ligation wurden Vektor und einzufügendes Fragment im Verhältnis 1:3 bis 1:10 eingesetzt. Für einen Ligrationsansatz (10 $\mu$ l) wurden ca. 100 ng des Vektors und 1 $\mu$ l T4 DNA-Ligase (NEB) benutzt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend 4h oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Vor der Transformation wurde der Ligrationsansatz 15min gegen Wasser auf einem Nitrozellulosefilter (Porengröße: 0,05  $\mu$ m, Millipore) dialysiert.

### Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden im Institut oder durch Firmen durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktion sowie die nachfolgende Probenaufbereitung erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers mit dem DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham-Pharmacia). Der Ansatz enthielt ca. 0,5µg Plasmid-DNA und 5pmol *primer*.

### V.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Technik wurde in dieser Arbeit zur Klonierung von Plasmidkonstrukten (s.V.3.2), zur direkten Transformation in Hefe (s.V.2.2) oder zur Analyse von Integrationen im Genom von *S. cerevisiae*-Stämmen (s.V.2.2) benutzt.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 50µl mit ca. 50ng Plasmid-DNA oder 0,2µg genomischer DNA in PCR-Puffer (Thermopol-Puffer, NEB, oder Pfu-Puffer, Stratagene), jeweils 0,6 µM der entsprechenden Oligonukleotid-*primer*, 1,75µl Desoxynukleotid-Mix (je 10mM, NEB) und 0,2-5u Polymerase (Pfu-Turbo (Stratagene), Taq/Vent-Mischung 4:1 (NEB), Taq) durchgeführt.

Die Amplifikation wurde in einem Mastercycler (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. Falls notwendig wurden die Temperaturen für die Bindung der *primer* und die Elongationszeiten optimiert. Es wurde folgendes Programm verwendet, dabei erfolgte die Zugabe der Polymerasen nach der initialen Denaturierung:

Initiale Denaturierung	94°C	10min
10 Amplifikationszyklen	94°C	1min
	45°C	50sec
	68°C	1min,40sec
	94°C	1min
20 Amplifikationszyklen	54°C	50sec
	68°C	1min,40sec
	94°C	1min
+20s/ Zyklus	68°C	1min,40sec
Abkühlung	4°C	

Zur Verifizierung von chromosomalen Integrationsereignissen, in der Regel der Deletion eines Gens, wurde die Kolonie-PCR Technik benutzt. Hierfür wurde ein Teil einer Hefekolonie in 20µl Natronlauge (0,02 M) resuspendiert, eine Spatelspitze Glasperle (Sigma, 425-600 nm) zugegeben und 5min im Thermomixer unter starkem Schütteln auf 100°C erhitzt. Nach kurzer Zentrifugation (15sec) in der Tischzentrifuge wurden 4µl des Überstandes abgenommen und als Vorlage für die PCR Reaktion benutzt. Zusätzlich wurden 5µl PCR-Puffer (Thermopol-Puffer, NEB), 0,6µM der entsprechenden Oligonukleotid-*primer*, 1,75µl Desoxynukleotid-Mix (je 10mM, NEB) und 2u Taq-Polymerase eingesetzt.

Folgendes PCR-Programm wurde benutzt:

Initiale Denaturierung	94°C	5min
30 Amplifikationszyklen	94°C	30sec
	55°C	30sec
	68°C	1min
	68°C	5min
Endverlängerung	68°C	5min
Abkühlung	4°C	

#### V.3.4 Zielgerichtete Punktmutagenese

Es wurde eine Methode verwendet, die auf der PCR basiert und sich an das *QuickChange*-Protokoll (Stratagene) anlehnt. Hierfür werden zwei komplementäre Oligonukleotid-*primer* benutzt, die in der Mitte eine Punktmutation gegenüber der Zielsequenz aufweisen und an beiden Enden um jeweils 15bp der Originalsequenz verlängert sind. Die PCR-Reaktionen wurden in 25µl-Ansätzen mit 2,5µl Pfu-Puffer (Stratagene), je 62,5ng *primer*; 0,625µl Desoxynukleotid-Mix (je 10mM, NEB), 0,5µl Pfu Turbo (Stratagene), und ca. 50ng Plasmid-DNA durchgeführt. Es wurde folgendes Programm verwendet:

Initiale Denaturierung	94°C	30sec
19 Amplifikationszyklen	94°C	30sec
	55°C	60sec
	68°C	2min/
		1kb Plasmid
Abkühlung	4°C	

Um die DNA des Ausgangs-Plasmids zu beseitigen, wurde 1h mit DpnI verdaut, das spezifisch methylierte DNA schneidet. Anschließend wurde ein Teil des Ansatzes direkt in *E. coli* transformiert. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierungen überprüft.

## V.4 Proteinbiochemische Techniken

### V.4.1 Gel- und Western-blot Techniken

#### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurden 4-12% Bis-Tris-Polyacrylamid-Gele verwendet. Diese wurden in *mighty small*-Gelsystemen (Hoefer) gegossen oder es wurden kommerziell erhältliche Fertiggele (Invitrogen) benutzt. Im Gegensatz zu klassischen Tris-SDS-Polyacrylamid-Gelen ermöglicht bei dem benutzten Geltyp der niedrigprozentige Teil des Gels ein Sammeln der Proben, so dass kein spezielles Sammelgel gegossen wurde. Die Proteinproben wurden in Probenpuffer (Laemmli-Puffer: 2% SDS, 100mM DTT, 1% Bromphenolblau, 20% Glycerol, 60mM Tris-HCl, pH 6,8; HU-Puffer: 8M Harnstoff, 5% SDS,

1mM EDTA, Bromphenolblau, 1,5% DTT, 200mM Tris-HCl, pH 6,8) aufgenommen, durch Erhitzen (5-15min bei 96°C bzw. 65°C in HU-Puffer) denaturiert, auf das Gel aufgetragen und bei einer konstanten Spannung von 140 V aufgetrennt. Als Laufpuffer diente MOPS Puffer (50mM MOPS (Morpholinoethansulfonsäure), 50mM Tris Base, 3,5mM SDS, 1mM EDTA). Als Molekulargewichts-Standard wurde PEQ Gold II (PEQLab) benutzt.

Gellösung:	4%	12%
Wasser	11,85ml	6,2ml
65% Saccharose	-	1,2ml
2,5M BisTris-HCl, pH 7,5	2,4ml	2,4ml
30% Acrylamid/Bisacrylamid	2,2ml	6,6ml
10% SDS	82,5 $\mu$ l	82,5 $\mu$ l
TEMED	16,5 $\mu$ l	16,5 $\mu$ l
10% APS	82,5 $\mu$ l	82,5 $\mu$ l

### Coomassie-Färbung von Proteingelen

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

### Western-blot

SDS-Polyacrylamidgele wurden nach der Elektrophorese mithilfe einer Tankblot-Apparatur (Hofer) in Transferpuffer (250mM Tris-Base, 1,92M Glycin, 0,1% SDS, 20% Methanol) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon P, Millipore) überführt. Der Transfer erfolgte in der Regel 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 TBST-Milch (TBST mit 5% Magermilchpulver) blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht in TBST-Milch. Danach wurde die Membran sechsmal für 5min (eventuell verlängerte Zeiten) mit TBST (137mM NaCl, 25mM Tris-HCl, pH 7,5, 2,6mM KCl, 0,1% Tween 20) gewaschen und anschließend mit einem sekundären Antikörper in einer 1:5000 Verdünnung in TBST-Milch für 1-2 h bei RT inkubiert. Nach erneutem, sechsmaligem Waschen mit TBST erfolgte die Detektion mittels Chemolumineszenz (ECL-Western Kit, Amersham) nach Herstellerangaben auf ECL-Hyperfilm (Amersham) oder mittels einer CCD-Kamera (LAS, Fuji).

Als sekundäre Antikörper wurden mit Peroxidase gekoppelte anti-Kaninchen bzw. anti-Maus-IgG eingesetzt (Dianova). Außerdem wurden folgende kommerzielle Antikörper benutzt: polyklonaler *anti-myc* (A14) und *anti-Clb2* aus Kaninchen (Santa Cruz Biotechnology) sowie der monoklonale Maus-Antikörper *anti-PGK1* (Molecular Probes). Desweiteren wurden polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen PCNA und SUMO eingesetzt,



welche im Labor hergestellt und aufgereinigt wurden (Hoege et al., 2002). Ein weiterer Antikörper, der im Labor aufgereinigt wurde, ist der monoklonale Maus-Antikörper *anti*-HA (12CA5).

#### *V.4.2 Herstellung von Zellextrakten*

##### **Bestimmung der Proteinkonzentration**

Proteinbestimmungen wurden nach der Bradford-Methode (BioRad-Proteinassay, Biorad) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Standard wurde eine wäßrige IgG-Lösung bekannter Konzentration verwendet.

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

Um Proteolyse zu vermeiden und posttranslationale Modifikationen zu erhalten, wurden für analytische Zwecke ausschließlich denaturierte Extrakte hergestellt. Logarithmisch wachsende Hefezellen, korrespondierend zu der Zellmenge von 1ml mit  $OD_{600}=1$  wurden geerntet und in 1ml kaltem Wasser resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 150  $\mu$ l 1,85M NaOH/ 7,5%  $\beta$ -Mercaptoethanol gemischt und 15min auf Eis gestellt. Durch Zugabe von 150  $\mu$ l 55% Trichloressigsäure (TCA) wurden Proteine ausgefällt und anschließend pelletiert (15min bei 20000g und 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, die Proteine nochmals kurz abzentrifugiert und TCA-Reste gründlich abgesaugt. Das Pellet wurde in 50  $\mu$ l HU-Puffer aufgenommen.

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

Hefezellen einer logarithmisch wachsenden Hefekultur wurden geerntet und einmal mit kaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde im gleichen Volumen gekühltem Lysepuffer (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.4, Protease-Inhibitoren (*complete mix*, Roche, 20mM NEM, 5mM Benzamidin, 6  $\mu$ g/ml Antipain, 6  $\mu$ g/ml Leupeptin, 4,5  $\mu$ g/ml Aprotinin, 5  $\mu$ g/ml Trypsin Inhibitor, 2mM PMSF, 5  $\mu$ g/ml Pepstatin, 6  $\mu$ g/ml Chymostatin, alle Sigma) aufgenommen und mit Glasperlen (Sigma, 425-600  $\mu$ m) bis zum Meniskus versetzt. Nach drei bis vierfachem Schütteln im Vortex-Schüttler (Retsch) bei 4°C für jeweils 4min wurde die Lyse mikroskopisch überprüft und das Lysat durch ein Loch im Boden des Eppendorfgefäßes in ein zweites Eppendorfgefäß zentrifugiert. Für anschließende Bindungsexperimente wurde das Gesamtlisat mit Detergenzien (1% TX-100, 0,05% SDS) für 30min solubilisiert und anschließend 15min bei 15000g zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem Bindungsexperiment eingesetzt, hierbei wurden bei unterschiedlichen Proben gleiche Protein-Konzentrationen eingestellt (3-10 mg/ml).

#### *V.4.3. Aufreinigungen und Bindungsexperimente*

##### **Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli***

Für diese Arbeit wurden Proteine in *E. coli* (BL21 DE3/RIL) exprimiert und aus diesen aufgereinigt. Die Reinigung erfolgte mittels Affinitäts-Chromatographie entweder über das GST- oder das His<sub>6</sub>-Epitop.

Für die Reinigung von GST-Fusionsproteinen wurde das Zellpellet von 1l Bakterienkultur in 30ml PBS (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>) mit 0,1mM EDTA und Proteaseinhibitoren aufgenommen und in einem Emulsiflex C5 Zelldisruptor durch dreimaliges Durchpressen lysiert. Anschließend wurde TritonX-100 bis zu einer Konzentration von 1% zugegeben und das Lysat für 30min inkubiert. Nach 30min Zentrifugation bei 20000g erfolgte für 1 bis 3h die Bindung des Überstands an Gluthathion-Sepharose (Amersham-Pharmacia). Die Sepharose wurde anschließend abzentrifugiert und vierfach gewaschen. Dem PBS-Waschpuffer wurde dabei für den ersten Waschschrift 1%TX-100 und 300mM NaCl, für den zweiten und dritten Waschschrift 0,1% TX-100 zugesetzt. Anschließend wurde die Bindung und die Reinheit des aufgereinigten Proteins mittels SDS-PAGE überprüft. Die Proteine wurden entweder für weiter Bindungsstudien an der Sepharose belassen oder durch Zugabe von Gluthathion eluiert. Alle Schritte wurden mit vorgekühlten Materialien und bei 4°C durchgeführt.

Für die Reinigung von His-Fusionsproteinen wurde ebenfalls 1l Bakterienkultur benutzt. Als Lysepuffer diente der NiNTA-Lysepuffer (300mM NaCl, 10mM Imidazol, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0) mit zugesetzten Proteaseinhibitoren. Das Zellpellet wurde in 30ml Puffer resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Zelldisruptors (s.o.), durch Zugabe von Lysozym (1mg/ml) oder durch Ultraschall (Stabsonifizierer, Bandelin). Nach 30min Zentrifugation bei 20000g erfolgte für 1 bis 3h die Bindung des Überstands an NiNTA-Agarose (Qiagen). Gebundene Proteine wurden viermal mit NiNTA-Waschpuffer (300mM NaCl, 20mM Imidazol, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0) gewaschen und anschließend in Fraktionen mit NiNTA-Elutionspuffer (300mM NaCl, 250mM Imidazol, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0) eluiert. Alle Schritte der Aufreinigung wurden durch SDS-PAGE überprüft. Auch für diese Aufreinigung erfolgten alle Schritte mit vorgekühlten Materialien und bei 4°C.

### **NiNTA-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen**

Diese Technik wurde zur Analyse der posttranslationalen SUMO- oder Ubiquitin-Modifikationen benutzt. Hierfür wurden Hefe-Stämme benutzt, welche mit einem His<sub>6</sub>-Epitop modifiziertes PCNA exprimierten. 200 OD Zellen wurden mit 4ml 1,85M NaOH/7,5% β-Mercaptoethanol für 15min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 4ml 55% TCA und Inkubation auf Eis für 10min präzipitiert. Nach 15min Zentrifugation bei 3000g wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet zweimal mit Aceton (-20°C) gewaschen. Anschließend wurde es in Puffer A (6M Guanidiniumhydrochlorid, 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris-HCl, pH 8,0, 20mM Imidazol) mit 0,05% Tween-20 mit der Pipette resuspendiert und 1h auf einem Schüttler bei RT solubilisiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch 20min Zentrifugation bei 15000g abgetrennt. Der Überstand wurde mit 50µl magnetischen *NiNTA magnetic beads* (Qiagen) versetzt. Nach Bindung über Nacht wurden die *magnetic beads* durch einem Magnetständer pelletiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und dreimal mit Puffer A mit 0,05% Tween-20 und viermal mit Puffer C (8M Harnstoff, 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris-HCl, pH 6,3) mit 0,05% Tween-20 gewaschen. Die Elution erfolgte mit 20µl 1% SDS bei 65°C. Nach

Lyophilisierung mithilfe einer SpeedVac (Eppendorf) wurden die Proteine in 10  $\mu$ l Wasser und 15  $\mu$ l HU-Puffer aufgenommen und 10min bei 65°C denaturiert.

### **GST-pulldown**

Um die Interaktion mit Srs2 zu untersuchen, wurde N-terminal trunkiertes, an Gluthathion-Sepharose (Amersham-Pharmacia) gebundenes Srs2 (Srs2 $\Delta$ N) benutzt (s. Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli*). Dies wurde entweder mit Zellextrakten (s. V.3.2) oder mit dem Produkt einer *in vitro*-Reaktion (s. *In vitro*-SUMOylierungs Reaktion) gemischt. Das Gemisch wurde 2-4 Stunden auf einem Drehrad (Rotatorque) bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die gebundenen Proteine viermal mit Bindungs-Puffer (Lyse Puffer mit 1% Triton X-100, 0,1% SDS) und einmal mit Lyse-Puffer gewaschen. Dabei wurde die Sepharose durch Zentrifugation (1000g, 1min) sedimentiert. Zum Schluss wurde der Überstand möglichst vollständig abgenommen und die Proteine wurden mit 25  $\mu$ l HU-Puffer bei 65°C eluiert. Die gebundenen Proteine wurden anschließend immunologisch nachgewiesen. Für Konkurrenzexperimente wurden rekombinantes, aufgereinigtes SUMO (Smt3-GG) oder Ubiquitin zusammen mit dem Zellextrakt inkubiert. Die Endkonzentrationen dieser Proteine betragen 0, 4, 40 oder 400  $\mu$ M.

### ***In-vitro*-SUMOylierungs-Reaktion**

Für diese Arbeit wurde PCNA *in vitro* mit rekombinanten, aus *E. coli* aufgereinigten Proteinen mit SUMO modifiziert. Die benutzten Proteine wurden wie in (Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli*) beschrieben aufgereinigt. Für einen 50  $\mu$ l Ansatz wurden His-PCNA (200 ng), Aos1/Uba2 (Boston Biochem, 1  $\mu$ g), His-Ubc9 (500ng), His-Smt3-GG (2  $\mu$ g) und Siz1-His-Flag (10  $\mu$ g einer Präparation, welche N-terminale Trunkierungen enthielt) in SUMOylierungs-Puffer (100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1mM DTT, 10nM ATP, 50mM Tris-HCl, pH 7,5) für 2h bei 30°C inkubiert.

Die SUMOylierungs-Reaktion wurde durch Zugabe von Apyrase gestoppt, wenn sie danach als Ausgangsmaterial für einen GST-Pulldown eingesetzt wurde.

### **Chromatin Bindungs Experiment**

Für die Überprüfung, ob ein Protein Chromatin-assoziiert vorliegt, wurde die Modifikation eines für *S.pombe* entwickelten Protokolls angewandt (Kai et al., 2001). Es wurde mit einer Zellzahl gearbeitet, die einer 25ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1 entspricht. Im ersten Schritt wurden die Hefezellen spheroplastiert. Die Zellen wurden hierfür durch Zentrifugation (1000g, 5min, 4°C) geerntet und mit 25ml STOP-Puffer (150mM NaCl, 1mM NaN<sub>3</sub>, 50mM NaF, 10mM EDTA, pH 8,0), 25ml Wasser und 10ml Sorbitol (1,2M) gewaschen. Dann wurden sie in 1,125ml CB1-Puffer (50mM Natriumcitrat, 1,2M Sorbitol, 40mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert und 147,5  $\mu$ l Spheroplasten-Lösung (125  $\mu$ l CB1, 20  $\mu$ l Zymolyase-100T (20mg/ml), 2,5  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol) zugegeben. Dieses Gemisch wurde 30min bei 30°C inkubiert und Spheroplasten anschließend durch Zentrifugation geerntet

(290g, 4min, 4°C). Nach zweimaligem Waschen in Sorbitol (1,2 M) wurden die Spheroplasten in 425µl Sorbitol (1,2 M) resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 50µl 10x Lyse-Puffer (500mM Kaliumacetat, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 200mM HEPES, pH 7,9), 10µl *complete protease inhibitors* (Roche) und 20µl Triton X-100 (25%). Die Zellen wurden 10min auf Eis inkubiert und aus dieser Lösung die Extrakt-Probe entnommen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (12000g, 15min, 4°C). Das Pellet wurde einmal in Lyse-Puffer (1,1M Sorbitol, 50mM Kaliumacetat, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 200mM HEPES, pH 7,9) gewaschen und dann in 100µl Lyse-Puffer resuspendiert, dem 5mM MgSO<sub>4</sub> zugesetzt war. Dieser Lösung wurden 10U DNase (aus Rinderpankreas, RNase frei, Roche) zugesetzt und 30min auf Eis inkubiert. Der Überstand nach erneuter Zentrifugation (14000g, 5min 4°C) bildete dann die Chromatin-Fraktion.

### **Affinitätsaufreinigung von Antikörpern**

Für diese Arbeit wurden Pol30-Antikörper aus einem Pol30-Antiserum aufgereinigt (Hoege et al., 2002). Hochaffine IgGs wurden dabei über Immuno-Affinitätschromatographie angereichert. Dafür wurde das Antigen mit einem His-Epitop-*tag* verwendet. Die Aufreinigung des Serums erfolgte über zwei hintereinandergeschaltete Säulen. An die erste Säule (Vorsäule) wurde ein nicht-verwandtes Protein mit einem His-Epitop-*tag* gekoppelt, an die zweite Säule (Hauptsäule) gereinigtes Antigen. Nach Auftragen des Serums auf die Säulen banden die spezifischen Antikörper an die Hauptsäule und konnten von dieser 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 Glycin (0,2 M, pH 8,0) für 2h bei RT blockiert. Anschließend wurden die beiden Säulen verbunden und mit verschiedenen Waschschrritten vorbereitet (Vorsäule und Hauptsäule: 4Vol 100mM NaAc, pH 4,0, 0,5M NaCl; 2Vol PBS; 2Vol PBS, 1%SDS, nach einem Durchlauf wurden die Säulen 40min bei 65°C denaturiert; Hauptsäule: 2Vol PBS, 1% Triton-X100, 2Vol PBS, 1% Triton-X100, 1% BSA; Vorsäule: 4Vol PBS, 1% Triton-X100). Das Serum wurde langsam für drei Läufe auf die Vorsäule und anschließend auf die Hauptsäule gegeben. Danach wurde mit 2 Vol PBS gewaschen, die Vorsäule verworfen und die Hauptsäule mit 3 Vol PBS, 1% Triton-X100, sowie mit 4 Vol PBS gewaschen. Die gebundenen, spezifischen IgGs wurden dann mit Glycin-Puffer (0,2M Glycin; 1mM EGTA pH 2,5) in mehreren Fraktionen eluiert und sofort mit 1M Tris, pH 8,0 neutralisiert. Positive Eluate wurden vereinigt 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.

## VI Literaturverzeichnis

Aboussekhra, A., Chanet, R., Adjiri, A. und Fabre, F. (1992). Semidominant suppressors of Srs2 helicase mutations of *Saccharomyces cerevisiae* map in the RAD51 gene, whose sequence predicts a protein with similarities to procaryotic RecA proteins. *Mol Cell Biol* **12**(7): 3224-34.

Aguilera, A. und Klein, H. L. (1988). Genetic control of intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and genetic characterization of hyper-recombination mutations. *Genetics* **119**(4): 779-90.

Amerik, A. Y. und Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1695**(1-3): 189-207.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmna, J. G., Smith, J. A. und Struhl., K. (1994). Current Protocols in Molecular Biology, Green and Wiley, New York.

Auty, R., Steen, H., Myers, L. C., Persinger, J., Bartholomew, B., Gygi, S. P. und Buratowski, S. (2004). Purification of active TFIIID from *Saccharomyces cerevisiae*. Extensive promoter contacts and co-activator function. *J Biol Chem* **279**(48): 49973-81.

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**(8): 4420-9.

Baba, D., Maita, N., Jee, J. G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugasawa, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H. und Shirakawa, M. (2005). Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1. *Nature* **435**(7044): 979-82.

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**(6): 1169-82.

Bailly, V., Lamb, J., Sung, P., Prakash, S. und Prakash, L. (1994). 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**(7): 811-20.

Barbour, L. und Xiao, W. (2003). Regulation of alternative replication bypass pathways at stalled replication forks and its effects on genome stability: a yeast model. *Mutat Res* **532**(1-2): 137-55.

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**(6): 920-4.

Ben-Aroya, S., Koren, A., Liefshitz, B., Steinlauf, R. und Kupiec, M. (2003). ELG1, a yeast gene required for genome stability, forms a complex related to replication factor C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(17): 9906-11.

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**(3): 345-56.

Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C. und Huber, R. (1999). The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **28**: 295-317.

- Brendel, M., Bonatto, D., Strauss, M., Revers, L. F., Pungartnik, C., Saffi, J. und Henriques, J. A. (2003). Role of PSO genes in repair of DNA damage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* **544**(2-3): 179-93.
- 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**(10): 5678-83.
- Brusky, J., Zhu, Y. und Xiao, W. (2000). UBC13, a DNA-damage-inducible gene, is a member of the error-free postreplication repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **37**(3): 168-74.
- Bylebyl, G. R., Belichenko, I. und Johnson, E. S. (2003). The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast. *J Biol Chem* **278**(45): 44113-20.
- Cohen, M., Stutz, F., Belgareh, N., Haguenaer-Tsapis, R. und Dargemont, C. (2003). Ubp3 requires a cofactor, Bre5, to specifically de-ubiquitinate the COPII protein, Sec23. *Nat Cell Biol* **5**(7): 661-7.
- Cox, M. M. (2002). The nonmutagenic repair of broken replication forks via recombination. *Mutat Res* **510**(1-2): 107-20.
- Davies, A. A., Masson, J. Y., McIlwraith, M. J., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., Venkitaraman, A. R. und West, S. C. (2001). Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell* **7**(2): 273-82.
- Denisenko, O. und Bomsztyk, K. (2002). Yeast hnRNP K-like genes are involved in regulation of the telomeric position effect and telomere length. *Mol Cell Biol* **22**(1): 286-97.
- Denison, C., Rudner, A. D., Gerber, S. A., Bakalarski, C. E., Moazed, D. und Gygi, S. P. (2005). A proteomic strategy for gaining insights into protein sumoylation in yeast. *Mol Cell Proteomics* **4**(3): 246-54.
- Desterro, J. M., Rodriguez, M. S. und Hay, R. T. (1998). SUMO-1 modification of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell* **2**(2): 233-9.
- Doe, C. L. und Whitby, M. C. (2004). The involvement of Srs2 in post-replication repair and homologous recombination in fission yeast. *Nucleic Acids Res* **32**(4): 1480-91.
- Dupre, S., Urban-Grimal, D. und Haguenaer-Tsapis, R. (2004). Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim Biophys Acta* **1695**(1-3): 89-111.
- Eladad, S., Ye, T. Z., Hu, P., Leversha, M., Beresten, S., Matunis, M. J. und Ellis, N. A. (2005). Intra-nuclear trafficking of the BLM helicase to DNA damage-induced foci is regulated by SUMO modification. *Hum Mol Genet*.
- Epps, J. L. und Tanda, S. (1998). The *Drosophila* semushi mutation blocks nuclear import of bicoid during embryogenesis. *Curr Biol* **8**(23): 1277-80.
- Finley, D., Ozkaynak, E. und Varshavsky, A. (1987). The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* **48**(6): 1035-46.
- Frantz, J. D. und Gilbert, W. (1995). A yeast gene product, G4p2, with a specific affinity for quadruplex nucleic acids. *J Biol Chem* **270**(16): 9413-9.
- Fuchs, S. Y., Lee, C. G., Pan, Z. Q. und Ronai, Z. (2002). SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell* **110**(4): 531.

- Galkin, V. E., Esashi, F., Yu, X., Yang, S., West, S. C. und Egelman, E. H. (2005). BRCA2 BRC motifs bind RAD51-DNA filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(24): 8537-42.
- Gangloff, S., Soustelle, C. und Fabre, F. (2000). Homologous recombination is responsible for cell death in the absence of the Sgs1 and Srs2 helicases. *Nat Genet* **25**(2): 192-4.
- 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**(2): 249-62.
- Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K. D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D. J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J. H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D. F., Kelly, D. E., Kelly, S. L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D. C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S. L., Revuelta, J. L., Roberts, C. J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D. D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Strathern, J. N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C. Y., Ward, T. R., Wilhelmy, J., Winzeler, E. A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J. D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R. W. und Johnston, M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**(6896): 387-91.
- 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**(2): 527-34.
- Gill, G. (2004). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* **18**(17): 2046-59.
- Giot, L., Chanet, R., Simon, M., Facca, C. und Faye, G. (1997). Involvement of the yeast DNA polymerase delta in DNA repair in vivo. *Genetics* **146**(4): 1239-51.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O. A., Thain, A., Anderson, L. A., Snowden, A. W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N. D. und Hay, R. T. (2003). P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* **11**(4): 1043-54.
- Goodman, M. F. (2002). Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem* **71**: 17-50.
- Haglund, K., Di Fiore, P. P. und Dikic, I. (2003). Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci* **28**(11): 598-603.
- Hannich, J. T., Lewis, A., Kroetz, M. B., Li, S. J., Heide, H., Emili, A. und Hochstrasser, M. (2005). Defining the SUMO-modified proteome by multiple approaches in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**(6): 4102-10.
- 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**(6): 1456-64.
- Hayashi, N. und Murakami, S. (2002). STM1, a gene which encodes a guanine quadruplex binding protein, interacts with CDC13 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* **267**(6): 806-13.
- Hicke, L. und Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 141-72.

Hicke, L., Schubert, H. L. und Hill, C. P. (2005). Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(8): 610-21.

Higgins, N. P., Kato, K. und Strauss, B. (1976). A model for replication repair in mammalian cells. *J Mol Biol* **101**(3): 417-25.

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**(20): 4179-86.

Hochstrasser, M. (2001). SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell* **107**(1): 5-8.

Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G. und Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**(6903): 135-41.

Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**(6835): 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**(5): 645-53.

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**(4): 178-87.

Ira, G., Malkova, A., Liberi, G., Foiani, M. und Haber, J. E. (2003). Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast. *Cell* **115**(4): 401-11.

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**(2): 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**(4): 1425-36.

Jentsch, S., McGrath, J. P. und Varshavsky, A. (1987). The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature* **329**(6135): 131-4.

Jentsch, S. und Pyrowolakis, G. (2000). Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol* **10**(8): 335-42.

Johnson, E. S. (2004). Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* **73**: 355-82.

Johnson, E. S. und Blobel, G. (1997). Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J Biol Chem* **272**(43): 26799-802.

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**(5): 981-94.

Johnson, E. S. und Gupta, A. A. (2001). An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* **106**(6): 735-44.



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**(18): 5509-19.

Johnson, R. E., Henderson, S. T., Petes, T. D., Prakash, S., Bankmann, M. und 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**(9): 3807-18.

Johnson, R. E., Prakash, S. und Prakash, L. (1994). Yeast DNA repair protein RAD5 that promotes instability of simple repetitive sequences is a DNA-dependent ATPase. *J Biol Chem* **269**(45): 28259-62.

Kagey, M. H., Melhuish, T. A. und Wotton, D. (2003). The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* **113**(1): 127-37.

Kai, M., Tanaka, H. und Wang, T. S. (2001). Fission yeast Rad17 associates with chromatin in response to aberrant genomic structures. *Mol Cell Biol* **21**(10): 3289-301.

Kaiser, P., Flick, K., Wittenberg, C. und Reed, S. I. (2000). Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell* **102**(3): 303-14.

Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H. P., Wada, H., Fukuda-Kamitani, T. und Yeh, E. T. (1998). Identification of three major sentrinization sites in PML. *J Biol Chem* **273**(41): 26675-82.

Kannouche, P. L., Wing, J. und Lehmann, A. R. (2004). Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Mol Cell* **14**(4): 491-500.

Kastan, M. B. und Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**(7015): 316-23.

Katzmann, D. J., Odorizzi, G. und Emr, S. D. (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(12): 893-905.

Kawabe, Y., Seki, M., Seki, T., Wang, W. S., Imamura, O., Furuichi, Y., Saitoh, H. und Enomoto, T. (2000). Covalent modification of the Werner's syndrome gene product with the ubiquitin-related protein, SUMO-1. *J Biol Chem* **275**(28): 20963-6.

Khan, M. M., Nomura, T., Kim, H., Kaul, S. C., Wadhwa, R., Shinagawa, T., Ichikawa-Iwata, E., Zhong, S., Pandolfi, P. P. und Ishii, S. (2001). Role of PML and PML-RARalpha in Mad-mediated transcriptional repression. *Mol Cell* **7**(6): 1233-43.

Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. und Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**(10B): 963-72.

Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O. A. und Palvimo, J. J. (2002). The nuclear receptor interaction domain of GRIP1 is modulated by covalent attachment of SUMO-1. *J Biol Chem* **277**(33): 30283-8.

Krejci, L., Van Komen, S., Li, Y., Villemain, J., Reddy, M. S., Klein, H., Ellenberger, T. und Sung, P. (2003). DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament. *Nature* **423**(6937): 305-9.

Laney, J. D. und Hochstrasser, M. (1999). Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell* **97**(4): 427-30.

- Lawrence, C. W. und Christensen, R. (1976). UV mutagenesis in radiation-sensitive strains of yeast. *Genetics* **82**(2): 207-32.
- Lawrence, C. W. und Christensen, R. B. (1979). Metabolic suppressors of trimethoprim and ultraviolet light sensitivities of *Saccharomyces cerevisiae* rad6 mutants. *J Bacteriol* **139**(3): 866-76.
- Li, S. J. und Hochstrasser, M. (1999). A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* **398**(6724): 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**(7): 2367-77.
- Li, T., Evdokimov, E., Shen, R. F., Chao, C. C., Tekle, E., Wang, T., Stadtman, E. R., Yang, D. C. und Chock, P. B. (2004). Sumoylation of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, zinc finger proteins, and nuclear pore complex proteins: a proteomic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(23): 8551-6.
- Liang, C. und Stillman, B. (1997). Persistent initiation of DNA replication and chromatin-bound MCM proteins during the cell cycle in *cdc6* mutants. *Genes Dev* **11**(24): 3375-86.
- Liberi, G., Maffioletti, G., Lucca, C., Chiolo, I., Baryshnikova, A., Cotta-Ramusino, C., Lopes, M., Pellicoli, A., Haber, J. E. und Foiani, M. (2005). Rad51-dependent DNA structures accumulate at damaged replication forks in *sgs1* mutants defective in the yeast ortholog of BLM RecQ helicase. *Genes Dev* **19**(3): 339-50.
- Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U. und Schwarz, K. (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(9): 712-20.
- Liefshitz, B., Steinlauf, R., Friedl, A., Eckardt-Schupp, F. und Kupiec, M. (1998). Genetic interactions between mutants of the 'error-prone' repair group of *Saccharomyces cerevisiae* and their effect on recombination and mutagenesis. *Mutat Res* **407**(2): 135-45.
- Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. und Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**(10): 953-61.
- Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Liberi, G. und Foiani, M. (2003). Branch migrating sister chromatid junctions form at replication origins through Rad51/Rad52-independent mechanisms. *Mol Cell* **12**(6): 1499-510.
- Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Pellicoli, A., Liberi, G., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., Newlon, C. S. und Foiani, M. (2001). The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* **412**(6846): 557-61.
- Lucca, C., Vanoli, F., Cotta-Ramusino, C., Pellicoli, A., Liberi, G., Haber, J. und Foiani, M. (2004). Checkpoint-mediated control of replisome-fork association and signalling in response to replication pausing. *Oncogene* **23**(6): 1206-13.
- Madura, K. (2004). Rad23 and Rpn10: perennial wallflowers join the melee. *Trends Biochem Sci* **29**(12): 637-40.
- 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**(1): 97-107.

- Mahajan, R., Gerace, L. und Melchior, F. (1998). Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. *J Cell Biol* **140**(2): 259-70.
- Mao, Y., Desai, S. D. und Liu, L. F. (2000a). SUMO-1 conjugation to human DNA topoisomerase II isozymes. *J Biol Chem* **275**(34): 26066-73.
- Mao, Y., Sun, M., Desai, S. D. und Liu, L. F. (2000b). SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(8): 4046-51.
- Martini, E. M., Keeney, S. und Osley, M. A. (2002). A role for histone H2B during repair of UV-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **160**(4): 1375-87.
- 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**(6 Pt 1): 1457-70.
- Matunis, M. J., Wu, J. und Blobel, G. (1998). SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **140**(3): 499-509.
- 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**(4): 1557-68.
- McGlynn, P. und Lloyd, R. G. (2002). Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(11): 859-70.
- Melo, J. und Toczyski, D. (2002). A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* **14**(2): 237-45.
- Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M. und Caput, D. (2000). Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J Biol Chem* **275**(46): 36316-23.
- 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**(4): 2958-64.
- Moazed, D. und Johnson, D. (1996). A deubiquitinating enzyme interacts with SIR4 and regulates silencing in *S. cerevisiae*. *Cell* **86**(4): 667-77.
- Morris, J. R. und Solomon, E. (2004). BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Hum Mol Genet* **13**(8): 807-17.
- Muller, S., Berger, M., Lehembre, F., Seeler, J. S., Haupt, Y. und Dejean, A. (2000). c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* **275**(18): 13321-9.
- Muller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G. und Jentsch, S. (2001). SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(3): 202-10.
- Muller, S., Ledl, A. und Schmidt, D. (2004). SUMO: a regulator of gene expression and genome integrity. *Oncogene* **23**(11): 1998-2008.
- Muller, 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**(1): 61-70.

- Muzi-Falconi, M., Liberi, G., Lucca, C. und Foiani, M. (2003). Mechanisms controlling the integrity of replicating chromosomes in budding yeast. *Cell Cycle* **2**(6): 564-7.
- Nelson, L. D., Musso, M. und Van Dyke, M. W. (2000). The yeast STM1 gene encodes a purine motif triple helical DNA-binding protein. *J Biol Chem* **275**(8): 5573-81.
- Nishikawa, H., Ooka, S., Sato, K., Arima, K., Okamoto, J., Klevit, R. E., Fukuda, M. und Ohta, T. (2004). Mass spectrometric and mutational analyses reveal Lys-6-linked polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* **279**(6): 3916-24.
- Orlando, V., Strutt, H. und Paro, R. (1997). Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* **11**(2): 205-14.
- Osborn, A. J., Elledge, S. J. und Zou, L. (2002). Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends Cell Biol* **12**(11): 509-16.
- Palladino, F. und Klein, H. L. (1992). Analysis of mitotic and meiotic defects in *Saccharomyces cerevisiae* SRS2 DNA helicase mutants. *Genetics* **132**(1): 23-37.
- Panse, V. G., Hardeland, U., Werner, T., Kuster, B. und Hurt, E. (2004). A proteome-wide approach identifies sumoylated substrate proteins in yeast. *J Biol Chem* **279**(40): 41346-51.
- Papouli, E., Chen, S., Davies, A. A., Huttner, D., Krejci, L., Sung, P. und Ulrich, H. D. (2005). Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. *Mol Cell* **19**(1): 123-33.
- Parrilla-Castellar, E. R., Arlander, S. J. und Karnitz, L. (2004). Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 1009-14.
- Pasero, P., Shimada, K. und Duncker, B. P. (2003). Multiple roles of replication forks in S phase checkpoints: sensors, effectors and targets. *Cell Cycle* **2**(6): 568-72.
- Pellegrini, L. und Venkitaraman, A. (2004). Emerging functions of BRCA2 in DNA recombination. *Trends Biochem Sci* **29**(6): 310-6.
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J. S., Dejean, A. und Melchior, F. (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* **108**(1): 109-20.
- Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* **70**: 503-33.
- Pickart, C. M. und Fushman, D. (2004). Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* **8**(6): 610-6.
- Prakash, L. (1981). Characterization of postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* and effects of rad6, rad18, rev3 and rad52 mutations. *Mol Gen Genet* **184**(3): 471-8.
- Prakash, S., Johnson, R. E. und Prakash, L. (2004). Eukaryotic Translesion Synthesis DNA Polymerases: Specificity of Structure and Function. *Annu Rev Biochem*.
- Quah, S. K., von Borstel, R. C. und Hastings, P. J. (1980). The origin of spontaneous mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **96**(4): 819-39.
- Raiborg, C., Rusten, T. E. und Stenmark, H. (2003). Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol* **15**(4): 446-55.
- Ratray, A. J. und Strathern, J. N. (2003). Error-prone DNA polymerases: when making a mistake is the only way to get ahead. *Annu Rev Genet* **37**: 31-66.

Robzyk, K., Recht, J. und Osley, M. A. (2000). Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* **287**(5452): 501-4.

Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Midgley, C. A., Lane, D. P. und Hay, R. T. (1999). SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo J* **18**(22): 6455-61.

Rong, L. und Klein, H. L. (1993). Purification and characterization of the SRS2 DNA helicase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **268**(2): 1252-9.

Rosas-Acosta, G., Russell, W. K., Deyrieux, A., Russell, D. H. und Wilson, V. G. (2005). A universal strategy for proteomic studies of SUMO and other ubiquitin-like modifiers. *Mol Cell Proteomics* **4**(1): 56-72.

Rosche, W. A. und Foster, P. L. (2000). Determining mutation rates in bacterial populations. *Methods* **20**(1): 4-17.

Saitoh, H., Sparrow, D. B., Shiomi, T., Pu, R. T., Nishimoto, T., Mohun, T. J. und Dasso, M. (1998). Ubc9p and the conjugation of SUMO-1 to RanGAP1 and RanBP2. *Curr Biol* **8**(2): 121-4.

Salghetti, S. E., Caudy, A. A., Chenoweth, J. G. und Tansey, W. P. (2001). Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science* **293**(5535): 1651-3.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning, CSH Laboratory Press.

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**(4): 817-31.

Schwartz, D. C. und Hochstrasser, M. (2003). A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem Sci* **28**(6): 321-8.

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**(2): 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**(10): 3314-24.

Smirnova, M. und Klein, H. L. (2003). Role of the error-free damage bypass postreplication repair pathway in the maintenance of genomic stability. *Mutat Res* **532**(1-2): 117-35.

Song, J., Durrin, L. K., Wilkinson, T. A., Krontiris, T. G. und Chen, Y. (2004). Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(40): 14373-8.

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**(3): 1265-73.

Stade, K., Vogel, F., Schwienhorst, I., Meusser, B., Volkwein, C., Nentwig, B., Dohmen, R. J. und Sommer, T. (2002). A lack of SUMO conjugation affects cNLS-dependent nuclear protein import in yeast. *J Biol Chem* **277**(51): 49554-61.

Steinacher, R. und Schar, P. (2005). Functionality of Human Thymine DNA Glycosylase Requires SUMO-Regulated Changes in Protein Conformation. *Curr Biol* **15**(7): 616-23.

- Stelter, P. und Ulrich, H. D. (2003). Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* **425**(6954): 188-91.
- 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**(7): 1621-34.
- Sun, L. und Chen, Z. J. (2004). The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol* **16**(2): 119-26.
- Sun, Z. W. und Allis, C. D. (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* **418**(6893): 104-8.
- Symington, L. S. (2002). Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(4): 630-70, table of contents.
- Takahashi, Y., Kahyo, T., Toh, E. A., Yasuda, H. und Kikuchi, Y. (2001a). Yeast Ull1/Siz1 is a novel SUMO1/Smt3 ligase for septin components and functions as an adaptor between conjugating enzyme and substrates. *J Biol Chem* **276**(52): 48973-7.
- Takahashi, Y., Mizoi, J., Toh, E. A. und Kikuchi, Y. (2000). Yeast Ulp1, an Smt3-specific protease, associates with nucleoporins. *J Biochem (Tokyo)* **128**(5): 723-5.
- Takahashi, Y., Toh-e, A. und Kikuchi, Y. (2001b). A novel factor required for the SUMO1/Smt3 conjugation of yeast septins. *Gene* **275**(2): 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**(38): 35368-74.
- Tercero, J. A. und Diffley, J. F. (2001). Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature* **412**(6846): 553-7.
- Toone, W. M., Morgan, B. A. und Jones, N. (2001). Redox control of AP-1-like factors in yeast and beyond. *Oncogene* **20**(19): 2336-46.
- 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**(18): 9676-81.
- Trincao, J., Johnson, R. E., Escalante, C. R., Prakash, S., Prakash, L. und Aggarwal, A. K. (2001). Structure of the catalytic core of *S. cerevisiae* DNA polymerase eta: implications for translesion DNA synthesis. *Mol Cell* **8**(2): 417-26.
- Tsurimoto, T. (1999). PCNA binding proteins. *Front Biosci* **4**: D849-58.
- Uhlmann, F. (2004). The mechanism of sister chromatid cohesion. *Exp Cell Res* **296**(1): 80-5.
- Ulrich, H. D. und Jentsch, S. (2000). Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *Embo J* **19**(13): 3388-97.
- Veaute, X., Jeusset, J., Soustelle, C., Kowalczykowski, S. C., Le Cam, E. und Fabre, F. (2003). The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature* **423**(6937): 309-12.

- Vertegaal, A. C., Ogg, S. C., Jaffray, E., Rodriguez, M. S., Hay, R. T., Andersen, J. S., Mann, M. und Lamond, A. I. (2004). A proteomic study of SUMO-2 target proteins. *J Biol Chem* **279**(32): 33791-8.
- Voges, D., Zwickl, P. und Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* **68**: 1015-68.
- Washington, M. T., Johnson, R. E., Prakash, S. und Prakash, L. (2000). Accuracy of thymine-thymine dimer bypass by *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase eta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3094-9.
- Washington, M. T., Prakash, L. und Prakash, S. (2001). Yeast DNA polymerase eta utilizes an induced-fit mechanism of nucleotide incorporation. *Cell* **107**(7): 917-27.
- Watanabe, K., Tateishi, S., Kawasuji, M., Tsurimoto, T., Inoue, H. und Yamaizumi, M. (2004). Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. *Embo J* **23**(19): 3886-96.
- Wold, M. S. (1997). Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem* **66**: 61-92.
- Wu-Baer, F., Lagazon, K., Yuan, W. und Baer, R. (2003). The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving lysine residue K6 of ubiquitin. *J Biol Chem* **278**(37): 34743-6.
- Wykoff, D. D. und O'Shea, E. K. (2005). Identification of sumoylated proteins by systematic immunoprecipitation of the budding yeast proteome. *Mol Cell Proteomics* **4**(1): 73-83.
- 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**(4): 1633-41.
- Yu, S. L., Johnson, R. E., Prakash, S. und Prakash, L. (2001). Requirement of DNA polymerase eta for error-free bypass of UV-induced CC and TC photoproducts. *Mol Cell Biol* **21**(1): 185-8.
- Yu, V. P., Koehler, M., Steinlein, C., Schmid, M., Hanakahi, L. A., van Gool, A. J., West, S. C. und Venkitaraman, A. R. (2000). Gross chromosomal rearrangements and genetic exchange between nonhomologous chromosomes following BRCA2 inactivation. *Genes Dev* **14**(11): 1400-6.
- Zhang, H., Saitoh, H. und Matunis, M. J. (2002). Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex. *Mol Cell Biol* **22**(18): 6498-508.
- Zhou, W., Ryan, J. J. und Zhou, H. (2004). Global analyses of sumoylated proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Induction of protein sumoylation by cellular stresses. *J Biol Chem* **279**(31): 32262-8.
- Zou, L. und Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **300**(5625): 1542-8.
- Zou, L., Liu, D. und Elledge, S. J. (2003). Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 13827-32.

## Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
APC/C	<i>anaphase promoting complex</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
Can	Canavanin
cDNA	komplementäre DNA
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
<i>D-loop</i>	<i>displacement loop</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxynuekleinsäure
DNase	Desoxynuklease
DRR	<i>direct repeat recombination</i>
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
DUB	Deubiquitinierendes Enzym
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Ligase
E4	Multi-Ubiquitinierungsfaktor
GCR	<i>gross chromosomal rearrangements</i>
GST	Gluthathion S-Transferase
h	Stunde
HR	Homologe Rekombination
HU	Hydroxurea
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktopyranosid
J	Joule
kB	Kilobasen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	molar
min	Minute
MMS	Methly-Methansulfonat
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
NEM	N-Ethylmaleimid
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NHEJ	<i>non-homologous end-joining</i>
NLS	Kern-Lokalisierungs-Sequenz
NPC	Kernporen-Komplex
4-NQO	4-Nitroquinolin-1-oxid
N-terminal	aminoterminal



N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethyenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	Replikations-Protein A
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Sedimentationskoeffizient (Svedberg)
S-Phase	Synthese-Phase
sec	Sekunde
SCF	Skp1-Cullin-F-Box-Komplex
SCJ	<i>sister-chromatid junction</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SIM	SUMO-Interaktionsmotiv
SSA	<i>single strand annealing</i>
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamid
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TLP	Translasiionspolymerase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>unit</i>
UBA	<i>ubiquitin associated domain</i>
UBC	<i>ubiquitin conjugation</i>
UBL	ubiquitin-ähnliches Protein
UIM	<i>ubiquitin interacting motif</i>
USCR	<i>unequal sister-chromatid recombination</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
YPD	Hefeextrakt/Pepton/Glukose (Medium)

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Stefan Jentsch bedanken, in dessen Arbeitsgruppe diese Doktorarbeit angefertigt wurde. Sein Enthusiasmus, seine stete Unterstützung und seine ständige Diskussionsbereitschaft hatten einen großen Anteil an dem Erfolg dieser Arbeit. Gleiches gilt auch für die große Freiheit, die er mir bei dem Bearbeiten dieses Projekts gelassen hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Peter B. Becker bedanke ich mich für die freundliche Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Lucian, Meik und Carsten, meinen Mitstreitern aus dem SUMO-Reparatur-Labor, möchte ich für die außerordentlich gute Zusammenarbeit bedanken. Zahlreiche gemeinsame Experimente und Diskussionen haben mich bereichert und das Projekt entscheidend weiter gebracht. Für ihre unermüdliche Hilfe bei unzähligen Experimenten möchte ich Ulla danken; außerdem für die Verbreitung von sehr wichtigen *good vibes*.

Natürlich geht auch ein Dankeschön an alle anderen Kollegen, die es geschafft haben innerhalb und ausserhalb der Abteilung eine Atmosphäre zu schaffen, in der ich mich sehr wohl gefühlt habe.

Ein großer Dank geht an meine Eltern, zum einen, dass sie mich immer unterstützt haben, zum anderen, dass sie in mir den Drang geweckt haben, die Welt zu erforschen.

Zuletzt möchte ich mich bei Claudia bedanken, die meine Augen für unheimlich viele Dinge geöffnet hat, nicht nur für Afrika!

## Lebenslauf

**Name** Boris Pfander  
**Adresse** Guido-Schneble-Str. 47  
80689 München  
**Geburtsdatum** 16.Dezember.1975  
**Geburtsort** Mainz

### Schulbildung

1982-1986 Grundschule, Kleinwaabs  
1986-1995 Klaus-Harms-Schule, Kappeln  
Abschluss mit Abitur im Juni 1995

### Studium

1995-2000 Universität Hannover  
Studiengang: Biochemie (Diplom)  
Vordiplom im Oktober 1997  
Diplomarbeit über „Charakterisierung der durch Nervenwachstumsfaktor (NGF) induzierten Phosphorylierung endozytotischer Proteine in PC12-Zellen“ am Institut für Physiologische Chemie (Arbeitsgruppe Dr. R. Bauerfeind)  
Abschluss mit Diplom im November 2000

### Doktorarbeit

Seit März 2001 Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung Molekulare Zellbiologie (Prof. S. Jentsch)