

Charakterisierung des Urm1-Konjugations- Systems

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

vorgelegt von
Diplom-Biologe
Karl Kenji Schorpp

Mai 2010

Ehrenwörtliche Erklärung

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 04.05.2010

.....

(Unterschrift)

Promotionsgesuch eingereicht: Mai 2010

Tag der mündlichen Prüfung: 22.Juni 2010

Erster Gutachter: Prof. Dr. Stefan Jentsch

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Angelika Böttger

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen September 2004 und Mai 2010 unter Anleitung von Prof. Dr. Stefan Jentsch am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Meinem Vater gewidmet

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1 Die Proteine der Ubiquitin-Familie	2
2.2 Ubl Aktivierung und Konjugation an Substrate	4
2.3 Deubiquitylierung	6
2.4 Der Ursprung des Ubiquitin-Konjugations-Systems	8
2.4.1 Ubiquitin-ähnliche Systeme in <i>Bacteria</i> und <i>Archaea</i>	8
2.4.2 Das Urm1-System vereinigt Eigenschaften des bakteriellen Schwefeltransfers mit dem Ubiquitin-System	9
2.4.2.1 Die Rolle von Urm1 als Protein-Modifizierer	10
2.4.2.2 Die Rolle von Urm1 als Schwefeltransferprotein	11
2.4.2.2.1 Die Rhodanese-Familie	11
2.4.2.2.1 tRNA-Modifikation durch Urm1	12
2.4.2.3 Phänotypen von $\Delta urm1$ -Mutanten	15
2.5 Der Redox-Status der Zelle	17
2.5.1 Die Glutathion-Synthese und das Glutathion/Glutaredoxin-System	18
2.5.2 Das Thioredoxin-System	19
2.6 Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	21
2.6.1 Die Nicht-homologe Endverknüpfung und die homologe Rekombination ..	21
2.6.2 MRX-Komplex	23
2.7 Zielsetzung der Arbeit	25
3. Ergebnisse	26
3.1 Der Urm1-Signalweg ist sensitiv gegenüber DNA-Doppelstrangbrüchen	26
3.1.1 Roboter-basierter Sensitivitäts-Test einer Kollektion von <i>S. cerevisiae</i> - Deletionsmutanten	26
3.1.2 Sensitivitäten von $\Delta urm1$ und $\Delta uba4$ gegenüber Zeocin sind spezifisch ..	27
3.1.3 Epistatische Analyse von Urm1 mit Komponenten der DNA-Reparatur ..	29
3.2 Urm1 modifiziert Proteine	31
3.2.1 Urm1 bildet Protein-Konjugate in Abhängigkeit von Uba4	31
3.2.2 Urm1 modifiziert Ahp1	32
3.2.3 Die Modifikation von Ahp1 ist von Uba4 und den beiden aktiven Cysteinen in Uba4 abhängig	34
3.2.4 Epistatische Analyse von $\Delta urm1$ und $\Delta ahp1$	36
3.2.5 Zugabe von t-BOOH zu Hefezellen inhibiert spezifisch die Ahp1- Modifikation	37
3.2.6 Ahp1 wird an Lysin K32 modifiziert	39
3.2.7 Phänotypische Analyse der $ahp1^{K32R}$ -Mutante	40
3.2.8 Der Einfluss der Thioredoxine auf die Ahp1-Modifikation	41
3.3. Identifikation neuer Urm1-Substrate in <i>S.cerevisiae</i>	43
3.3.1 Doppelaufreinigung von ^{HisHA} Urm1-Substraten	43
3.3.2 Verifikation der Uba4-Modifikation unter denaturierenden Bedingungen ..	46
3.4 Rad50 wird durch Urm1 modifiziert	48
3.4.1 Aufreinigung von „armyliertem“ Rad50	48
3.4.2 Die Modifikation von Rad50 ist abhängig von Uba4 und den beiden aktiven Cysteinen in Uba4	49
3.4.3 Die Urm1-Rad50-Interaktion ist sensitiv zu NEM	50
3.4.4 Die Urm1-Rad50-Interaktion lässt sich nur unter nativen und nicht unter denaturierenden Bedingungen nachweisen	51
3.4.5 Die Stabilität des MRX-Komplexes ist in $\Delta urm1$ -Mutanten verringert	51
3.5 Die Protein- und tRNA-Modifikation durch Urm1 sind zwei unabhängige Signalwege	54

3.5.1 Defekte bei der tRNA-Schwefelmodifikation führen zu einer Sensitivität gegenüber Zeocin	54
3.5.2 Die Modifikation von Ahp1 und Rad50 findet unabhängig von der tRNA-Modifikation statt.....	55
3.6 Aufbau eines Urm1 <i>in vitro</i> Systems	57
3.6.1 Aufreinigung der rekombinaten Urm1- und Uba4-Proteine für einen <i>in vitro</i> Aktivitätstest.....	57
3.6.2 Aufreinigung der oxidierten und reduzierten Form von Ahp1	58
2.6.3 <i>In vitro</i> „Urmylierungs“-Reaktion	59
3.7 Identifikation neuer Enzyme des Urm1-Signalweges.....	61
3.7.1 Urm1-Sepharose-Säule	61
3.7.2 Verifikation der Urm1-Ape1-Interaktion	62
3.8 Urm1 wird ubiquityliert und SUMOyliert.....	64
3.8.1 Aufreinigung von ubiquityliertem und SUMOyliertem Urm1	64
3.8.2 Urm1 wird an Lysin K18 ubiquityliert	65
3.8.3 Die Modifikation von Urm1 hat keinen Einfluss auf die Urm1-Konjugation	65
4. Diskussion.....	67
4.1 Urm1 modifiziert Ahp1 an Lysin K32	67
4.2 Ahp1 wird in Abhängigkeit von Uba4 modifiziert	70
4.3 Rad50 bildet mit Urm1 einen NEM-sensitiven Komplex	73
4.4 Die Zeocin-Sensitivität von Δ <i>urm1</i> -Mutanten ist ein Phänotyp der tRNA-Modifikation.....	74
4.5 Enzyme des Urm1-Signalweges.....	75
4.7 Gemeinsamkeiten und Unterschiede der bakteriellen Biosynthesewege zum eukaryontischen Urm1-Signalweg.....	78
5. Material und Methoden.....	81
5.1 Material	81
5.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	81
5.1.2 Computeranalysen.....	81
5.1.3 <i>E. coli</i> Stämme.....	81
5.1.4 <i>E. coli</i> Medien	82
5.1.5 <i>E. coli</i> Vektoren.....	82
5.1.6 <i>S. cerevisiae</i> Medien	82
5.1.7 Verwendete <i>S. cerevisiae</i> Stämme.....	83
5.1.8 <i>S. cerevisiae</i> Vektoren.....	85
5.1.9 Antikörper	85
5.1.10 Zusammensetzung aller weiteren Puffer und Lösungen	86
5.2 Methoden mit <i>E. coli</i>.....	88
5.2.1 Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i>	88
5.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien	88
5.2.3 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen.....	89
5.2.4 Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	89
5.3 Methoden mit <i>S. cerevisiae</i>.....	90
5.3.1 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	90
5.3.2 Herstellung und Transformation von kompetenten Hefezellen.....	90
5.3.3 Genomische Integration von Plasmid-DNA	90
5.3.4 Sporulation und Tetradenanalyse diploider <i>S. cerevisiae</i> Stämme	91
5.3.5 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit dem <i>yeast two hybrid</i> -(<i>Y2H</i>)-System	91
5.3.6 Analyse von Phänotypen durch Wachstumstests.....	91
5.3.7 Cycloheximid <i>chase assay</i> (CCHX).....	92
5.3.8 Strategie zur Suche des Akzeptorlysins für die „Urmylierung“ von Ahp1 ..	92
5.3.9 Roboter-basierte genetische Suche (<i>screen</i>)	92

5.4 Molekularbiologische Techniken	93
5.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	93
5.4.2 Präzipitation von DNA.....	93
5.4.3 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	93
5.4.4 Polymerase-Kettenreaktion	93
5.4.5 Zielgerichtete Punktmutagenese	96
5.4.6 Klonierung von Plasmidkonstrukten	97
5.4.6.1 Restriktionsverdau von DNA.....	97
5.4.6.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	97
5.4.6.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	97
5.4.6.4 Ligation von DNA.....	98
5.4.6.5 Sequenzierung von DNA	98
5.5 Proteinbiochemische Techniken.....	98
5.5.1 Gel- und Western Blot-Techniken.....	98
5.5.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	98
5.5.1.2 Coomassie-Färbung von Proteingelen	99
5.5.1.3 Silber-Färbung	100
5.5.1.4 Western Blot	100
5.5.1.5 Immunologischer Nachweis von Membran-gebundenen Proteinen	100
5.5.1.6 Entfernen gebundener Immunglobuline von Western Blots	100
5.5.2 Herstellung von Zellextrakten und Aufreinigungs-Methoden	101
5.5.2.1 Herstellung von denaturierten Hefe-Extrakten.....	101
5.5.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	101
5.5.2.3 Reinigung rekombinanter Proteine unter nativen Bedingungen	101
5.5.2.4 NiNTA-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen.....	102
5.5.2.5 Immunpräzipitation unter nativen Bedingungen	102
5.5.2.6 Tandemaufreinigung von Urm1-Substraten.....	103
5.5.2.7 Herstellung der Urm1-Sepharose-Säule.....	104
5.5.2.8 Aufreinigung von Urm1-Interaktoren mittels einer Urm1-Sepharose-Säule.....	104
5.5.3 <i>In vitro</i> Methoden	105
5.5.3.1 <i>In vitro</i> Aktivitätstest.....	105
5.5.3.2 <i>In vitro</i> „Urmylierungs“-Assay	105
6. Abkürzungsverzeichnis	107
7. Literaturverzeichnis.....	110

1. Zusammenfassung

Ubiquitin und Ubiquitin-ähnliche Proteine (Ubl) können posttranslational an Proteine geknüpft werden. Die am besten untersuchte Funktion von Protein-Modifizierern ist die Ubiquitylierung und damit verbundene Markierung von Substrat-Proteinen für die Degradation durch das 26S-Proteasom. Neben dem klassischen Signal für proteasomalen Abbau kann die Ubiquitylierung oder die Modifikation durch andere Ubls unter anderem Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln oder die Lokalisation und Aktivität von Substraten verändern. Für einzelne Ubls sind jedoch die Substrate und die Funktion der Modifikation bisher weitgehend unbekannt.

Urm1 (*ubiquitin related modifier*) ist ein Protein-Modifizierer, der Eigenschaften bakterieller Schwefeltransfer-Systeme und des klassischen Ubl-Systems vereint. Zum einen kann Urm1 Schwefel auf die „Wobble“-Base bestimmter cytosolischer tRNAs übertragen. Andererseits kann Urm1 über eine bisher unbekannt chemische Bindung mit Proteinen verknüpft werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Urm1 ein Lysin-gerichteter Protein-Modifizierer ist. Ahp1 (*alkyl hydroxy peroxidase*) wird an Lysin K32 „urmyliert“. Die Modifikation von Ahp1 ist dabei absolut essentiell für dessen Funktion. Ahp1 wird für die Reduktion von Alkylhydroxyperoxide benötigt, um die Entstehung von reaktiven Sauerstoffarten in der Zelle zu vermeiden. Die Konjugation von Urm1 an Ahp1 ist abhängig vom Aktivierungs-Enzym Uba4 und dessen beiden aktiven Zentren. Die Bildung der modifizierten Form von Ahp1 konnte zudem durch die Zugabe der thiol-reaktiven Chemikalie NEM (N-Ethylmaleimid) sehr stark induziert werden, wogegen sich die Zugabe von t-BOOH (tert-Butyl-Hydroperoxid) und der damit verbundene oxidative Stress inhibitorisch auf die Ahp1-Modifikation auswirkte. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Urm1-Protein-Modifikation unabhängig von der Urm1-abhängigen tRNA-Schwefelmodifikation stattfindet.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit diente der Identifikation unbekannter Urm1-Substrate. Hierbei konnten Uba4, Rad50 und Ape1 mit Hilfe biochemischer und massenspektroskopischer Untersuchungen identifiziert und weiter charakterisiert werden.

2. Einleitung

2.1 Die Proteine der Ubiquitin-Familie

Eukaryontische Proteine unterliegen einer Vielzahl an posttranslationalen Modifikationen. Die kovalente Modifikation von Proteinen erweitert ihre Eigenschaften und die Dynamik von Protein-Protein-Wechselwirkungen um ein Vielfaches. Posttranslationale Modifikationen sind oft reversible und energetisch günstige Prozesse, die die Aktivität, Stabilität, Lokalisierung oder Interaktion mit anderen Proteinen oder Nukleinsäuren beeinflussen. Phosphorylierung, Methylierung, Acetylierung, Glykosylierung oder Modifikationen durch Proteine der Ubiquitin-Familie spielen in einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie DNA-Reparatur, Replikation, Regulation des Zell-Zyklus und vielen weiteren Bereichen eine sehr wichtige Rolle.

Ubiquitin ist ein kleines, aus 76 Aminosäuren bestehendes, globuläres und kompakt gefaltetes Protein und ist in allen Eukaryonten hoch konserviert. Die am besten verstandene Funktion von Ubiquitin ist die Markierung von Proteinen für die Degradation durch das 26S-Proteasom. Proteine, die vom Proteasom degradiert werden, tragen in der Regel eine sogenannte „Poly-Ubiquitin“-Modifikation, bei der einzelne Ubiquitin-Moleküle untereinander verknüpft sind. Allerdings bewirken andere Formen der Ubiquitin-Modifikation (z.B. „Mono-Ubiquitylierung“) keinen Abbau, sondern vermitteln vielmehr Protein-Protein-Wechselwirkungen. Seit der Entdeckung von Ubiquitin Ende der 70er Jahre wurden eine ganze Reihe von Proteinen identifiziert, die als Ubiquitin-ähnliche Proteine (*ubiquitin like*, Ubl) bezeichnet werden (Tabelle 1). Trotz geringer Sequenzähnlichkeit ist die charakteristische Struktur für Ubiquitin und Ubls, die sogenannte Ubiquitin-Faltung (*β -grasp fold*) (Abb.1A), sehr stark konserviert. Neben Ubiquitin sind NEDD8 (Rub1 in *S. cerevisiae*) und SUMO (Smt3 in *S. cerevisiae*) gut untersuchte Proteine, die zudem in vielen eukaryontischen Organismen essentiell sind (Jentsch and Pyrowolakis, 2000; Liakopoulos et al., 1998; Muller et al., 2001). Weitere Ubls sind Urm1, ISG15, FAT10, Atg12, Atg8 und UFM1, die in diversen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen (Tabelle 1). Ubiquitin und Ubls

2. Einleitung

scheinen spezifisch für Eukaryonten zu sein, obwohl auch bakterielle Proteine bekannt sind, die eine Ubiquitin-ähnliche Faltung besitzen (Abb.1A) (Iyer et al., 2006). Allerdings scheinen diese bakteriellen Proteine nicht als Protein-Modifizierer zu fungieren, sondern sind beim Transfer von Schwefel in bestimmten Biosynthesewegen von Bedeutung. Ein weiteres typisches Merkmal für maturiertes Ubiquitin und Ubls ist der C-terminale Glycin-Rest, dessen Carboxy-Gruppe für die Verknüpfung an Substrate benötigt wird (Abb. 1B).

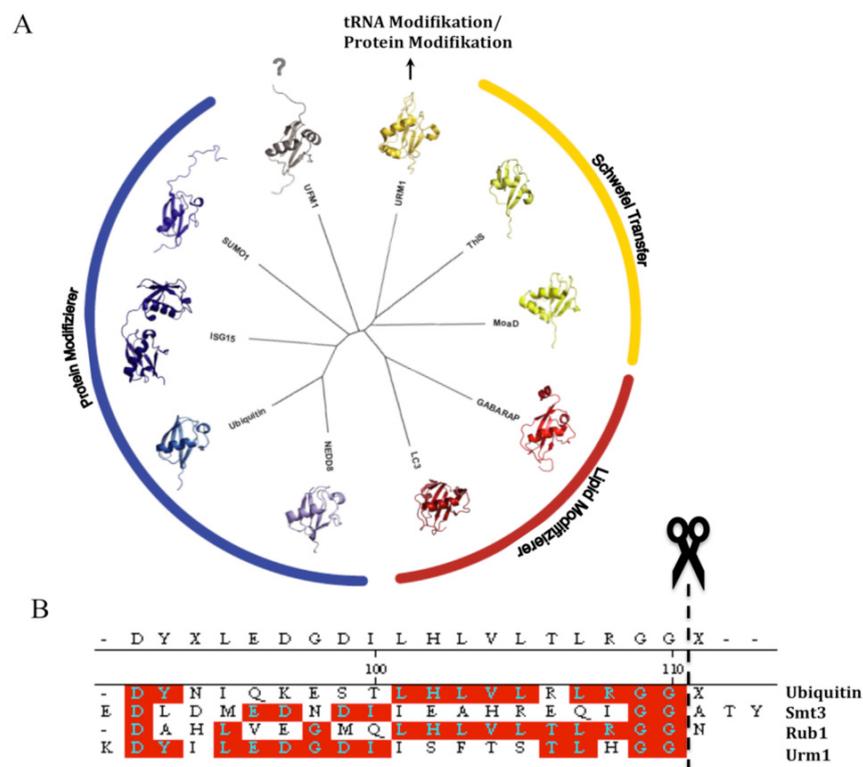


Abbildung 1: Ubiquitin- und die Ubl-Familie. A: Phylogramm und Strukturkatalog von Ubiquitin, Ubls und deren prokaryontischen Verwandten (Nach Schlieker et al., 2008). Ubiquitin, SUMO, ISG15 und NEDD8 sind Protein-Modifizierer. Ths und MoaD sind am Schwefeltransfer in *E. coli* beteiligt. Urm1 modifiziert Proteine und überträgt Schwefel auf tRNAs. **B:** Vergleich des C-Terminus von Ubiquitin und ausgewählten Ubls. Das konservierte Doppelglycin-Motiv am C-Terminus ist entscheidend für die Funktion von Ubiquitin und Ubls als Protein-Modifizierer. Die Schere repräsentiert Proteasen, die Ubl-Vorläuferproteine am C-Terminus prozessieren können.

2. Einleitung

Modifizierer	Aktivierende Enzyme E1	Konjugierende Enzyme E2	Ligierende Enzyme E3	Funktion
Ubiquitin	Uba1	Ubc1-8, 10, 11, Ubc13-Mms2	Viele RING/U-box und HECT-Domänen Proteine	Signal für die Degradation von Proteinen, kann aber auch einen Einfluss auf die Lokalisation und die Bindung zu anderen Proteinen haben.
Ubiquitin	UBA6	Use1		
UBL				
Rub1/NEDD8	Uba3-Ula1 Heterodimer	Ubc12	Dcn1	Aktivierung von Cullin-basierten E3s
FUB1				
FAT10	UBA6			Signal für die Degradation von Proteinen
ISG15	UBE1L	UBCH8	Herc5, Efp	
Smt3/SUMO	Uba2-Aos1 Heterodimer	Ubc9	Siz1, Siz2, Mms21, Zip3	Funktion bei Protein-Lokalisation und -Aktivität; Markiert Proteine für Ubiquitylierung
Atg8	Atg7	Atg3		Autophagosom
Atg12	Atg7	Atg10		Autophagosom
Urm1	Uba4			tRNA Uracil Thio-Modifizierung
UFM1	Uba5	Ufc1	Ufl1	

Tabelle 1: Modifiziert nach Kerscher & Hochstrasser (2006).

2.2 Ubl Aktivierung und Konjugation an Substrate

Ubls werden durch einen ähnlichen enzymatischen Mechanismus an ihre Substrate gekoppelt. Dabei werden Ubiquitin und die meisten Ubls als inaktive Vorläuferproteine synthetisiert. Der Vorläufer muss durch spezifische Proteasen am C-Terminus prozessiert werden, damit die C-terminale Carboxy-Gruppe von Glycin für die Konjugation an Substrate zur Verfügung steht (Abb.1B und Abb.2). Für die Aktivierung wird Ubiquitin durch das Aktivierungs-(E1)-Enzym Uba1 unter Hydrolyse von ATP am C-Terminus adenyliert (Haas et al., 1982). Daraufhin attackiert diese hochenergetische Anhydrid-Bindung die Thiol-Gruppe am aktiven Cystein des E1 und bildet dabei eine Thioester-Bindung aus (Hershko, 1996). Anschließend wird

2. Einleitung

Ubiquitin auf das Cystein im aktiven Zentrum des E2-Enzyms (Ubc) transferiert, wobei wieder eine Thioester-Bindung gebildet wird (Jentsch, 1992; Jentsch and Pyrowolakis, 2000). Vom E2 wird das Ubiquitin im Falle von sogenannten HECT (*homologous to E6-AP-C-terminus*) Ubiquitin-Ligasen (E3) erst auf einen Cysteinrest des E3-Enzyms (Huibregtse et al., 1995; Scheffner et al., 1995) und dann auf das Substrat übertragen. Alternativ kann Ubiquitin auch unter Mitwirkung einer sogenannten RING-Finger (*really interesting new gene*) Ubiquitin-Ligase direkt mit dem Substrat konjugiert werden. Dabei attackiert die ϵ -Amino-Gruppe eines Lysin-Restes des Substrates den Thioester zwischen Ubiquitin und dem E2 oder E3. Es entsteht somit eine Isopeptidbindung zwischen Substrat und Modifizierer (Jentsch, 1992). Im Falle von RING-Finger Ubiquitin-Ligasen dissoziiert das E2 vom E3 und erlaubt somit eine erneute Bindung eines mit Ubiquitin beladenen E2s. Das Substrat kann auf diese Weise an einem weiteren Lysin ubiquityliert werden, was zu einer mehrfachen Monoubiquitylierung führt. Eine andere Möglichkeit besteht in der Bildung einer Ubiquitin-Kette. Dabei bildet eine ϵ -Amino-Gruppe eines internen Lysins von Ubiquitin eine Isopeptidbindung mit der C-terminalen Carboxy-Gruppe eines weiteren Ubiquitinmoleküls aus (Chau et al., 1989; Pickart, 2001). Abhängig von der Position des Lysins innerhalb des Rezeptor-Ubiquitin spricht man beispielsweise von K48- oder K63-Polyubiquitin-Ketten.

Eine Besonderheit liefert das Atg8- und Atg12-Konjugations-System. In beiden Fällen übernimmt Atg7 die E1-Funktion (Tabelle 1). Dies unterscheidet Atg7 von den meisten E1-Enzymen, die nur ein einziges Ubl aktivieren können. Die Aminosäuresequenz von Atg12 endet mit einem C-terminalen Glycin-Rest. Es wird daher keine Prozessierung für Atg12 benötigt. Nach der Aktivierung wird Atg12 auf ein Cystein von Atg10, einem E2-Enzym, transferiert und anschließend über eine Isopeptidbindung an ein Lysin des Proteins Atg5 konjugiert (Mizushima et al., 1998). Im Gegensatz dazu modifiziert Atg8 nicht Proteine, sondern Phosphatidyl-Ethanolamine (PE). Nach der Prozessierung durch die Protease Atg4 wird Atg8 durch das E1-Enzym Atg7 aktiviert. Aktiviertes Atg8 wird schließlich auf ein Cystein des E2-ähnlichen Enzymes Atg3 unter Entstehung einer Thioester-Bindung

2. Einleitung

übertragen. Im nächsten Schritt bildet Atg8 eine kovalente Amid-Bindung mit PE aus (Ichimura et al., 2000). Das Atg-Konjugations-System zeigt somit, dass neben Protein-Substraten durchaus andere Moleküle Ziel von Ubl-Modifikationen sein können.

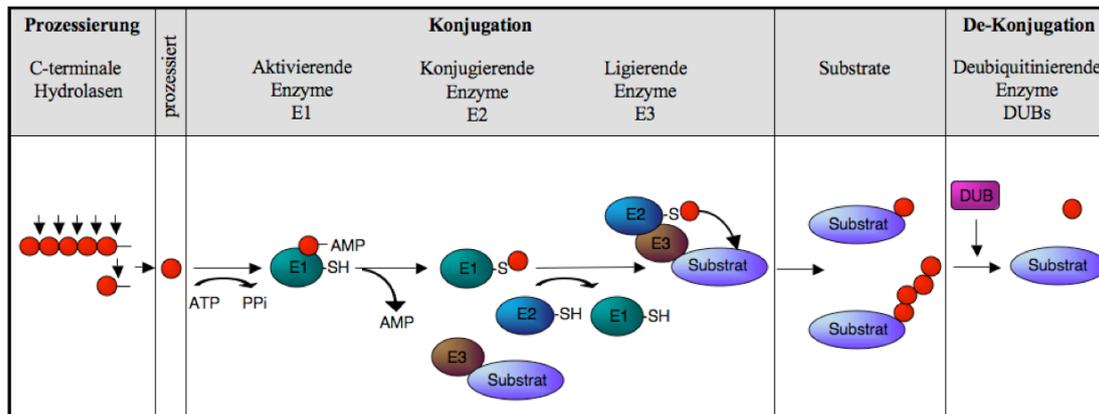


Abbildung 2: Übersicht des Ubiquitin-Konjugations-Systems. Für die spezifische Konjugation von Ubiquitin ist eine konservierte Enzymkaskade aus aktivierenden, konjugierenden und ligierenden Enzymen notwendig. Der Prozessierungsschritt wird benötigt, um das Vorläuferprotein für die Konjugation zu aktivieren. Das jeweils aktive Cystein ist mit SH gekennzeichnet und bildet mit Ubiquitin einen Thioester. Die Abbildung zeigt ein RING-Finger E3-Enzym, das den Transfer von Ubiquitin zwischen E2 und Substrat vermittelt. Die Ubiquitylierung ist ein reversibler Prozess. Für die Deubiquitylierung sind deubiquitylierende Enzyme (DUBs) zuständig (Modifiziert nach Müller et al., 2001).

2.3 Deubiquitylierung

Deubiquitylierende Enzyme (DUBs) sind Proteasen, die verschiedene Aufgaben im Ubiquitin-System übernehmen können (Wilkinson, 1997). Unter anderem führen DUBs die Prozessierung der Ubiquitin-Vorläuferproteine aus (Abb. 2). Ubiquitin wird entweder als Vorläuferprotein in Fusion mit einem ribosomalen Protein oder als lineare Polyubiquitinkette exprimiert. Diese Vorläufer werden prozessiert, um das aktive Ubiquitin-Monomer zu erhalten (Baker and Board, 1987; Ozkaynak et al., 1987; Wiborg et al., 1985). Eine weitere entscheidende Funktion von DUBs ist der Umkehrprozess zur Ubiquitylierung (Nijman et al., 2005; Wilkinson, 1997). Wie die Ubiquitylierung ist auch die Deubiquitylierung ein stark regulierter Prozess, der in zahlreichen zellulären Funktionen involviert ist. Dazu gehört unter anderem die Regulation des Zellzyklus (Song and Rape, 2008), der Proteasom-abhängige und

2. Einleitung

lysosomale Protein-Abbau (Guterman and Glickman, 2004; Komada, 2008; Schmidt et al., 2005), Gen-Expression (Daniel and Grant, 2007), DNA-Reparatur (Kennedy and D'Andrea, 2005), Kinaseaktivierung (Komada, 2008) und viele weitere Prozesse. Die größte Gruppe von DUBs in *S. cerevisiae* sind die 16 identifizierten Ubiquitin-spezifischen Proteasen (UBPs), wovon die meisten eine katalytische Hauptdomäne besitzen. Zudem können UBPs mehrere weitere Domänen tragen, die Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen (Abb. 3).

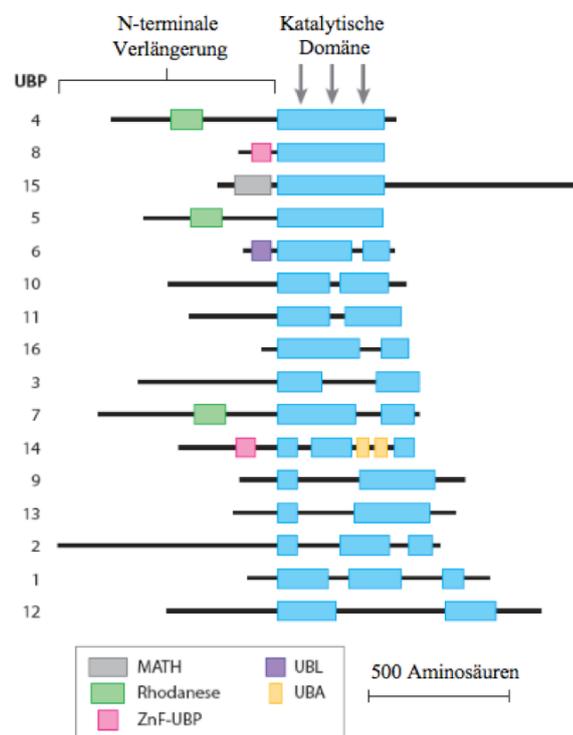


Abbildung 3: Domänenstruktur der *S. cerevisiae* UBPs (Ubiquitin spezifische Proteasen). Die blauen Boxen zeigen die katalytische Domäne. Weitere Domänen werden durch andersfarbige Boxen schematisch dargestellt (Abgeändert nach Reyes-Turcu et al., 2009).

2.4 Der Ursprung des Ubiquitin-Konjugations-Systems

2.4.1 Ubiquitin-ähnliche Systeme in *Bacteria* und *Archaea*

Ubiquitin, Ubls und die entsprechende enzymatische Kaskade spielen in eukaryontischen Zellen in vielen Prozessen eine essentielle Rolle. Im Gegensatz zu eukaryontischen Ubl-Systemen, die lebensnotwendige Funktionen übernehmen und gut untersucht sind, ist kein Ubiquitin-ähnliches System in Prokaryonten bekannt. Es gibt eine Vielzahl von bakteriellen Proteinen, die trotz geringer Übereinstimmung der Aminosäuresequenz eine Ubiquitin-ähnliche Proteinfaltung aufweisen (Iyer et al., 2006). Moad, eine kleine Untereinheit der Molybdopterin-Synthase, und ThiS (ThiaminS) sind die am besten beschriebenen bakteriellen Proteine mit einer Ubiquitin-Faltung. Der C-Terminus trägt in beiden Fällen, wie bei Ubiquitin, ein Doppelglycin-Motiv. Das C-terminale Glycin von Moad und ThiS wird in einer ATP-abhängigen Reaktion von MoeB (Molybdopterin Synthase Sulfurylase) und ThiF (ThiaminF) adenyliert (Rajagopalan, 1997; Taylor et al., 1998). Anders als in eukaryontischen Ubl-Systemen scheinen diese Proteine jedoch nicht als Protein-Modifizierer, sondern als Schwefelüberträger in der Thiamin- und Molybdopterin-Synthese zu wirken (Abb. 4).

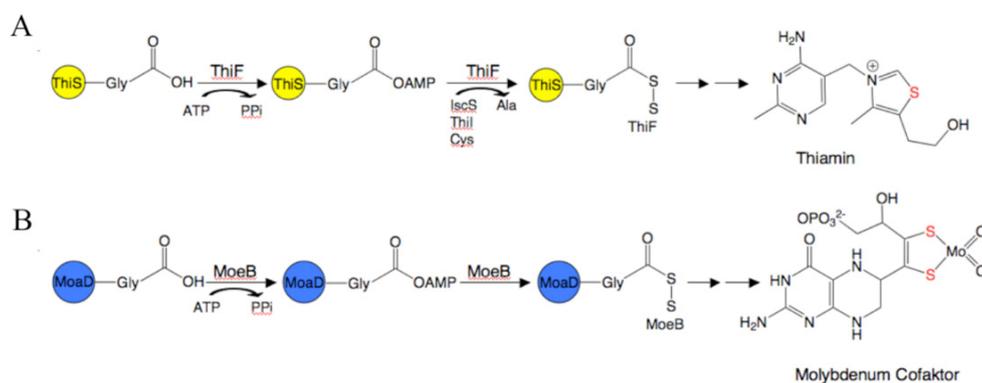


Abbildung 4: Thiamin- und Molybdopterin-Synthese. A: Der Thiamin-Syntheseweg. **B:** Der Molybdopterin-Syntheseweg. Die Aktivierung von ThiF und MoadD erfolgt durch eine Acyl-Adenylierung des C-Terminus. Anschließend kommt es über eine Acyl-Disulfidbindung zur Bildung eines kovalenten Komplexes mit dem aktivierenden Enzym. In weiteren Schritten wird entweder Thiamin oder der Molybdopterin Kofaktor synthetisiert.

2. Einleitung

Das erste in Prokaryonten entdeckte Beispiel eines Protein-Modifizierers ist das in *Actinobacteria* und *Nitrospira* identifizierte PUP-Protein (*prokaryotic ubiquitin-like protein*, PUP) (Burns et al., 2009; Pearce et al., 2008). Das PUP-System unterscheidet sich jedoch deutlich vom Ubiquitylierungs-System durch den Gebrauch von Deamidasen und Glutamin-Synthase-ähnlichen Ligasen für die Konjugationsreaktion (Pearce et al., 2008; Striebel et al., 2009). Interessanterweise besitzt PUP zwar ein C-terminales Doppelglycin-Motiv, aber ansonsten eine geringe Sequenzähnlichkeit zu Ubiquitin. Zudem unterscheidet es sich strukturell von Ubiquitin und besitzt keine typische β -grasp-Faltung.

Kleine Proteine mit einer β -grasp-Faltung und einem C-terminalen Doppelglycin-Motiv sind auch in *Archaea* weit verbreitet, wobei ihre Funktion bislang weitgehend unbekannt war (Burroughs et al., 2007; Burroughs et al., 2009; Iyer et al., 2006). Zumindest für zwei *Archaea*-Proteine, SAMP1 und SAMP2, aus *Haloferax volcanii* konnte gezeigt werden, dass diese Protein-Konjugate bilden können. Dabei sind die SAMP-Protein-Konjugate besonders gut unter stickstofflimitierenden Bedingungen und in proteasomalen Mutanten detektierbar (Humbard et al., 2010). Das Ubiquitin-ähnliche Konjugations-System ist somit nicht nur auf Eukaryonten beschränkt, sondern existiert in abgewandelter Form auch in *Bacteria* und *Archaea*.

2.4.2 Das Urm1-System vereinigt Eigenschaften des bakteriellen Schwefeltransfers mit dem Ubiquitin-System

Furakawa und Kollegen haben ausgehend von den Proteinsequenzen für Moad und ThiS aus *E. coli*, eine ψ BLAST-Suche in einer Hefe-Sequenz-Datenbank durchgeführt. Identifiziert wurde eine damals uncharakterisierte, kodierende Sequenz in *S. cerevisiae*. Diese Sequenz kodiert für ein Protein mit 99 Aminosäuren und einer relativen molekularen Masse von 11kDa. Urm1 (*ubiquitin related modifier 1*) zeigt eine Sequenzähnlichkeit von 20% und 23% zu ThiS und Moad. In einem anschließenden Urm1-*yeast two hybrid*-(Y2H)-Screen wurde Uba4 identifiziert, das eine signifikante Sequenzähnlichkeit mit dem Ubiquitin-E1 Uba1 aufweist. Urm1 und Uba4 werden dabei als DTT-sensitiver Komplex (Dithiothreitol, DTT) beschrieben. Daher wurde in

2. Einleitung

Analogie zu anderen UbIs vermutet, dass sie durch eine Thioester-Bindung verbunden werden (Furukawa et al., 2000). Allerdings konnte in einer anderen Arbeit eine Thiocarboxylat-Gruppe am C-Terminus von Urm1 nachgewiesen werden, woraufhin es für wahrscheinlicher gehalten wurde, dass der Urm1-Uba4-Komplex eine Disulfid-Brücke bildet (Schmitz et al., 2008). Interessanterweise trägt auch Moad eine Thiocarboxylat-Gruppe. Dabei wandelt eine Schwefeltransferase das aktivierte Moad-Acyl-Adenylat in ein Thiocarboxylat um (Leimkuhler and Rajagopalan, 2001), das wiederum als Schwefeldonor für die weitere Molybdopterin-Bildung fungiert (Gutzke et al., 2001). Abgesehen von den Ähnlichkeiten zum bakteriellen Moad-System verhält sich Urm1 wie ein klassisches Ubl, das in Abhängigkeit seines E1-Enzyms Protein-Konjugate bilden kann (Furukawa et al., 2000; Goehring et al., 2003a). Die Gemeinsamkeiten von Urm1 zu dem bakteriellen Schwefeltransfer-System und dem eukaryontischen Ubl-System verdeutlichen die besondere evolutionäre Stellung, die Urm1 einnimmt.

2.4.2.1 Die Rolle von Urm1 als Protein-Modifizierer

Zum jetzigen Zeitpunkt ist das thiol-spezifische Peroxiredoxin Ahp1 das einzige beschriebene Urm1-Protein-Substrat (Goehring et al., 2003a). Peroxiredoxine sind eine Klasse von Enzymen, die eine wichtige Rolle bei der Eliminierung von H₂O₂ und Alkylhydrogenperoxiden spielen. Sie dienen somit der zellulären Abwehr gegen oxidativen Stress (Bryk et al., 2000; Nathan et al., 2000). Es konnte eine starke Sensitivität des Δ *ahp1*-Hefestammes gegenüber t-BOOH (tert-Butyl-Hydroperoxid) festgestellt werden. Welche Rolle Urm1 und die entsprechende Modifikation von Ahp1 in diesem Prozess spielt, ist weiterhin unklar. Auch die Art der Verknüpfung zwischen Urm1 und Ahp1, ob es sich um eine Isopeptid- oder Acyl-Disulfid-Bindung handelt, konnte noch nicht gezeigt werden. Neben einer unkonjugierten Form von Urm1 und der modifizierten Form von Ahp1 konnten weitere langsamer migrierende Urm1-Konjugate detektiert werden. Dabei war die Uba4-E1-Funktion essentiell für die Bildung der potentiellen Urm1-Substrat-Konjugate (Furukawa et al., 2000; Goehring et al., 2003b). Aufgrund dieser Beobachtung und der Tatsache, dass Δ *ahp1*-Zellen im Vergleich zu Δ *urm1* und Δ *uba4*

2. Einleitung

wenige Phänotypen teilen, ist davon auszugehen, dass noch eine Vielzahl weiterer „urmylierter“ Proteine existiert. Interessanterweise wurde bis heute kein E2-Enzym für das Urm1-System beschrieben. Es wird deshalb spekuliert, dass eventuell Uba4 mit seiner für E1-Enzyme untypischen Rhodanese-Domäne die E1- und die E2-Funktion übernehmen könnte (Hochstrasser, 2000).

2.4.2.2 Die Rolle von Urm1 als Schwefeltransferprotein

2.4.2.2.1 Die Rhodanese-Familie

Rhodanese-Domänen sind häufig vorkommende strukturelle Module. Die Kristallstruktur zeigt, dass Rhodanese aus zwei identisch gefalteten Domänen mit jeweils ungefähr 120 Aminosäuren besteht (Ploegman et al., 1978). Allerdings trägt nur die C-terminale Domäne einen katalytisch aktiven Cystein-Rest. Rhodanese ist eine Schwefeltransferase, die Schwefel auf andere Proteine überträgt und dabei ein Persulfid-Intermediat an ihrem aktiven Cystein bildet (Abb.5) (Mueller, 2006; Westley, 1973). Außerdem katalysieren diese Enzyme *in vitro* den Schwefeltransfer von Thiosulfat auf Cyanid (Abb.5) (Westley, 1973). Neben Rhodanese gibt es zahlreiche weitere Proteine, die entweder beide Domänen als Tandem oder eine einzeln, in Kombination mit einer anderen Protein-Domäne, tragen. In Hefe gibt es neben Rhodanese sieben weitere Proteine mit diesen Domänen: Mih1, Ygr203w, Yer075c, Ubp4, Ubp5, Ubp7 und Uba4 (Hofmann et al., 1998). Die Funktion der Rhodanese-Domäne bei diesen Proteinen ist allerdings unklar.

2. Einleitung

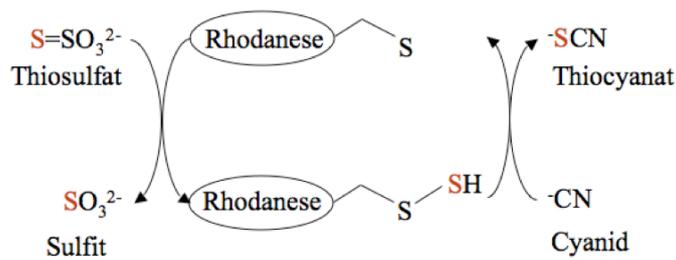


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer *in vitro* Schwefeltransfer-Reaktion mit Rhodanese. Das aktive Cystein von Rhodanese erhält ein Schwefel-Atom von einem Thiosulfat und überträgt es auf Cyanid.

2.4.2.2.1 tRNA-Modifikation durch Urm1

Wie oben erwähnt trägt Uba4 eine C-terminale Rhodanese-Domäne, die untypisch für klassische E1-Enzyme ist (Hochstrasser, 2000; Schmitz et al., 2008). Eine Reihe aktueller Publikationen beschäftigten sich mit diesem Aspekt und konnten Urm1 eine Funktion bei der Modifikation von bestimmten cytosolischen tRNAs zuordnen (Bjork et al., 2007; Dewez et al., 2008; Leidel et al., 2009; Lu et al., 2008; Nakai et al., 2008). tRNAs besitzen nicht nur die kanonischen Basen Uridin, Cytidin, Adenosin und Guanodin, sondern auch deren modifizierte Formen (Abb. 6) (Urbonavicius et al., 2005), wobei man annimmt, dass diese modifizierten Formen die Faltung, die Stabilität und die Lebensdauer von tRNAs beeinflussen (Jones et al., 2008; Wang et al., 2008) und eine Funktion bei der Affinität zu mRNAs und den Ribosomen spielen (Bjork et al., 2007; Sen and Ghosh, 1976). Bei einer dieser Modifikationen wird der Sauerstoff an Position zwei der „Wobble“-Base Uridin (U_{34}) von tRNA^{Lys} (UUU), tRNA^{Glu} (CUU) und tRNA^{Gln} (GUU) durch ein Schwefelatom ersetzt (s^2U_{34}) (Abb. 6).

2. Einleitung

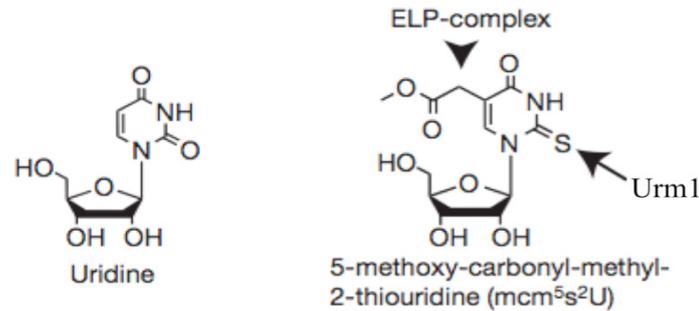


Abbildung 6: Chemische Struktur von Uridin und 5-Methoxy-carbonyl-methyl-2-thiouridin. Die Pfeile markieren die Modifikation und weisen die entsprechenden Komponenten auf, die daran beteiligt sind. Der Elongator-Protein-Komplex (ELP) modifiziert den Uridinrest mit einer 5-Methoxy-carbonyl-methyl-Gruppe. Der Urm1-Signalweg ist für den Schwefeltransfer auf Uridin verantwortlich (Leidel et al., 2009).

Drei voneinander unabhängige genetische Analysen in *S. cerevisiae* haben die Komponenten Urm1, Uba4, Ncs2, Ncs6 und Tum1 identifiziert, die für die Schwefelmodifikation an U₃₄ benötigt werden (Leidel et al., 2009; Lu et al., 2005; Nakai et al., 2008). In *tum1*-Deletionsmutanten ist allerdings der Anteil der tRNA-Schwefelmodifikation nur reduziert. Tum1 ist somit nicht essentiell für diesen Prozess (Leidel et al., 2009; Noma et al., 2009). Ncs6 gehört zu den PP-Loop ATPasen und ist mit der TtcA-Proteinfamilie verwandt, die eine wichtige Rolle bei der Schwefelmodifikation von Cytidin spielt (Jager et al., 2004). Es ist bereits bekannt, dass Ncs6 *in vitro* tRNA U₃₄ binden und adenylieren kann (Dewez et al., 2008; Leidel et al., 2009; Pedrioli et al., 2008). Ncs2 ist eine weitere PP-Loop ATPase, die viele Sequenzmotive mit Ncs6 teilt und zusammen mit Ncs6 einen Komplex bildet (Dewez et al., 2008; Leidel et al., 2009). Das momentane Modell besagt, dass die Cystein-Desulfurase Nfs1 die Rhodanese-Domäne von Uba4 bindet und ein Persulfid-Intermediat generiert (Marelja et al., 2008; Nakai et al., 2007). Uba4 überträgt daraufhin den Persulfid-Schwefel auf Urm1. Es entsteht somit eine thiocarboxylierte Form von Urm1 (Leidel et al., 2009; Schlieker et al., 2008). Ncs2/Ncs6 transferieren anschließend den Schwefel auf die Position zwei von U₃₄ (Abb. 7). Zusätzlich kann der Uridinrest durch den Elongator-Protein-Komplex (ELP) auch mit einer 5-Methoxy-carbonyl-methyl-Gruppe (mcm⁵U₃₄) modifiziert werden (Abb. 6). Der ELP-Komplex ist konserviert und besteht aus sechs Untereinheiten (Svejstrup, 2007). Ursprünglich wurde dieser Komplex mit der transkriptionellen Elongation in Verbindung gebracht. Neueste Daten zeigten jedoch einen direkten Einfluss auf die tRNA-Modifikation (Lu et al.,

2. Einleitung

2005). Anscheinend ist die Bildung der Modifikationen s^2U_{34} und mcm^5U_{34} voneinander abhängig, d.h. die Präsenz der einen Modifikation hat Einfluss auf den Erwerb der anderen (Bjork et al., 2007; Leidel et al., 2009; Nakai et al., 2008). Interessanterweise sind Mutanten dieser Faktoren, die für die Modifikation an U_{34} benötigt werden, resistenter gegenüber dem *Kluyveromyces lactis* Killer Toxin als Wildtyp-Hefen (Fichtner et al., 2003; Huang et al., 2005; Lu et al., 2008; Lu et al., 2005). Dieses Toxin besitzt eine Nuklease-Aktivität und spaltet den Anticodon-Bogen von tRNAs, die die beschriebenen Uridin-Modifikationen besitzen. Mutanten mit der fehlenden tRNA-Modifikation besitzen dementsprechend eine geringere Sensitivität gegenüber dem Killer Toxin.

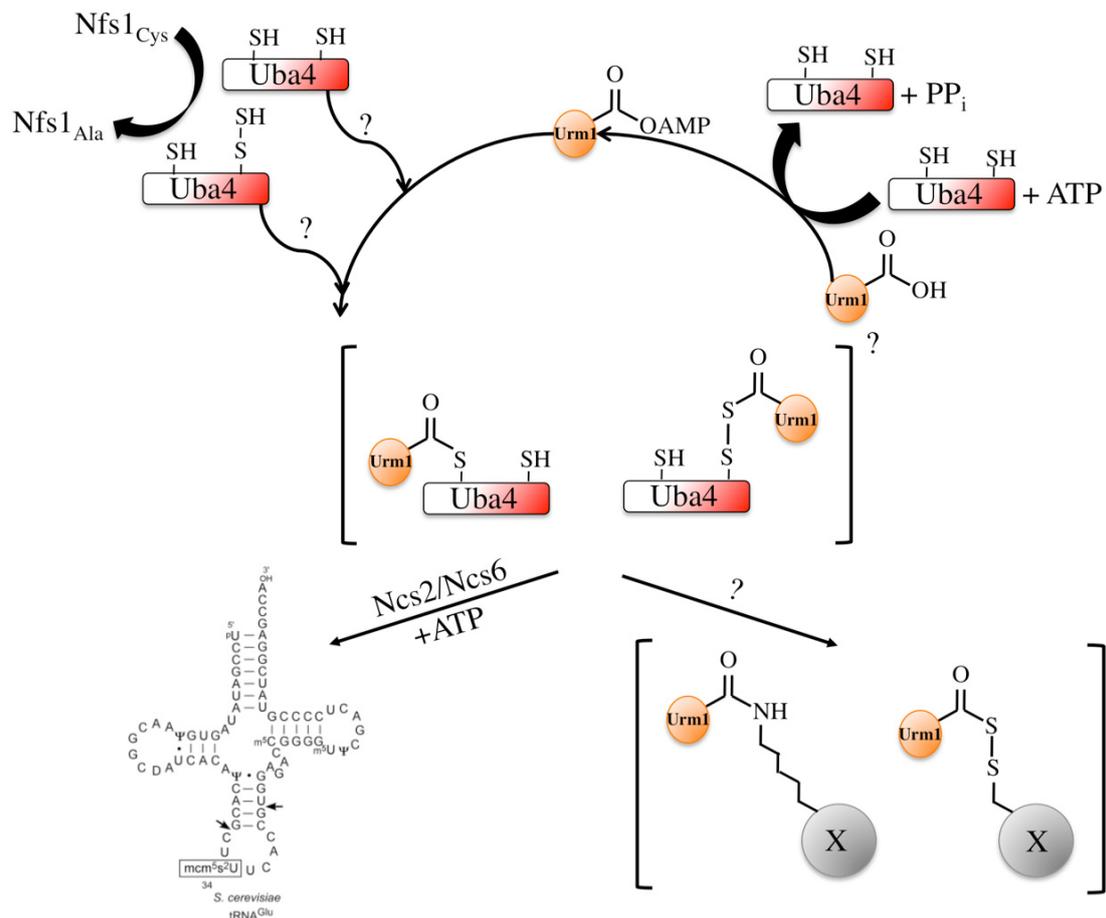


Abbildung 7: Der Urm1-Signalweg. Urm1 wird durch Uba4 am C-Terminus Acyl-adenyliert und aktiviert. Die Cystein-Desulfurase Nfs1 erhält ein Schwefelatom von einem Cystein und bildet ein Persulfid-Intermediat (nicht gezeigt). Der Persulfid-Schwefel wird anschließend auf das Cystein C397 der Rhodanese-Domäne (in rot markiert) von Uba4 übertragen. Anschließend überträgt Uba4 den Persulfid Schwefel auf Urm1. Es entsteht somit eine thiocarboxylierte Form von Urm1 und AMP wird freigesetzt (nicht gezeigt). Ob Urm1 dabei eine Acyl-Disulfid- oder Thioester-Bindung mit Uba4 ausbildet ist unklar. Urm1 modifiziert anschließend in Abhängigkeit von Uba4 Protein-Substrate. Ob es sich dabei um eine

2. Einleitung

Isopeptidbindung oder um eine Acyl-Disulfid-Bindung handelt ist nicht bekannt. Das Vorhandensein von weiteren Enzymen für die Konjugation zu Proteinen ist ebenso unklar. Eine weitere Funktion von Urm1 ist zusammen mit Ncs2/Ncs6 der Schwefeltransfer auf die tRNA-Uridin-, „Wobble“-Base von tRNA^{Lys} (UUU), tRNA^{Glu} (CUU) und tRNA^{Gln} (GUU).

2.4.2.3 Phänotypen von $\Delta urm1$ -Mutanten

Deletions-Mutanten des Urm1-Signalweges führen zu pleiotropen Phänotypen. Es stellt sich daher die Frage, welche Phänotypen mit der Funktion von Urm1 bei der tRNA-Modifikation zusammenhängen und welche durch das Fehlen von Urm1-Modifikationen an Proteinen zustande kommen. $\Delta urm1$ - und $\Delta uba4$ -Stämme zeigen beispielsweise Wachstumsdefekte und sind temperatursensitiv (Furukawa et al., 2000). Sie zeigen Defekte bei Zell-Elongation und invasivem Wachstum in den Agar und sind zudem sensitiv gegenüber Rapamycin (Goehring et al., 2003b). Zusätzlich weisen sie eine Sensitivität gegenüber Zeocin (diese Arbeit), Caffein, Calcofluor (Fichtner et al., 2003), Diamid (Goehring et al., 2003a) und Ölsäure (Lockshon et al., 2007) auf. Dagegen sind sie gegenüber dem Killer Toxin von *Kluyveromyces lactis*, einer Modifikations-abhängigen tRNA-Endonuklease, resistent (Fichtner et al., 2003). Einige dieser Phänotypen können eindeutig der Urm1-Funktion bei der tRNA-Modifikation zugeordnet werden. Interessanterweise haben Komponenten, die allein der tRNA-Modifikation dienen, die gleichen zur Zeit bekannten Phänotypen wie $\Delta urm1$ -Stämme. So sind $\Delta ncs2$ - und $\Delta ncs6$ -Stämme im gleichen Maße sensitiv gegenüber Rapamycin, Caffein und Diamid. Sie haben die gleichen Probleme beim invasiven Wachstum in den Agar und der Zell-Elongation bei Glukose-Mangel (Goehring et al., 2003b; Leidel et al., 2009). Man geht davon aus, dass bestimmte Proteine nach Behandlung mit diesen Chemikalien vermehrt benötigt werden. Deren mRNA-Transkripte könnten Codons enthalten, die von s²U₃₄-tRNAs gelesen werden. Fehlt diese Modifikation, liegen die benötigten Proteine in zu geringer Konzentration vor und diese Hefestämme weisen dementsprechend Sensitivitäten gegenüber den genannten Chemikalien auf. Die beschriebenen Sensitivitäten gegenüber Rapamycin, Caffein und Diamid können außerdem durch Überexpression der unmodifizierten Formen der tRNAs für tRNA^{Lys} (UUU), tRNA^{Glu} (CUU) und tRNA^{Gln} (GUU) kompensiert werden (Leidel et al., 2009). Die Überproduktion dieser unmodifizierten tRNAs scheint hierbei die

2. Einleitung

höhere Spezifität der modifizierten Formen ersetzen zu können. Es bleibt dennoch weiter zu klären, ob alle Urm1-Phänotypen mit der Funktion von Urm1 als tRNA-Modifizierer verknüpft sind.

2.5 Der Redox-Status der Zelle

Alle aeroben Organismen sind reaktiven Sauerstoffarten (*reactive oxygen species*, ROS) ausgesetzt, die große Schäden in der Zelle verursachen können. So entstehen ROS wie Hydrogenperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikale ($\bullet\text{OH}$) und Superoxid Anionen ($\bullet\text{O}_2^-$) beim zellulären Metabolismus und der mitochondrialen Atmung (Cadenas, 1989; Longo et al., 1996). Diese hoch reaktiven O_2 -Derivate können mit allen zellulären Makromolekülen wie DNA, Proteinen und Lipiden reagieren und sie dabei schädigen (Dean et al., 1997; Moradas-Ferreira et al., 1996; Stadtman and Berlett, 1997). Oxidativer Stress ist somit Auslöser für viele physiologischen und pathologischen Krankheiten wie Krebs, neurodegenerative Erkrankungen und Diabetes (Cook et al., 2004; Lowell and Shulman, 2005). Außerdem ist die Erhaltung der reduzierenden Bedingungen im Cytosol essentiell für eine Vielzahl von Prozessen, wie beispielsweise die korrekte Proteinfaltung und -Aktivität. Dabei spielen Cysteine aufgrund ihrer Redox-Eigenschaften, der hohen Reaktivität der freien Thiol-Gruppe und ihrer Fähigkeit Metallionen zu koordinieren eine wichtige Aufgabe bei der biochemischen Funktion vieler Proteine. Für die Regulation des Redox-Status der Zelle existieren in *S. cerevisiae* zwei Hauptreduktions-Systeme. Das Glutathion/ Glutaredoxin- und das Thioredoxinsystem. Es handelt sich hierbei um Systeme, die über Thiol-Disulfid-Austausch-Reaktionen ROS reduzieren und eliminieren können. Glutaredoxine und Thioredoxine sind strukturell sehr ähnlich und sind im Bereich ihrer aktiven Zentren evolutionär hoch konserviert geblieben. Die meisten Glutaredoxine, alle Thioredoxine und alle Thioredoxin-Reduktasen besitzen ein konserviertes Motiv aus zwei Cystein-Resten, die durch zwei weitere Aminosäuren getrennt sind (CXXC) (Holmgren, 1989).

2. Einleitung

2.5.1 Die Glutathion-Synthese und das Glutathion/Glutaredoxin-System

Die Biosynthese und die Konzentration der reduzierten Form von Glutathion (GSH) in der Zelle wird durch eine Serie komplexer Reaktionen reguliert. Dabei sind die Enzyme Gsh1 (γ -Glutamylcystein-Synthetase), Gsh2 (Glutathion-Synthetase) und Glr1 (Glutathion-Reduktase) beteiligt. Im ersten Schritt katalysiert Gsh1 die Bildung des Dipeptides γ -Glutamylcystein aus Glutamat und Cystein. Im zweiten Schritt katalysiert Gsh2 die Ligation dieses Dipeptides mit Glycin (Abb. 8). GSH kann allerdings auch in einer NADPH-abhängigen Reaktion mit Glr1 aus seiner oxidierten Form (GSSG) regeneriert werden. Somit kann GSH in Zusammenarbeit mit Glutaredoxin-Proteinen zelluläre Disulfidbrücken reduzieren, als Elektronendonator für das antioxidierende Enzym Glutathion-Peroxidase wirken und freie Radikale abfangen (Abb. 8).

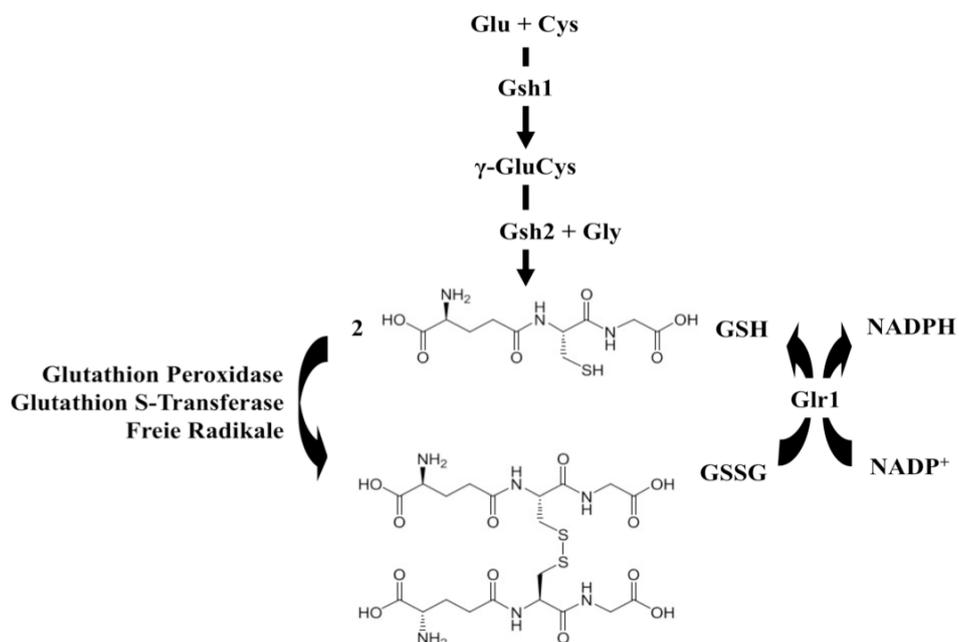


Abbildung 8: Der Glutathion-Zyklus in *S. cerevisiae*. GSH wird aus Aminosäuren in ATP-abhängigen Schritten synthetisiert. Im ersten Schritt katalysiert Gsh1 die Bildung von γ -Glutamylcystein aus Glutamat und Cystein. Anschließend ligiert Gsh2 dieses Dipeptid mit Glycin, woraus das Tripeptid GSH entsteht. GSH kann durch freie Radikale, in Reaktion mit der Glutathion-Peroxidase oder Glutathion S-Transferase zu GSSG oxidiert werden. Danach kann GSH durch eine NADPH-abhängige Reaktion mit Glr1 regeneriert werden.

2.5.2 Das Thioredoxin-System

In ähnlicher Weise wie Glutathion dienen Thioredoxine als Disulfid-Oxidoreduktasen und als Elektronen-Donor für Peroxiredoxine. Peroxiredoxine sind eine Klasse von Enzymen, die H_2O_2 und Alkylhydrogenperoxide (ROOH) eliminieren. In *S. cerevisiae* wurden bisher fünf Peroxiredoxine identifiziert. *AHP1*, *TSA1*, *YDR453C*, *YBL064C* und *YIL010W*, wobei Ahp1 und Tsa1 unter aeroben Bedingungen am stärksten exprimiert werden. Ahp1 wurde unabhängig von drei verschiedenen Gruppen entdeckt und als ein aus 176 Aminosäuren bestehendes, cytosolisches Protein beschrieben (Jeong et al., 1999; Lee et al., 1999; Verdoucq et al., 1999). *In vivo* konnte gezeigt werden, dass Ahp1 für seine Aktivität die Funktion von Thioredoxinen und der Thioredoxin-Reduktase benötigt (Abb. 9) (Jeong et al., 1999; Lee et al., 1999). Ahp1 bevorzugt dabei *in vitro* die Reduktion von t-BOOH gegenüber H_2O_2 (Jeong et al., 1999; Pedrajas et al., 1999). Phänotypisch ließ sich in Δ *ahp1*-Mutanten außerdem neben der t-BOOH- auch eine Rapamycin- und Diamid-Sensitivität nachweisen (Goehring et al., 2003a; Lee et al., 1999; Pedrajas et al., 1999). Vor kurzem wurde Ahp1 eine weitere Funktion bei der Regulation des Transkriptionsfaktor Cad1 zugewiesen (Iwai et al., 2010). Als Antwort auf oxidativen Stress katalysiert Ahp1 die Bildung von Disulfid-Brücken in Cad1 und sorgt damit für eine erhöhte Cad1-abhängige transkriptionelle Aktivität. Wie bereits erwähnt, ist Ahp1 das einzige bisher beschriebene Urm1-Protein-Substrat. Es konnte jedoch weder die genaue Rolle der Modifikation bei der Abwehr von oxidativen Stress geklärt werden noch wurde der Aminosäurerest von Ahp1 identifiziert, der durch Urm1 modifiziert wird (Goehring et al., 2003a).

2. Einleitung

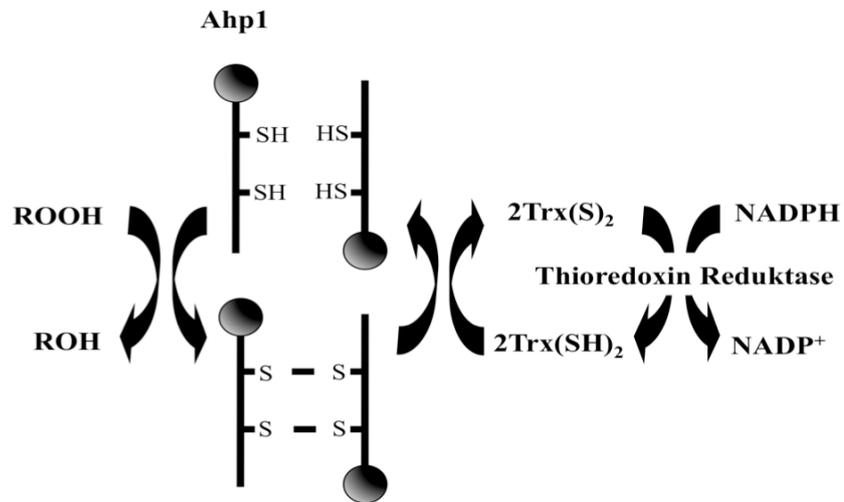


Abbildung 9: Die Rolle von Ahp1 bei der zellulären Abwehr von oxidativem Stress. Ahp1 reduziert Alkylhydroperoxide (ROOH), wird dabei selbst oxidiert und bildet somit intermolekulare Disulfidbrücken aus. Durch Thioredoxine, die Thioredoxin-Reduktase und NADPH wird die reduzierte Form von Ahp1 regeneriert (Modifiziert nach Trivelli et al., 2003).

2.6 Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

2.6.1 Die Nicht-homologe Endverknüpfung und die homologe Rekombination

$\Delta urm1$ -Mutanten sind sensitiv gegenüber DNA-Schäden. Insbesondere DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) führen zu starken Phänotypen in $\Delta urm1$ - und $\Delta uba4$ -Stämmen (diese Arbeit). DSBs sind besonders gefährlich, da schon ein einziger DSB zum Zelltod führen kann (Rich et al., 2000) und ein unprozessierter DSB zu chromosomalen Veränderungen wie Duplikationen, Translokationen und Deletionen führen kann. Alle diese Veränderungen sind Vorläufer für Genominstabilität und können in höheren Eukaryonten zu Tumorgenese führen. Daher ist die Zelle mit einem komplexen System ausgestattet, das bei DNA-Schädigungen aktiviert wird. Dabei werden DNA-Schäden beseitigt (DNA-Reparatur) und die Zelle an das Vorhandensein von Schäden angepasst (*DNA damage checkpoint*).

DSBs können spontan während des normalen Zellmetabolismus entstehen oder durch Behandlung mit DNA-schädigenden Substanzen. Sie kommen außerdem natürlicherweise beim sogenannten *mating-type switch* in *S. cerevisiae* (Paques and Haber, 1999), bei der V(D)J-Rekombination in Lymphocyten (Soulas-Sprauel et al., 2007) und als Intermediate der meiotischen Rekombination vor (Keeney and Neale, 2006). Zellen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um den DSB abhängig vom Vorhandensein homologer Chromosomen und von der Phase des Zellzyklus zu reparieren. Die Reparatur von DSBs kann in eukaryontischen Zellen im Wesentlichen durch zwei Hauptwege erfolgen: Homologe Rekombination (HR) und nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ). NHEJ ist in höheren Eukaryonten der dominante Reparaturweg, in *S. cerevisiae* ist jedoch HR der bevorzugte Reparatur-mechanismus (Krogh and Symington, 2004).

Bei NHEJ werden beide DNA-Enden des Bruches ligiert. Jedoch ist NHEJ potentiell fehleranfällig, da die Prozessierung und die anschließende DNA-Ligation meist mit dem Verlust von Nukleotiden einhergeht (Abb.10). In *S. cerevisiae* werden drei Proteinkomplexe für NHEJ benötigt: Das Ku-Heterodimer (Yku70 und Yku80), MRX (Mre11, Rad50 und Xrs2) und DNA-

2. Einleitung

Ligase IV (Dnl4 und Lif1), zusammen mit dem Ligase-assoziierten Protein Nej1 (Daley and Wilson, 2005; Dudasova et al., 2004).

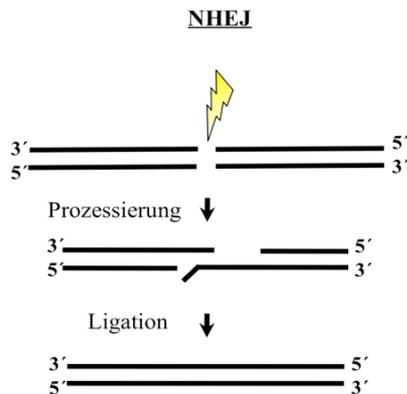


Abbildung 10: DSB-Reparatur über NHEJ. Nach Induktion eines DSB wird dieser prozessiert. Es findet eine Hybridisierung der kurzen 3'-Überhänge statt. Dabei muss keine perfekte Homologie vorliegen. Durch Ligation werden die freien DNA-Enden wieder verknüpft. Da bei diesem Prozess Nukleotide und somit genetische Information verloren gehen können, ist dieser Reparaturmechanismus potentiell fehleranfällig.

Die Reparatur von DSBs durch HR erfolgt dagegen durch das Kopieren von identischer oder sehr ähnlicher genetischer Information von intakten homologen Loci. In diploiden Organismen treten diese auf doppelt vorhandenen Chromosomen oder nach erfolgter DNA-Replikation auf duplizierten Schwester-Chromatiden auf. Bei diesem Prozess geht keine Information verloren, man spricht deshalb auch vom fehlerfreien Mechanismus der DNA-Reparatur (Abb.11). HR beginnt mit der Erkennung des DNA-DSBs durch den MRX-Komplex. Der MRX-Komplex besitzt nukleolytische Aktivität, die nach Bindung an freie DNA-Enden zur 5'-3'-Prozessierung und zur Entstehung von 3'-einzelsträngiger DNA führt. Der MRX-Komplex hat zudem, neben der Erkennung und anfänglichen Prozessierung von DSBs, die Funktion, beide Enden des Bruches in räumlicher Nähe zu halten. Die einzelsträngige DNA wird anschließend von dem heterotrimeren RPA-Komplex gebunden und so vor weiterer Nukleolyse geschützt. Für den weiteren, als Homologie-Suche bezeichneten Prozess, sind die Proteine Rad51 und Rad52 essentiell. Bei diesem Schritt der DSB-Reparatur durch HR wird RPA gegen die Rekombinase Rad51 ausgetauscht. Rad51 ist homolog zum bakteriellen RecA-Protein. Der Austausch von RPA durch Rad51 wird durch Rad52 vermittelt, dabei kommt es zur Bildung von Rad51-DNA Nukleoprotein-Filamenten (Lisby and Rothstein, 2004; Sugawara et al., 2003; White and Haber, 1990). Anschließend dringt das DNA-Rad51-Filament in einen homologen Doppelstrang ein und führt zur Bildung einer D-

2. Einleitung

Loop-Struktur (Abb.11). Das einzelsträngige DNA-Molekül, das sich nun mit einer homologen Region (Donor Sequenzen) paart, kann nach erfolgter Invasion als Startstrang für die Synthese fehlerfreier DNA genutzt werden.

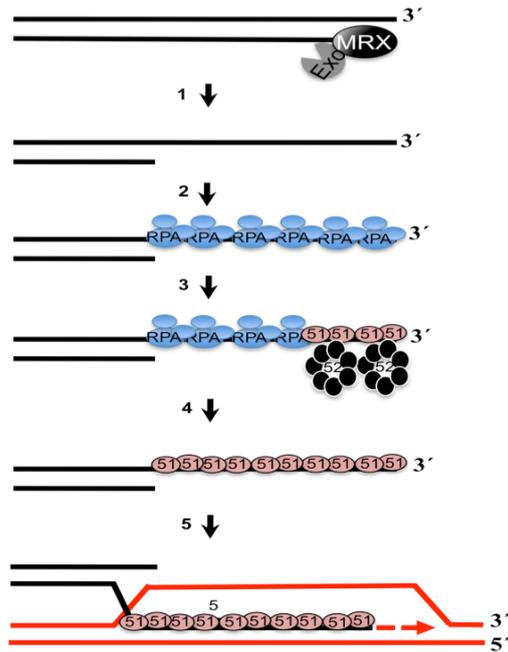


Abbildung 11: DSB-Reparatur über HR. 1) MRX bildet mit 5'-3'-Exonukleasen einen 3'-ssDNA-Überhang 2) RPA bedeckt ssDNA 3) Rad52 rekrutiert Rad51 an die DNA-RPA-Struktur. RPA wird durch Rad51 ersetzt 4) Verlängerung des Rad51-Nukleoprotein-Filamentes 5) Es kommt zu einer DNA-Rad51-Filament-Invasion in einen homologen Doppelstrang und zur Bildung einer D-Loop-Struktur (modifiziert nach Krogh und Symington, 2004)

2.6.2 MRX-Komplex

Der MRX-Komplex besteht in *S. cerevisiae* aus den Komponenten Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX) (Chen et al., 2001; Hopfner et al., 2002). Die *RAD50*- und *XRS2*-Gene wurden ursprünglich als sensitive Mutanten gegenüber ionisierender Strahlung identifiziert. (Anderson et al., 2001; Wiltzius et al., 2005). Die Struktur von Rad50 ist typisch für eine Klasse von Proteinen, die als *structural maintenance of chromosome* Proteine (SMC) bekannt sind. Diese Klasse von Proteinen ist für die Chromosomen-Kondensation und die Kohäsion von Schwester-Chromatiden notwendig (Hirano, 2002). Die globulären Enden von Rad50 bestehen aus ATPase Domänen, die durch eine lange *coiled-coil* Region voneinander getrennt und durch einen Zink-Haken miteinander verbunden sind (Abb.12) (Alani et al., 1989; Anderson et al., 2001; Dolganov et al., 1996; Wiltzius et al., 2005). Die Kristall-Struktur von Rad50 zeigt, dass sich ein Dimer zwischen zwei Rad50 Molekülen bilden kann. Dies ermöglicht es eine flexible Brücke aus einem Rad50 Dimer

2. Einleitung

zwischen zwei DNA-Molekülen über eine Distanz von 1200 Å auszubilden (Abb.12) (Hopfner et al., 2002). Mutationen in den Genen für den MRX-Komplex führen zu gut untersuchten Phänotypen wie verkürzten Telomeren, meiotischen Defekten und Sensitivität zu DNA-Schäden (D'Amours and Jackson, 2002). Interessanterweise scheint die Nukleaseaktivität für einige dieser Prozesse wie HR und Telomer-Erhaltung entbehrlich zu sein. Somit scheint dieser Komplex auch Funktionen unabhängig von der DNA-Prozessierung auszuführen (Bressan et al., 1998; Moreau et al., 1999; Tsukamoto et al., 2001). Strukturanalysen des MRX-Komplexes zeigen eine ausgedehnte Konformation mit der Eigenschaft Schwester-Chromatiden während der homologen Rekombination miteinander zu verbinden (Williams et al., 2007).

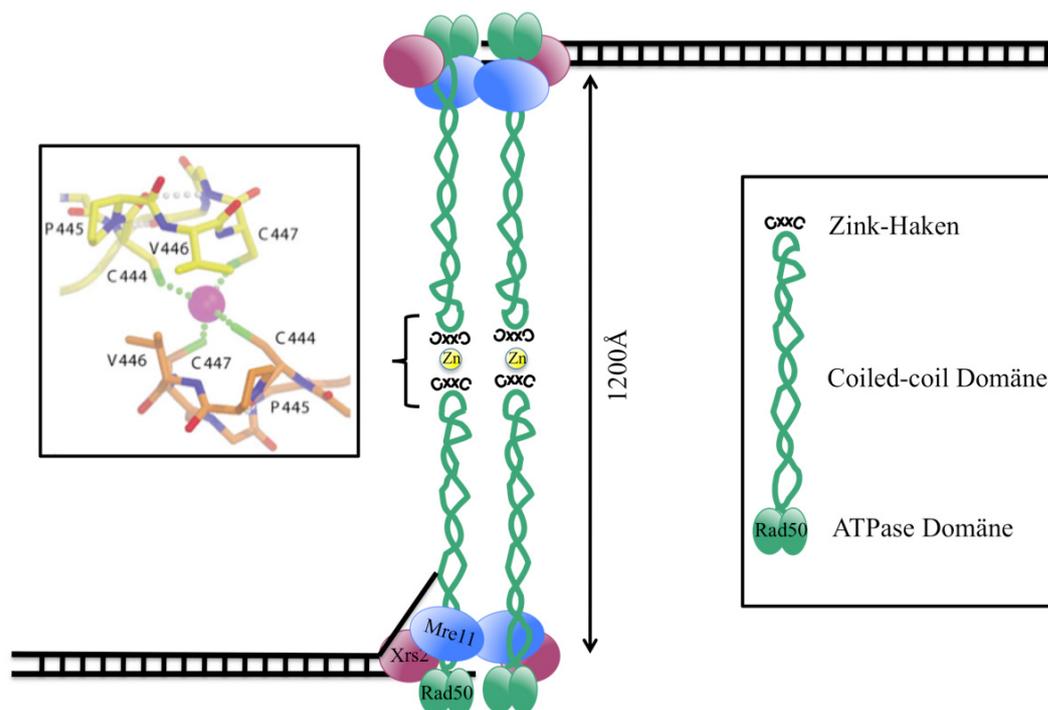


Abbildung 12: Schematische Darstellung des MRX-Komplexes am Doppelstrangbruch (DSB). Der MRX-Komplex (Mre11 = blau, Rad50 = grün, Xrs2 = violett) detektiert DSBs. DSBs können durch HR und NHEJ repariert werden. MRX ist bei der DNA-Reparatur an der Resektion, HR und NHEJ beteiligt. Rad50 kann über seine lange *coiled-coil* Domäne und durch Komplexbilden von Zn^{2+} eine Lücke von 1200Å überbrücken. Der Zink-Haken der zum Komplexbilden benötigt wird, ist in allen eukaryontischen Organismen hoch konserviert (Modifiziert nach Hopfner, 2008)

2.7 Zielsetzung der Arbeit

Über die Funktion und die Biochemie einiger Ubiquitin-ähnlicher Proteine ist im Gegensatz zum Ubiquitin-System sehr wenig bekannt. Urm1 und das E1-Enzym Uba4 sind am Schwefeltransfer auf cytosolische tRNAs beteiligt. Einige Publikationen beschäftigen sich zudem mit der Rolle von Urm1 als Protein-Modifizierer, jedoch ist die Funktion und der exakte enzymatische Ablauf der „Urmylierung“ von Proteinen in weiten Bereichen unklar.

In dieser Arbeit wurden bei einer phänotypischen Analyse Mutanten für Urm1 und dessen E1-Enzym Uba4 identifiziert. $\Delta urm1$ - und $\Delta uba4$ -Mutanten zeigten eine bisher unbekannte Sensitivität gegenüber der DNA-schädigenden Substanz Zeocin. Durch genetische Analysen sollten erste Hinweise über eine mögliche Funktion von Urm1 bei der DNA-Reparatur gewonnen werden.

Frühere Studien haben gezeigt, dass die Alyklhydroxyperoxidase Ahp1 mit Urm1 modifiziert wird. Ahp1 als bisher einzig bekanntes Protein-Substrat sollte in dieser Arbeit als Modell dienen, um die Funktion und die Chemie der Verknüpfung mit Urm1 besser zu verstehen. Insbesondere sollte der Frage nachgegangen werden, welche Aminosäure am Protein-Substrat durch Urm1 attackiert wird. Es sollte auch untersucht werden, ob und welche mögliche Funktion Urm1 bei der Abwehr von oxidativem Stress spielt. Außerdem sollten mit Hilfe des *yeast 2 hybrid*-(Y2H)-Systems und biochemischen Aufreinigungsmethoden neue Substrate und Interaktoren des Urm1-Signalweges identifiziert werden.

3. Ergebnisse

3.1 Der Urm1-Signalweg ist sensitiv gegenüber DNA-Doppelstrangbrüchen

3.1.1 Roboter-basierter Sensitivitäts-Test einer Kollektion von *S. cerevisiae*-Deletionsmutanten

Zur Identifikation neuer Komponenten, die in der DNA-Reparatur eine Rolle spielen, wurde eine *S. cerevisiae*-Kollektion von etwa 5000 Deletionsmutanten auf MMS- (Methyl-Methan-Sulfonat) und Zeocin-haltige Platten übertragen. Zeocin ist eine hoch toxische Substanz und gehört zur strukturverwandten Gruppe des Bleomycin-/ Phleomycintypus. Der toxische Effekt resultiert aus der Fähigkeit DNA zu fragmentieren. Zeocin bindet durch sein aminoterminales Peptid an DNA. Der aktivierte Komplex generiert freie Radikale die zur Spaltung von DNA-Bindungen führen. Dagegen sind alkylierende Agenzien wie MMS Substanzen, die nukleophile Atome in der DNA *in vivo* und *in vitro* direkt über nukleophile Substitution oder die Bildung eines reaktiven Alkyldiazonium-Ions angreifen und ihre Methylgruppe kovalent an die DNA binden (Swenson, 1983). Genetische Methoden mit unterschiedlichsten *S. cerevisiae*-Kollektionen sind sehr effektiv um gezielt neue und unbekannte Komponenten eines Signalweges zu identifizieren. Für diese Arbeit wurde eine Kollektion mit Deletionsmutanten verwendet. Da jede Mutante doppelt in der Kollektion enthalten ist, wurden nur solche Kolonien bewertet, deren Duplikate gleiches Wachstum auf den Selektivmedien zeigten. $\Delta urm1$ - und $\Delta uba4$ -Stämme zeigten nach diesen Kriterien eine starke und bisher unbeschriebene Sensitivität gegenüber Zeocin (Abb. 13A). Um dieses Ergebnis zu verifizieren wurden diese Mutanten in einen DF5-Hefestamm (in dieser Arbeit als WT bezeichnet) eingeführt und anschließend in seriellen Verdünnungsreihen auf Zeocin-haltigen Platten ausgebracht. Die $\Delta urm1$ - und $\Delta uba4$ -Mutanten zeigten erneut die starke Sensitivität der vorangegangenen Roboter-basierten Analyse (Abb.13B). Die Sensitivität ist vergleichbar zu einem $\Delta rad52$ -Stamm (Abb.13B). Rad52 ist ein essentielles

3. Ergebnisse

Protein für die Reparatur von DSBs durch homologe Rekombination (HR) und ist somit ein idealer Marker, um Sensitivitäten gegenüber Zeocin miteinander zu vergleichen.

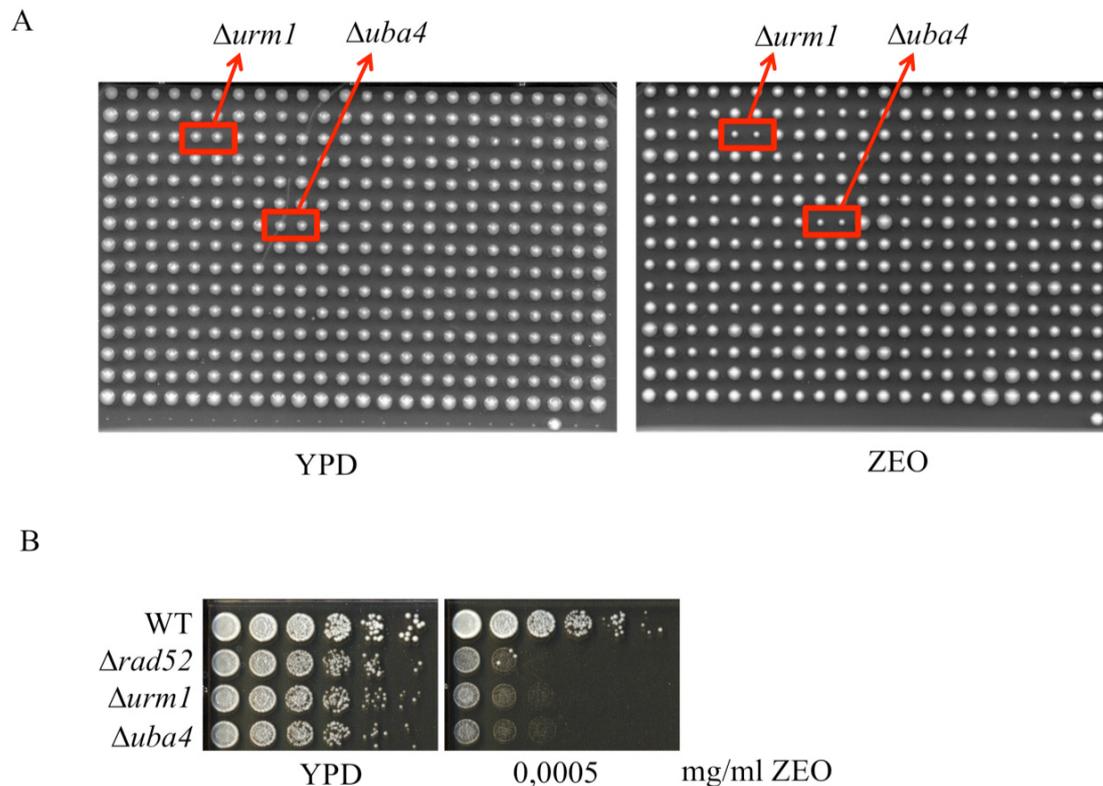


Abbildung 13: $\Delta urm1$ - und $\Delta uba4$ -Stämme sind sensitiv gegenüber Zeocin. A: Exemplarische Darstellung der Roboter-basierten Analyse. Die *S. cerevisiae*-Kollektion mit Deletionsmutanten wurde mit Hilfe eines Roboters auf Hefepetten ausgebracht. Die Abbildung zeigt Wachstum auf YPD und Zeocin-haltigen (ZEO) Hefepetten. Die $\Delta urm1$ - und $\Delta uba4$ -Duplikate sind in rot markiert. **B:** Phänotypen verschiedener DF5-Hefestämme. Gleiche Mengen an Zellen wurden in einer seriellen Verdünnungsreihe auf YPD-Platten oder Platten mit der DNA-schädigenden Substanz Zeocin getüpfelt und nach zwei Tagen Wachstum bei 30°C fotografiert. Untersucht wurden die in **A** identifizierten Stämme und $\Delta rad52$.

3.1.2 Sensitivitäten von $\Delta urm1$ und $\Delta uba4$ gegenüber Zeocin sind spezifisch

Um zu zeigen, dass die Sensitivität von $\Delta urm1$ und $\Delta uba4$ spezifisch gegenüber Zeocin und den damit verbundenen DSBs ist, wurden diese Stämme auf Hefepetten mit weiteren DNA-schädigenden Substanzen inkubiert. $\Delta urm1$ und $\Delta uba4$ weisen hierbei eine weit geringere oder keine Sensitivität gegenüber HU (Hydroxyurea) und MMS auf (Abb.14A). Um

3. Ergebnisse

auszuschließen, dass die Sensitivitäten durch unspezifische Wirkung von Zeocin erzeugt werden, wurde ein System basierend auf Galaktose-(Gal)-induzierbarer Expression der HO-Endonuklease verwendet. HO ist die am besten charakterisierte Endonuklease in *S. cerevisiae* und erkennt lange, nicht-palindromische Sequenzen und generiert dabei DSBs mit 3'-OH-Überhängen und einem 5'-Phosphat. Durch Zugabe von Galaktose zum Hefemedium wird die Expression von HO unter Kontrolle des *GAL1-10*-Promotors angeschaltet und erzeugt pro Hefezelle einen einzigen DSB an einem definierten Ort, dem MAT-Lokus. Der einzelne DNA-DSB induziert homologe Rekombination (HR) von MAT mit Donorsequenzen. Nach abgeschlossener HR ist der DSB repariert und die ursprüngliche Sequenz mit der Donorsequenz ausgetauscht worden. Der Hefestamm wird deshalb als *donor proficient* bezeichnet. Dieser Stamm und die entsprechenden $\Delta rad52$, $\Delta urm1$ - und $\Delta ku80$ -Stämme wurden auf Galaktose-haltigen Platten inkubiert. Unter diesen Bedingungen entspricht die Sensitivität des $\Delta urm1$ -Stammes einem $\Delta ku80$ -Stamm (Abb.14B). Die Besonderheit dieses Galaktose-induzierbaren Systems liegt darin, dass der Bruch permanent neu gesetzt wird. Die Zellen können somit nur wachsen, wenn der Bruch durch nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) repariert wird und dabei die HO-Erkennungssequenz verloren geht oder die Zellteilung trotz Bestehen des unreparierten Bruches aktiviert wird. Der $\Delta ku80$ -Stamm, der einen DSB nicht durch NHEJ reparieren kann, hat demnach eine sehr starke Sensitivität gegenüber Galaktose (Abb. 14B). Dass es sich hierbei nur um eine Sensitivität gegenüber Galaktose handelt, konnte durch Inkubation der entsprechenden nicht-induzierbaren DF5-Hefestämme auf Galaktose-haltigen Hefepplatten ausgeschlossen werden. $\Delta urm1$, $\Delta ku80$ und $\Delta rad52$ verhielten sich dort wie WT (Abb.14B).

3. Ergebnisse

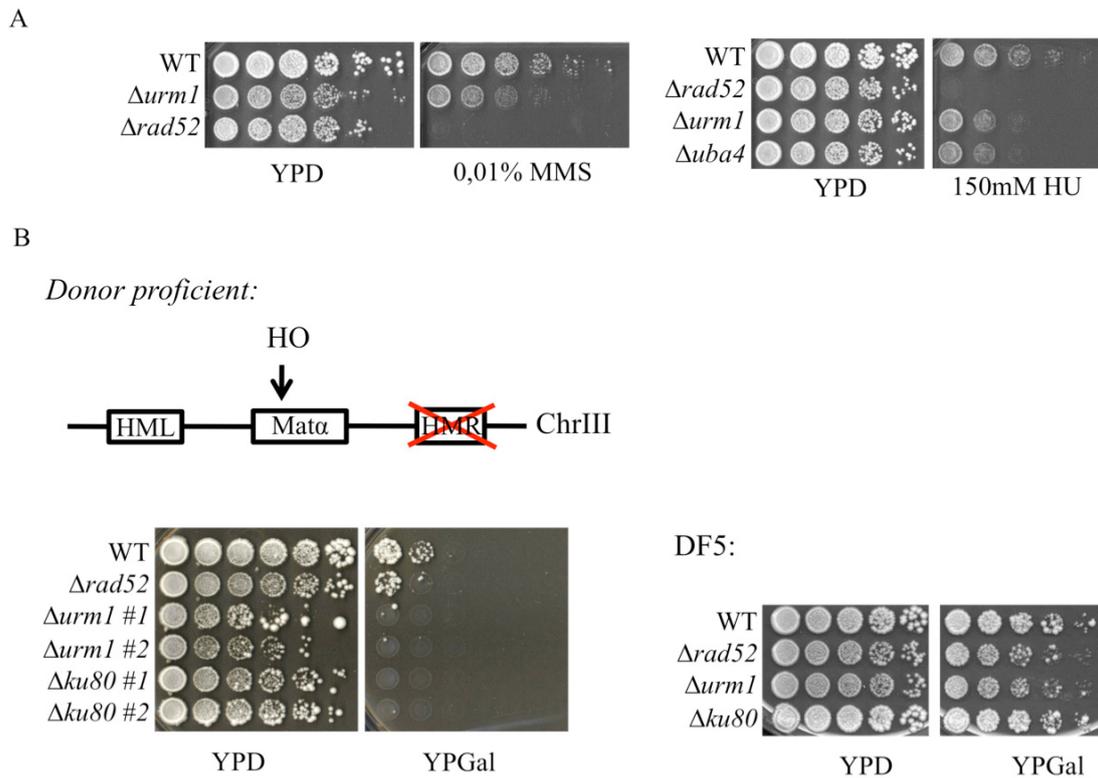


Abbildung 14: Der $\Delta urm1$ -Signalweg zeigt spezifische Sensitivität gegenüber Zeocin und DSBs. **A:** Serielle Verdünnungsreihen von Hefestämmen. Es wurden die entsprechenden Hefestämme auf Platten mit den DNA-schädigenden Substanzen, MMS und HU, ausgebracht. **B:** Schematische Darstellung von Chromosom III. Ein einzelner DSB im MAT-Lokus wird nach Galaktose-(Gal)-Induktion durch die Endonuklease HO gebildet. Die Glucose in YPD-Platten reprimiert dagegen die Expression der HO-Endonuklease. HML- und HMR-Homologieregionen sind als Kästen markiert, wobei die HMR-Homologieregion in diesem Stamm nicht vorliegt. Dieser Stamm und die entsprechenden Mutanten ($\Delta rad52$, $\Delta urm1$ und $\Delta ku80$) wurden als serielle Verdünnungsreihen auf Glucose- und Galaktosehaltigen Platten ausgebracht. #1 und #2 kennzeichnen zwei unterschiedliche Stämme. DF5 und die entsprechenden Mutanten wurden ebenso auf Glucose- und Galaktosehaltige Platten ausgebracht.

3.1.3 Epistatische Analyse von Urm1 mit Komponenten der DNA-Reparatur

Es konnte bisher gezeigt werden, dass $\Delta urm1$ eine spezifische Sensitivität gegenüber Zeocin besitzt, die vergleichbar zu $\Delta rad52$ -Mutanten ist. Andererseits entspricht $\Delta urm1$ im HO-induzierbaren System eher dem $\Delta ku80$ -Phänotyp und ist damit NHEJ zuzuordnen. Um diese Diskrepanz zu analysieren wurden $\Delta urm1$ -Doppelmutanten von Komponenten, die bei verschiedenen DNA-Reparatur-Mechanismen beteiligt sind, hergestellt. $\Delta urm1 \Delta rad52$ und $\Delta urm1 \Delta rad51$ um zu überprüfen, ob Urm1 eine Rolle in

3. Ergebnisse

HR spielt. In beiden Fällen ist die Doppelmutante deutlich sensitiver als die Einzelmutanten (Abb.15). Urm1 ist somit nicht epistatisch zu diesen Komponenten der DNA-Reparatur. Genauso verhielt es sich mit der $\Delta urm1 \Delta rad18$ -Doppelmutante. Rad18 ist der entscheidende Regulator der PCNA-Ubiquitylierung und gehört zur *RAD6*-Epistasisgruppe. Mre11 und Rad50 sind in NHEJ und HR involviert. Auch in diesem Fall waren die Doppelmutanten sensitiver. Anders verhielt es sich mit der $\Delta urm1 \Delta ku80$ -Mutante (Abb.15). Diese Mutante offenbarte die gleiche Sensitivität wie die $\Delta urm1 \Delta rad52$ -Mutante, was ein Hinweis für eine Funktion von Urm1 in NHEJ sein könnte.

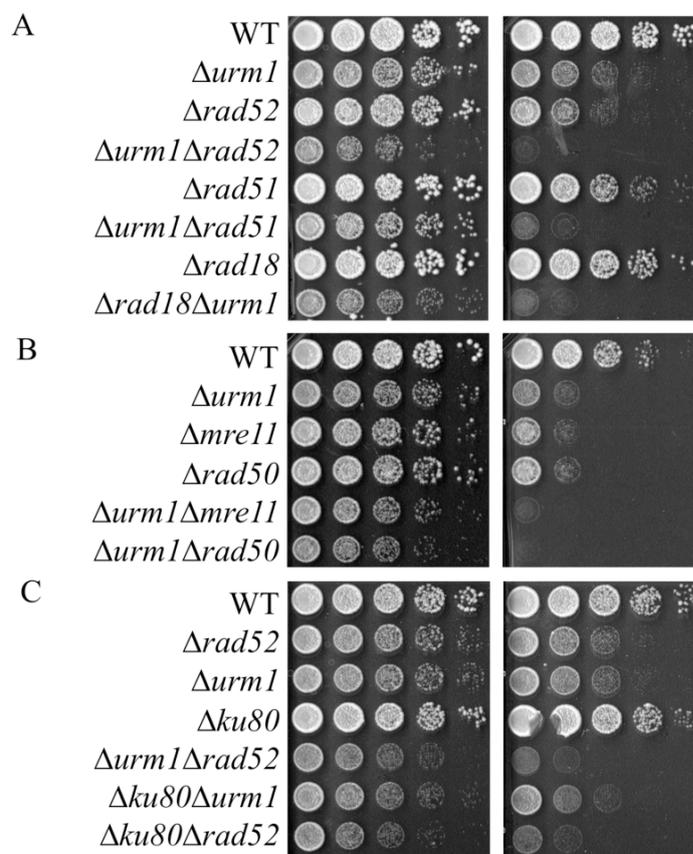


Abbildung 15: Epistatische Analyse der $\Delta urm1$ -Mutante in Kombination mit HR- und NHEJ-Mutanten. Serielle Verdünnungen von $\Delta urm1$ -Doppelmutanten wurden auf Zeocin-haltigen Platten ausgebracht, für 2 Tage bei 30°C inkubiert und fotografiert. **A:** Vergleich von $\Delta urm1$ mit HR-Mutanten ($\Delta rad52$, $\Delta rad51$) und Mutanten der postreplikativen Reparatur ($\Delta rad18$). **B:** Epistatische Analyse von Urm1 und Komponenten des MRX-Komplexes. **C:** $\Delta urm1$ in Kombination mit $\Delta ku80$ (NHEJ) und $\Delta rad52$ (HR).

3.2 Urm1 modifiziert Proteine

3.2.1 Urm1 bildet Protein-Konjugate in Abhängigkeit von Uba4

Ubiquitin und Ubiquitin-ähnliche Proteine (Ubl) werden über eine enzymatische Kaskade an Proteine konjugiert. Einige Publikationen der letzten Jahre weisen darauf hin, dass es sich bei Urm1 um einen Protein-Modifizierer handeln könnte (Furukawa et al., 2000; Goehring et al., 2003a, b). Es ist allerdings noch absolut unklar, welche Funktion Urm1 dabei besitzt. Außerdem werden in der Literatur die Chemie und die Art und Weise der Bindung von Urm1 zu seinen Substraten kontrovers diskutiert, da die Substrat-Aminosäure, die für die Konjugation benötigt wird, nicht identifiziert werden konnte. Es ist interessanterweise unter normalen Bedingungen sehr schwer in einem α HA-Immunblot die ^{HA}Urm1-Konjugate zu detektieren. Erst nach starker Überexposition sind die Banden erkennbar (Abb.16A). Es scheint fast als liege ^{HA}Urm1 hauptsächlich in unmodifizierter Form vor. Jedoch kann durch Zugabe von NEM (N-Ethylmaleimid) zum Medium die Konjugatbildung stabilisiert oder induziert werden (Abb.16B). NEM wird klassischerweise bei Ubiquitin-Aufreinigungen verwendet, da es mit dem aktiven Cystein von dekonjugierenden Enzymen reagiert und somit die Abspaltung des Modifizierers vom Substrat verhindert (Abb.16C). Die durch NEM stabilisierte Konjugat-Bildung ist abhängig von der Anwesenheit des E1-Enzymes Uba4 (Abb.16B). Dementsprechend ist im ^{HA}Urm1 Δ *uba4*-Stamm trotz Zugabe von NEM nur die unkonjugierte Form von ^{HA}Urm1 detektierbar. Dies sind alles Hinweise für ein klassisches Ubl, das als Protein-Modifizierer wirkt.

3. Ergebnisse

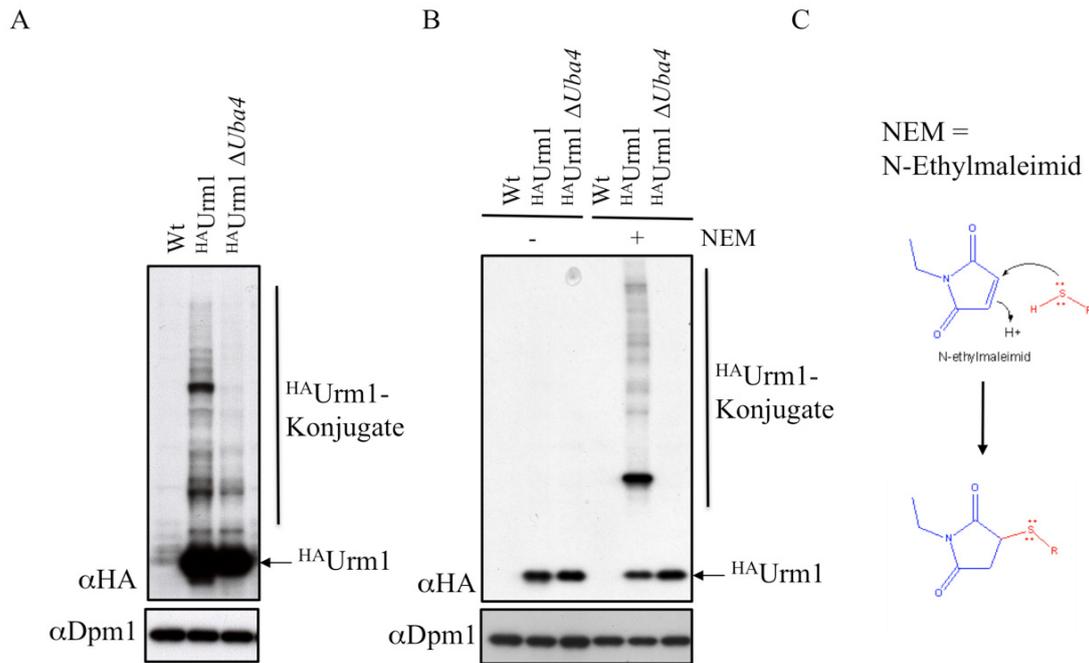


Abbildung 16: Urm1 bildet Konjugate in Abhängigkeit von Uba4. **A:** $HA-Urm1$ wurde in WT- und $\Delta uba4$ -Stämmen exprimiert. Die Konjugatbildung wurde durch αHA -Immudetektion von denaturierten Zellextrakten nachgewiesen (lange Exposition des Filmes). Zur Ladekontrolle wurde die gleiche Membran zudem mit $\alpha Dpm1$ -Antikörper behandelt. **B:** Zugabe von 10mM NEM für 1h zum Hefekulturmedium (+). Kürzere Exposition des Filmes, ansonsten siehe **A**. **C:** Schematische Darstellung der Verknüpfung von NEM mit Cysteinen.

3.2.2 Urm1 modifiziert Ahp1

Urm1 wird an Proteine konjugiert und die Bildung dieser Konjugate ist abhängig vom E1-Enzym Uba4 und dessem aktiven Cystein an Position C225 (Furukawa et al., 2000). Außerdem konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die Urm1-Konjugate durch Zugabe von NEM, einem Isopeptidase Inhibitor, zum Zellmedium stabilisiert sind. Jede dieser einzelnen Banden könnte demnach ein „urmyliertes“ Protein repräsentieren. In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei einer dieser Banden um modifiziertes Ahp1 handelt (Goehring et al., 2003a). Es konnte allerdings die Aminosäure von Ahp1, die durch Urm1 modifiziert wird, nicht identifiziert werden. Es ist somit auch nicht bekannt, ob es sich dabei um eine klassische Protein-Modifikation an Lysinen handelt. Da Ahp1 das bisher einzige beschriebene Substrat der Urm1-Modifikation ist, wurde die Funktionsweise

3. Ergebnisse

der Urm1-Konjugation in dieser Arbeit anhand dieses Modell-Substrates untersucht. Jedoch wurde zuerst die Ahp1-Modifikation in einem etwas veränderten Experiment mit zusätzlichen Kontrollen bestätigt. In einem WT-Stamm wurde ^{HisHA}Urm1 exprimiert und nach Zugabe von NEM zum Hefemedium ein denaturierter Zellextrakt hergestellt. Im anschließenden α HA-Western Blot konnte neben freien ^{HisHA}Urm1 eine weitere prominente Bande mit einer langsameren Mobilität, die von einer Urm1-Protein-Konjugation resultieren könnte, detektiert werden (Abb.17A). Wie bereits vorher gezeigt wurde, waren diese Bande und ebenso alle langsamer migrierenden ^{HisHA}Urm1-Signale in einem $\Delta uba4$ -Stamm abwesend. Außerdem war diese Bande in einem $\Delta ahp1$ -Stamm nicht detektierbar, wobei alle anderen Urm1-Konjugate in Stärke und Intensität unverändert erhalten blieben (Abb. 17A). Zusätzlich konnte durch C-terminales Markieren von *AHP1* mit einem Myc-Epitop und dem daraus resultierenden ^{HisHA}Urm1 Ahp1^{myc}-Stamm gezeigt werden, dass sich die Migrationsgeschwindigkeit dieser Bande entsprechend der Größe des fusionierten Epitops verzögerte (Abb. 17A). Auch ein α Myc-Immunblot von Ahp1^{myc}-Hefen nach Behandlung der Zellen mit NEM ermöglichte eine Detektion der modifizierten Form von Ahp1, die durch die zusätzliche HA-Markierung von Urm1 eine langsamere Migrationsgeschwindigkeit aufwies (Abb. 17B). Folglich wird ein Teil der Ahp1-Moleküle in Abhängigkeit von Uba4 mit Urm1 modifiziert. Ahp1 scheint somit ein Substrat und kein Enzym des Urm1-Signalweges zu sein, da alle weiteren Urm1-Konjugate in einem $\Delta ahp1$ -Stamm völlig unverändert sind. Allerdings ist die Modifikation von Ahp1 nicht die Ursache der Zeocin-Sensitivität des $\Delta urm1$ -Stammes. $\Delta ahp1$ zeigt keine Sensitivität gegenüber Zeocin (Abb. 17C). Es ist davon auszugehen, dass ein weiteres Urm1-Substrat für diesen Phänotyp verantwortlich ist.

3. Ergebnisse

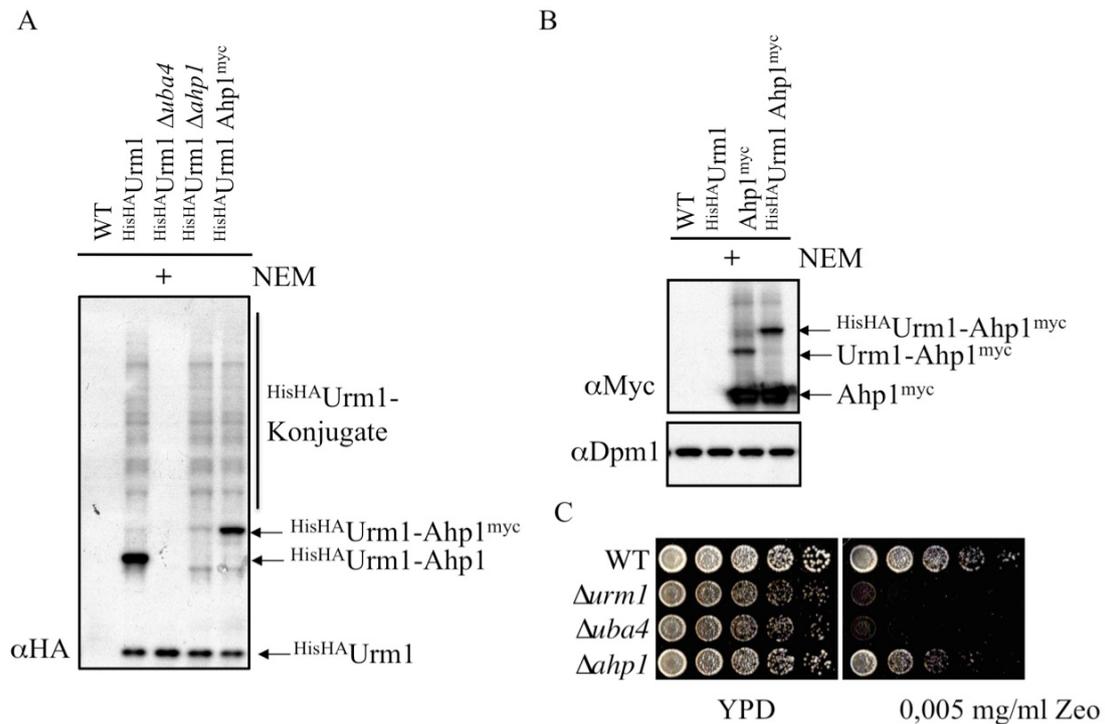


Abbildung 17: Urm1 modifiziert Ahp1 und weitere Substrate, die durch NEM-Zugabe stabilisiert werden. **A:** In einen $\Delta urm1$ -Stamm wurde N-terminal HisHA-fusioniertes *URM1* in das Genom integriert. In diesen Stammhintergrund können durch Zugabe von 10mM NEM für 1h (+) zum Hefemedium die Urm1-Konjugate stabilisiert werden. Es wurde der Effekt von $\Delta uba4$, $\Delta ahp1$ und $Ahp1^{myc}$ auf die Konjugatbildung untersucht. **B:** Hefestämme siehe **A**, Detektion sowohl mit αMyc - als auch mit $\alpha Dpm1$ -Antikörper. **C:** Serielle Verdünnungsreihen von WT-, $\Delta urm1$ -, $\Delta uba4$ - und $\Delta ahp1$ -Stämmen. Inkubation für zwei Tage auf Zeocin-haltigen Hefeplatten.

3.2.3 Die Modifikation von Ahp1 ist von Uba4 und den beiden aktiven Cysteinen in Uba4 abhängig

Uba4 ist das E1 für Urm1 (Furukawa et al., 2000) und das einzige Enzym soweit, dass bei der Urm1-Modifikation von Proteinen identifiziert wurde. Uba4 besitzt im Gegensatz zu anderen E1-Enzymen eine Rhodanese-Domäne. Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, kann diese Domäne Schwefel transferieren und dient somit der tRNA-Modifikation. Etliche E1-Enzyme anderer Protein-Modifizierer bilden Heterodimere um funktionell aktiv zu sein. So interagiert im Smt3-Signalweg Uba2 mit Aos1 und im Rub1-Signalweg Uba3 mit Ula1. In beiden Fällen ist die Bildung des Heterodimeres essentiell für die E1-Funktion. In einem Roboter-basiertem *yeast 2 hybrid*-(*Y2H*)-*Screen* konnte eine Dimerisierung von Uba4 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis konnte in einem konventionellem *Y2H*-

3. Ergebnisse

System bestätigt werden (Abb. 18B). Dazu wurden verschiedene *UBA4*-Fragmente verwendet um die Dimerisierung einer bestimmten Region von Uba4 zuzuordnen (Abb.18A). Es konnte das Ergebnis aus dem *Screen* bestätigt werden und es zeigte sich, dass für die Dimerisierung die N-terminale E1-Domäne und nicht die C-terminale Rhodanese-Domäne benötigt wird (Abb.18B). Die Interaktion von Uba4 mit Urm1 ist abhängig von den Aminosäuren 199-328. In diesem Bereich liegt auch an Position C225 das aktive Cystein der E1-Domäne (Abb.18B). Um zu überprüfen, ob die katalytisch aktiven Cysteine C225 und C397 bei der Sensitivität zu Zeocin involviert sind, wurden in einen $\Delta uba4$ -Stamm N-terminal Myc-markierte Punktmutanten von *UBA4* integrativ eingebracht. Diese Stämme wurden in seriellen Verdünnungsreihen auf Zeocin-haltigen Platten inkubiert und anschließend die Sensitivitäten miteinander verglichen. Die *C225S*- und *C397S*-Stämme zeigten die gleiche Sensitivität zu Zeocin wie ein $\Delta uba4$ -Stamm. Eine weitere Frage ist, ob auch beide aktiven Cysteine für die Modifikation von Ahp1 benötigt werden. Dazu wurden die eben beschriebenen Stämme verwendet und die Abhängigkeit der Ahp1-Modifikation nach NEM-Behandlung überprüft. In jeder der einzelnen *uba4*-Mutanten war die Urm1-Ahp1-Bande abwesend (Abb.18B). Es werden somit in der Tat beide aktiven Cysteine für die Modifikation von Proteinen benötigt. Beide Cysteine scheinen zudem eine Funktion bei der Sensitivität gegenüber Zeocin zu spielen. Daraus lässt sich schließen, dass ein Substrat in Abhängigkeit von Uba4 und beiden Cysteinen „urmyliert“ wird und das Fehlen dieser Modifikation Auslöser der Zeocin-Sensitivität ist.

3. Ergebnisse

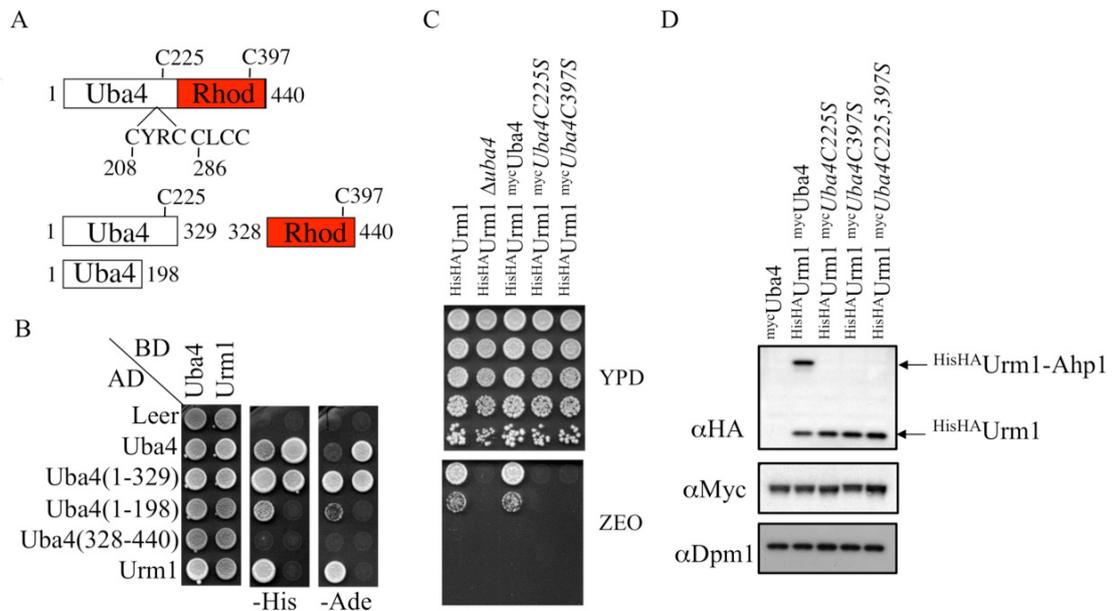


Abbildung 18: Uba4 interagiert mit sich selbst. Die Cysteine C225 und C397 werden für die Modifikation von Ahp1 benötigt. **A:** Schematische Darstellung von Uba4 und Fragmenten von Uba4, die in **B** für Y2H verwendet werden. Die aktiven Cysteine sind C225 und C397. C397 liegt in der Rhodanese-Domäne (in rot markiert). **B:** Y2H von BD-Uba4 und BD-Urm1 mit AD-Uba4-Volllänge und -Fragmenten sowie AD-Urm1. **C:** Hefestämme mit integrativ eingebrachten N-terminal markierten *uba4*-Mutanten wurden auf Zeocin-haltige Platten getüpfelt. **D:** Western Blot mit denaturierten Zellextrakten von Stämmen aus **C**. Die Zellen wurden mit 10mM NEM für 1h behandelt. Es wurde ein α HA-Antikörper verwendet, um die Urm1-Ahp1-Interaktion in Abhängigkeit dieser Mutanten zu überprüfen. α Myc- und α Dpm1-Antikörper dienten der Lade- und Expressionskontrolle.

3.2.4 Epistatische Analyse von $\Delta urm1$ und $\Delta ahp1$

Es konnte bereits gezeigt werden, dass $\Delta ahp1$ -Mutanten eine hohe Sensitivität gegenüber tert-Butyl-Hydroperoxid (t-BOOH) besitzen (Goehring et al., 2003b). Hydroperoxide erzeugen oxidativen Stress und können somit eine Vielzahl von Schäden innerhalb der Zelle verursachen. Um in diesem Zusammenhang die Modifikation von Ahp1 weiter zu charakterisieren wurde die $\Delta urm1 \Delta ahp1$ -Doppelmutante und die entsprechenden Einzelmutanten auf Hefepplatten mit t-BOOH und Zeocin inkubiert. Dabei zeigte sich, dass die Sensitivität der Doppelmutanten schwer zu interpretieren ist, da bereits der $\Delta urm1$ -Stamm einen leichten Wachstumsdefekt besitzt (Abb.19). Die $\Delta urm1 \Delta ahp1$ -Doppelmutante zeigte jedoch gegenüber den Einzelmutanten neben dem Wachstumsdefekt der $\Delta urm1$ -Deletion eine erhöhte Sensitivität zu t-BOOH, was gegen eine Epistasie von Urm1 und Ahp1 spricht. Dabei ist

3. Ergebnisse

anzumerken, dass epistatische Analysen mit Modifizierern aufgrund vieler Protein-Substrate häufig schwer zu interpretieren sind. Auf Zeocin-Platten verhielt sich der $\Delta ahp1$ -Stamm dagegen wie WT (Abb. 19). Interessanterweise wies dagegen die $\Delta ahp1 \Delta urm1$ -Doppelmutante eine geringere Sensitivität als der $\Delta urm1$ -Stamm auf. Dies bedeutet, dass ein Teil der Sensitivität des $\Delta urm1$ -Stammes gegenüber Zeocin durch unmodifiziertes Ahp1 zustande kommt.

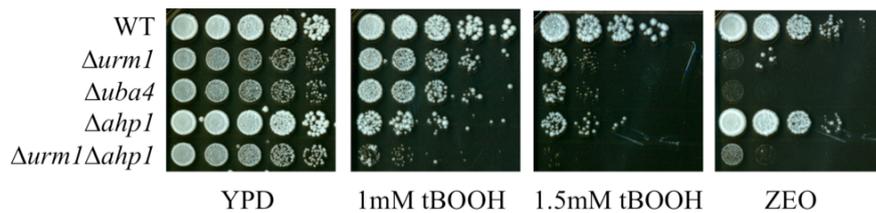


Abbildung 19: Epistatische Analyse von $\Delta urm1$ und $\Delta ahp1$ auf t-BOOH- und Zeocin-haltigen Hefeplatten. Es wurden serielle Verdünnungen von $\Delta urm1$ -, $\Delta uba4$ -, $\Delta ahp1$ - und $\Delta urm1\Delta ahp1$ -Mutanten auf YPD, t-BOOH- und Zeocin-Hefeplatten für zwei Tage bei 30°C inkubiert.

3.2.5 Zugabe von t-BOOH zu Hefezellen inhibiert spezifisch die Ahp1-Modifikation

Wie eben gezeigt wurde, besitzen $\Delta ahp1$ -Mutanten eine hohe Sensitivität gegenüber t-BOOH. In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss von t-BOOH auf die „Urmlyierung“ von Ahp1 und den anderen Urm1-Substraten untersucht. Dazu wurde die ^{HisHA}Urm1-Konjugation an Proteine ohne Zugabe von NEM, in Anwesenheit von NEM oder nach Behandlung mit t-BOOH in Kombination mit NEM untersucht (Abb. 20A). Wie schon vorher mehrmals gezeigt wurde, ist die Urm1-Substrat-Bildung nach NEM-Behandlung stark induziert oder stabilisiert (Abb. 20A). Erstaunlicherweise führte eine Vorabbehandlung der Zellen mit t-BOOH für 2h und eine anschließende Zugabe von NEM zu einer drastischen Abnahme des Urm1-Ahp1-Signales (Abb. 20A). Es waren allerdings nicht alle Urm1-Substrat-Signale reduziert. Ein großer Teil war unverändert und nur einige wenige Banden im höher molekularen Bereich zeigten ein leicht reduziertes Signal (Abb. 20A). Der offensichtlichste Effekt war jedoch die Auswirkung der t-BOOH-Behandlung

3. Ergebnisse

auf die Urm1-Ahp1-Konjugation. Um auszuschließen, dass NEM durch die Zugabe von t-BOOH zu den Zellen inaktiviert wurde, sind auch die Smt3-Protein-Konjugate untersucht worden (Abb. 20B). NEM beeinflusste die Smt3-Konjugate, jedoch machte es keinen Unterschied, ob vorher t-BOOH zu den Zellen gegeben wurde oder nicht (Abb. 20B). Die Wirkung von NEM wurde demnach durch die Anwesenheit von t-BOOH nicht beeinträchtigt. Die gleiche Auswirkung von t-BOOH auf die Urm1-Ahp1-Konjugation war in einem α Myc-Immunblot gegen Ahp1^{myc} zu beobachten (Abb. 20C). Die Bande, die den Urm1-Ahp1-Komplex repräsentiert, war nach Zugabe von t-BOOH abwesend. Zudem scheinen nach einer t-BOOH-Behandlung schneller migrierende Banden von Ahp1^{myc} aufzutauchen, die entweder Degradationsprodukte darstellen oder aus einer verstärkten negativen Ladung von Ahp1^{myc} resultieren könnten (Abb. 20C). Die Behandlung der Zellen mit t-BOOH und der damit verbundene oxidative Stress scheinen sich inhibitorisch auf die Ahp1-Modifikation auszuwirken.

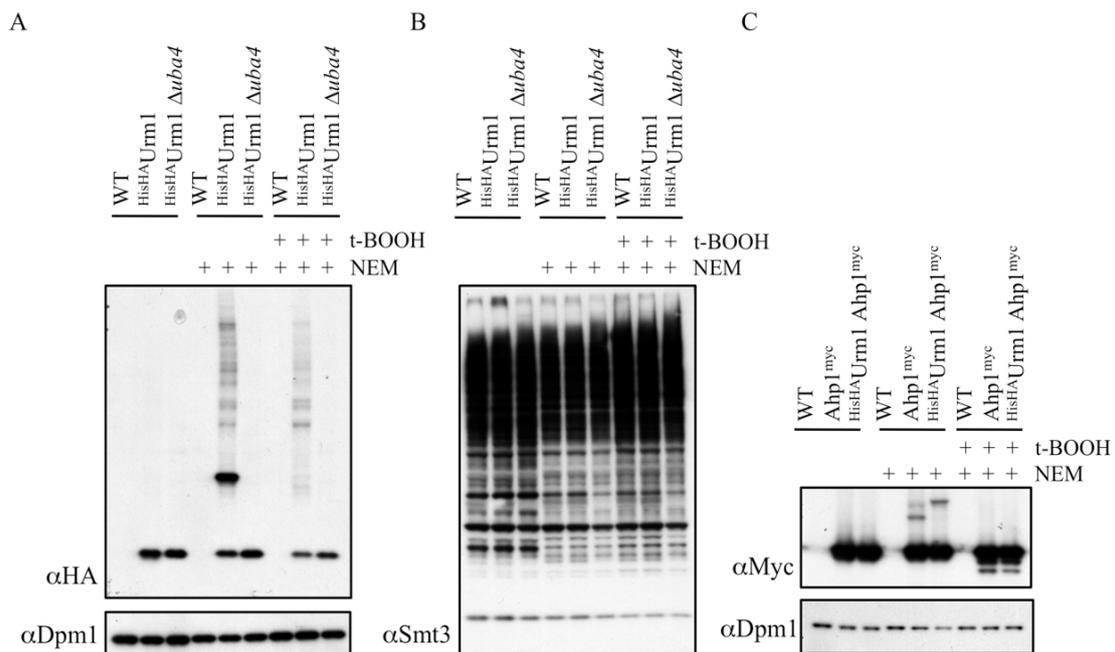


Abbildung 20: Die Urm1-Modifikation von Ahp1 ist unter oxidativem Stress abwesend.
A: WT-, HisHA-Urm1- und HisHA-Urm1 Δ uba4-Stämme wurden mit NEM und t-BOOH behandelt. 1.5mM t-BOOH wurde während der logarithmischen Wachstums-Phase für 2h zu den Zellen gegeben. Anschließend wurde für 1h 10mM NEM zugegeben und daraufhin denaturierte Zellextrakte hergestellt. Der Western Blot wurde mit α HA- und α Dpm1-Antikörper behandelt.
B: Mit den Proben aus **A** wurde ein erneuter Western Blot durchgeführt. Dieser wurde anschließend mit α Smt3-Antikörper behandelt.
C: WT-, Ahp1^{myc}- und HisHA-Urm1 Ahp1^{myc}-Stämme wurden wie in **A** beschrieben mit t-BOOH und NEM behandelt.

3.2.6 Ahp1 wird an Lysin K32 modifiziert

Die ungewöhnliche Domänen-Struktur von Uba4 und die Tatsache, dass beide aktiven Cysteine, C225 und C397, für die Modifikation von Ahp1 benötigt werden, wirft die Frage auf, ob Besonderheiten in der Verknüpfung zwischen Modifizierer und Substrat vorliegen. Ubiquitin und Ubls bilden bis auf seltene Ausnahmen eine Isopeptidbindung zwischen der Carboxy-Gruppe ihres C-terminalen Glycin und einer ϵ -Amino-Gruppe eines Substrat-Lysins aus. Da sich im Falle von Urm1 die Stelle der Modifikation am Substrat massenspektroskopisch nicht nachweisen ließ, wurden *ahp1*-Mutanten hergestellt und anschließend die Bildung des Urm1-Ahp1-Konjugates im Western Blot überprüft. Jede einzelne *ahp1*-Mutante war mit einem C-terminalen Myc-Epitop versehen und wurde integrativ in den *LEU2*-Lokus eines Δ *ahp1*-Stammes eingebracht. Behandlung dieser Zellen mit NEM sollte die Urm1-Ahp1-Interaktion stabilisieren. Es konnte anschließend eindeutig in einem α HA- und α Myc-Immunblot festgestellt werden, dass Ahp1 an Lysin K32 mit Urm1 modifiziert wird (Abb. 21B). Die weiteren Einzel- oder Doppel-Lysinmutanten hatten keinen wesentlichen Einfluss auf die Urm1-Ahp1-Konjugat-Bildung (Abb. 21B). Interessanterweise liegt das Lysin K32 genau in einem Proteinbereich, der als besonders unstrukturiert und flexibel beschrieben wurde (Trivelli et al., 2003) (Abb. 21A+C). Dieser Bogen enthält viele polare Aminosäure-Reste (S, D/E) und ein konserviertes Cystein (C31) direkt neben dem modifizierten Lysin (Abb. 21A). Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass die Cystein- zu Serin-Mutante an Position C31 keinen Einfluss auf die antioxidierenden Eigenschaften von Ahp1 hat (Jeong et al., 1999).

3. Ergebnisse

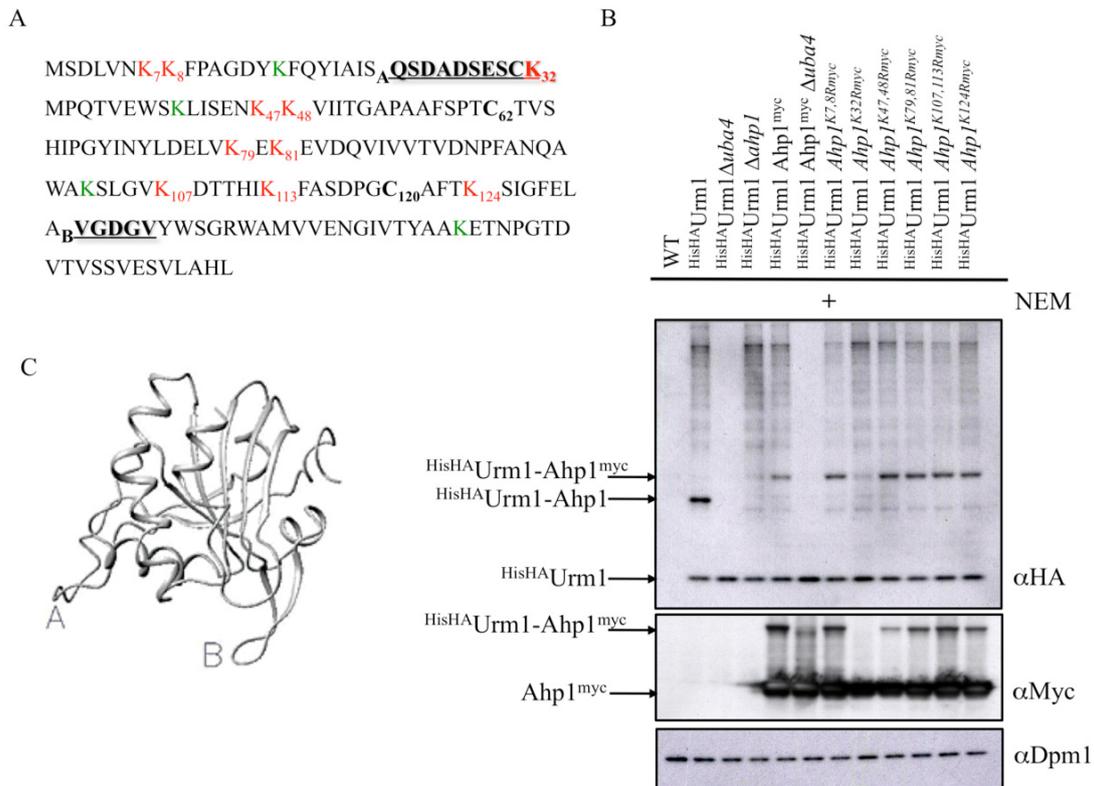


Abbildung 21: Ahp1 wird an Lysin K32 modifiziert. **A:** Aminosäuresequenz von Ahp1. Lysine, die für diese Studie zu Arginin mutiert wurden, sind rot markiert und alle anderen grün. Die aktiven Cysteine C₆₂ und C₁₂₀ sind fett gedruckt. Unterstrichen sind die unstrukturierten und flexiblen Regionen (A und B) von Ahp1. **B:** Immunblot von denaturierten Zellextrakten. C-terminal markierte Einzel- und Doppel-Mutanten von *AHP1* wurden integrativ in einen Δ *ahp1*-Stamm eingebracht. Zudem war in allen Hefestämmen (außer WT) *URM1* N-terminal mit einem HisHA-Epitop versehen. Durch Zugabe von 10mM NEM für 1h wurde die Konjugatbildung induziert. Der Δ *uba4*-Hintergrund diente jeweils der Kontrolle, da in diesem Stamm keine Urm1-Konjugate detektierbar sind. Der Western Blot wurde mit α HA-, α Myc- und α Dpm1-Antikörper behandelt. **C:** Ansicht der Ahp1-Struktur (Trivelli et al., 2003).

3.2.7 Phänotypische Analyse der *ahp1*^{K32R}-Mutante

Da die Δ *ahp1*-Mutante eine starke Sensitivität gegenüber t-BOOH zeigte, wurde überprüft, ob möglicherweise schon die K32R-Variante einen Phänotyp aufweist. Sollte Urm1 bei der Reduktion von Alkylhydroperoxiden eine entscheidende Funktion haben, müsste dies in phänotypischen Analysen erkennbar sein. Dazu wurde die vorher beschriebene *ahp1*^{K32R-myc}-Mutante in seriellen Verdünnungsreihen auf t-BOOH-haltigen Hefepplatten inkubiert. Es zeigte sich, dass ein HisHA_{Urm1} *ahp1*^{K32R-myc}-Stamm eine vergleichbare

3. Ergebnisse

Sensitivität zu t-BOOH wie ein His^{HA}Urm1 Δ *ahp1*-Stamm besitzt. Zwar verursachte bereits das Myc-Epitop eine leichte Sensitivität zu t-BOOH, jedoch scheint auch die Modifikation von Ahp1 durch die Myc-Fusion leicht beeinträchtigt zu sein (Abb. 21B). Urm1 ist somit in der Tat eine wichtige Komponente bei der Regulation der Ahp1-Funktion.

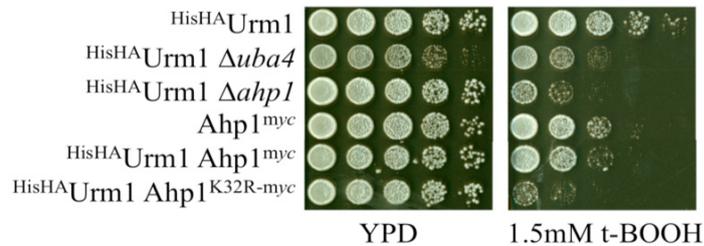


Abbildung 22: Phänotypische Analyse der *ahp1*^{K32R-myc}-Mutante. Serielle Verdünnungsreihe der beschriebenen Stämme auf YPD- und t-BOOH-Hefeplatten. Inkubation für drei Tage bei 30°C.

3.2.8 Der Einfluss der Thioredoxine auf die Ahp1-Modifikation

Interessanterweise liegt das Lysin K32 in einem besonders unstrukturiertem und flexiblem Proteinbereich. Es wurde bereits früher spekuliert, dass dieser flexible Bogen ein Interaktions-Motiv für potentielle Proteinpartner darstellt (Trivelli et al., 2003). Gut beschriebene Interaktionspartner von Ahp1 sind die Thioredoxine Trx1 und Trx2, die in *Y2H*-Versuchen und massenspektroskopischen Untersuchungen als Ahp1-Interaktoren identifiziert wurden (Vignols et al., 2005). Die Trx-Proteine werden benötigt um oxidiertes Ahp1 zu reduzieren und ermöglichen es Ahp1, durch diesen Regenerations-Prozess, erneut als Reduktase aktiv zu werden. Die Trx-Proteine könnten somit einen Einfluss auf die Modifikation von Ahp1 haben. Um dies zu überprüfen, wurden Δ *trx1*- und Δ *trx2*-Stämme hergestellt. Diese Stämme wurden anschließend verwendet, um die Modifikation von Ahp1 nach Zugabe von NEM zu analysieren. Es zeigte sich, dass die jeweiligen Δ *trx1*- und Δ *trx2*-Mutanten keinen Einfluss auf die Ahp1-Modifikation haben (Abb. 23A), obwohl der Δ *trx2*-Stamm eine starke Sensitivität gegenüber t-BOOH zeigte (Abb. 23B). Diese Sensitivität scheint somit nicht mit der Ahp1-Modifikation in Zusammenhang zu stehen.

3. Ergebnisse

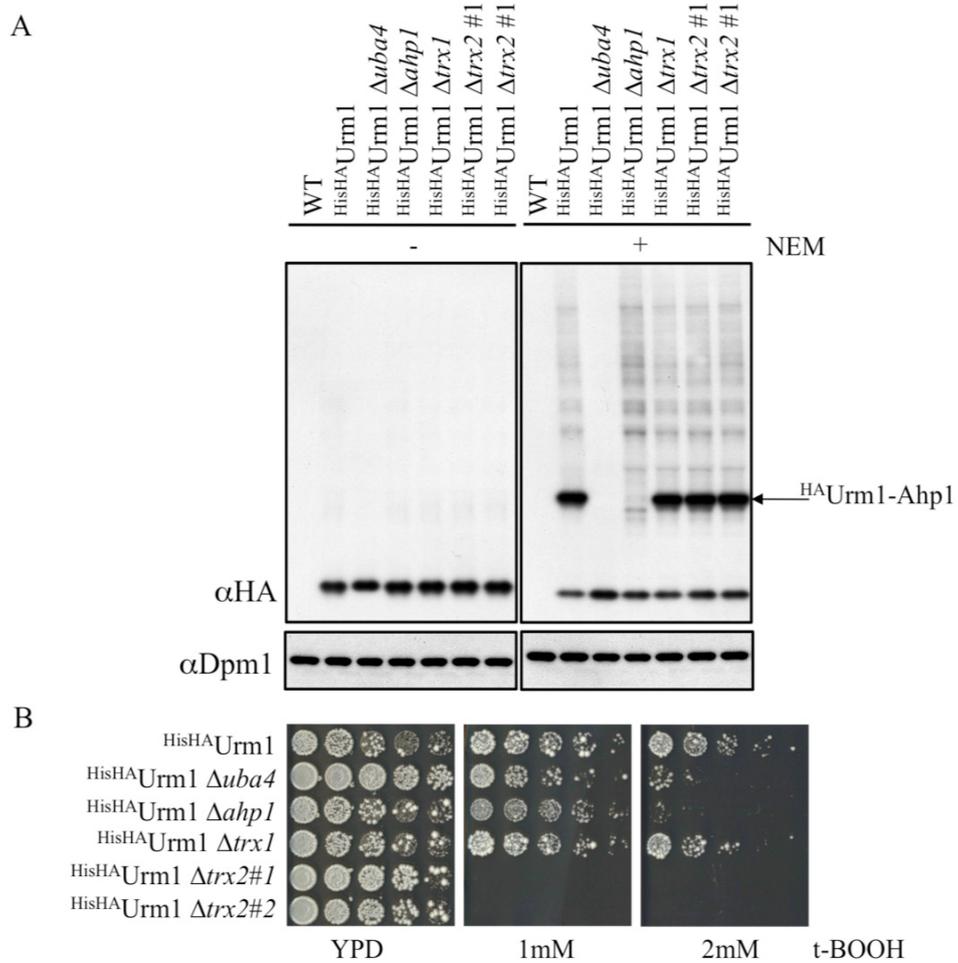


Abbildung 23: Der Einfluss der Thioredoxine auf die Ahp1-Modifikation. A: Immunblot von denaturierten Zellextrakten mit α HA- und α Dpm1-Antikörper. Es wurde die *His^{HA}Urm1-Ahp1*-Konjugation in Δ *trx1*- und Δ *trx2*-Stämmen untersucht. Zwei unterschiedliche Δ *trx2*-Mutanten wurden durch #1 und #2 gekennzeichnet. **B:** Stämme aus **A** wurden auf YPD- und t-BOOH-Hefeplatten inkubiert.

3.3. Identifikation neuer Urm1-Substrate in *S.cerevisiae*

3.3.1 Doppelaufreinigung von ^{HisHA}Urm1-Substraten

Bisher wurde gezeigt, dass Urm1 über eine kovalente Bindung Ahp1 am Lysin K32 modifizieren kann. Dabei scheint die Modifikation von Ahp1 wesentlich für dessen Funktion bei der Abwehr von oxidativem Stress zu sein. Jedoch zeigten bereits die α HA-Immunblots gegen ^{HA}Urm1 und die fehlende Zeocin-Sensitivität des Δ *ahp1*-Stammes, dass neben Ahp1 noch einige weitere Urm1-Substrate existieren müssen. Um weitere spezifische Urm1-Substrate zu identifizieren wurde ein Hefestamm verwendet, der ^{HisHA}Urm1 exprimiert, und damit eine Doppelaufreinigung durchgeführt (nach Hoege et al, 2002). Um vorab die Effizienz einer Urm1-Doppelaufreinigung zu überprüfen, wurden die Schritte der Doppelaufreinigung einzeln ausgeführt und Ahp1 als bekanntes Substrat zur Detektion eingesetzt. Es wurde mit NEM-behandelten Zellen eine ^{HisHA}Urm1-NiNTA-Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen und anschließend ein α Myc-Immunblot gegen Ahp1^{myc} durchgeführt. Es konnte eine Bande detektiert werden, die gemäß ihrer Migrationsgeschwindigkeit der Größe von Urm1-Ahp1 entspricht (Abb. 24A). Auch nach einer HA-Immunpräzipitation unter nativen Bedingungen und einem Immunblot gegen Ahp1^{myc} konnte diese Bande, insbesondere nach Behandlung der Zellen mit NEM, nachgewiesen werden (Abb. 24B). Außerdem war zu beobachten, dass auch unter nativen Bedingungen die Aufreinigung der modifizierten Form von Ahp1 vom E1-Enzym Uba4 abhängt (Abb. 24B). Beide Aufreinigungsmethoden eignen sich demnach zur Anreicherung von Urm1-Substraten.

3. Ergebnisse

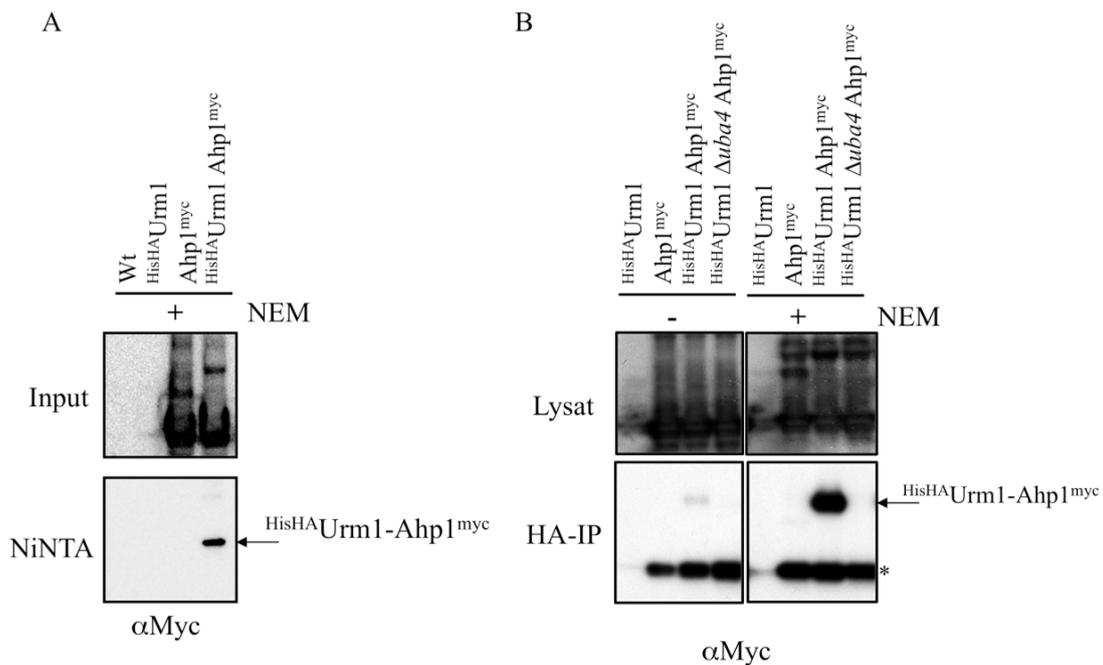


Abbildung 24: Aufreinigung von „urmyliertem“ Ahp1. **A:** Denaturierende NiNTA-Aufreinigung von HisHA-Urm1. Die Zellen wurden für 1h mit 10mM NEM behandelt (+). Detektion mit αMyc-Antikörper. **B:** HA-Immunpräzipitation von HisHA-Urm1. Den Zellen wurde vor dem Ernten 10mM NEM für 1h (-/+ NEM) bei 30°C zugegeben. Detektion von Ahp1 mittels C-terminalem Myc-Epitop

In einer Doppelaufreinigung wurden nun beide Schritte kombiniert. Im ersten Schritt der Aufreinigung wurde aus 6000 OD Zellen ein denaturierter Zellextrakt hergestellt und die HisHA-Urm1-Substrate über eine NiNTA-Agarose angereichert. Die eluierten Proteine wurden nach einer Dialyse in einem zweiten Schritt mittels einer HA-Immunpräzipitation aufgereinigt. Die gebundenen Proteine wurden eluiert, elektrophoretisch aufgetrennt und entweder durch einen αHA-Western Blot oder eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht und zur massenspektroskopischen Untersuchung verwendet (Abb. 25).

3. Ergebnisse

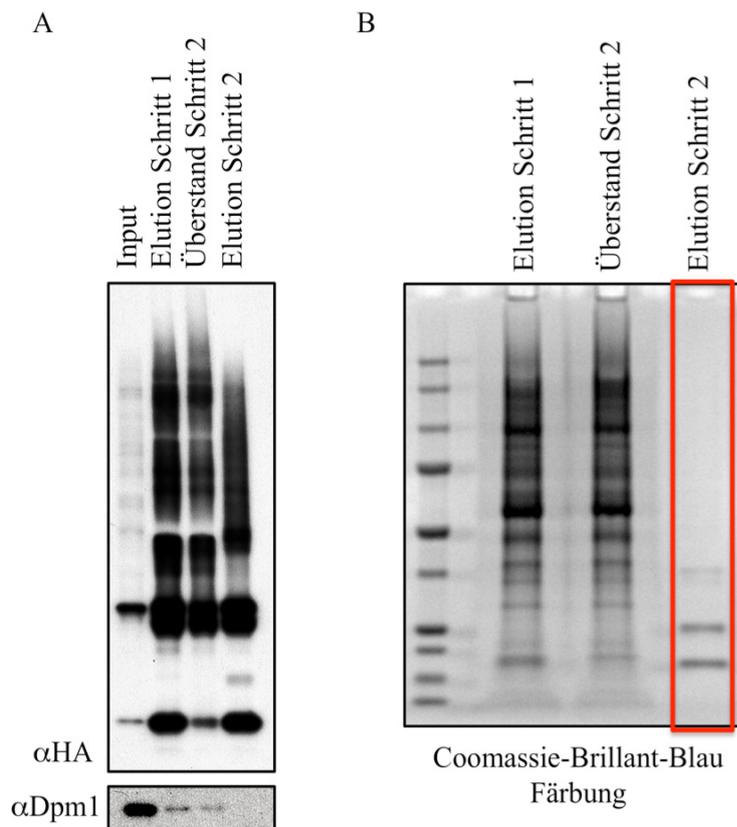


Abbildung 25: Aufreinigung von Urm1-Substraten. **A:** Die N-terminale ^{HisHA}Urm1-Fusion wurde unter denaturierenden Bedingungen über eine NiNTA-Säule und anschließend unter nativen Bedingungen durch eine HA-Immünpräzipitation aufgereinigt. Die einzelnen Aufreinigungsschritte wurden durch einen Western Blot mit α HA-Antikörper überprüft. Um die Effizienz und die Spezifität der Aufreinigung zu testen wurde außerdem ein α Dpm1-Antikörper verwendet. **B:** gleiche Proben wie in **A**; die einzelnen Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt. Die markierte Region des Gels wurde massenspektroskopisch untersucht.

Es konnten neben unkonjugiertem, freiem ^{HisHA}Urm1 eine Reihe von potentiellen ^{HisHA}Urm1-Substraten durch Massenspektroskopie nachgewiesen werden (Tabelle 2). Als eine wichtige interne Kontrolle für die Aufreinigung galt die Identifikation von Ahp1, das bei der massenspektroskopischen Untersuchung neben Urm1 die stärksten Signal-Intensitäten ergab (Tabelle 2). Interessanterweise wurden zahlreiche weitere Komponenten entdeckt, die bei der Kontrolle des Redox-Status der Zelle eine wichtige Rolle spielen und dabei direkte oder zumindest genetische Interaktoren von Ahp1 sind. Zudem konnte Uba4 als potentielles Urm1-Substrat identifiziert werden, was ein Hinweis für eine weitere Regulationsebene im Urm1-Signalweg sein könnte.

3. Ergebnisse

Protein	Beschreibung	Intensität
Urm1	Ubiquitin-ähnliches Protein, Aktivierung durch das E1-Enzym Uba4	106600000
Uba4	E1-Enzym für Urm1	1393300
Ahp1	Alkylhydroxyperoxid Reduktase	86020000
Trx1	Thioredoxin, interagiert mit Tsa1 und Ahp1	434850
Tsa1	Thioredoxin Peroxidase	62253
Grx1	Glutathion-abhängige Disulfid-Oxidoreduktase	304450
Grx3	Glutathion-abhängige Disulfid-Oxidoreduktase	182820

Tabelle 2: Urm1 und potentielle Substrate. Es wurden die Substrat-Kandidaten zusammengefasst, die eine bekannte Funktion bei der Abwehr von oxidativen Stress haben.

3.3.2 Verifikation der Uba4-Modifikation unter denaturierenden Bedingungen

In der oben beschriebenen massenspektroskopischen Untersuchung ergab Uba4 neben Ahp1 und Urm1 das stärkste Signal. Dies bedeutet, dass die „urmylierte“ Form von Uba4 unter denaturierenden Bedingungen nachweisbar gewesen ist. Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurden denaturierende NiNTA-Aufreinigungen gegen ^{HisHA}Urm1 durchgeführt und anschließend in einem α Myc-Western Blot die ^{myc}Uba4-Signale detektiert. Es zeigte sich, dass Uba4 durch Urm1 modifiziert wird (Abb. 26). Außerdem konnte die modifizierte Form von Uba4 durch Zugabe von NEM zum Hefemedium zusätzlich verstärkt werden (Abb. 26). Es ist dabei zu beachten, dass mehrere Banden erkennbar waren, die auf eine mehrfache „Mono-Urmylierung“ oder eine einzige „Poly-Urmylierung“ hinweisen (Abb. 26).

3. Ergebnisse

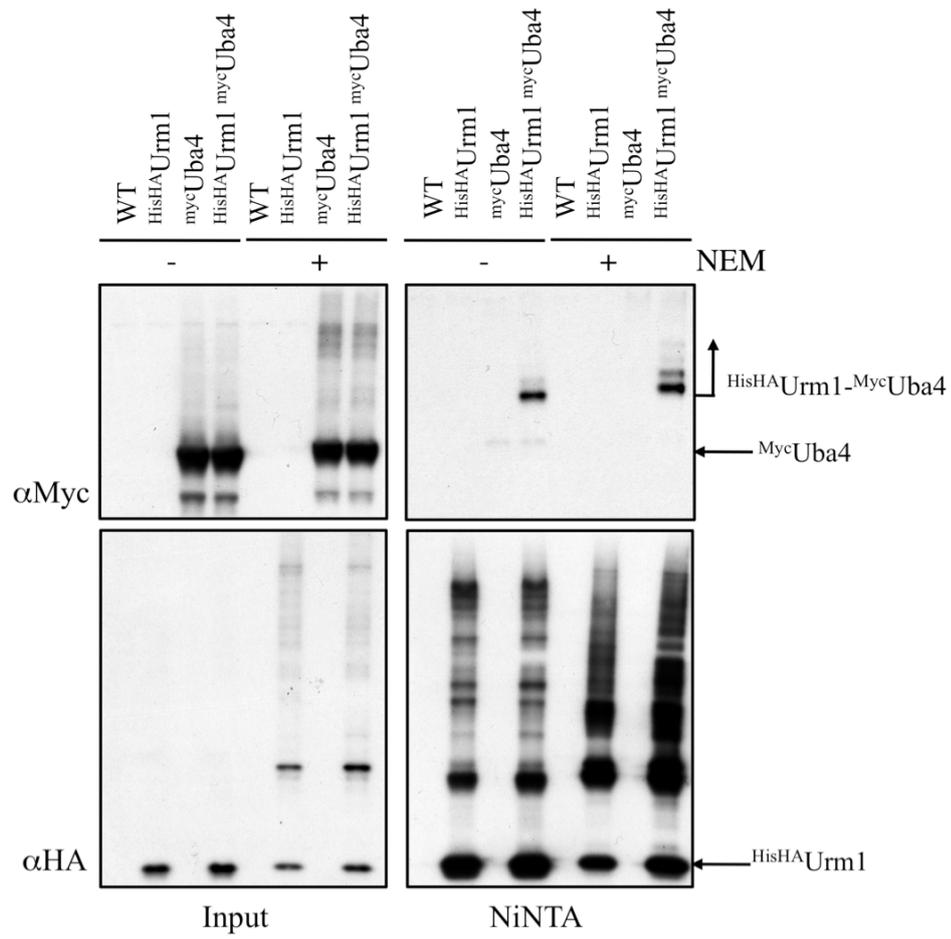


Abbildung 26: Die Urm1-Uba4-Interaktion ist unter denaturierenden Bedingungen stabil. Die Zellen wurden entweder ohne NEM (-) oder für 1h mit 10mM NEM behandelt (+) und anschließend eine NiNTA-Aufreinigung gegen HisHA-Urm1 durchgeführt. Die Detektion der HisHA-Urm1-mycUba4-Konjugate erfolgte mit einem αMyc-Antikörper. Die Effizienz der Aufreinigung wurde mit einem αHA-Western Blot überprüft.

3.4 Rad50 wird durch Urm1 modifiziert

3.4.1 Aufreinigung von „urmyliertem“ Rad50

Da $\Delta urm1$ eine sehr starke Sensitivität zu Zeocin zeigte, stellte sich die Frage, ob ein Protein, das bei der DNA-Reparatur involviert ist, mit Urm1 interagiert oder damit modifiziert wird. Die Doppelaufreinigung und anschließende massenspektroskopische Untersuchung ergab keine Proteine, die bei der DNA-Reparatur eine Rolle spielen. Da durch den denaturierenden Schritt der Doppelaufreinigung nur Substrate angereichert werden, wurden mit dem HA Urm1-Fusionsprotein Immunpräzipitationen unter nativen Bedingungen durchgeführt, um auch Interaktoren aufzureinigen zu können. Im Western Blot wurde daraufhin getestet, ob eine Interaktion oder modifizierte Form von DNA-Reparatur-Proteinen vorliegt. Die N-terminalen Urm1-Fusionen hatten keinen negativen Einfluß auf die Funktion von Urm1, was durch serielle Verdünnungen der entsprechenden Hefestämme auf Zeocin-haltigen Hefepplatten überprüft wurde (Abb. 27A).

Unter anderem wurde Rad50 getestet, das zusammen mit Mre11 und Xrs2 in *S. cerevisiae* den MRX-Komplex bildet. Der MRX-Komplex erkennt den DSB und initiiert für beide Reparaturwege, NHEJ und HR, die ersten Schritte. Tatsächlich konnten in einer HA Urm1-Immunpräzipitation unmodifiziertes Rad50 und langsamer migrierende Banden für Rad50 identifiziert werden, die in einem $\Delta rad50$ -Hefestamm abwesend waren (Abb. 27B). Die entsprechende α Rad50-Immunpräzipitation mit anschließender Detektion von HA Urm1 ergab ein ähnliches Resultat mit langsamer migrierenden Banden, die zudem abhängig von der Präsenz des E1-Enzymes Uba4 waren (Abb. 27C). Zu weiteren Kontrollzwecken wurde ein $^{GFPHisHA} URM1$ -Konstrukt hergestellt, integrativ in einen $\Delta urm1$ -Stamm eingebracht und anschließend eine HA-Immunpräzipitation durchgeführt. Die Detektion mit α Rad50-Antikörper ergab einen deutlichen Größenunterschied, der spezifisch von der zusätzlichen GFP-Fusion resultiert (Abb. 27D). Es bleibt somit festzuhalten, dass es sich bei Rad50 um ein weiteres Urm1-Substrat handelt, das in Abhängigkeit von Uba4 modifiziert wird.

3. Ergebnisse

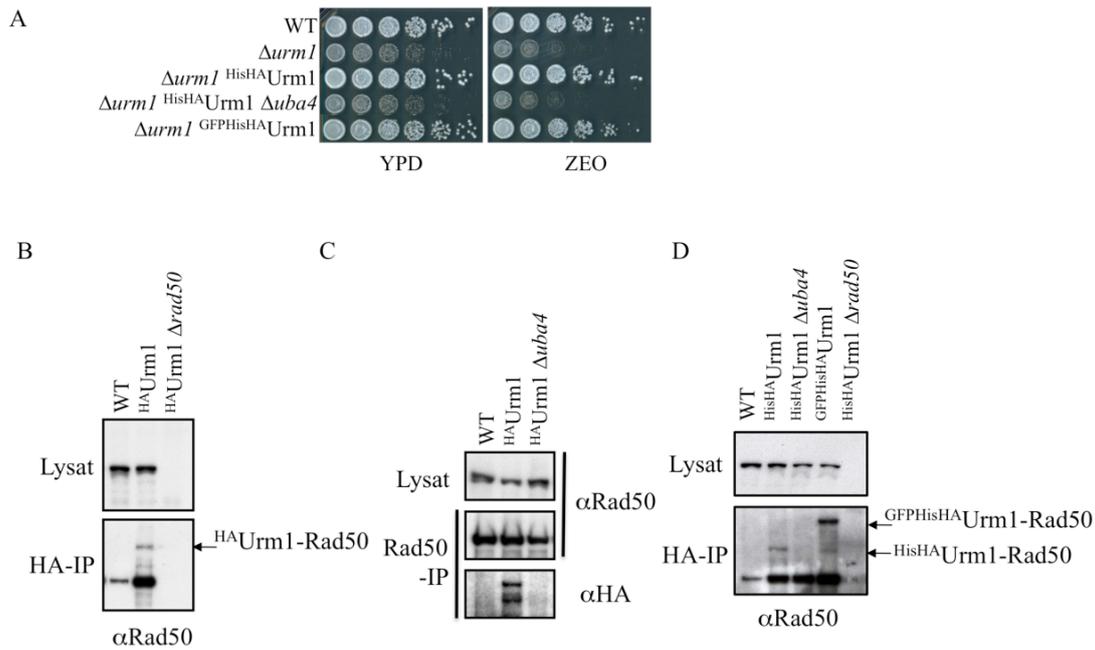


Abbildung 27: Urm1 modifiziert Rad50. **A:** Viabilitätstest von in **B-D** eingesetzten Hefestämmen. Die Hefestämme wurden in seriellen Verdünnungsreihen auf Zeocin-haltigen Hefeplatten ausgebracht um die Funktionalität der verschiedenen Urm1-Fusionsproteine zu überprüfen **B:** HA-Immünpräzipitation. Anschließender Western Blot und Detektion mit α Rad50-Antikörper. Der Pfeil markiert die langsamer migrierenden Rad50-Urm1-Konjugate **C:** Rad50-Immünpräzipitation und anschließender Western Blot, sowohl mit α Rad50- als auch mit α HA-Antikörper. **D:** siehe **B**, zusätzlich wurde eine ^{GFPHisHA} URM1-Fusion eingesetzt. Rad50 und modifiziertes Rad50 wurden mit α Rad50-Antikörper nachgewiesen.

3.4.2 Die Modifikation von Rad50 ist abhängig von Uba4 und den beiden aktiven Cysteinen in Uba4

Im Falle von Ahp1 konnte bereits in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass sowohl das Cystein C225 der E1-Domäne als auch das Cystein C397 der Rhodanese-Domäne von Uba4 für die Modifikation benötigt wird. Um zu überprüfen, ob auch die Rad50-Modifikation von der Aktivität beider Cysteine abhängt, wurden die bereits beschriebenen Myc-markierten *uba4*-Mutanten verwendet (Abb. 18C), um mit ihnen eine ^{HA}Urm1-Immünpräzipitation durchzuführen. Ein anschließender Western Blot mit α Rad50-Antikörper zeigte, dass die Modifikation von Rad50 in den C225S- und C397S-Mutanten abwesend war (Abb.28). Beide aktiven Cysteine werden somit auch für die Modifikation von Rad50 benötigt. Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten für die Ahp1-Modifikation überein.

3. Ergebnisse

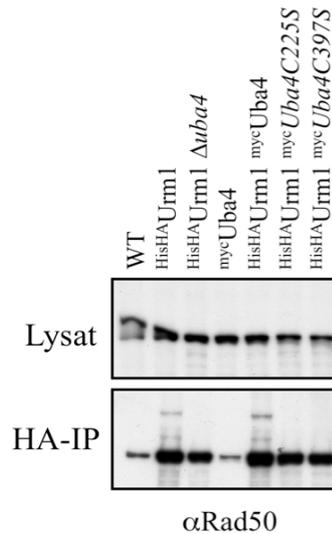


Abbildung 28: Einfluss der unterschiedlichen Uba4-Domänen auf die Rad50-Modifikation. ^{HA}Urm1-Immünpräzipitation. In einem ^{HA}Urm1 $\Delta uba4$ -Stamm wurden verschiedene Mutanten von *uba4* integrativ eingebracht. In einem Immunblot mit α Rad50-Antikörper wurde die Abhängigkeit der Modifikation von *uba4*-Mutanten überprüft.

3.4.3 Die Urm1-Rad50-Interaktion ist sensitiv zu NEM

Die Modifikation von Ahp1 kann durch Zugabe von NEM zum Hefemedium vor der anschließenden Zellyse stabilisiert werden. Im Gegensatz dazu ist der Urm1-Rad50-Komplex stark sensitiv zu NEM (Abb. 29). Eine ^{HA}Urm1-Immünpräzipitation führte in Anwesenheit von NEM im Hefemedium zum Verschwinden der Urm1-Rad50-Interaktion und der modifizierten Formen von Rad50 (Abb. 29). Um zu testen, ob durch die sehr starke Modifikation von Ahp1 nach Zugabe von NEM die Urm1-Rad50-Modifikation negativ beeinflusst wird, wurde eine Immünpräzipitation für ^{HA}Urm1 in einem $\Delta ahp1$ -Hintergrund durchgeführt. Es konnte allerdings kein Unterschied zwischen dem WT- und dem $\Delta ahp1$ -Stamm festgestellt werden (Abb. 29). Ahp1 spielt somit für die Modifikation von Rad50 keine Rolle.

Bereits die beiden benötigten aktiven Zentren von Uba4 zeigen, dass sich die Chemie der Urm1-Aktivierung von klassischen Ubls unterscheidet. Die Sensitivität der Urm1-Rad50-Interaktion gegenüber NEM könnte zudem einen weiteren Hinweis liefern, dass sogar innerhalb des Urm1-Systems Unterschiede bei der Konjugation zu Proteinen bestehen.

3. Ergebnisse

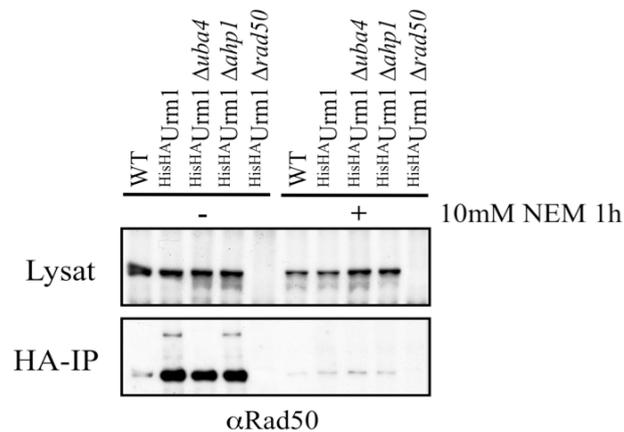


Abbildung 29: Die Rad50-Modifikation findet unabhängig von der Anwesenheit von Ahp1 statt und ist sensitiv gegenüber NEM. Es wurde eine ^{HA}Urm1-Immunpräzipitation durchgeführt. Die Zellen wurden entweder ohne NEM (-) oder für 1h mit 10mM NEM (+) behandelt. Ein anschließender Western Blot mit α Rad50-Antikörper zeigt die Modifikation in Abhängigkeit von NEM und Ahp1.

3.4.4 Die Urm1-Rad50-Interaktion lässt sich nur unter nativen und nicht unter denaturierenden Bedingungen nachweisen

Die bisher gezeigten Interaktionen von Urm1 mit Rad50 wurden immer unter nativen Bedingungen untersucht. Bei einer denaturierenden Aufreinigung von His^{HA}Urm1 mit NiNTA-Agarose konnte keine Modifikation von Rad50 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnte die Ahp1-Modifikation unter denaturierenden Bedingungen eindeutig bewiesen werden. Allerdings war dies erst nach Behandlung der Zellen mit NEM möglich (Abb. 24A). Die „Urmylierung“ von Rad50 ist im Gegensatz zur Urm1-Ahp1-Interaktion nicht nur sensitiv zu NEM, sondern verhält sich auch unter denaturierenden Bedingungen instabil. Trotz dieser Unterschiede ist in beiden Fällen die Modifikation abhängig von der Aktivität der E1- und der Rhodanese-Domäne von Uba4.

3.4.5 Die Stabilität des MRX-Komplexes ist in Δ urm1-Mutanten verringert

Es konnte bisher gezeigt werden, dass Rad50 durch Urm1 modifiziert wird. Als nächstes wurde überprüft, ob Urm1 einen möglichen Einfluss auf die Komplexbildung oder Stabilität von MRX-Komponenten hat. Dazu wurde mit

3. Ergebnisse

einem α Mre11-Antikörper und WT-, $\Delta urm1$ -, $\Delta mre11$ - und $\Delta rad50$ -Stämmen eine α Mre11-Immunpräzipitation und anschließend ein Western Blot mit Rad50-Detektion durchgeführt. Im $\Delta urm1$ -Stamm ist deutlich weniger Rad50 co-aufgereinigt worden als im WT-Stamm (Abb. 30A). Die $\Delta mre11$ - und $\Delta rad50$ -Stämme dienten der Kontrolle. Der α Mre11-Antikörper ergab allerdings im Western Blot recht unspezifische Signale (Daten nicht gezeigt), sodass auf Epitop-markierte Hefestämme ausgewichen wurde. Dazu wurden die jeweiligen Mre11^{HA}- und Xrs2^{Myc}-Stämme hergestellt. Durch serielle Verdünnungsreihen und Inkubation dieser Stämme auf Zeocin-haltigen Platten, konnte ein negativer Einfluss der Epitop-Markierungen auf die Protein-Funktionalität ausgeschlossen werden (Abb. 31B). Durch eine Mre11^{HA}-Immunpräzipitation und einen folgenden Western Blot konnte das vorherige Ergebnis bestätigt werden (Abb. 30B). Im $\Delta urm1$ -Stamm wurden erneut deutlich weniger Rad50 und Xrs2 co-immunpräzipitiert.

Zudem konnte in Cycloheximid-*shut-off*-Experimenten gezeigt werden, dass Rad50 bereits innerhalb von zwei Stunden stark abgebaut wird. Es konnte allerdings nur eine minimal verringerte Stabilität von Rad50 in $\Delta urm1$ - und $\Delta uba4$ -Stämmen nachgewiesen werden (Abb. 30C). Das Urm1-Konjugations-System hat somit keinen wesentlichen Einfluss auf die Stabilität von Rad50. Freies unkonjugiertes Urm1 ist dagegen ein sehr stabiles Protein. In WT- sowie $\Delta uba4$ -Zellen ist nach 180min kein Abbau beobachtbar. Die Ergebnisse zeigen, dass das Urm1-System einen signifikanten Einfluss auf die MRX-Komplex-Bildung hat.

3. Ergebnisse

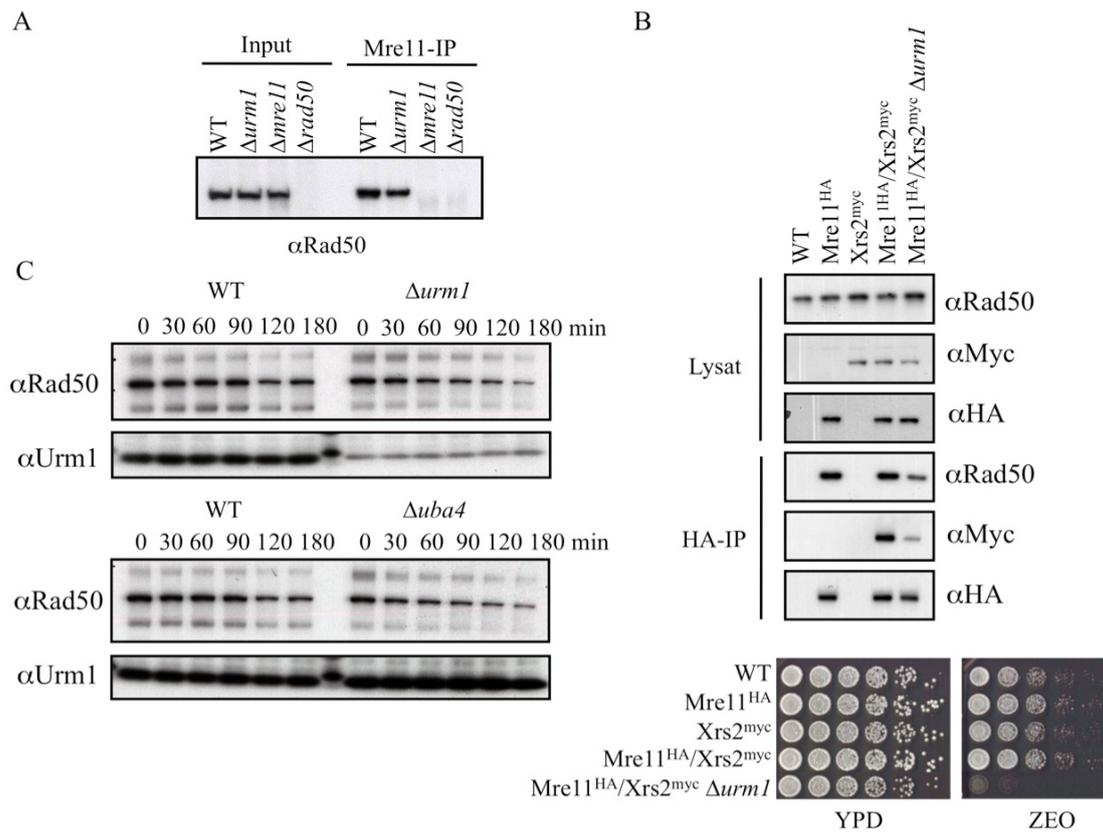


Abbildung 30: Einfluss von Urm1 auf die Stabilität des MRX-Komplexes. **A:** Mre11-Immünpräzipitation mit anschließender $\alpha Rad50$ -Detektion. $\Delta mre11$ - und $\Delta rad50$ -Stämme dienten der Kontrolle. **B:** Oben: HA-markiertes Mre11 wurde aus Zelllysaten immunpräzipitiert. Anschließende Detektion gebundener Proteine mit $\alpha Rad50$ - und αMyc -Antikörper. Unten: Beschriebene Stämme wurden in Verdünnungsreihen auf Zeocin-haltigen Platten bei 30°C inkubiert. **C:** Cycloheximid-*shut-off* Experiment. Es wurde die Stabilität von Rad50 und Urm1 in WT, $\Delta urm1$ - und $\Delta uba4$ -Stämmen überprüft. Zur Detektion wurden $\alpha Rad50$ - und $\alpha Urm1$ -Antikörper eingesetzt.

3.5 Die Protein- und tRNA-Modifikation durch Urm1 sind zwei unab-hängige Signalwege

3.5.1 Defekte bei der tRNA-Schwefelmodifikation führen zu einer Sensitivität gegenüber Zeocin

Die starke Zeocin-Sensitivität der $\Delta urm1$ -Hefestämme lässt eine Funktion von Urm1 bei einem DNA-Reparaturmechanismus vermuten. Allerdings zeigte sich, dass alle genetischen Analysen mit Urm1 schwierig zu interpretieren waren. So sind die $\Delta urm1 \Delta rad52$ - und $\Delta urm1 \Delta rad51$ -Doppelmutanten gegenüber Zeocin deutlich sensitiver als die jeweiligen Einzelmutanten. Auch zum *RAD6*-Signalweg konnte keine Epistasis erkannt werden. Kombinationen mit Komponenten aus dem MRX-Komplex zeigten eindeutig eine geringere Resistenz gegenüber Zeocin als die Einzelmutanten (Abb. 15). Die genetische Interaktion mit NHEJ ist ebenfalls schwierig zu interpretieren, da NHEJ-Mutanten im Gegensatz zu $\Delta urm1$ eigentlich keine starke Sensitivität zu DNA-schädigenden Substanzen aufweisen. Da es sich bei Urm1 um einen Modifizierer handelt, der höchstwahrscheinlich in mehr als einem Signalweg Aufgaben übernimmt, wären diese Effekte allerdings erklärbar.

Interessanterweise konnte jedoch gezeigt werden, dass viele Phänotypen von $\Delta urm1$ -Mutanten durch Überexpression von spezifischen tRNAs revertiert werden konnten (Bjork et al., 2007; Dewez et al., 2008; Leidel et al., 2009; Lu et al., 2008; Nakai et al., 2008). Urm1 und Uba4 scheinen für die Schwefelmodifikation dieser tRNAs essentiell zu sein. Die Abwesenheit dieser tRNA-Modifikation führt demnach zu diversen Sensitivitäten wie gegenüber Rapamycin, Caffein und Diamid (Leidel et al., 2009). Ncs2 ist eine weitere dieser essentiellen Komponenten für die Schwefelmodifikation von tRNAs. Zusammen mit Ncs6 überträgt es Schwefel von Urm1 und Uba4 auf die tRNAs von tRNA^{Lys} (UUU), tRNA^{Glu} (CUU) und tRNA^{Gln} (GUU). Aus diesem Grund wurde getestet, ob sich die Sensitivität gegenüber Zeocin der tRNA-Schwefelmodifikation zuordnen lässt. In der Tat zeigten $\Delta ncs2$ -, $\Delta urm1$ - und $\Delta urm1 \Delta ncs2$ -Stämme identische Sensitivitäten und sind somit epistatisch (Abb. 31A). Einen weiteren Hinweis ergab die C-terminale Doppelglycin-Mutante (Glycin zu Alanin) von Urm1. Der ^{HisHA}*Urm1AA*-Stamm zeigte zwar

3. Ergebnisse

eine reduzierte, aber dennoch gut detektierbare Konjugat-Bildung nach Behandlung der Zellen mit NEM (Abb. 31C). Gegenüber Zeocin verhielt sich die Doppelglycin-Mutante allerdings wie ein $\Delta urm1$ -Stamm (Abb. 31B). Die Sensitivität gegenüber Zeocin wird somit nicht durch eine fehlende Protein-Modifikation hervorgerufen, sondern repräsentiert vielmehr eine fehlende Funktionalität im tRNA-Signalweg.

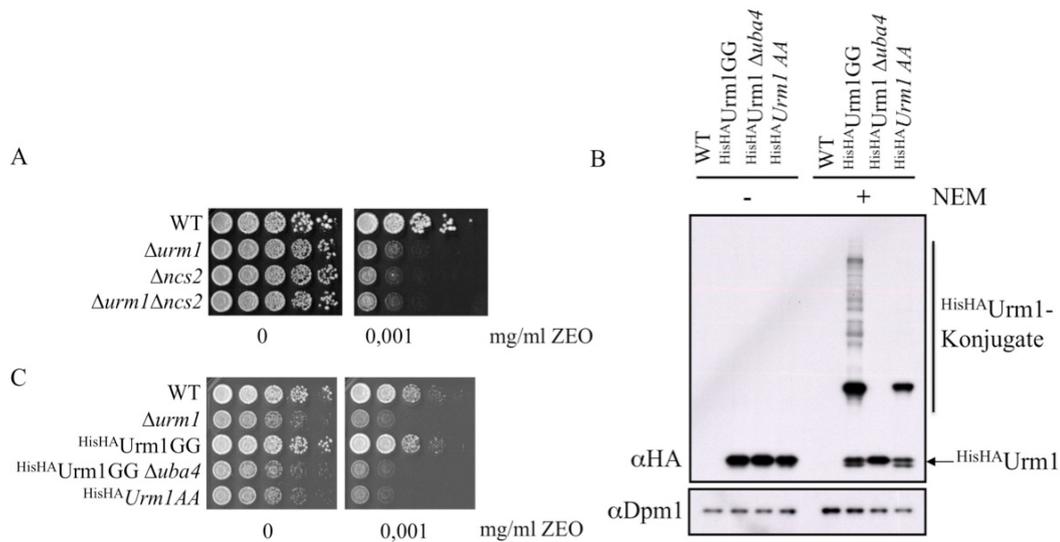


Abbildung 31: Mutanten mit Defekten in der tRNA-Schwefelmodifikation verhalten sich epistatisch zu $\Delta urm1$. **A:** Die Abbildung zeigt die Sensitivität der $\Delta ncs2$ -Mutante gegenüber Zeocin im Vergleich zu $\Delta urm1$. Hierfür wurde das Wachstum seriell verdünnter Hefekulturen auf Zeocin-haltigen Hefeplatten analysiert. **B:** Western Blot mit α HA-Antikörper um die Konjugatbildung der $^{HisHA}Urm1AA$ -Doppelglycinmutante zu überprüfen. α Dpm1-Immunblot diente der Ladekontrolle. **C:** Es wurden serielle Verdünnungen der Hefestämme aus **B** auf Zeocin-haltigen Platten inkubiert.

3.5.2 Die Modifikation von Ahp1 und Rad50 findet unabhängig von der tRNA-Modifikation statt

Die Feststellung, dass viele Phänotypen der $\Delta urm1$ -Mutanten auf die fehlende Schwefelmodifikation bestimmter tRNAs zurückzuführen ist, lässt die Vermutung zu, dass Komponenten, die bei der tRNA-Modifikation eine Rolle spielen auch bei der Modifikation von Proteinen involviert sein könnten. Da Ahp1 und Rad50 Urm1-Substrate sind, wurde anhand dieser die mögliche Funktion von Ncs2 bei der Urm1-Protein-Modifikationen überprüft. Im Falle von Ahp1 konnte kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden. Der Vergleich der Urm1-Signale im Western Blot weist in $\Delta ncs2$ weiterhin eine

3. Ergebnisse

prominente Bande in gleicher Stärke und Intensität auf (Abb. 32A). Wie bereits vorher ausführlich gezeigt wurde, handelt es sich hierbei um modifiziertes Ahp1. Auch die Modifikation von Rad50 ist absolut unverändert, was erneut mittels HA-Immünpräzipitation und anschließender Detektion mit α Rad50-Antikörper gezeigt wurde (Abb. 32B). Die fehlende tRNA-Schwefelmodifikation hat somit keinen Einfluss auf die Urm1-Protein-Modifikation. Ncs2 scheint exklusiv beim Schwefeltransfer auf tRNAs zu wirken und keine enzymatische Aktivität bei der Konjugation von Urm1 an Protein-Substrate zu besitzen.

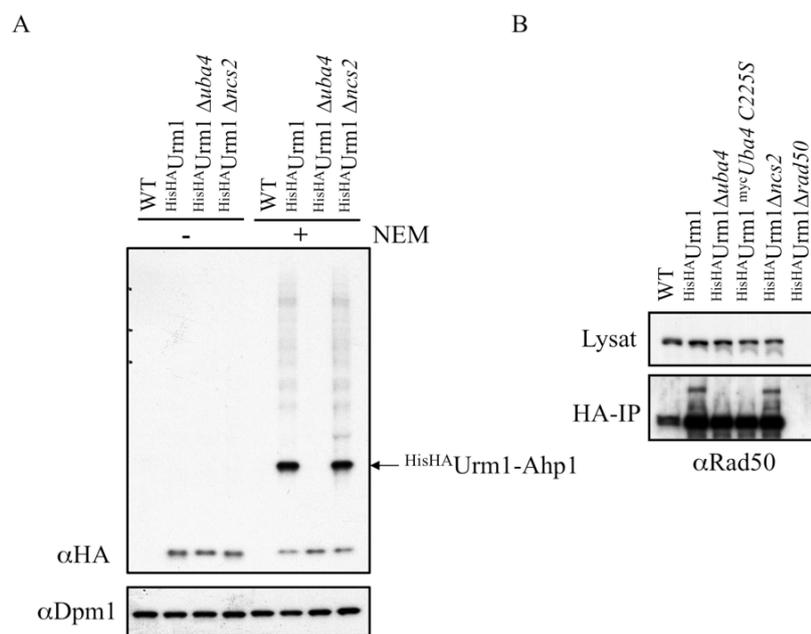


Abbildung 32: Die Urm1-Proteinmodifikation findet unabhängig von der Urm1-Funktion bei der tRNA-Schwefelmodifikation statt. **A:** Denaturierte Zellextrakte aus Hefe, die His^{HA}Urm1 exprimieren. Es wurde die Modifikation von Ahp1 ohne NEM (-) oder nach Behandlung mit 10mM NEM für 1h (+) in einem $\Delta ncs2$ -Hintergrund untersucht. Nachgewiesen durch α HA-Western Blot. **B:** HA-Immünpräzipitation. His^{HA}Urm1 wurde immunpräzipitiert und gebundenes Rad50 mit einem α Rad50-Antikörper detektiert. Es wurde der Einfluss einer $\Delta ncs2$ -Mutante auf die Rad50-Modifikation überprüft.

3.6 Aufbau eines Urm1 *in vitro* Systems

3.6.1 Aufreinigung der rekombinaten Urm1- und Uba4-Proteine für einen *in vitro* Aktivitätstest

Es konnte gezeigt werden, dass Urm1 in Abhängigkeit von Uba4 und dessen beiden aktiven Zentren die Proteine Ahp1 und Rad50 modifizieren kann. Es sind allerdings keine E2- oder E3-Enzyme für den Urm1-Signalweg bekannt. Um zu überprüfen, ob Urm1 und Uba4 die einzigen benötigten Komponenten für die Protein-Modifikation sind, wurde versucht ein Urm1 *in vitro* System zu etablieren. Dazu wurden Urm1 und Uba4 in *E. coli* exprimiert und anschließend mit Hilfe von Affinitäts-Chromatographie aus dem Zelllysat aufgereinigt. Letztendlich erhielt man unmarkiertes Urm1 und ^{GST}Uba4. Urm1 wurde mit einem N-terminalen GST-His-Epitop aufgereinigt, das nach der Aufreinigung durch eine enzymatische Spaltung entfernt wurde. Da es sich bei Uba4 um ein E1-Enzym handelt, wurde die Aktivität getestet sich selbst mit Urm1 zu beladen. Dazu wurde eine *in vitro* Reaktion mit Urm1 und ^{GST}Uba4 angesetzt. Durch Zugabe von ATP sollte die Aktivierung von Urm1 initiiert werden. In der Tat konnte eine Bande mit langsamerer Mobilität in der Reaktion mit den Komponenten Urm1, ^{GST}Uba4 und ATP identifiziert werden, die ^{GST}Uba4-Urm1 entspricht (Abb. 33). Wie für eine E1-Ubl-Interaktion zu erwarten, war dieser Komplex sensitiv zu DTT, was ein Indiz für eine klassische Thioester-Bindung ist. Wie schon im Y2H-System scheint Uba4 auch in der *in vitro* Reaktion ein Dimer zu bilden (Abb. 33). Die Daten zeigen somit, dass die rekombinanten Komponenten aktiv sind und für weitere *in vitro* Analysen eingesetzt werden können.

3. Ergebnisse

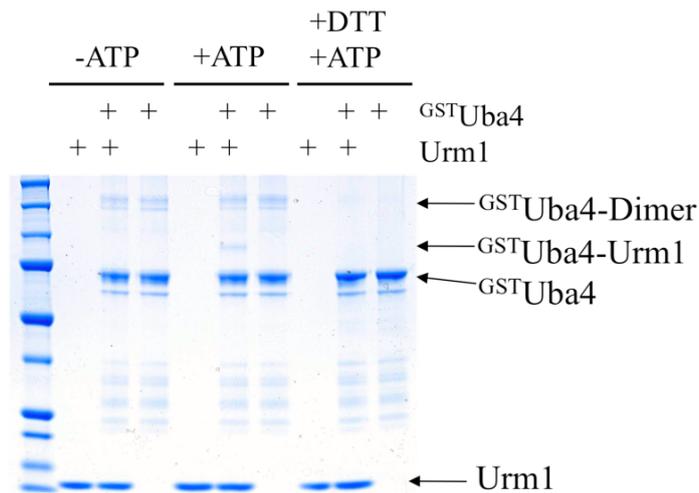


Abbildung 33: Aus *E. coli* aufgereinigtes rekombinantes Urm1 und ^{GST}Uba4 sind aktiv und bilden einen DTT-sensitiven Komplex. Urm1 und Uba4 wurden jeweils aus *E. coli* aufgereinigt und in verschiedenen Kombinationen in eine *in vitro* Reaktion zusammengegeben. Entweder in Anwesenheit oder Abwesenheit von ATP (-/+). Die Proben wurden anschließend in Probenpuffer (-/+) DTT erhitzt, auf ein SDS-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und die Protein-Banden durch eine Coomassie-Brillant-Färbung sichtbar gemacht.

3.6.2 Aufreinigung der oxidierten und reduzierten Form von Ahp1

Da für Ahp1 gezeigt werden konnte, dass es an Lysin K32 „urmyliert“ wird, sollte rekombinantes Ahp1 als Substrat im Urm1 *in vitro* System dienen. Zur Aufreinigung aus *E. coli* wurde *AHP1* über SLIC (*Sequence & Ligation Independent Cloning*) in einen pCoofy16 Vektor mit N-terminaler Histidin-NusA-Markierung kloniert. Die NusA-Fusion wird genutzt um eine bessere Löslichkeit des Proteins bei der Aufreinigung zu garantieren. Interessanterweise lag Ahp1 nach der Aufreinigung aus *E. coli* hauptsächlich als oxidiertes Dimer vor. Da es unbekannt ist, welche Version von Urm1 modifiziert wird, wurde Ahp1 unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen gereinigt (Abb. 34A). Beide Proben wurden mit Probenpuffer (-/+ DTT) behandelt und auf ein Gel aufgetragen. Die Coomassie-Färbung zeigte für die Proben, die unter oxidierenden Bedingungen aufgereinigt wurden, die Dimere Form, falls kein DTT zum Probenpuffer gegeben wurde. Eine geringe Menge schien jedoch auch als Monomer vorzuliegen (Abb. 34A). Zugabe von DTT zum Probenpuffer führte zur Reduktion von Disulfidbrücken, sodass Ahp1 als Monomer vorzuliegen schien. Ahp1, das unter

3. Ergebnisse

reduzierenden Bedingungen aufgereinigt wurde, liegt erwartungsgemäß als Monomer und nur in sehr geringen Mengen als Dimer vor (Abb. 34A).

2.6.3 *In vitro* „Urmylierungs“-Reaktion

Nachdem gezeigt wurde, dass rekombinantes Uba4 funktional ist und Urm1 aktivieren kann, wurde untersucht, ob potentielle Urm1-Substrate *in vitro* „urmyliert“ werden können. In dieser Arbeit konnte bereits nachgewiesen werden, dass Ahp1 und Rad50 *in vivo* Substrate von Urm1 sind. Mit reinen rekombinanten Proteinen wurde nun versucht diese Reaktion *in vitro* nachzustellen. Ahp1 wurde, wie oben beschrieben, in oxidiert und reduzierter Form aufgereinigt und anschließend für beide Varianten eine *in vitro* „Urmylierungs“-Reaktion angesetzt (Abb. 34B). Die *in vitro* Reaktion enthielt ^{GST}Uba4, Urm1, oxidiertes/reduziertes Ahp1 und ATP. Die Proben wurden für zwei Stunden bei 30°C inkubiert und anschließend mit Probenpuffer (-/+ DTT) behandelt. Es konnte nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Coomassie-Färbung keine Protein-Bande identifiziert werden, die von der Mobilität einer modifizierten Form von Ahp1 entspricht (Abb. 34B). Dies könnte einerseits daran liegen, dass nicht die passenden Inkubationszeiten oder Proteinkonzentrationen für eine effiziente Urm1 *in vitro* Reaktion gefunden wurden. Es könnte allerdings auch bedeuten, dass eine oder mehrere Komponenten für ein vollständiges Urm1-Konjugations-System fehlen.

3. Ergebnisse

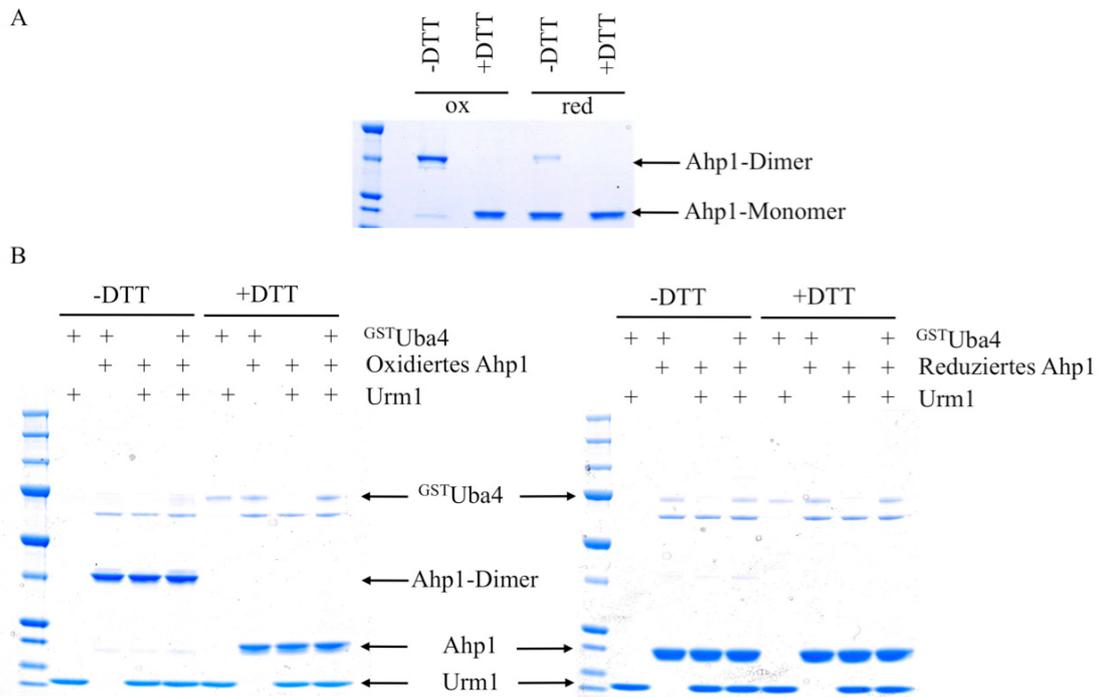


Abbildung 34: Aufbau eines *in vitro* „Urmylierungs“-Systems. A: Die oxidierte und reduzierte Form von Ahp1 wurde aus *E. coli* aufgereinigt und anschließend mit Probenpuffer (-/+ DTT) behandelt. Die Proben wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Protein-Banden mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt. **B:** Urm1, ^{GST}Uba4 und ox./red. Ahp1 wurden in Anwesenheit von ATP für 2h bei 30°C inkubiert. Ansonsten siehe **A**.

3.7 Identifikation neuer Enzyme des Urm1-Signalweges

3.7.1 Urm1-Sepharose-Säule

Uba4 ist das einzige bekannte Enzym des Urm1-Signalweges. Das Urm1 *in vitro* System zeigte jedoch, dass höchstwahrscheinlich weitere enzymatische Aktivitäten fehlen, die für „Urm1-Modifizierung“ von Ahp1 benötigt werden. Um neue, unbekannte Komponenten des Urm1-Signalweges zu identifizieren, wurde rekombinantes Urm1-Protein über eine CNBr-aktivierte Sepharose-Säule kovalent gekoppelt. Anschließend wurde ein $\Delta urm1$ -Zelllysats unter Zugabe von ATP auf die Säule gegeben und inkubiert. Enzyme eines Ubl-Konjugations-Systems gehen in Abhängigkeit von ATP eine Thioester-Bindung mit dem jeweiligen Modifizierer ein. Nach extensiven Waschschritten sollten diese Enzyme mittels DTT-Reduktion von der Urm1-Sepharose-Säule eluiert werden. Die vereinigten Elutions-Fraktionen wurden auf ein Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und die aufgereinigten Proteine anschließend durch eine Silber-Färbung des Geles sichtbar gemacht. Die einzelnen Banden wurden ausgeschnitten und zur massenspektroskopischen Analyse gegeben. In der Elutions-Fraktion waren zwei Banden sichtbar, die im letzten Wachsritt nicht vorkamen und somit spezifisch durch die Behandlung mit DTT von der Säule eluiert wurden (Abb. 35). Bei dem Protein mit der langsameren Migrationsgeschwindigkeit konnten sieben Peptide für die 57 kDa große Aminopeptidase Ape1 identifiziert werden. Es handelt sich dabei um eine vakuolär aktive Aminopeptidase, die häufig in Studien für Autophagie und für den CVT-Signalweg (*cytosol to vacuole targeting*, CVT) eingesetzt wird. Bei der zweiten Bande wurde Urm1 nachgewiesen (Abb. 35).

3. Ergebnisse

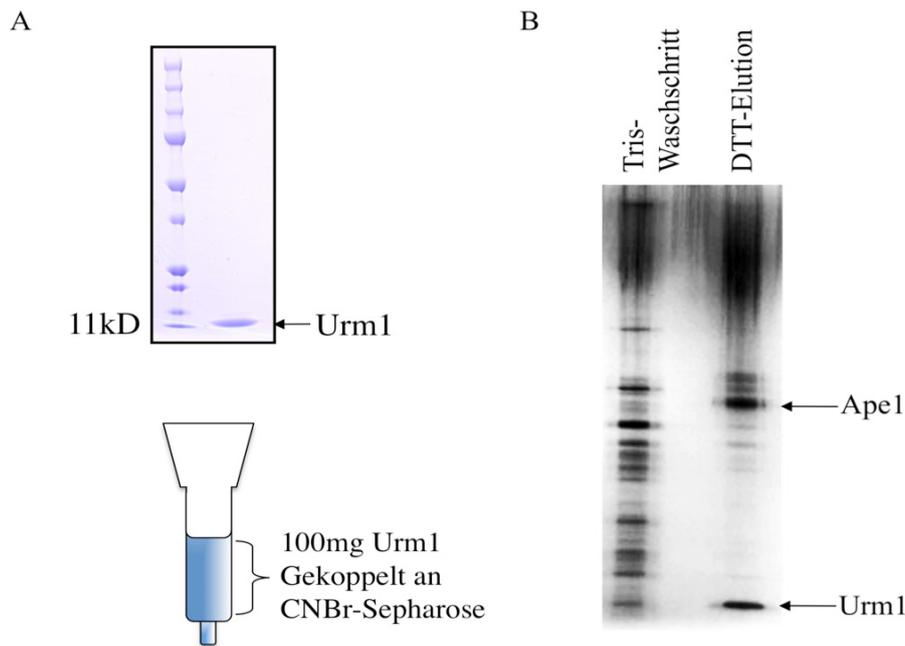


Abbildung 35: Aufreinigung potentieller Enzyme des Urm1-Signalweges. A: Oben: Coomassie gefärbtes SDS-Gel mit rekombinant gereinigtem Urm1. Unten: Schematische Darstellung der Urm1-Sepharose-Säule. 100mg Urm1 wurden an 4ml CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. Ein Zellysate aus 100g Biomasse eines $\Delta urm1$ -Stammes wurde mit 2mM ATP versetzt und anschließend auf die Säule gegeben. **B:** siehe **A**, die Säule wurde mit Hochsalz gewaschen und zuletzt alle gebundenen Proteine mit 100mM DTT eluiert. Der letzte Waschschritt und die DTT-Elution wurden auf ein Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteinbanden danach mit einer Silber-Färbung sichtbar gemacht.

3.7.2 Verifikation der Urm1-Ape1-Interaktion

Um das Ergebnis aus der massenspektroskopischen Analyse zu bestätigen wurde *APE1* mit einem C-terminalen Myc-Epitop markiert, um das Protein im Western Blot detektieren zu können. In einer HA-Immunpräzipitation gegen His^{HA}Urm1 und anschließendem Western Blot gegen Ape1^{myc} konnte ein Signal identifiziert werden, das von der Mobilität einem Urm1-Ape1-Komplex entsprach (Abb. 36A). Es wurde auch die unmodifizierte Form von Ape1 in der HA-Immunpräzipitation angereichert. Da Urm1 und Ape1 einen DTT-sensitiven Komplex bilden und die Proben mit DTT im Probenpuffer behandelt wurden, handelte es sich höchstwahrscheinlich ursprünglich um die modifizierte Form von Ape1 (Abb. 36A+B). Wie beim Urm1-Rad50-Komplex ist diese Interaktion sensitiv zu NEM. Nach Zugabe von NEM zum Zellmedium ist die modifizierte Form von Ape1 nicht detektierbar (Abb. 36B). Um zu überprüfen, ob es sich bei Ape1 um ein Enzym des Urm1-Signalweges

3. Ergebnisse

handelt, wurde die Urm1-Konjugatbildung in $\Delta ape1$ -Mutanten beobachtet (Abb. 36C). Dabei ließ sich feststellen, dass die $\Delta ape1$ -Mutanten keinen Einfluss auf die Urm1-Konjugatbildung haben. Es handelt sich somit vermutlich um ein Substrat und nicht um ein Enzym der Urm1-Konjugations-Maschinerie.

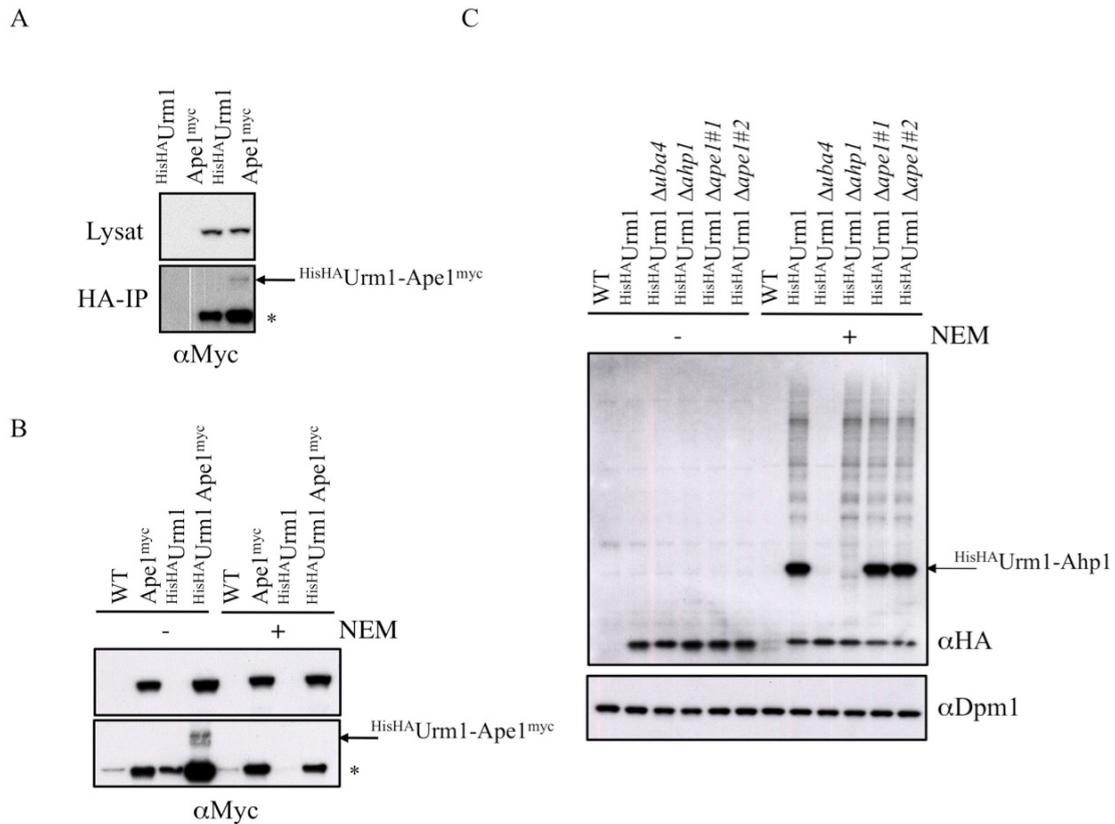


Abbildung 36: Die Ape1-Urm1-Interaktion. **A:** HA-Immünpräzipitation. Exprimiertes HisHA-Urm1 wurde mit α HA-Antikörper präzipitiert und gebundenes Ape1 wurde im α Myc-Western Blot detektiert. **B:** Siehe **A**, zusätzlich wurden Zellen mit NEM (+) behandelt. **C:** Denaturierte Zellextrakte von HisHA-Urm1-Stämmen. Die mit (+) gekennzeichneten Proben wurden für 1h mit 10mM NEM behandelt. Die jeweils letzten beide Stämme sind unterschiedliche $\Delta ape1$ -Mutanten und sind durch #1 und #2 gekennzeichnet. Western Blot mit α HA- und α Dpm1-Antikörper.

3.8 Urm1 wird ubiquityliert und SUMOyliert

3.8.1 Aufreinigung von ubiquityliertem und SUMOyliertem Urm1

Die Analyse der Struktur und der Aminosäuresequenz von Urm1 ergab, dass vier der sechs Lysine räumlich in nächster Nähe liegen und sogar Teil einer SUMO-Konsensus-Seite sind (Abb. 37A). Ein weiteres Lysin (K18) liegt zudem sehr exponiert an der Oberfläche von Urm1. Um zu überprüfen, ob diese Lysine möglicherweise durch Ubiquitin oder SUMO (Smt3) modifiziert werden, wurden sowohl für His-Ubiquitin als auch für His-Smt3 denaturierende NiNTA-Aufreinigungen durchgeführt. Zusätzlich war in diesen Hefestämmen Urm1 mit einer N-terminalen HA-Markierung versehen. Der Western Blot mit den Proben der denaturierenden Aufreinigung ergab, dass Urm1 tatsächlich in ubiquitylierter Form vorliegt (Abb. 37B). Ob es sich dabei um mehrere einzelne Ubiquitin-Moleküle oder um eine Polyubiquitinkette an Urm1 handelte, konnte nicht unterschieden werden. Zudem konnte auch eine schwache Modifikation mit Smt3 identifiziert werden. Typischerweise laufen Smt3-Modifikationen auf der Höhe der Di-ubiquitylierten Form des gleichen Substrates (Abb. 37B).

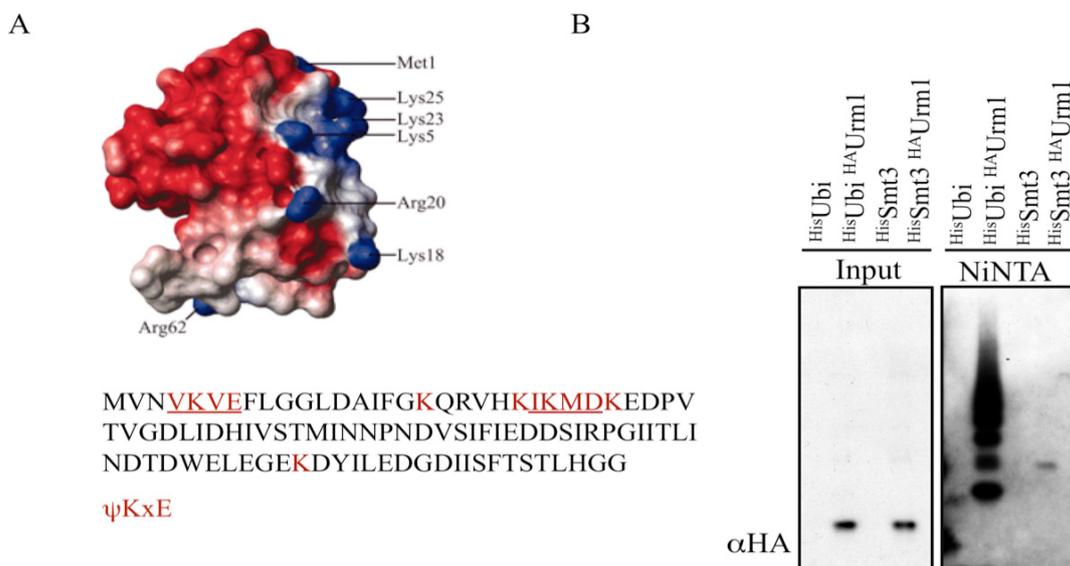


Abbildung 37: Urm1 wird ubiquityliert und SUMOyliert. **A:** Dreidimensionale Darstellung der elektrostatischen Oberfläche von Urm1. Die Oberflächenfarben geben die Stärke des elektrostatischen Potentials an. Rot = negativ, weiß = neutral, blau = positiv (Xu et al., 2006). Darunter ist die lineare Aminosäuresequenz von Urm1 abgebildet. Die Lysine und die

3. Ergebnisse

SUMO-Konsensus-Seiten (zusätzlich unterstrichen) sind rot markiert. **B:** NiNTA-Aufreinigung von His-Ubiquitin und His-Smt3. Detektion von ^{HA}Urm1 mit α HA-Antikörper.

3.8.2 Urm1 wird an Lysin K18 ubiquityliert

Nachdem Urm1 anscheinend selbst Ziel von Modifikationen ist, ergab sich die Fragestellung, an welchem Lysin die Modifikationen stattfinden. In der massenspektroskopischen Untersuchung der zweistufigen Aufreinigung von Urm1 konnte ein verzweigtes Peptid am Lysin K18 identifiziert werden wie es typischerweise bei Ubiquitylierungen vorkommt. Interessanterweise konnten bei der selben Aufreinigung zudem verzweigte Peptide am Lysin K48 von Ubiquitin entdeckt werden. Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass Urm1 höchstwahrscheinlich am Lysin K18 polyubiquityliert wird und es sich dabei um eine Lysin K48-Kette handelt.

3.8.3 Die Modifikation von Urm1 hat keinen Einfluss auf die Urm1-Konjugation

Urm1 wird an Lysin K18 ubiquityliert und höchstwahrscheinlich an einem der Lysine K5, 18, 23, 25 oder 28 SUMOyliert. Um zu überprüfen, ob die Abwesenheit der modifizierten Formen von Urm1 einen Phänotyp generiert, wurde ein Hefestamm konstruiert, der eine Urm1-Variante ohne Lysine exprimiert (*^{HisHA}Urm1K0*). Dieser Hefestamm wurde auf Zeocin-haltigen Hefepplatten inkubiert und mit WT-, ^{HisHA}Urm1- und ^{HisHA}Urm1 Δ *uba4*-Hefestämmen verglichen. Dieser Stamm wies die gleiche Resistenz gegenüber Zeocin auf wie WT und ^{HisHA}Urm1 (Abb. 38). Somit scheint die Modifikation von Urm1 nicht für die Schwefelmodifikation an tRNAs benötigt zu werden. Die Urm1-Substrat-Konjugation scheint ebensowenig durch die Modifikationen beeinflusst zu werden. Zugabe von NEM zum Hefemedium induzierte die Konjugatbildung im ^{HisHA}Urm1-Stamm im gleichem Maße wie im *^{HisHA}Urm1K0*-Hefestamm. Somit bleibt die Rolle der Modifikationen an Urm1 weiterhin unbekannt.

3. Ergebnisse

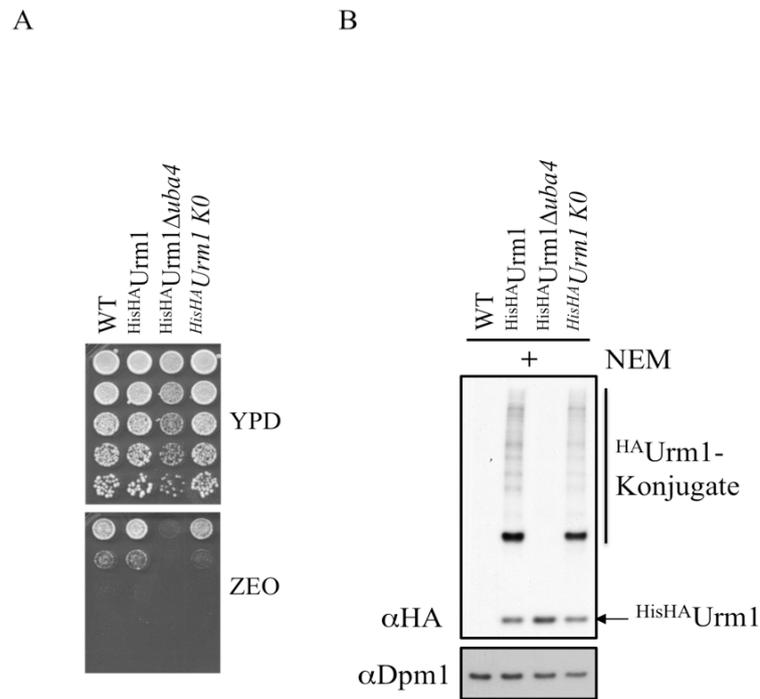


Abbildung 38: Die Modifikation von Urm1 hat keinen offensichtlichen Phänotyp. A: Serielle Verdünnungsreihen von Hefestämmen, die N-terminal markiertes Urm1 exprimieren, auf YPD und Zeocin-haltigen Hefepetrischalen. Phänotypische Analyse des ^{HisHA}Urm1KO-Hefestammes. **B:** Stämme aus **A**. Durch Behandlung der Zellen mit 10mM NEM für 1h (+) wurde die Urm1-Konjugat-Bildung stabilisiert. αHA-Western Blot zeigt freies ^{HisHA}Urm1 und die Konjugate. Vergleich zwischen ^{HisHA}Urm1 und ^{HisHA}Urm1KO ergab keinen wesentlichen Unterschied. αDpm1-Detektion diente der Ladekontrolle.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der posttranslationale Modifizierer Urm1 untersucht. Es konnte detailliert aufgezeigt werden, dass es sich bei Urm1 um einen Protein-Modifizierer handelt. Anhand von Ahp1 konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die „Urm1-Modifikation“ von Proteinen an einem Lysin stattfindet und diese Modifikation von beiden aktiven Cysteinen des E1-Enzymes Uba4 abhängig ist. Außerdem wurden neue unbeschriebene Urm1-Substrate identifiziert, wobei die Rad50-Modifikation genauer untersucht wurde. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Sensitivität der $\Delta urm1$ -Mutante gegenüber Zeocin mit der Funktion von Urm1 beim Schwefeltransfer auf tRNAs zusammenhängt. Weiterhin beschreibt diese Arbeit, dass Urm1 selbst Ziel von Modifikationen wie Ubiquitylierung und SUMOylierung ist. Es konnte auch hierbei die Aminosäure von Urm1 identifiziert werden, die durch Ubiquitin modifiziert wird. Diese und alle weiteren Ergebnisse werden auf den folgenden Seiten diskutiert.

4.1 Urm1 modifiziert Ahp1 an Lysin K32

In dieser Arbeit wurde durch massenspektroskopische Untersuchungen und proteinbiochemische Aufreinigungsmethoden bestätigt, dass Ahp1 post-translational mit Urm1 modifiziert wird. Ahp1 ist eines von fünf Peroxiredoxinen in *S. cerevisiae*. Peroxiredoxine können reaktive Sauerstoffarten (ROS) reduzieren und somit unschädlich machen. ROS wie t-BOOH (tert-Butyl-Hydroperoxid) lösen in Zellen oxidativen Stress aus und können in Makromolekülen (DNA, Proteine, Lipide) weitläufige Schäden anrichten. Ahp1 besitzt eine hohe Spezifität bei der Reduktion von t-BOOH. Mit seinem konservierten N-terminalen Cystein C62 (C62-SH) kann Ahp1 t-BOOH attackieren und unter Entstehung einer Sulfensäure (C62-SOH) zu t-BOH (tert-Butanol) reduzieren. Das Cystein C120 (*resolving Cystein*) eines anderen Ahp1-Moleküles reagiert mit der Sulfensäure und bildet unter Freilassung von H₂O eine Disulfidbrücke aus. Diese dimerisierte Form von

4. Diskussion

Ahp1 kann wiederum durch das Thioredoxin-System reduziert werden (Abb.39).

In dieser Arbeit wurde nun erstmals gezeigt, dass Ahp1 am Lysin K32 „urmyliert“ wird, sodass von einer Verknüpfung über eine Isopeptidbindung ausgegangen werden kann. Eine mögliche Funktion des Urm1-Systems könnte ein direkter Einfluss bei der Abwehr von oxidativem Stress sein. Tatsächlich besitzt die *ahp1*^{K32R}-Mutante eine Sensitivität gegenüber t-BOOH, die vergleichbar zum Δ *ahp1*-Stamm ist. Die Urm1-Modifikation an Lysin K32 von Ahp1 scheint somit für dessen Funktion essentiell zu sein. Interessanterweise liegt das Lysin K32 mit dem benachbarten und konserviertem Cystein C31 in einem Proteinbereich, der als unstrukturiert und flexibel beschrieben wird (Trivelli et al., 2003). Dieses Cystein scheint jedoch im Gegensatz zu den Cysteinen C62 und C120 nicht für die Reduktion von t-BOOH benötigt zu werden (Jeong et al., 1999). Es existieren deshalb Spekulationen, ob diese unstrukturierte Region in Ahp1 für die Interaktion mit dem Thioredoxin-System benötigt wird (Trivelli et al., 2003). Weiterführende Interaktionsstudien könnten Hinweise auf die Fragestellung liefern, ob Urm1 einen Einfluss auf die Interaktion von Ahp1 mit den Trx-Proteinen hat.

Interessanterweise wurde die „Urmylierung“ von Ahp1 in Anwesenheit von NEM sehr stark stabilisiert. NEM ist eine Thiol-reaktive Chemikalie, die reduzierte Thiol-Gruppen irreversibel modifizieren kann, sodass diese keine Disulfidbrücken ausbilden können. Behandlung von Hefezellen mit t-BOOH führte dagegen dazu, dass durch nachträgliche Zugabe von NEM keine modifizierte Form von Ahp1 detektiert werden konnte. Anwesenheit von t-BOOH löst in Zellen oxidativen Stress aus und induziert die Bildung von Disulfidbrücken zwischen zwei Ahp1-Molekülen (Iwai et al., 2010). Die anschließende Behandlung mit NEM hat somit keinen Einfluss auf die Ahp1-Modifikation, da keine freien Thiol-Gruppen vorliegen. Die unterschiedliche Wirkweise dieser Chemikalien beeinflusst den Redox-Status von Ahp1 und bestimmt somit, ob Ahp1 ein Urm1-Substrat ist oder nicht. Ahp1 scheint nur in reduzierter Form ein Substrat der Urm1-Modifikation zu sein (Abb. 39).

Es ist bekannt, dass Ahp1 nicht nur der Reduktion von t-BOOH dient, sondern das Redox-Signal auch auf weitere Sensor-Moleküle, wie dem transkriptionellen Aktivator Cad1, übermitteln kann. Die oxidierte Form von

4. Diskussion

Ahp1 scheint dabei Cad1 zu oxidieren, welches folglich inter- bzw. intramolekulare Disulfidbrücken ausbildet und dadurch transkriptionell aktiv wird. Es ist somit durchaus denkbar, dass Urm1 auch einen Einfluss auf das Expressionslevel von stressinduzierten Proteinen hat (Iwai et al., 2010). Die Untersuchung der mRNA-Level dieser stressinduzierten Transkripte oder der entsprechenden Protein-Level in $\Delta urm1$ -Stämmen könnte hierbei Erkenntnisse über die Funktion von Urm1 in diesem Prozess liefern.

Einen weiteren Hinweis, dass Urm1 eine wichtige Funktion bei der Abwehr von oxidativen Stress spielt, ergab die Aufreinigung von Urm1-Substraten. Neben Ahp1 wurden massenspektroskopisch weitere potentielle Urm1-Protein-Substrate (Trx1, Tsa1, Grx1, Grx3) entdeckt, die beim Glutathion-/Thioredoxin-System eine entscheidende Funktion einnehmen. Ließe sich die Urm1-Modifikation dieser Proteine verifizieren, wäre es interessant zu untersuchen, ob in $\Delta urm1$ -Stämmen die Konzentration von ROS erhöht ist. Die Produktion von ROS lassen sich in der Zelle durch den Gebrauch von CM-H₂DCFDA (5-(und-6)-Chloromethyl-2'7'-Dichloro-dihydro-fluorescein Diacetat) nachweisen. Es handelt sich um eine Zell-permeablen Chemikalie, die nach Oxidation durch ROS grün fluoresziert. Erhöhte ROS-Konzentrationen in $\Delta urm1$ -Mutanten sollten in diesem System detektierbar sein (Su et al., 2010).

Über die genaue Funktion der „Urmylierung“ von Ahp1 kann allerdings nur spekuliert werden. Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Urm1 für die Aktivität von Ahp1 benötigt wird. Somit wäre es vorstellbar, dass die Urm1-Konjugation zu sterischen Veränderungen in Ahp1 führen kann. Dies könnte sich wiederum positiv auf die katalytische Aktivität von Ahp1 auswirken. Außerdem könnte die „Urmylierung“ auch Protein-Protein-Interaktion zwischen Ahp1 und anderen Proteinen erleichtern, die für die Aktivität benötigt werden. Die Interaktoren könnten ein Urm1-Interaktion-Motiv tragen und somit modifiziertes Ahp1 besser als die unmodifizierte Form erkennen. Hierbei wäre es interessant die bekannten Ahp1-Interaktoren wie die Trx-Proteine auf ein solches Motiv zu untersuchen. Bereits für andere Ubl-Proteine konnte ein ähnlicher Mechanismus aufgezeigt werden. Ein prominentes Beispiel ist das SIM (SUMO Interaktions Motiv), das in zahlreichen Proteinen vorhanden ist und die Interaktion mit SUMOylierten Proteinen ermöglicht.

4.2 Ahp1 wird in Abhängigkeit von Uba4 modifiziert

Das Urm1-System vereinigt Eigenschaften von bakteriellen Schwefeltransfer-Systemen und eukaryontischen Ubl-Systemen. Zum einen besitzt es die Fähigkeit der bakteriellen MoeD/ThiS-Systeme Schwefel zu übertragen und ist für die Thio-Modifikation von spezifischen tRNAs essentiell. Andererseits kann Urm1 Proteine modifizieren und verhält sich wie ein klassisches Ubl (Abb. 40). Die ambivalenten Eigenschaften des Urm1-Systems zeigen sich am deutlichsten am E1-Enzym Uba4. Uba4 besitzt neben der typischen E1-Domäne, die für die Adenylierung und den Transfer von Ubls benötigt wird, eine aktive Rhodanese-Domäne. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide Domänen mit ihren aktiven Cysteinen C225 und C397 an der Modifikation von Proteinen beteiligt sind. Die „Urmylierung“ von Ahp1 ist sowohl in C225S- als auch C397S-Mutanten abwesend. Beide Domänen sind somit bei der Modifikation von Proteinen katalytisch aktiv (Abb. 39). Rhodanese-Domänen sind eigentlich als strukturelle Module bekannt, die beim Schwefeltransfer eine Rolle spielen können. In bisherigen Publikationen konnte der Rhodanese-Domäne von Uba4 bereits eine essentielle Funktion bei der posttranskriptionellen Modifikation von bestimmten cytosolischen tRNAs zugewiesen werden (Bjork et al., 2007; Dewez et al., 2008; Leidel et al., 2009; Nakai et al., 2008). Interessanterweise liegt Urm1 neben der zu erwartenden carboxylierten auch in einer thiocarboxylierten Form vor (Leidel et al., 2009; Schmitz et al., 2008). Für die Thiocarboxylierung scheint nicht das E1-Cystein C225 verantwortlich zu sein, sondern allein das Cystein C397 der Rhodanese-Domäne (Schmitz et al., 2008). Dabei überträgt die Cystein-Desulfurase Nfs1 Schwefel auf das Cystein C397 von Uba4 unter Bildung einer Persulfides (C397-S-SH) (Nakai et al., 2007). Schmitz und Mitarbeiter verweisen in ihren Daten zudem darauf, dass zwischen rekombinanten Urm1- und Uba4-Proteinen im Gegensatz zu Ubiquitin und Uba1 keine Thioester-Bindung entsteht. Sie halten es deshalb in diesem Zusammenhang für wahrscheinlicher, dass adenyliertes Urm1 direkt auf das Persulfid von Cystein C397 übertragen wird und somit eine Acyl-Disulfid-Bindung eingeht. Eine anschließende reduktive Spaltung der Disulfid-Bindung durch das Cystein C225 von Uba4 könnte die thiocarboxylierte Form von Urm1 freisetzen. Von

4. Diskussion

dort könnte daraufhin der Schwefel über einen unbekanntes Mechanismus mit Hilfe des Ncs2/Ncs6-Komplexes auf tRNAs transferiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, dass die rekombinanten Proteine Urm1 und Uba4 in Abhängigkeit von ATP einen DTT-sensitiven Komplex ausbilden. Außerdem wurde bereits früher *in vivo* ein DTT-sensitiver Urm1-Uba4-Komplex identifiziert (Furukawa et al., 2000). Nach gängigen Kriterien spricht hier alles für eine Thioester-Bindung. Ob die Thioester-Bindung an beiden aktiven Cysteinen oder nur am Cystein C225 ausgebildet wird, müsste mit den jeweiligen rekombinanten Punktmutanten *in vitro* weiter analysiert werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist es durchaus vorstellbar, dass Uba4 unterschiedliche Mechanismen der Urm1-Aktivierung und des Transfers durchführt. Bereits das Atg-Konjugations-System, das für die Autophagie essentiell ist, zeigt mögliche variable Eigenschaften von E1-Enzymen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, kann hierbei das E1-Enzym Atg7 zwei verschiedene Modifizierer (Atg8 und Atg12) aktivieren und auf unterschiedliche E2-Enzyme (Atg3 und Atg10) transferieren. Außerdem zeigt das Beispiel der Atg8-Modifikation von Phosphatidyl-Ethanolamin, dass Ubls neben Protein-Substraten auch andere Moleküle modifizieren können. Es ist daher denkbar, dass Uba4 abhängig von seiner Funktion zwei unterschiedliche Aktivierungs-Mechanismen ausführen kann. Im Fall von Protein-Modifikationen könnte Urm1 mit dem Cystein C225 eine klassische Thioester-Bindung eingehen. Anschließend könnte das Cystein C397 die Funktion eines E2-Enzymes übernehmen und Urm1 auf ein Substrat wie Ahp1 übertragen (Kerscher et al., 2006). Beim Transfer von Schwefel auf tRNAs wäre dementsprechend ein alternativer Mechanismus, wie er von Schmitz und Mitarbeitern postuliert wurde, denkbar.

In diesem Zusammenhang wäre es sehr interessant zu untersuchen, ob die Persulfid-Bildung am Cystein C397 für die „Urmylisierung“ von Proteinen benötigt wird. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Zellen mit einem Mangel an Nfs1 keinen Schwefeltransfer auf cytosolische tRNAs durchführen können (Nakai et al., 2007). Hätte die Abwesenheit von Nfs1 keinen Einfluss auf die Urm1-Protein-Konjugation wäre dies ein Hinweis, dass die Rhodanese-Domäne in Uba4 eine klassische E2-Funktion ausüben kann.

4. Diskussion

Neben einer enzymatischen Aktivität im Urm1-Signalweg scheint Uba4 selbst Ziel der „Urmlyierung“ zu sein. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Uba4 nicht nur die E1-typische Thioester-Bindung mit Urm1 eingeht, sondern auch einen Komplex bildet, der unter denaturierenden Bedingungen stabil ist. Die Zugabe von NEM zu den Zellen kann diese Modifikation sogar noch verstärken. Thioester-Bindungen sind unter denaturierenden Bedingungen nicht stabil, sodass hier von einer Isopeptidbindung ausgegangen werden muss. Uba4 ist somit Enzym und Substrat des Urm1-Signalweges. Als weiterführende Untersuchungen wäre es interessant die Seite der Modifikation zu identifizieren, um durch gezielte *UBA4*-Punktmutationen den Einfluss auf die Urm1-Konjugations-Maschinerie zu analysieren. Zudem könnten *in vitro* Analysen mit rekombinanten Uba4-Varianten und Urm1 weitere Informationen über die unterschiedlichen Aktivitäten von Uba4 liefern.

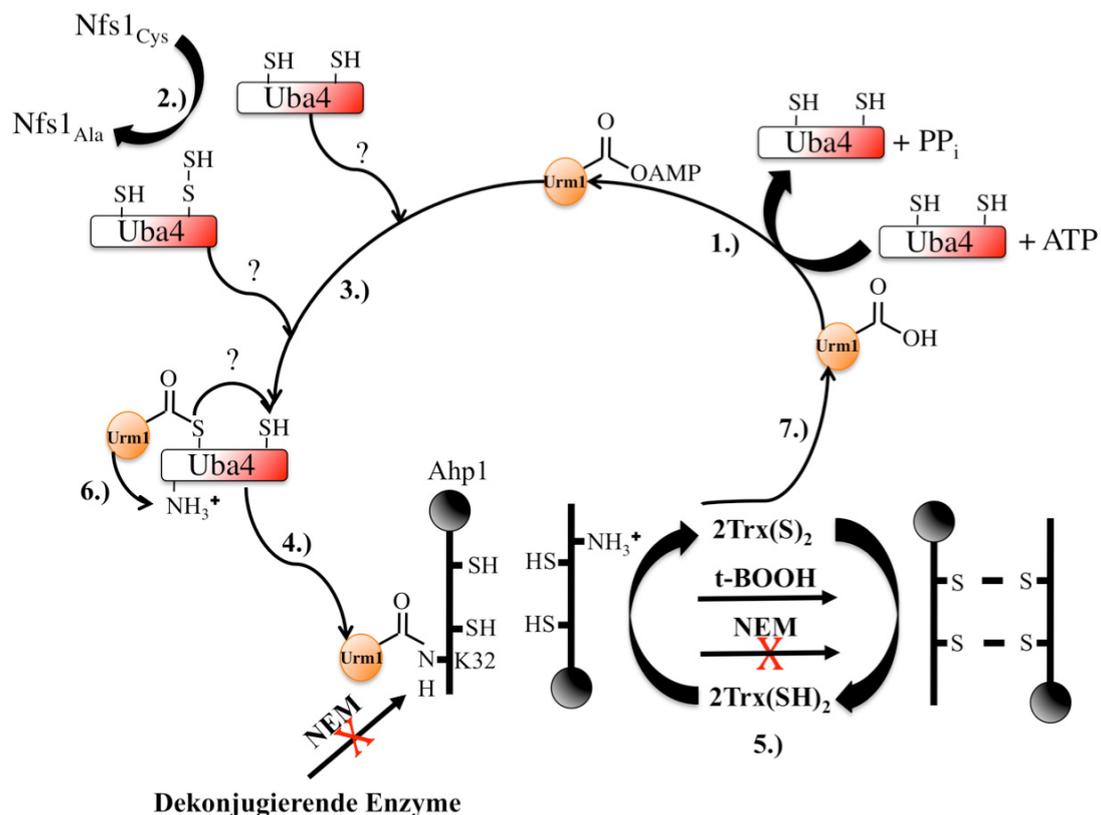


Abbildung 39: Die „Urmlyierung“ von Proteinen: 1.) Urm1 wird durch Uba4 an seinem C-Terminus adenyliert und aktiviert. Uba4 besitzt zwei aktive Cysteine. C225 und C397 (die Rhodanese-Domäne ist in rot markiert). 2.) Das Cystein C397 von Uba4 erhält direkt oder indirekt ein Schwefel-Atom von Nfs1 und kann ein Persulfid ausbilden. 3.) Aktiviertes Urm1 bildet mit einem aktiven Cystein von Uba4 eine Thioester-Bindung aus. Ob hierfür der Persulfid am Cystein C397 benötigt wird ist unklar 4.) Anschließend wird Urm1 entweder über

4. Diskussion

das Cystein C397 und/oder andere enzymatische Aktivitäten auf das Lysin K32 von reduziertem Ahp1 übertragen. 5.) Ahp1 liegt in reduzierter und oxidiert Form vor. Die oxidierte Form wird durch ein Thioredoxinsystem reduziert und liegt somit wieder als Monomer vor. Ahp1 ist nur in reduzierter Form Substrat von Urm1. Durch Zugabe von NEM wird die Dimerisierung und die Bildung von Disulfidbrücken blockiert, wodurch die Modifikation von Ahp1 verstärkt wird. Außerdem wird durch die NEM-Zugabe die Aktivität von dekonjugierenden Enzymen blockiert. Zugabe von t-BOOH führt dagegen zu einer vermehrten Dimerisierung von Ahp1. Dementsprechend kann unter diesen Bedingungen Ahp1 nicht modifiziert werden. 6.) Uba4 ist nicht nur das E1-Enzym des Urm1-Signalweges, sondern ist selbst Substrat der „Urm1-Mylierung“. 7.) Dekonjugiertes Urm1 kann erneut für die Modifikation von Ahp1 oder von anderen Proteine eingesetzt werden.

4.3 Rad50 bildet mit Urm1 einen NEM-sensitiven Komplex

Aufgrund der Zeocin-Sensitivität des $\Delta urm1$ -Stammes wurde nach potentiellen Substraten und Interaktoren gesucht, die bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) eine Rolle spielen. Dabei konnte für Rad50 gezeigt werden, dass es in Abhängigkeit von Uba4 und seinen beiden aktiven Cysteinen modifiziert wird. Erstaunlicherweise ist jedoch die Urm1-Rad50-Verknüpfung im Gegensatz zur Urm1-Ahp1-Bindung NEM-sensitiv. Der entscheidende Effekt durch die Zugabe von NEM zum Zellmedium scheint dabei nicht aufgrund einer Inaktivierung von dekonjugierenden Enzymen zu entstehen, sondern vielmehr durch direktes Einwirken auf ein Substrat. NEM kann mit jedlicher Art von Thiol-Gruppen reagieren und ist dabei nicht auf dekonjugierende Enzyme beschränkt. Es wäre daher denkbar, dass bei Rad50 die Ausbildung von Disulfidbrücken, die Dimerisierung über den Zink-Haken oder andere Protein-Protein-Wechselwirkungen durch NEM beeinträchtigt werden und sich dies im Gegensatz zu Ahp1 negativ auf die Urm1-Modifikation auswirkt. Umgekehrt könnte dies wiederum bedeuten, dass Urm1 auch für die effektive Komplexbildung benötigt wird. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass in $\Delta urm1$ -Stämmen eine geringere Komplexbildung von MRX stattfindet. Außerdem war die Protein-Stabilität von Rad50 in $\Delta urm1$ - und $\Delta uba4$ -Mutanten leicht verringert.

Die NEM-Sensitivität könnte allerdings auch daran liegen, dass sich die chemische Bindung von Urm1-Rad50 gegenüber Urm1-Ahp1 unterscheidet. Ein Indiz dafür lieferte eine denaturierende Aufreinigung von Urm1. Im Gegensatz zu nativen Aufreinigungen konnte unter denaturierenden Bedingungen die Rad50-Modifikation nicht nachgewiesen werden.

4. Diskussion

Isopeptidbindungen wie sie zwischen Ubis und deren Substraten entstehen sind im Gegensatz zu Thioester-Bindungen unter diesen Aufreinigungsbedingungen stabil. Dies könnte bedeuten, dass Rad50 nicht an Lysinen, sondern an Cysteinen modifiziert wird und könnte zudem erklären, warum der Urm1-Rad50-Komplex NEM-sensitiv ist. Die reaktiven Cysteine werden durch NEM blockiert und könnten folglich nicht durch Urm1 modifiziert werden. Diese Diskrepanz zwischen der Ahp1- und Rad50-Modifikation wäre erneut durch die ungewöhnliche Domänenstruktur von Uba4 erklärbar, die dem Urm1-System eine funktionale Flexibilität ermöglicht. Jedoch ist zu bemerken, dass auch die „Urm1-Modifikation“ von Ahp1 unter denaturierenden Bedingungen erst nach Induktion mit NEM detektierbar war, wogegen unter nativen Bedingungen auch ohne Zugabe von NEM. Im Fall von Rad50 wäre es demnach denkbar, dass die Modifikation an Lysinen stattfindet, aber nur aufgrund einer fehlenden Induktion nicht detektierbar gewesen ist.

Interessanterweise besitzt Rad50 wie Uba4, die Glutaredoxine und die Thioredoxine auch ein CXXC-Motiv, über das zwei Rad50-Moleküle Zink komplexieren können. Ob zwischen diesem Motiv und der Modifikation durch Urm1 ein ursächlicher Zusammenhang steht müsste mit entsprechenden Punktmutanten weiter analysiert werden.

4.4 Die Zeocin-Sensitivität von $\Delta urm1$ -Mutanten ist ein Phänotyp der tRNA-Modifikation

Die $\Delta urm1$ - und $\Delta uba4$ -Mutanten wurden in dieser Arbeit bei einem *Screen* entdeckt, der zur Identifikation sensibler Mutanten gegenüber DNA-schädigenden Substanzen durchgeführt wurde. Das ursprüngliche Ziel war neue Komponenten der DNA-Reparatur zu identifizieren. Erste genetische Analysen ließen jedoch keine eindeutige Aussage über die Funktion von Urm1 in DNA-Reparatur-Signalwegen zu. Jedliche Kombinationen von $\Delta urm1$ mit Mutanten der DNA-Reparatur führten zu verstärkten Sensitivitäten. So hatte die $\Delta urm1 \Delta rad52$ -Doppelmutante deutlich größere Probleme beim Wachstum auf Zeocin-haltigen Hefeplatten als die jeweiligen Einzelmutanten. Da es sich bei Urm1 um einen Modifizierer handelt, der potentiell bei

4. Diskussion

verschiedensten zellulären Prozessen beteiligt ist, sind allerdings auch keine klaren epistatischen Ergebnisse zu erwarten. Jedoch stellte sich später heraus, dass der Phänotyp der $\Delta urm1$ - und $\Delta uba4$ -Mutanten gegenüber Zeocin nicht mit der Modifikation von Proteinen im Zusammenhang steht, sondern vielmehr mit der Funktion von Urm1 beim Schwefeltransfer auf bestimmte tRNAs korreliert. Es wurde bereits für einige Phänotypen gezeigt, dass die Überexpression bestimmter unmodifizierter tRNAs die Sensitivitäten der $\Delta urm1$ -Mutanten aufheben können (Leidel et al., 2009). Dabei scheint der Überschuss die mangelnde Spezifität der unmodifizierten tRNAs zu einzelnen mRNA-Codons ersetzen zu können. In dieser Arbeit konnte anschließend nachgewiesen werden, dass Mutanten von Komponenten, die wie Ncs2 für die tRNA-Modifikation benötigt werden, die gleiche Sensitivität zu Zeocin wie $\Delta urm1$ -Mutanten besitzen und sich auch die Doppelmutanten strikt epistatisch verhielten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Ncs2 nicht für die Urm1-Konjugation an Proteine, wie Ahp1 und Rad50, benötigt wird, sondern eine exklusive Funktion beim Schwefeltransfer auf tRNAs ausübt.

Eine weitere Erklärung für die Ursache der Zeocin-Sensitivität lieferte die Urm1-Doppelglycin-Mutante (Glycin zu Alanin). Diese bildete im reduzierten, aber dennoch signifikanten Maße Protein-Konjugate und verhielt sich gegenüber Zeocin wie ein $\Delta urm1$ -Stamm. Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass nicht die fehlende Urm1-Konjugation zu einem Protein für den Zeocin-Phänotyp verantwortlich ist, sondern mangelnder Schwefeltransfer auf tRNAs.

4.5 Enzyme des Urm1-Signalweges

Wie bereits erwähnt wurde ist für das Urm1-Konjugations-System nur das E1-Enzym Uba4 bekannt. Es wurden weder E2- noch E3-Homologe entdeckt. Die Inkubation von $\Delta urm1$ -Lysat auf einer Urm1-Sepharose-Säule und eine anschließende reduktive Elution sollten es ermöglichen Enzyme des Urm1-Konjugations-Systems zu identifizieren. Die Aminopeptidase 1 (Ape1) war das einzige Protein das spezifisch in der Elutions-Fraktion angereichert wurde. Uba4 als interne Kontrolle konnte zwar im Western Blot detektiert werden, war allerdings in der massenspektroskopischen Untersuchung nicht

4. Diskussion

identifizierbar (Daten nicht gezeigt). Ape1 ist eine vakuoläre Hydrolase, die als unprozessierte Form prApe1 (pr = *precursor*) über den CVT-Signalweg (*cytosol to vacuol*, CVT) selektiv in die Vakuole transportiert wird. prApe1 wird als Vorläuferprotein im Cytosol synthetisiert und bildet dort ein Homo-Dodecamer. Dieser sogenannte Ape1-Komplex wird über Atg19 und Atg11 zur preautophagosomalen Struktur transportiert (PAS). PAS ist eine perivakuoläre Vesikel-bildende Struktur, die unter anderem den Ape1-Komplex mit einer Doppelmembran umhüllt. Diese Struktur wird als CVT-Vesikel bezeichnet. Der CVT-Vesikel fusioniert mit der Vakuole, prApe1 wird daraufhin prozessiert und als Aminopeptidase in der Vakuole aktiv.

Um für Ape1 eine potentielle enzymatische Funktion im Urm1-Signalweg zu identifizieren, wurde die Urm1-Substrat-Bildung in einem Δ *ape1*-Stamm überprüft. Die Konjugation von Urm1 zu Proteinen war im Δ *ape1*-Hintergrund nicht verändert. Ape1 ist scheinbar ein weiteres Substrat und kein Enzym der Urm1-Enzym-Kaskade. Interessanterweise ist die Interaktion und die kovalente Bindung von Urm1 mit Ape1 NEM-sensitiv. Da sich die Urm1-Ape1-Interaktion wie eine Urm1-Rad50-Interaktion verhält, ist auch hier von einer Verknüpfung mit einem Ape1-Cystein auszugehen. Die Funktion der Ape1-Modifikation und die Rolle von Urm1 im CVT-Signalweg bleibt allerdings weiterhin unklar. Da sich die Ape1-Lokalisation in der Zelle sehr gut darstellen lässt, könnte getestet werden, ob Urm1 mit Ape1 kolokalisiert oder für den Transport in die Vakuole benötigt wird. Aufgrund der Tatsache, dass Ape1 kein Enzym des Urm1-Konjugations-Systems ist und keine weiteren Kandidaten identifiziert wurden, stellte sich die Frage, ob eine Konjugations-Maschinerie möglicherweise einzig aus einem Modifizierer und einem E1-Enzym bestehen kann. Die Existenz eines Ubiquitin-ähnlichen Systems, das stromlinienförmiger ohne aufwendige weitere Enzymkaskade funktioniert, wird durch folgende Tatsachen gestützt: 1.) Es existieren verwandte eukaryontische E1-Enzyme, die relativ promiskuitiv, mehr als ein Ubl-Protein aktivieren können (Ichimura et al., 2000). 2.) Für das SAMP-System in Archaea wurde auch kein E2-Enzym entdeckt (Humbard et al., 2010) 3.) Die Ubiquitylierung kann auch in der Abwesenheit von E3-Ubiquitin-Ligasen stattfinden. 4.) Die Rhodanese-Domäne könnte eine Art E2-Funktion übernehmen (Kerscher et al., 2006). Es scheint somit die Idee eines E2- und

E3-unabhängigen Ubiquitin-ähnlichen Systems zulässig. Die Kombination aus E1- und Rhodanese-Domäne könnte in der Tat die Variabilität und die unterschiedlichen Eigenschaften des Urm1-Systems erklären. Allerdings bleibt zu erwähnen, dass auch für das Atg-Konjugations-System ein E2-Enzym entdeckt wurde, das keinerlei Homologie zu bekannten Ubiquitin-E2-Enzymen besitzt (Shintani et al., 1999). Auch der Versuch ein *in vitro* „Urmylierungs“-System mit rekombinanten Urm1, Uba4 und Ahp1 zu etablieren misslang. Es ist somit zu vermuten, dass noch weitere enzymatische Komponenten für eine „Urmylierungs“-Reaktion benötigt werden.

4.6 Die Modifikation von Urm1

Urm1 besitzt sechs Lysine, wobei K5, 23, 25 und 28 innerhalb oder in nächster Nähe eines SUMO-Konsensus-Motives mit der Sequenz $\psi Kx E/D$ liegen (ψ steht hier für eine aliphatische und x für eine beliebige Aminosäure). Dabei interagiert das Smt3-E2-Enzym Ubc9 meistens direkt mit den Smt3-Substraten und bindet an das Konsensus-Motiv. Die Konjugation von Smt3 kann allerdings auch an Lysinen stattfinden, die nicht Teil einer Konsensussequenz sind. Eine denaturierende Aufreinigung von Smt3-Substraten hat ergeben, dass Urm1 an einem seiner Lysine modifiziert wird. Die genaue Stelle der Modifikation ist nicht identifiziert worden, aber es ist davon auszugehen, dass es sich um eines der vier genannten Lysine handelt. Im Falle der SUMOylierung kann es zuweilen schwierig sein die genaue Stelle der Modifikation zu identifizieren, da durch die Mutation des ursprünglich modifizierten Lysins ein anderes Lysin Ziel der Modifikation werden kann.

Neben der SUMOylierung von Urm1 konnte auch eine Ubiquitylierung nachgewiesen werden. Das detektierte Signal der ubiquitylierten Form von Urm1 ließ jedoch keine Unterscheidung zwischen mehrfacher Mono-Ubiquitylierung und einer einzelnen Poly-Ubiquitinkette zu. Interessanterweise konnte in einer denaturierenden Aufreinigung zur Identifikation von Urm1-Substraten die Stelle der Modifikation mit Hilfe einer massenspektroskopischen Untersuchung identifiziert werden. Es handelte sich um Lysin K18, das an einer sehr exponierten Stelle an der Oberfläche von Urm1,

aber außerhalb der SUMO-Konsensus-Motive liegt. Da in der gleichen massenspektroskopischen Untersuchung eine verzweigte Form von Ubiquitin am Lysin K48 entdeckt wurde, ist es vorstellbar, dass Urm1 mit K48-Ubiquitinketten am Lysin K18 modifiziert wird. Über die Rolle der Modifikation von Urm1 kann nur spekuliert werden. Es konnte für die *Urm1K0*-Mutante (alle Lysine sind zu Arginin mutiert) gezeigt werden, dass das Fehlen der Modifikationen keine offensichtliche Sensitivität gegenüber Zeocin hervorruft. Dies bedeutet, dass Modifikationen an Urm1 keine wesentliche Rolle für den tRNA-Schwefeltransfer spielen. Auch scheint in dieser Mutante die Konjugation zu Proteinen nicht verändert zu sein. Da Modifikationen die Stabilität, die Lokalisation und die Aktivität ihrer Substrate verändern können, ist anzunehmen, dass auch im Falle von Urm1 die Regulation eines dieser Prozesse beeinflusst wird.

4.7 Gemeinsamkeiten und Unterschiede der bakteriellen Biosynthesewege zum eukaryontischen Urm1-Signalweg

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das Urm1-System viele Gemeinsamkeiten, aber auch deutliche Unterschiede zu klassischen eukaryontischen Ubl-Konjugations-Systemen aufzeigt. Urm1 besitzt wie alle Ubls eine β -*grasp*-Proteinfaltung. Die Proteinsequenz ähnelt jedoch mehr den bakteriellen MoaD- und ThiF-Proteinen als den eukaryontischen Ubl-Proteinen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, sind MoaD und ThiS Komponenten zweier Schwefeltransfer-Systeme und werden für die Synthese von Molybdopterin und Thiamin benötigt. Es konnte im Gegensatz zu Urm1 weder für MoaD noch für ThiS eine Funktion als Protein-Modifizierer nachgewiesen werden. Außerdem fehlt den E1-ähnlichen Proteinen MoeB und ThiF, die für die Adenylierung und Aktivierung von MoaD und ThiS benötigt werden, im Gegensatz zu Uba4 eine Rhodanese-Domäne. Man vermutet, dass im Falle vom MoaD-Signalweg das bakterielle YnjE-Protein mit seinen drei Rhodanese-Modulen (zwei inaktive und eine aktive Domäne) zusammen mit MoeB den Schwefeltransfer übernehmen kann. Für den Thiamin-Syntheseweg wird vermutet, dass ThiI mit seiner Rhodanese-

4. Diskussion

Domäne am Schwefeltransfer beteiligt ist. Außerdem wird ThiI zusammen mit IscS für die Thio-Modifikation von bakteriellen tRNAs benötigt (Abb. 40). Trotz der strukturellen Ähnlichkeit zu Moad und ThiS ist zu bemerken, dass *S. cerevisiae* einer der wenigen Organismen ist, der keine Molybdopterin-Synthese durchführt. Außerdem wird die Thiamin-Synthese in *S. cerevisiae* durch Thi4 (Thiazol Synthase), das keine Ähnlichkeit zu Komponenten des Urm1-Systems aufweist, übernommen.

Das humane Genom codiert für zwei Urm1-ähnliche Proteine. Das eine wird aufgrund seiner höheren Sequenzähnlichkeit als humanes Urm1 (hUrm1) bezeichnet und das andere wegen seiner bereits beschriebenen Funktion bei der Molybdopterin-Synthese als MOCS2A (Stallmeyer et al., 1999). Es existiert jedoch nur ein Uba4-ähnliches Protein, MOCS3, das für die Aktivierung von hUrm1 und MOCS2A benötigt wird. MOCS3 und MOCS2A sind Komponenten der humanen Molybdopterin-Synthese. Thiamin kann dagegen in höheren Eukaryonten nicht selbst synthetisiert werden und muss über die Nahrung (Vitamin B1) aufgenommen werden. Im Gegensatz zu MOCS2A dient hUrm1 nicht der Molybdopterin-Synthese, sondern transferiert zusammen mit MOCS3 Schwefel auf cytosolische tRNAs. Ob hUrm1 zudem ein Protein-Modifizierer ist konnte bisher noch nicht gezeigt werden.

Zusammenfassend lässt sich das eukaryontische Urm1-Protein als Ubl bezeichnen, das in vielen Punkten große Ähnlichkeiten zu bakteriellen Biosynthesewegen aufweist. Diese Gemeinsamkeiten verdeutlichen die besondere evolutive Stellung des Urm1-Systems und lassen vermuten, dass die ersten eukaryontischen Ubls eine sehr große Ähnlichkeit zu dem „molekularen Fossil“ Urm1 besaßen (Xu et al., 2006).

4. Diskussion

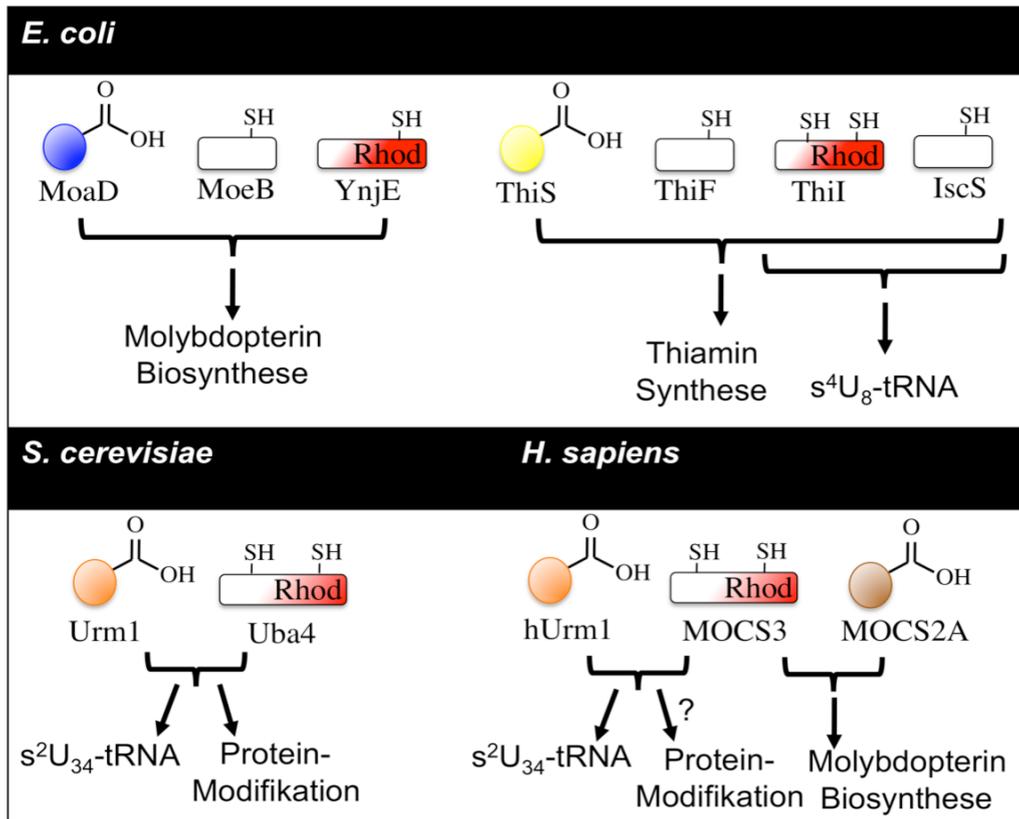


Abbildung 40: Schematische Darstellung der verschiedenen Urm1-ähnlichen Systeme in *E. coli*, *S. cerevisiae* und *H. sapiens*. *E. coli*: MoaD, MoeB und YnjE werden für die Molybdopterin-Biosynthese benötigt. ThiS, ThiF, ThiI und IscS sind an der Thiamin-Synthese beteiligt. IscS und ThiI sind zudem essentiell für die Thio-Modifikation von bestimmten tRNAs. *S. cerevisiae*: Urm1 und Uba4 sind sowohl am Schwefeltransfer auf cytosolische tRNAs beteiligt als auch an der Modifikation von Proteinen. In *S. cerevisiae* findet keine Molybdopterin-Synthese statt. Thiamin wird über Enzyme, die nicht mit dem Urm1-System verwandt sind, synthetisiert. *H. sapiens*: Es existieren zwei Versionen von Urm1. hUrm1 und MOCS2A. MOCS3 entspricht Uba4. MOCS3 und hUrm1 werden für den Schwefeltransfer auf spezifische tRNAs benötigt. Die Urm1-Modifikation von Proteinen wurde bisher in humanen Zellen nicht untersucht. MOCS3 und MOCS2A sind Komponenten der humanen Molybdopterin-Biosynthese.

5. Material und Methoden

5.1 Material

Die verwendeten mikrobiologischen, molekularbiologischen und protein-biochemischen Methoden wurden im Wesentlichen wie bei Sambrook et al. (1989) und Ausubel et al. (1994) beschrieben und nach Herstellerangaben durchgeführt.

5.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Es wurden analysenreine Chemikalien der Firmen Biorad, GE-Healthcare, Fluka, Invitrogen, Merck, New England Biolabs, Roth, Roche, Riedel de Haen, Serva oder Sigma verwendet. Für die unten beschriebenen Methoden wurden entionisiertes und sterilisiertes Wasser, sterile Lösungen und sterile Reaktionsgefäße verwendet.

5.1.2 Computeranalysen

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

5.1.3 *E. coli* Stämme

XL1-Blue: hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi-1 supE44 relA1 lac
[F' proAB lacIq Δ M15 Tn10(Tet^r)] (Stratagene)
Rosetta: F-ompT hsdSB(rB-mBr) gal dcm

5. Material und Methoden

5.1.4 *E. coli* Medien

Den beschriebenen Medien wurden Antibiotika in den folgenden Konzentrationen zugegeben: Ampicilin, 200µg/ml; Kanamycin, 30µg/ml; Chloramphenicol, 34µg/ml.

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	1% <i>Bacto Tryptone</i> (Difco) 0,5% <i>Bacto Yeast Extract</i> (Difco) 1% NaCl (sterilisiert durch Autoklavieren)
LB-Agar	1,5% Agar in LB-Medium (sterilisiert durch Autoklavieren)

5.1.5 *E. coli* Vektoren

Vektor	Verwendungszweck	Firma
pQE32	Expression mit His-Markierung	Qiagen
pGEX-4T	Expression mit GST-Markierung	Amersham
pETM33	Expression mit His-GST-Markierung	<i>Core facility</i> , MPIB
pCoofy16	Expression mit His-NusA-Markierung	<i>Core facility</i> , MPIB

5.1.6 *S. cerevisiae* Medien

Flüssigkulturen wurden bei 30°C in den angegebenen Medien bei 120rpm geschüttelt. Agarplatten wurden ebenfalls bei 30°C inkubiert.

Medium	Zusammensetzung
YPD	1% <i>Bacto Yeast Extract</i> (Difco) 2% <i>Bacto Peptone</i> (Difco) 2% Glukose
SC-Medium	3,5% <i>Bacto Yeast Nitrogen Base</i> ohne Aminosäuren 20g Zucker (Glukose oder Galaktose) 2g Aminosäure-Mix ohne Selektions-Aminosäuren pro 1l Wasser
YPD-G418	200 mg/l G418 (Sigma: G-9516)
YPD-NAT	100 mg/l NAT (Noursethricin, HKI Jena)

5. Material und Methoden

5.1.7 Verwendete *S. cerevisiae* Stämme

Name	Genotyp	Referenz
DF5	trp1-1 his3Δ200 ura3-52 leu2-3,11 lys2-801	(Finley et al., 1987)
Y1094	DF5, SMT3::pYI-ADH1p-HisSMT3::URA3	diese Arbeit
YKS150	DF5, <i>urm1::NatNT2</i>	diese Arbeit
YKS151	DF5, <i>uba4::KanMX6</i>	diese Arbeit
YKS152	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3	diese Arbeit
YKS153	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1AA-tADH ::URA3	diese Arbeit
YKS154	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1K5,18,23,25,28R tADH ::URA3	diese Arbeit
YKS155	DF5, ^{H^A} Urm1::NatNT2	diese Arbeit
YKS156	DF5, ^{H^A} Urm1::NatNT2 <i>uba4::KanMX6</i>	Diese Arbeit
YKS157	DF5, Ahp1 ^{myc} ::HisMX6	diese Arbeit
YKS157	DF5, ^{H^A} Urm1::NatNT2 Ahp1 ^{myc} ::HisMX6	diese Arbeit
YKS158	DF5, ^{H^A} Urm1::NatNT2 Ahp1 ^{myc} ::HisMX6 <i>uba4::KanMX6</i>	diese Arbeit
YKS159	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>uba4::KanMX6</i>	diese Arbeit
YKS160	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>ahp1::KanMX6</i>	diese Arbeit
YKS208	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>trx1::KanMX6</i>	diese Arbeit
YKS209	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>trx2::KanMX6</i>	diese Arbeit
YKS210	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>ape1::KanMX6</i>	diese Arbeit
YKS211	DF5, Ape1 ^{myc} ::KanMX6	diese Arbeit
YKS212	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, Ape1 ^{myc} ::KanMX6	diese Arbeit
YKS213	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>ape1::KanMX6</i>	diese Arbeit
YKS161	DF5, <i>ahp1::KanMX6</i> pYI-ADH1pAhp1myc-tADH::LEU2	diese Arbeit
YKS162	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>ahp1::KanMX6</i> pYI-ADH1pAhp1myc-tADH :: LEU2	diese Arbeit
YKS163	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>uba4::KanMX6</i> <i>ahp1::HisMX6</i>	diese Arbeit
YKS164	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>ahp1::KanMX6</i> pYI-ADH1pAhp1-(K8,9R)-myc-tADH :: LEU2	diese Arbeit
YKS165	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>ahp1::KanMX6</i> pYI-ADH1pAhp1-(K32R)-myc-tADH :: LEU2	diese Arbeit
YKS166	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>ahp1::KanMX6</i> pYI-ADH1pAhp1-(K47,48R)-myc-tADH :: LEU2	diese Arbeit
YKS167	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>ahp1::KanMX6</i> pYI-ADH1pAhp1-(K79,81R)-myc-tADH :: LEU2	diese Arbeit
YKS168	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>ahp1::KanMX6</i> pYI-ADH1pAhp1-(K107,113R)-myc-tADH :: LEU2	diese Arbeit
YKS169	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>ahp1::KanMX6</i> pYI-ADH1pAhp1-(K124R)-myc-tADH ::LEU2	diese Arbeit

5. Material und Methoden

YKS170	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>uba4::KanMX6</i> pYI-ADH1p ^{myc} Uba4 –tADH::LEU2	diese Arbeit
YKS171	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>uba4::KanMX6</i> pYI-ADH1p ^{myc} Uba4(C225S) –tADH::LEU2	diese Arbeit
YKS172	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>uba4::KanMX6</i> pYI-ADH1p ^{myc} Uba4 (C397S) –tADH::LEU2	diese Arbeit
YKS173	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>uba4::KanMX6</i> pYI-ADH1p ^{myc} Uba4 (C225,397S) –tADH::LEU2	diese Arbeit
YKS174	DF5, <i>uba4::KanMX6</i> pYI-ADH1p ^{myc} Uba4 –tADH::LEU2	diese Arbeit
YKS175	DF5, ^{HA} Urm1::NatNT2, <i>rad50::KanMX6</i>	diese Arbeit
YKS176	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pGFPHisHAUrm1-tADH ::URA3	diese Arbeit
YKS177	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pGFPHisHAUrm1-tADH ::URA3 <i>uba4::KanMX6</i>	diese Arbeit
YKS178	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pGFPHisHAUrm1-tADH ::URA3 <i>ahp1::KanMX6</i>	diese Arbeit
YKS179	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>rad50::KanMX6</i>	diese Arbeit
YKS180	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>uba4::KanMX6 rad50::HisMX6</i>	diese Arbeit
YKS181	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>ncs2::KanMX6</i>	diese Arbeit
YKS182	DF5, <i>ahp1::KanMX6</i>	diese Arbeit
YKS183	DF5, <i>urm1::NatNT2 ahp1::KanMX6</i>	diese Arbeit
YKS184	DF5, <i>urm1::NatNT2</i> pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH ::URA3, <i>ncs2::KanMX6</i>	Diese Arbeit
YKS185	DF5, <i>ncs2::KanMX6</i>	diese Arbeit
YKS186	DF5, <i>urm1::NatNT2 ncs2::KanMX6</i>	diese Arbeit
YKS187	DF5, SMT3::pYI-ADH1p-HisSMT3::URA3 HAUrm1::NatN2	diese Arbeit
YKS188	DF5, pYE-ADH1p-HisUbi-tADH::LEU2	diese Arbeit
YKS189	DF5, ^{HA} Urm1::NatN2 pYE-ADH1p-HisUbi-tADH::LEU2	diese Arbeit
YKS190	DF5, <i>rad52::NatN2</i>	diese Arbeit
YKS191	<i>ku80::KanMX6</i>	diese Arbeit
YKS192	DF5, <i>rad52::KanMX6, urm1::NatN2</i>	diese Arbeit
YKS193	DF5, <i>rad51::HisMX6</i>	diese Arbeit
YKS194	DF5, <i>rad51::HisMX6, urm1::NatN2</i>	diese Arbeit
Y0352	DF5, <i>rad18::LEU2</i>	(Ulrich und Jentsch, 2000)
YKS195	DF5, <i>rad18::LEU2, urm1::NatN2</i>	diese Arbeit
YKS196	DF5, <i>rad50::KanMX6</i>	diese Arbeit
YKS197	DF5, <i>mre11::HisMX6</i>	diese Arbeit
YKS198	DF5, <i>rad50::KanMX6, Δurm1::NatN2</i>	diese Arbeit
YKS199	DF5, <i>mre11::HIS, Δurm1::NatN2</i>	diese Arbeit
YKS200	DF5, <i>ku80::KanMX6, Δurm1::NatN2</i>	diese Arbeit
YKS201	DF5, <i>rad52::NatN2, Δku80::KanMX6</i>	diese Arbeit

5. Material und Methoden

JKM161	<i>ho HML@ hmr::ADE1 ade1-100 leu2-3, 112 lys5 trp1::hisG'ura3-52 ade3::GAL::HO</i>	Sugawara et al., 2003
YMS547	JKM161, <i>ho HML@ hmr::ADE1 ade1-100 leu2-3, 112 lys5 trp1::hisG'ura3-52 ade3::GAL::HO rad52::KanMX6</i>	Meik Sacher
YKS202	JKM161, <i>ho HML@ hmr::ADE1 ade1-100 leu2-3, 112 lys5 trp1::hisG'ura3-52 ade3::GAL::HO ku80::KanMX6</i>	diese Arbeit
YKS203	JKM161, <i>ho HML@ hmr::ADE1 ade1-100 leu2-3, 112 lys5 trp1::hisG'ura3-52 ade3::GAL::HO urm1::NatN2</i>	diese Arbeit
YKS204	DF5, <i>Mre11^{HA}::TRP</i>	diese Arbeit
YKS205	DF5, <i>Mre11^{HA}::TRP, Xrs2^{Myc}::HisMX6</i>	diese Arbeit
YKS206	DF5, <i>Xrs2^{Myc}::HisMX6</i>	diese Arbeit
YKS207	DF5, <i>Mre11^{HA}::TRP, Xrs2^{Myc}::HisMX6, Δurm1::NatN2</i>	diese Arbeit
PJ69-7a	Gal4 gal80 LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ	James et al., 1996

5.1.8 S. cerevisiae Vektoren

Vektor	Verwendungszweck	Literaturangabe
<i>pYCplac33, pYCplac22, pYCplac111</i>	Centromere Plasmide	Gietz und Sugino, 1988
<i>pYIplac204, pYIplac211, pYIplac128</i>	Integrative Plasmide	Gietz und Sugino, 1988
<i>pGAD-C, pGBD-C</i>	Yeast two hybrid-(Y2H)-Plasmide	James et al., 1996

5.1.9 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für die Detektion im Western Blot und für Immunpräzipitationen eingesetzt.

Primäre Antikörper	Quelle
HA	Santa Cruz Biotechnology
Myc	Santa Cruz Biotechnology
Rad50	Santa Cruz Biotechnology
Mre11	Santa Cruz Biotechnology
Urm1	Proteome
Dpm1	Invitrogen
Smt3	Carsten Höge
Sekundäre Antikörper	Quelle
HRP-gekoppelte anti-rabbit IgG	Dianova
HRP-gekoppelte anti-mouse IgG	Dianova
HRP-gekoppelte anti-Protein A IgG	DAKO

5. Material und Methoden

5.1.10 Zusammensetzung aller weiteren Puffer und Lösungen

- Aminosäure-Mix:
 - 20mg Ade, Ura, Trp, His
 - 30mg Arg, Tyr, Leu, Lys
 - 50mg Phe
 - 100mg Glu, Asp
 - 150mg Val
 - 200mg Thr
 - 400mg Ser
- *Blocking*-Puffer:
 - 1M Ethanolamin, pH 9,0
- *Coupling*-Puffer:
 - 0.1M NaHCO₃, pH 8,5
 - 0.25M NaCl
- DNA Probenpuffer (6x):
 - 0,5% SDS
 - 0,25% Orange G
 - 0,25% Glycerol
 - 25mM EDTA, pH 8,0
- *E. coli*-Lysis-Puffer:
 - 1xPBS
 - 400mM NaCl
 - 5mM DTT
 - Complete-Protease-Inhibitoren* (Roche)
- HU Proben-Puffer:
 - 200mM Tris-HCl, pH 6,8
 - 8M Harnstoff
 - 5% SDS
 - 1mM EDTA
 - 1,5% DTT
 - 0,1% Bromphenolblau
- IP-Lysis-Puffer:
 - 50mM Tris-HCl, pH 7,4
 - 150mM NaCl
 - 0,1 mM EDTA
 - 0,1% Triton-X-100
 - Complete-Protease-Inhibitoren* (Roche)
- Laemmli Proben-Puffer:
 - 2% SDS
 - 20% glycerol
 - 100mM Tris
 - 60mM EDTA
 - 0,1% Bromphenolblau
- Lyse-Puffer:
 - 100mM NaCl
 - 1mM EDTA
 - 2% Triton-X-100
 - 1% SDS
 - 10mM Tris-HCl, pH 8,0
- MOPS Lauf-Puffer:
 - 50mM MOPS
 - 50mM Tris
 - 3,5mM SDS
 - 1mM EDTA
- PBS:
 - 137mM NaCl
 - 2,7mM KCl
 - 8mM Na₂HPO₄M
 - 1,4mM KH₂PO₄, pH 7,4
- PEG:
 - 100mM CH₃COOLi
 - 10mM Tris-HCl, pH 8,0
 - 1mM EDTA, pH 8,0
 - 40% PEG-3350 sterilifiltriert

5. Material und Methoden

- Puffer A (NiNTA):

6M Guanidiniumhydrochlorid
100mM NaH₂PO₄
10mM Tris-HCl, pH 8,0
20mM Imidazol

- RIPA-Puffer:

150mM NaCl
50mM Tris-HCl, pH 8,0
1% Triton-X-100
0,5% DOC (Deoxycholat)
0,1% SDS
20mM NEM

- Sporulation-Medium:

1,5% Kalium-Acetat

- Tankblot-Puffer:

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

- TBST:

25mM Tris-HCl, pH 7,5
137mM NaCl
2,6mM KCl
0,1% Tween 20

- Tfb1-Puffer:

30mM KAc
50mM MnCl₂
100mM KCl
15% Glycerin;
auf pH 5,8 mit 25%iger HAC
eingestellt

- Tris-Glycin-Lauf-Puffer (1x)

25mM Tris-HCL, pH
192mM Glycin
0,1% SDS

- Puffer C (NiNTA):

8M Harnstoff
100mM NaH₂PO₄
10mM Tris-HCl, pH 6,3

- SORB:

100mM CH₃COOLi
10mM Tris-HCl, pH 8,0
1mM EDTA, pH 8,0
1M Sorbitol
sterilfiltriert

- *Stripping*-Puffer:

4% SDS
100mM β-Mercaptoethanol
62,5mM Tris-HCl, pH 6,8

- TBE-Puffer (5x):

90mM Tris
90mM Borsäure
2,5mM EDTA, pH 8,0
autoklaviert

- TE-Puffer:

10mM Tris-HCl, pH 8,0
1mM EDTA
autoklaviert

- Tfb2-Puffer:

10mM MOPS/NaOH
75mM CaCl₂
10mM KCl
15% Glycerin
auf pH 7,0 mit NaOH eingestellt

- Zymolyase 20T-Lösung:

0,9M Sorbitol
0,1M Tris-HCl, pH 8,0
0,2M EDTA, pH 8,0
50mM DTT
0,5mg/ml Zymolase 20T (Biochemicals)

5.2 Methoden mit *E. coli*

5.2.1 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

LB-Flüssigkulturen wurden bei 37°C (oder bei 22°C für Proteinexpressionen) geschüttelt (200rpm). LB-Agarplatten wurden ebenfalls bei 37°C inkubiert. Die Dichte von *E. coli*-Kulturen wurde photometrisch mit einem Spektrophotometer (Eppendorf) bei einer Wellenlänge $\lambda = 600\text{nm}$ (OD_{600}) bestimmt. Für die langfristige Lagerung wurden stationäre Flüssigkulturen mit Glycerin versetzt (Endkonzentration 20%) und bei -80°C eingefroren.

5.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Es wurden sowohl chemisch-kompetente als auch elektro-kompetente Zellen verwendet.

Für die Herstellung chemisch-kompetenter Zellen ist es besonders wichtig die Zellen immer kühl zu halten. Die Zellen wurden auf LB-Platten mit entsprechender Selektion ausgestrichen und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Es wurde eine einzelne Kolonie gepickt und in 5ml LB-Medium (falls nötig mit Selektionsdruck) inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Übernachtskultur in frisches, warmes LB-Medium überimpft ($\text{OD}_{600} = 0.05$) und bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,5$ bei 37°C wachsen gelassen. Anschließend wurde die Kultur auf Eis gekühlt (15min). Die Zellen wurden daraufhin in gekühlten Zentrifugenbechern (15min, 3500rpm, 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 30ml Tfb1-Puffer pro 100ml Kultur resuspendiert. Die Zellen wurden erneut in einem Eisbad gekühlt (15min) und danach abzentrifugiert (15min, 2500rpm, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen sehr vorsichtig in 5ml Tfb2-Puffer pro 100ml Kultur resuspendiert, auf Eis gekühlt (5min) und anschließend in 1,5ml Eppendorfgefäße auf Trockeneis aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Für die Herstellung von elektro-kompetenten Zellen wurde 10ml einer Übernachtskultur in 1l LB-Medium überführt und bis zu einer OD_{600} von 0,6 bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlung der Kultur in Eiswasser für 1h wurden die Zellen durch Zentrifugation (5min, 5000g, 4°C) geerntet. Alle weiteren Schritte wurden im Kühlraum unter Verwendung von zuvor gekühlten sterilen

5. Material und Methoden

Materialien und Lösungen durchgeführt. Die Zellen wurden zweimal mit 500ml 10%igem Glycerin gewaschen und anschließend in 20ml Glycerin resuspendiert und nach 30min Inkubation in Eiswasser erneut durch Zentrifugation geerntet. Schließlich wurden die Zellen in 3ml 10%igem Glycerin resuspendiert und in Aliquots zu 50 μ l bei -80°C gelagert.

5.2.3 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Für chemisch-kompetente Zellen

Dazu wurden 100 μ l kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 μ l Plasmid-DNA bzw. 10 μ l eines Ligationsansatzes gemischt und für 30min auf Eis inkubiert. Danach wurde ein Hitzeschock von 1min bei 42°C durchgeführt. Anschließend wurden die Bakterien für 1min auf Eis abgekühlt und in 1ml LB-Medium (ohne Antibiotika) aufgenommen. Nach einer Inkubation von 1h bei 37°C wurde die Zellsuspension auf LB-Platten mit Selektion ausgestrichen.

Für elektro-kompetente Zellen

25 μ l Elektro-kompetente Zellen wurden mit 1 μ l Plasmid-DNA bzw. 2 μ l eines gegen Wasser dialysierten Ligationsansatzes gemischt. Die Bakterien-DNA-Suspension wurde in eine Elektroporationsküvette (0,1cm Spaltbreite) gegeben und mit der Geräteeinstellung 1,8kV, 25 μ F und 200 Ω elektroporiert. Unmittelbar nach dem elektrischen Puls wurden die Zellen in 1ml LB-Medium (ohne Antibiotika) aufgenommen und nach einer Inkubation für 1h bei 37°C auf Selektionsplatten ausgebracht. Die Zellen wurden auf LB-Platten mit Selektion über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.2.4 Expression von Proteinen in *E. coli*

Für die Expression rekombinanter Proteine wurde der *E. coli* Stamm Rosetta verwendet. Für eine anschließende Aufreinigung wurden Kulturen mit einem Volumen von 2l benutzt, für Expressionstests Kulturen mit einem Volumen von 10ml. Dabei wurde eine Übernachtskultur 1:100 verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 wachsen gelassen. Bei dieser OD wurde die Expression durch Zugabe von IPTG (1mM Endkonzentration) bei 22°C oder 30°C induziert. Die IPTG-Induktion erfolgte für 2 bis 4h, wobei vor und nach der Induktion Proben entnommen wurden, um die Expression zu überprüfen. Die Zellen wurden nach der Induktion abzentrifugiert (5min, 5000g, 4°C), einmal in PBS gewaschen und nach Schockgefrieren in N₂ bei - 80°C gelagert.

5.3 Methoden mit *S. cerevisiae*

5.3.1 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Für alle beschriebenen Versuche wurden Flüssigkulturen, die aus frischen Übernachtskulturen verdünnt worden waren, bei 30°C wachsen gelassen und bei einer OD₆₀₀ von circa 1,0 geerntet. Die Zelldichte wurde photometrisch bestimmt und die Zellzahl berechnet (OD₆₀₀ = 1,0 entsprechen circa 1,5x10⁷ Zellen/ml). Die Hefen konnten für zwei Wochen auf Platten bei 4°C gelagert werden. Für die Langzeitaufbewahrung wurde eine stationäre Kultur mit Glycerin (16,7% Endkonzentration) versetzt und bei -80°C eingefroren. Flüssigkulturen wurden teilweise mit NEM und t-BOOH inkubiert. NEM wurde bei einer OD₆₀₀ = 1,0 für 1h zu den Zellen gegeben. Oxidativer Stress wurde durch Zugaben von t-BOOH für 2h bei einer OD₆₀₀ = 0,6 induziert. Beim Gießen von Hefepplatten musste darauf geachtet werden, dass die Temperatur des YPD-Agar bei der Zugabe der Chemikalien nicht mehr als 60°C betrug.

5.3.2 Herstellung und Transformation von kompetenten Hefezellen

Die Herstellung und Transformation von kompetenten Hefezellen wurde nach Standardprotokollen durchgeführt. Beschrieben in Knop *et al.* (1999).

5.3.3 Genomische Integration von Plasmid-DNA

Um eine Integration in das Genom zu erreichen wurden die *pYIplac*-Plasmide (Gietz und Sugino, 1988) verwendet, die einen Auxotrophiemarker und kein autonomes Replikationselement enthalten. Das zu untersuchende Gen wurde in einen dieser integrativen Vektoren kloniert und stand entweder unter der Kontrolle des eigenen Promotors oder eines Hefepromotors, der eine konstitutive Expression des Genes ermöglicht. Vor der Transformation wurde das Plasmid im Gen des Selektionsmarkers mit einem Restriktionsenzym geschnitten und somit linearisiert. Die Integration erfolgte über die entstandenen freien Plasmid-Enden in die entsprechenden homologen Bereiche im Genom durch homologe Rekombination.

Eine Gendeletion erfolgte mit Hilfe von *knock out*-PCR-Kassetten. Beschrieben in Longtine *et al.* (1998), Knop *et al.* (1999) und Janke *et al.* (2004). Gendeletionen wurden durch Kolonie-PCRs, über die Analyse des Phänotyps und im Western Blot verifiziert.

5.3.4 Sporulation und Tetradenanalyse diploider *S. cerevisiae* Stämme

Diploide Hefezellen müssen für die Tetradenanalyse sporuliert werden. Dazu werden 500µl diploide und stationäre Hefezellen geerntet (2min, 500g, RT), viermal mit sterilem Wasser gewaschen und anschließend in 4ml Sporulationsmedium (1,5% Kalium-Acetat) resuspendiert. Die Zellen wurden mindestens drei Tage bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Daraufhin wurden 10µl der sporulierten Zellen mit 10µl Zymolyase-20T-Lösung gemischt und 10min bei RT inkubiert. Die Tetraden konnte dann mit Hilfe eines Mikromanipulators (Singer MSM System) ausgelegt werden und wurden für drei Tage auf YPD-Platten ohne Selektion wachsen gelassen, bevor eine Replika-Plattierung auf Selektionsplatten und eine Analyse des *mating types* durchgeführt wurde.

5.3.5 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit dem *yeast two hybrid-(Y2H)-System*

Protein-Protein-Interaktionen wurden mit Hilfe des *Y2H*-Systems untersucht. Dazu wurden die Vollängen-ORFs (*open reading frame*, ORF) und entsprechende Fragmente der zu untersuchenden Proteine mit dem C-Terminus der DNA-Binde- (BD) bzw. der Aktivierungs-Domäne (AD) von Gal4 fusioniert. Diese Fusionskonstrukte wurden in den Hefestamm PJ69-7a (James et al., 1996) transformiert und auf SC^{-Leu-Trp}-, SC^{-Leu-Trp-His}- und SC^{-Leu-Trp-Ade}-Platten ausgebracht. Eine Interaktion zwischen zwei Proteinen führt zur Rekonstitution des Gal4-Transkriptionsaktivators und Expression eines Reportergenes, das unter der Transkriptionskontrolle von Gal4 liegt. Als Reportergen dienen die Gene *HIS3* und *ADE2*, so dass die Hefezellen bei einer positiven Interaktion auf den entsprechenden Selektionsplatten wachsen konnten.

5.3.6 Analyse von Phänotypen durch Wachstumstests

Vergleich des *S.cerevisiae*-Wachstums verschiedener Stämme unter bestimmten Bedingungen dient der phänotypischen Analyse. Für diese Arbeit wurden unterschiedliche Hefestämme auf ihre Sensitivität gegenüber HU, MMS, t-BOOH und Zeocin getestet. Hierzu wurden serielle Verdünnungen von Hefekulturen auf Hefepetten inkubiert, die unterschiedliche Konzentrationen dieser Drogen enthielten. Stationäre Hefekulturen wurden in

sterilem Wasser auf eine $OD_{600} = 0,5$ eingestellt und in fünf Schritten jeweils 1:5 verdünnt. Gleiche Mengen dieser fünf Verdünnungen wurden nebeneinander mit Hilfe eines Stempels, der für 30sek auf den Hefepplatten platziert wurde, ausgebracht. Die Inkubation erfolgte zwei bis vier Tage bei 30°C.

5.3.7 Cycloheximid *chase assay* (CCHX)

Um die Lebensdauer von Proteinen zu bestimmen, wurden sogenannte *expression-shut-off* Experimente durchgeführt. Dabei wurde durch die Zugabe von Cycloheximid jegliche Proteinbiosynthese inhibiert, sodass sich die Abnahme eines bestimmten Proteins immunologisch im Western Blot verfolgen ließ. Dazu wurde eine Übernachtskultur der entsprechenden Hefen in YPD angeimpft. Am nächsten Morgen wurden die Kulturen in 50ml YPD auf $OD_{600} = 0,2$ eingestellt und bei 30°C bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ schütteln gelassen. Bei $OD_{600} = 0,6$ wurden 10 OD geerntet und bei 500g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die pelletierte Hefe in 10ml YPD mit Cycloheximid resuspendiert. Die Kulturen wurden erneut bei 30°C geschüttelt und zu den entsprechenden Zeitpunkten 1ml (= 1 OD) abgenommen. Der Überstand wurde sofort abgesaugt und die Proben in N_2 schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

5.3.8 Strategie zur Suche des Akzeptorlysin für die „Urmyleierung“ von Ahp1

Bei der Suche nach dem Akzeptorlysin für die Ahp1-Urmyleierung wurden denaturierte Zellextrakte der *ahp1K8/9R-*, *K32R-*, *K48,49R-*, *K79/81R-*, *K107/113R-* und *K124R-*Varianten im Western Blot untersucht. Die Zellen wurden dazu bei einer $OD_{600} = 1,0$ für 1h mit 10mM NEM bei 30°C behandelt. Anschließend wurde 1 OD geerntet und daraus denaturierte Hefe-Zellextrakte hergestellt. Im Western Blot ließ sich anschließend die Urm1-Modifikation von Ahp1 untersuchen.

5.3.9 Roboter-basierte genetische Suche (*screen*)

Eine Kollektion von etwa 5000 Deletionsmutanten wurde auf Zeocin- bzw. MMS-haltigen Hefepplatten inkubiert und das Wachstum dieser Stämme analysiert. Die Kollektion von Deletionsmutanten liegt in Duplikaten auf

Kulturplatten mit jeweils 384 Einzelkolonien vor. Diese können automatisiert durch eine Bio-MK FX[®] Arbeitsstation von Beckton Dickinson mittels spezieller Stempel auf Hefepplatten mit den entsprechenden Drogen ausgebracht werden. Die Inkubation erfolgte für zwei bis vier Tage bei 30°C. Es wurden nur solche Deletionsmutanten bewertet, deren Duplikate gleiches Wachstum aufwiesen.

5.4 Molekularbiologische Techniken

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

5ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurde mit einer einzelnen *E. coli*-Kolonie, die ein DNA-Plasmid von Interesse trägt, angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit Produkten der Firmen Qiagen (Plasmid Mini Kit) oder Bioneer (AccuPrep Plasmid Mini Extraction Kit) nach Angaben des Herstellers isoliert.

5.4.2 Präzipitation von DNA

DNA kann mit Hilfe einer Ethanol-Fällung präzipitiert werden. Dazu wurden 1/10 Volumen Natriumacetat (3M, pH 4,8) und 2,5 Volumen Ethanol zur DNA-Lösung gegeben. Der Ansatz wurde für mindestens 30min bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch Zentrifugation (30min, 13000rpm, RT) pelletiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder in destilliertem Wasser aufgenommen.

5.4.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mit einem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer (PeqLab) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260\text{nm}$ bestimmt. Dabei entspricht bei doppelsträngiger DNA die $OD_{260} = 1,0$ einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$.

5.4.4 Polymerase-Kettenreaktion

DNA-Fragmente wurden von DNA-Vorlagen mittels Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) amplifiziert.

Amplifikation von DNA-Fragmenten aus genomischer DNA

Für die Amplifikation von genomischer DNA wurde die hoch akkurate *PhusionTM* DNA-Polymerase (Finnzymes) verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden folgendermaßen angesetzt:

PCR-Reaktion:

- 0,2µg genomische DNA
- 10µl 5x HF-Puffer (Finnzymes)
- 1,0µl dNTP-Mix (10mM, New England Biolabs)
- jeweils 2,5µl beider Primer (10µM)
- 0,5µl *Phusion* DNA-Polymerase (Finnzymes)
- 31,5µl H₂O

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aus genomischer DNA wurde folgendes Programm verwendet:

PCR-Schritt	T(°C)	Dauer der einzelnen PCR-Schritte
Initiale Denaturierung	98°C	30sek
35 Amplifikationszyklen	98°C	10sek
	45-72°C	30sek
	72°C	15-30sek/1kb
Endverlängerung	72°C	10min
Abkühlung	4°C	∞

Amplifikation von Deletionskassetten

Epitop-Markierungen von Genen und chromosomale Gen-Deletionen wurden mit Hilfe einer PCR-Strategie durchgeführt. Diese Methode basiert auf homologer Rekombination des PCR-Fragmentes in den entsprechenden DNA-Lokus (Janke et al., 2004). Die PCR-Reaktionen wurden folgendermaßen angesetzt:

PCR-Reaktion:

- 50ng Plasmid-DNA
- 5µl 10x Thermopol Puffer (New England Biolabs)
- 1,0µl dNTP-Mix (10mM, New England Biolabs)
- jeweils 3,2µl beider Primer (10µM)
- 0,4µl *Taq* DNA-Polymerase (New England Biolabs)

5. Material und Methoden

- 0,5µl *Vent* DNA-Polymerase (New England Biolabs)
- 31,25µl H₂O

Zur Amplifikation von Deletionskassetten wurde folgendes Programm verwendet:

PCR-Schritt	T(°C)	Dauer der einzelnen PCR-Schritte
Initiale Denaturierung	94°C	5min
10 Amplifikationszyklen	94°C	20sek
	45°C	30sek
	68°C	1min 40sek
20 Amplifikationszyklen	94°C	20sek
	54°C	30sek
	68°C	1min 40sek + 20sek/Zyklus
Abkühlung	4°C	∞

Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wird verwendet um den Erfolg einer Gendelektion oder einer Epitopmarkierung eines Genes zu überprüfen. Mit einer sterilen Zahnstocherspitze wurde eine geringe Menge einer Hefekolonie in 20µl Natronlauge (0,02M) resuspendiert, eine Spatelspitze Glasperlen (Sigma, Durchmesser 425-600nm) dazugegeben und 5min im Thermomixer bei 99°C stark geschüttelt. Nach kurzer Zentrifugation (15sek) in der Tischzentrifuge bei RT wurden 4µl des Überstandes abgenommen und als Vorlage für die PCR-Reaktion verwendet.

PCR-Reaktion:

- 4µl DNA-Überstand
- 5µl 10x Thermopol Puffer (New England Biolabs)
- 1,0µl dNTP-Mix (10mM, New England Biolabs)
- jeweils 3,2µl beider Primer (10µM)
- 0,8µl MgSO₄ (100mM, New England Biolabs)
- 0,4µl *Taq* DNA-Polymerase (New England Biolabs)
- 31,6µl H₂O

5. Material und Methoden

Dabei wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

PCR-Schritt	T(°C)	Dauer der einzelnen PCR-Schritte
Initiale Denaturierung	94°C	5min
30 Amplifikationszyklen	94°C	30sek
	55°C	30sek
	68°C	1min
Endverlängerung	68°C	5min
Abkühlung	4°C	∞

5.4.5 Zielgerichtete Punktmutagenese

Um Punktmutationen oder Deletionen in DNA-Sequenzen einzuführen wurde eine PCR-Methode verwendet, die sich an das *QuickChange*-Protokoll (Stratagene) anlehnt. Hierfür wurden zwei komplementäre Primer synthetisiert, die in der Mitte eine Punktmutation gegenüber der Zielsequenz aufwiesen und ausgehend von der Punktmutation auf beiden Seiten jeweils weitere 15bp der Originalsequenz besaßen.

PCR-Reaktion:

- 0,4µl Plasmid-DNA (Mini)
- 2,5µl 10x Pfu-Puffer (Stratagene)
- 0,6µl dNTP-Mix (10mM, New England Biolabs)
- jeweils 0,5µl beider Mutagenese-Primer (10µM)
- 0,5µl *Pfu-Turbo* DNA-Polymerase (New England Biolabs)
- 20µl H₂O

Dabei wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

PCR-Schritt	T(°C)	Dauer der einzelnen PCR-Schritte
Initiale Denaturierung	94°C	30sek
19 Amplifikationszyklen	94°C	30sek
	55°C	60sek
	68°C	2min/1kb Plasmid
Abkühlung	4°C	∞

Die DNA des Ausgangsplasmides wurde durch Zugabe von Dpn1 bei 37°C für 2h verdaut. Die aus *E. coli* gewonnene Plasmid-DNA ist in der Regel methyliert, während die über die PCR-Methode amplifizierte DNA nicht methyliert ist. Dpn1 schneidet spezifisch methylierte DNA und entfernt somit das Ausgangsplasmid. Anschließend wurde ein Teil des PCR-Ansatzes direkt in kompetente *E. coli* transformiert. Der Erfolg der Mutagenese konnte durch Sequenzierungen überprüft.

5.4.6 Klonierung von Plasmidkonstrukten

5.4.6.1 Restriktionsverdau von DNA

DNA kann durch Restriktionsenzyme sequenzspezifisch verdaut werden. Der Verdau wurde nach den allgemein Empfehlungen des Herstellers (New England Biolabs) durchgeführt. Für 1µg DNA wurden 5 bis 10 Units Enzym und die entsprechenden Puffer (New England Biolabs) zugegeben. Plasmid-DNA wurde 1-2h bei der für das jeweilige Enzym geeigneten Temperatur inkubiert, wogegen PCR-Produkte über Nacht verdaut wurden. Um die Rezirkularisierung des Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Enden der Vektor-DNA dephosphoryliert. Dies erfolgte durch Zugabe von 1µl *Calf Intestinal Phosphatase* (CIP; New England Biolabs) zum Restriktionsansatz und einer Inkubation von 1h bei 37°C.

5.4.6.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die DNA-Proben wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt und anschließend auf ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen, das mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid versetzt war. Die DNA-Proben wurden bei einer Spannung von 120V in TBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid in DNA können DNA-Fragmente auf einem UV-Transilluminator ($\lambda = 324\text{nm}$) visualisiert und photographiert werden. Die Größe der DNA-Fragmente konnte durch Vergleich mit einem Größenmarker (1kb DNA *Ladder* (Invitrogen)) ermittelt werden.

5.4.6.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die zu isolierenden DNA-Fragmente unter langwelligem UV-Licht ($\lambda = 324\text{nm}$) mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß

überführt. Die DNA wurde mit Hilfe von Produkten der Firmen Qiagen (QIAquick Gel Extraction Kit) oder Bioneer (AccuPrep Gel Purification Kit) nach den Angaben des Herstellers aus dem Gelstück isoliert und in einem geeigneten Volumen sterilem Wasser eluiert.

5.4.6.4 Ligation von DNA

Für die Ligation wurden der Vektor und das einzufügende Fragment im Verhältnis 1:3 bis 1:10 eingesetzt. Für einen Ligationsansatz (20µl) wurden circa 100ng des Vektors, die entsprechende Fragmentmenge, 10µl 2x Quick-Ligase-Puffer (New England Biolabs) und 1µl Quick-DNA-Ligase (New England Biolabs) verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend für 10min bei RT inkubiert. Vor der Transformation in elektro-kompetente *E. coli* wurde der Ligationsansatz für 30min gegen Wasser auf einem Nitrozellulosefilter (Porengröße: 0,05µm (Millipore)) dialysiert. Für die Transformation in chemisch-kompetente Zellen konnte auf den Dialyse-Schritt verzichtet werden.

5.4.6.5 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden von der *Core Facility* (Max Planck Institut für Biochemie) mittels eines ABI 3730 Sequenzierers durchgeführt. Die Proben enthielten in der Regel 0,5µg Plasmid-DNA und 5pmol Primer. Die nachfolgende Probenaufbereitung erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers mit dem *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit* (Amersham Pharmacia).

5.5 Proteinbiochemische Techniken

5.5.1 Gel- und Western Blot-Techniken

5.5.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In dieser Arbeit wurden 4-12%ige Bis-Tris-Polyacrylamid-Gele sowie 6%ige Tris-Glycin-Polyacrylamid-Gele verwendet. Für das Bis-Tris-System wurden selbst gegossene Gele oder kommerziell erwerbliche Fertiggele (Invitrogen) eingesetzt. Der niedrigprozentige Teil des Bis-Tris-Systems ermöglicht ein Sammeln der Proben, sodass kein spezielles Sammelgel gegossen werden

5. Material und Methoden

muss.

Gellösung (für 13 Gele):	4%	12%
Wasser	32,31ml	16,97ml
65% Saccharose	-	3,38ml
2,5M Bis-Tris/HCl	6,53ml	6,53ml
30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid	5,94ml	17,91ml
10% SDS	225µl	225µl
TEMED	45µl	45µl
10% APS	225µl	225µl

Für selbst gegossene Gele wurden die Gellösungen mit Hilfe eines Gradientenmischers und einer Peristaltikpumpe in die Gelform (Hofer-Gelsystem) gegossen, wobei die Geltaschen mit einem geeigneten Kamm gesteckt wurden. Sowohl bei den selbst gegossenen als auch bei den kommerziellen Bis-Tris-Gelen diente ein MOPS-Puffer als Laufpuffer. Die Proteine wurden bei einer konstanten Spannung von 120V aufgetrennt. Für die Detektion von Proteinen mit einem hohen Molekulargewicht (>130 kDa) wurden kommerziell erworbene 6%ige Tris-Glycin-Polyacrylamid-Gele (Invitrogen) verwendet. Ein 1xTrisGlycin-Puffer diente als Laufpuffer. Hierbei wurden die Proteine bei 100V im Kühlraum aufgetrennt.

Die Proteinproben wurden vorher in Laemmli- oder HU-Probenpuffer aufgenommen, durch Erhitzen (5min bei 95°C in Laemmli-Puffer bzw. 15min bei 65°C in HU-Puffer) denaturiert und in den entsprechenden Gelen aufgetrennt. Als Molekulargewichts-Marker wurde der *All Blue Precision Plus Protein Pre-stained Standard* (Bio-Rad) verwendet. Anschließend wurden die Proteinbanden mit Hilfe einer Silber- oder Coomassie-Färbung direkt im Gel sichtbar gemacht. Für eine genauere und spezifischere Detektion wurde die Western Blot-Methode verwendet.

5.5.1.2 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Um Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden Polyacrylamid-Gele 2h oder über Nacht in einer *PageBlue™ Protein Staining Solution* (Fermentas) gefärbt und anschließend durch wiederholtes Waschen mit H₂O entfärbt bis der Hintergrund des Geles klar wurde.

5.5.1.3 Silber-Färbung

Silber-Färbungen wurden nach dem Protokoll für das Silver Stain Kit II von Pierce durchgeführt.

5.5.1.4 Western Blot

SDS-Polyacrylamid-Gele wurden nach der Elektrophorese mit Hilfe einer Tankblot-Apparatur (Hofer) in Transferpuffer auf eine Membran aus PVDF (Polyvinylidenfluorid) (ImmobilonTM-P, 0,45µm Porengröße, Millipore) überführt. Der Transfer erfolgte für 2h bei einer konstanten Spannung von 70V.

5.5.1.5 Immunologischer Nachweis von Membran-gebundenen Proteinen

Zum immunologischen Nachweis der immobilisierten Proteine wurde die PVDF-Membran für 1h bei RT in TBST-Milch (5% Magermilchpulver (Fluka) in TBST) blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht in TBST-Milch bei 4°C. Danach wurde die Membran fünfmal für 5min mit TBST gewaschen und anschließend mit einem sekundären Peroxidasegekoppelten Antikörper in einer 1:5000 Verdünnung in TBST-Milch für 1h bei RT inkubiert. Nach erneutem, sechsmaligem Waschen mit TBST erfolgte die Detektion mittels Chemolumineszenz. Dazu wurden die Detektions-Systeme von Amersham Pharmacia (ECLTM und ECLTM-Advance) nach Herstellerangaben verwendet. Die Immunblots wurden durch variable Expositionszeiten auf ECL-Hyperfilmen (Amersham Pharmacia, GE Healthcare) und automatisierter Filmentwicklung visualisiert.

5.5.1.6 Entfernen gebundener Immunglobuline von Western Blots

Um die Membran eines Western Blots mehrmals mit verschiedenen primären Antikörpern inkubieren zu können, wurden bereits gebundene Immunglobuline durch Inkubation in *Stripping*-Puffer entfernt. Dazu wurde die PVDF-Membran für 30min in *Stripping*-Puffer bei 60°C inkubiert und anschließend dreimal für 10min mit TBST gewaschen. Danach konnte die PVDF-Membran erneut mit einem primären Antikörper behandelt werden.

5.5.2 Herstellung von Zellextrakten und Aufreinigungs-Methoden

5.5.2.1 Herstellung von denaturierten Hefe-Extrakten

Um posttranslationale Urm1-Protein-Modifikationen vor proteolytischen Aktivitäten im Zellysate zu schützen, wurden in dieser Arbeit häufig denaturierte Zellextrakte verwendet. Logarithmisch wachsende Hefezellen wurden bei einer OD_{600} von circa 1,0 geerntet (1min, 13000rpm, RT) und in 1ml kaltem Wasser resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 150 μ l 1,85M NaOH/ 7,5% β -Mercaptoethanol gemischt und 15min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 150 μ l 55%iger Trichloressigsäure (TCA) wurden die Proteine gefällt und anschließend pelletiert (15min, 13000rpm, 4°C). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet nochmals kurz abzentrifugiert, um letzte TCA-Rückstände zu entfernen. Das Pellet wurde in 100 μ l HU-Puffer (100mM DTT) aufgenommen und bei 65°C für 15min denaturiert.

5.5.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Bradford-Methode (BioRad-Proteinassay, Biorad) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Kalibrierung wurde als Standard eine wässrige BSA-Lösung bekannter Konzentration eingesetzt.

5.5.2.3 Reinigung rekombinanter Proteine unter nativen Bedingungen

Für diese Arbeit wurden Proteine in *E. coli* (Rosetta) exprimiert und aus diesen aufgereinigt. Die Reinigung erfolgte mittels Affinitätschromatographie über das GST-Epitop. Für die Reinigung von GST-Fusionsproteinen wurden 2l Bakterienkultur verwendet. Das Zellpellet wurde in 30ml *E. coli*-Lyse-Puffer resuspendiert, und die Zellen durch viermaliges Durchpressen durch einen Emulsiflex C5 Zelldisruptor lysiert. Nach einer Zentrifugation (30min, 20000g, 4°C) erfolgte für 2h die Bindung des Überstandes an Glutathion-*Beads* (Qiagen). Gebundene Proteine wurden mit 500ml Lyse-Puffer gewaschen und anschließend in Fraktionen mit Elutionspuffer (Lyse-Puffer + 50mM Glutathion [pH 7,0]) eluiert. Die vereinigten Elutionsfraktionen (circa 2ml) wurden über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert. Anschließend konnte das aufgereinigte GST-Fusionsprotein bei -80°C gelagert werden. Alle Schritte der Aufreinigung wurden durch SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung überprüft.

Für diese Aufreinigung erfolgten alle Schritte mit vorher gekühlten Materialien bei 4°C.

5.5.2.4 NiNTA-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen

Diese Methode wurde zur Analyse der posttranslationalen Urm1-, Smt3- und Ubiquitin-Modifikationen in *S. cerevisiae* verwendet. Hierfür wurden Hefe-Stämme eingesetzt, welche die jeweiligen Modifizierer mit einem N-terminalen His-Epitop 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%iger TCA und Inkubation auf Eis für weitere 15min präzipitiert. Nach einer Zentrifugation (15min, 3000g, 4°C) wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet zweimal mit eiskaltem Aceton (-20°C) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in Puffer A mit 0,05% Tween-20 mit der Pipette resuspendiert und 1h auf einem Schüttler bei RT solubilisiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch einen Zentrifugationsschritt (20min, 13500rpm, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde mit 50 μ l magnetischen NiNTA-*magnetic-beads* (Qiagen) versetzt und über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Nach der Bindung wurden die *magnetic beads* mit Hilfe eines Magneten pelletiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und dreimal mit Puffer A mit 0,05% Tween-20 und fünfmal mit Puffer C mit 0,05% Tween-20 gewaschen. Die Elution erfolgte mit 30 μ l 1%igem SDS bei 65°C. Nach der Trocknung mit Hilfe einer SpeedVac (Eppendorf) wurden die Proteine in 10 μ l Wasser mit 15 μ l HU-Puffer (100mM DTT) aufgenommen und 15min bei 65°C denaturiert.

5.5.2.5 Immunpräzipitation unter nativen Bedingungen

Um Protein-Protein-Interaktionen und die „Urmylierung“ von Proteinen zu untersuchen, wurden Immunpräzipitationen unter nativen Bedingungen durchgeführt. Ausgehend von einer Übernachtskultur wurden die Hefestämme in einem Volumen von 100ml YPD bei 30°C inkubiert. 100 OD Hefe-Zellen wurden durch Zentrifugation (10min, 3500rpm, 4°C) geerntet und in 1.5ml Eppendorf-Gefäßen bei -80°C gelagert oder direkt zur Zellyse eingesetzt. Zum Zellpellet wurde für die Lyse 250 μ l IP-Lysis-Puffer (0,1% Triton X-100) zugegeben. Nach der Zugabe der Silika-Zirkon-*beads* wurden die Zellen mit einem *Bead Beater* (Retsch) durch 5-6faches schütteln für 30s bei 4°C lysiert.

5. Material und Methoden

Das Eppendorf-Gefäß wurde mit einer 23G-Nadel perforiert und durch eine „Rucksack“-Elution wurden die Zelllysate von den Silika-Zirkon-*beads* getrennt. Durch eine anschließende Zentrifugation (5min, 5000rpm, 4°C) wurden Zellfragmente pelletiert und verworfen. Zum klaren Überstand wurde 20µl *Slurry* der vorgekoppelten αHA-Agarose (Roche) zugegeben und für 12h bei 4°C unter Rotation inkubiert.

Alternativ wurden 2µg eines Antikörpers zum Lysat zugegeben und die Lösung für 12h auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Antikörper/Antigen-Komplexe durch Zugabe von ProteinG-Agarose gefällt.

Die Reaktionen wurden 6-7fach im IP-Lysis-Puffer (0,5% Triton X-100) gewaschen. Die Waschschriffe beinhalten Zentrifugationschritte (2min, 500g, 4°C), Überstand mit einer 27G-Nadel absaugen, 700µl Waschpuffer auf die *Beads* geben und eine anschließende Inkubation für 20min auf dem Drehrad bei 4°C. Zuletzt werden die *Beads* in 20µl HU-Puffer (100mM DTT) aufgenommen und 15min bei 65°C denaturiert.

5.5.2.6 Tandemaufreinigung von Urm1-Substraten

Es wurde eine Tandemaufreinigung durchgeführt, die ^{HisHA}Urm1-Substrate über eine denaturierende NiNTA-Chromatographie anreichert und in einem zweiten Schritt über eine HA-Immünpräzipitation weiter aufreingt. Dafür wurden 6l Zellen in YPD hochgezogen und eine Stunde vor dem Ernten mit 10mM NEM behandelt. Aus den 6l erhielt man 6000 OD pelletierte und gewaschene (PBS) Zellen (*urm1::NatNT2 pYI-ADH1pHisHAUrm1-tADH::URA3*). Diese wurden in 160ml 1,85M NaOH/ 7,5% β-Mercaptoethanol resuspendiert und für 20min auf Eis inkubiert. Zur Präzipitation der Proteine wurden 160ml 55%ige TCA hinzugefügt und weitere 20min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (20min, 3500rpm, 4°C) wurde das Pellet in kaltem Wasser gewaschen und anschließend in Puffer A mit 0,05% Tween 20 mit einer Pipette resuspendiert. Durch Inkubation für 1h bei RT auf einem Schüttler wurden die Proteine solubilisiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch eine Zentrifugation (20min, 13500rpm, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde mit 6ml NiNTA-Agarose (Qiagen) sowie Imidazol (Endkonzentration 20mM) versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf eine Säule gepackt. Nach dem Waschen der Säule mit 30ml

Puffer A und 100ml Puffer C erfolgte die Elution in zwei aufeinander folgenden Schritten mit jeweils 2ml Puffer C, welcher mit 200mM Imidazol versetzt war. 1ml des Eluats wurde mit 55%iger TCA präzipitiert, während 3ml gegen 4l RIPA-Puffer über Nacht dialysiert wurden. Zur weiteren Aufreinigung erfolgte eine Immunpräzipitation über Nacht mit 50µl antiHA-Agarose (Roche). Die gebundenen Proteine wurden mit 50µl HU-Puffer (100mM DTT) bei 65°C von der Säule eluiert. Die Proben wurden auf ein 4-12%iges Bis-Tris-Gel (Invitrogen) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach einer Coomassie-Färbung wurden spezifische Banden ausgeschnitten und zur massenspektroskopischen Analyse gegeben.

5.5.2.7 Herstellung der Urm1-Sepharose-Säule

Es wurden 2g CNBr-aktivierte Sepharose 4B langsam in einer Flasche mit 200ml 1mM HCl gequollen (mindestens für 30min). Anschließend wurde die Sepharose mit 1l 1mM HCl gewaschen (Buechner-Trichter + Filter). Die Sepharose wurde daraufhin auf dem Filter zuerst mit destilliertem Wasser und danach mit dem *Coupling*-Puffer gespült. Die *Beads* wurden in 30ml *Coupling*-Puffer in ein 50ml Falcon überführt und sedimentiert (1min, 1500rpm, 4°C). Es wurden 100mg rekombinantes Urm1 in 20ml *Coupling*-Puffer zur sedimentierten Sepharose gegeben und für 2h bei RT auf einem rotierendem Rad inkubiert. Die Sepharose wurde erneut sedimentiert und der Überstand verworfen. Nach einem Waschschrift mit *Coupling*-Puffer wurde die Sepharose mit 50ml *Blocking*-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die *Beads* für 2h bei Raumtemperatur im *Blocking*-Puffer inkubiert. Die *Beads* wurden in einer alkalischen Waschlösung (0,1M NaHCO₃, 1M NaCl) zweimal gewaschen. Es folgten weitere fünf Waschschriffe in einem sauren Acetat-Waschpuffer (0.1M Acetat [pH 4]), weitere zwei Waschschriffe mit destilliertem Wasser und zuletzt zwei Waschschriffe mit PBS. Die Urm1-Sepharose wurde in PBS mit 0.02% NaN₃ bei 4°C über mehrere Monate gelagert.

5.5.2.8 Aufreinigung von Urm1-Interaktoren mittels einer Urm1-Sepharose-Säule

Es wurde hierfür 100g pelletierte und bei -80°C gelagerte Δ urm1-Hefe verwendet. Das gefrorene Pellet wurde mit der gleichen Menge gekühlter

5. Material und Methoden

Glasperlen (Sigma, Durchmesser 425-600nm) versetzt. Zudem wurde ein zweifaches Pellet-Volumen vom gekühlten Puffer A (50mM Tris-HCl [pH 7,2], 10mM MgCl₂, 0,2mM DTT) zugegeben. Die Suspension wurde anschließend in einen *Bead Beater*TM (Biospec Products) transferiert und das Gefäß komplett mit Eis bedeckt. Die Zellen wurden durch sechsfaches Mixen (30sec) und Abkühlen (5min) lysiert. Über ein Zellulose-Filter wurden die Glasperlen entfernt und das gefilterte Lysat daraufhin zentrifugiert (5min, 5000rpm, 4°C), um Zellbruchstücke zu entfernen. Der Überstand wurde mit ATP (2mM Endkonzentration) versetzt und anschließend auf die Urm1-Sepharose-Säule gegeben und für 1h inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Lysat mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5ml/min über die Säule laufen gelassen. Daraufhin wurde die Säule mit drei Säulenvolumen Puffer A, 1M KCl und 50mM Tris-HCl [pH 7,2] gewaschen. Zuletzt wurden gebundene Proteine, die mit Urm1 auf der Säule einen Thioester bildeten, mit einer reduktiven Elution (50mM Tris-HCl [pH 7,2], 100mM DTT) von der Säule eluiert. Die Proteine der letzten Waschschriffe und der Elutionsfraktion wurden mittels TCA-Fällung präzipitiert und in HU-Probenpuffer (100mM DTT) aufgenommen.

5.5.3 *In vitro* Methoden

5.5.3.1 *In vitro* Aktivitätstest

Um die Aktivität und Funktionalität der aufgereinigten Urm1 und Uba4 Proteine zu untersuchen wurden *in vitro* Aktivitätstests durchgeführt. Es ist bekannt, dass E1-Enzyme mit ihrem Ubl-Protein in Gegenwart von ATP einen Thioester bilden können. Hierzu wurden 3,5µg Urm1 mit 5,4µg Uba4 für 15min in einem *in vitro* Reaktions-Puffer (50mM Hepes [pH 7,6], 50mM KCl, 12mM Mg(OAc)₂, 0,1mM DTT, 2,5% glycerol, 2mM ATP) bei 30°C inkubiert (Reaktionsvolumen = 20µl). Anschließend wurden 5µl 5x HU-Puffer (-/+DTT) zugegeben und der Reaktionsansatz bei 65°C für 15min denaturiert.

5.5.3.2 *In vitro* „Urmylierungs“-Assay

Uba4 ist das einzige beschriebene Enzym des Urm1-Signalweges. Um zu überprüfen ob die Aktivität von Uba4 ausreicht Protein-Substrate mit Urm1 zu

5. Material und Methoden

modifizieren, wurde eine Urm1 in vitro Reaktion angesetzt. Dazu wurden 3µg Urm1 zusammen mit 200ng ^{GST}Uba4 und 5µg reduziertem oder oxidiertem Ahp1 in Modifikationspuffer (50mM Tris-HCl [pH 7,5], 5mM MgCl₂, 2mM ATP) für 2h bei 30°C in einem 20µl Reaktionsansatz inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5µl 5x HU-Puffer (-/+DTT) gestoppt und für 15min bei 65°C denaturiert.

6. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
λ	Wellenlänge
AD	Aktivierungs-Domäne von Gal4
Ahp1	<i>alkyl hydroxy peroxidase</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BD	DNA-Binde-Domäne von Gal4
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
CNBr	Cyanogen Bromid
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
D-loop	displacement loop
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonucleotid (N=A,T,G,C)
DNA	Desoxynuekleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
DUB	Deubiquitinierendes Enzym
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Ligase
ELP	Elongator-Protein-Komplex
g	1. Gramm, 2. Gravitationskoeffizient (9,81 m/sec ²)
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Glu	Glutamat
Gln	Glutamin
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Gluthathion S-Transferase
h	Stunde
HR	Homologe Rekombination
HU	Hydroxurea
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid
J	Joule
k	Kilo (x10 ³)
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Lys	Lysin
M	molar
MAT	<i>mating type</i>
mcm ⁵ U ₃₄	5-Methoxy-carbonyl-methyl-Gruppe an Uridin „Wobble“-Base

6. Abkürzungsverzeichnis

min	Minute
MMS	Methyl-Methan-Sulfonat
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
NEM	N-Ethylmaleimid
NHEJ	nicht-homologe Endverknüpfung
nm	Nanometer
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600\text{nm}$
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphatidyl-Ethanolamin
PEG	Polyethyenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PUP	<i>prokaryotic ubiquitin-like protein</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rhod	Rhodanese-Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
ROOH	Alkylhydrogenperoxide
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SC	<i>synthetic complete</i>
sec	Sekunde
SIM	SUMO Interaktions Motiv
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
s ² U ₃₄	Thio-Modifikation an Postion 2 der Uridin „Wobble“-Base
SUMO	small ubiquitin-like modifier
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid
t-BOOH	tert-Butyl Hydroperoxid
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
t-RNA	Transfer-RNA
U	<i>Unit</i>
U ₃₄	Uridin „Wobble“-Base an Postion 34 der tRNA
Uba	<i>ubiquitin associated domain</i>
Ubc	<i>ubiquitin conjugation</i>
Ubi	Ubiquitin
Ubl	ubiquitin-ähnliches Protein
UBP	Ubiquitin spezifische Protease
Urm1	<i>ubiquitin related modifier</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
Y2H	<i>yeast two hybrid</i>

6. Abkürzungsverzeichnis

YPD	Hefeextrakt/Pepton/Glukose (Medium)
ZEO	Zeocin
Ω	Ohm

7. Literaturverzeichnis

- Alani, E., Subbiah, S., and Kleckner, N. (1989). The yeast RAD50 gene encodes a predicted 153-kD protein containing a purine nucleotide-binding domain and two large heptad-repeat regions. *Genetics* 122, 47-57.
- Anderson, D.E., Trujillo, K.M., Sung, P., and Erickson, H.P. (2001). Structure of the Rad50 x Mre11 DNA repair complex from *Saccharomyces cerevisiae* by electron microscopy. *J Biol Chem* 276, 37027-37033.
- Baker, R.T., and Board, P.G. (1987). The human ubiquitin gene family: structure of a gene and pseudogenes from the Ub B subfamily. *Nucleic Acids Res* 15, 443-463.
- Bjork, G.R., Huang, B., Persson, O.P., and Bystrom, A.S. (2007). A conserved modified wobble nucleoside (mcm5s2U) in lysyl-tRNA is required for viability in yeast. *RNA* 13, 1245-1255.
- Bressan, D.A., Olivares, H.A., Nelms, B.E., and Petrini, J.H. (1998). Alteration of N-terminal phosphoesterase signature motifs inactivates *Saccharomyces cerevisiae* Mre11. *Genetics* 150, 591-600.
- Bryk, R., Griffin, P., and Nathan, C. (2000). Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* 407, 211-215.
- Burns, K.E., Liu, W.T., Boshoff, H.I., Dorrestein, P.C., and Barry, C.E., 3rd (2009). Proteasomal protein degradation in *Mycobacteria* is dependent upon a prokaryotic ubiquitin-like protein. *J Biol Chem* 284, 3069-3075.
- Burroughs, A.M., Balaji, S., Iyer, L.M., and Aravind, L. (2007). A novel superfamily containing the beta-grasp fold involved in binding diverse soluble ligands. *Biol Direct* 2, 4.
- Burroughs, A.M., Iyer, L.M., and Aravind, L. (2009). Natural history of the E1-like superfamily: implication for adenylation, sulfur transfer, and ubiquitin conjugation. *Proteins* 75, 895-910.
- Cadenas, E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 58, 79-110.
- Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., and Varshavsky, A. (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243, 1576-1583.
- Chen, L., Trujillo, K., Ramos, W., Sung, P., and Tomkinson, A.E. (2001). Promotion of Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes. *Mol Cell* 8, 1105-1115.

7. Literaturverzeichnis

- Cook, J.A., Gius, D., Wink, D.A., Krishna, M.C., Russo, A., and Mitchell, J.B. (2004). Oxidative stress, redox, and the tumor microenvironment. *Semin Radiat Oncol* 14, 259-266.
- D'Amours, D., and Jackson, S.P. (2002). The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 317-327.
- Daley, J.M., and Wilson, T.E. (2005). Rejoining of DNA double-strand breaks as a function of overhang length. *Mol Cell Biol* 25, 896-906.
- Daniel, J.A., and Grant, P.A. (2007). Multi-tasking on chromatin with the SAGA coactivator complexes. *Mutat Res* 618, 135-148.
- Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., and Davies, M.J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324 (Pt 1), 1-18.
- Dewez, M., Bauer, F., Dieu, M., Raes, M., Vandenhaute, J., and Hermand, D. (2008). The conserved Wobble uridine tRNA thiolase Ctu1-Ctu2 is required to maintain genome integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5459-5464.
- Dolganov, G.M., Maser, R.S., Novikov, A., Tosto, L., Chong, S., Bressan, D.A., and Petrini, J.H. (1996). Human Rad50 is physically associated with human Mre11: identification of a conserved multiprotein complex implicated in recombinational DNA repair. *Mol Cell Biol* 16, 4832-4841.
- Dudasova, Z., Dudas, A., and Chovanec, M. (2004). Non-homologous end-joining factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 28, 581-601.
- Fichtner, L., Jablonowski, D., Schierhorn, A., Kitamoto, H.K., Stark, M.J., and Schaffrath, R. (2003). Elongator's toxin-target (TOT) function is nuclear localization sequence dependent and suppressed by post-translational modification. *Mol Microbiol* 49, 1297-1307.
- Furukawa, K., Mizushima, N., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000). A protein conjugation system in yeast with homology to biosynthetic enzyme reaction of prokaryotes. *J Biol Chem* 275, 7462-7465.
- Goehring, A.S., Rivers, D.M., and Sprague, G.F., Jr. (2003a). Attachment of the ubiquitin-related protein Urm1p to the antioxidant protein Ahp1p. *Eukaryot Cell* 2, 930-936.
- Goehring, A.S., Rivers, D.M., and Sprague, G.F., Jr. (2003b). Urm1ylation: a ubiquitin-like pathway that functions during invasive growth and budding in yeast. *Mol Biol Cell* 14, 4329-4341.
- Guterman, A., and Glickman, M.H. (2004). Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome. *J Biol Chem* 279, 1729-1738.

7. Literaturverzeichnis

- Gutzke, G., Fischer, B., Mendel, R.R., and Schwarz, G. (2001). Thiocarboxylation of molybdopterin synthase provides evidence for the mechanism of dithiolene formation in metal-binding pterins. *J Biol Chem* 276, 36268-36274.
- Haas, A.L., Warms, J.V., Hershko, A., and Rose, I.A. (1982). Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J Biol Chem* 257, 2543-2548.
- Hershko, A. (1996). Lessons from the discovery of the ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* 21, 445-449.
- Hirano, T. (2002). The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev* 16, 399-414.
- Hochstrasser, M. (2000). Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nat Cell Biol* 2, E153-157.
- Hofmann, K., Bucher, P., and Kajava, A.V. (1998). A model of Cdc25 phosphatase catalytic domain and Cdk-interaction surface based on the presence of a rhodanese homology domain. *J Mol Biol* 282, 195-208.
- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 264, 13963-13966.
- Hopfner, K.P., Craig, L., Moncalian, G., Zinkel, R.A., Usui, T., Owen, B.A., Karcher, A., Henderson, B., Bodmer, J.L., McMurray, C.T., *et al.* (2002). The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* 418, 562-566.
- Huang, B., Johansson, M.J., and Bystrom, A.S. (2005). An early step in wobble uridine tRNA modification requires the Elongator complex. *RNA* 11, 424-436.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S., and Howley, P.M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2563-2567.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., *et al.* (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipitation. *Nature* 408, 488-492.
- Iyer, L.M., Burroughs, A.M., and Aravind, L. (2006). The prokaryotic antecedents of the ubiquitin-signaling system and the early evolution of ubiquitin-like beta-grasp domains. *Genome Biol* 7, R60.
- Jager, G., Leipuviene, R., Pollard, M.G., Qian, Q., and Bjork, G.R. (2004). The conserved Cys-X1-X2-Cys motif present in the TtcA protein is required for the thiolation of cytidine in position 32 of tRNA from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 186, 750-757.

7. Literaturverzeichnis

- Jentsch, S. (1992). The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet* 26, 179-207.
- Jentsch, S., and Pyrowolakis, G. (2000). Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol* 10, 335-342.
- Jeong, J.S., Kwon, S.J., Kang, S.W., Rhee, S.G., and Kim, K. (1999). Purification and characterization of a second type thioredoxin peroxidase (type II TPx) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 38, 776-783.
- Jones, C.N., Jones, C.I., Graham, W.D., Agris, P.F., and Spremulli, L.L. (2008). A disease-causing point mutation in human mitochondrial tRNA^{Met} results in tRNA misfolding leading to defects in translational initiation and elongation. *J Biol Chem* 283, 34445-34456.
- Keeney, S., and Neale, M.J. (2006). Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochem Soc Trans* 34, 523-525.
- Kennedy, R.D., and D'Andrea, A.D. (2005). The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes Dev* 19, 2925-2940.
- Kerscher, O., Felberbaum, R., and Hochstrasser, M. (2006). Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 159-180.
- Komada, M. (2008). Controlling receptor downregulation by ubiquitination and deubiquitination. *Curr Drug Discov Technol* 5, 78-84.
- Krogh, B.O., and Symington, L.S. (2004). Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet* 38, 233-271.
- Lee, J., Spector, D., Godon, C., Labarre, J., and Toledano, M.B. (1999). A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast. *J Biol Chem* 274, 4537-4544.
- Leidel, S., Pedrioli, P.G., Bucher, T., Brost, R., Costanzo, M., Schmidt, A., Aebersold, R., Boone, C., Hofmann, K., and Peter, M. (2009). Ubiquitin-related modifier Urm1 acts as a sulphur carrier in thiolation of eukaryotic transfer RNA. *Nature* 458, 228-232.
- Leimkuhler, S., and Rajagopalan, K.V. (2001). A sulfurtransferase is required in the transfer of cysteine sulfur in the in vitro synthesis of molybdopterin from precursor Z in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276, 22024-22031.
- Liakopoulos, D., Doenges, G., Matuschewski, K., and Jentsch, S. (1998). A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system. *EMBO J* 17, 2208-2214.
- Lisby, M., and Rothstein, R. (2004). DNA repair: keeping it together. *Curr Biol* 14, R994-996.

7. Literaturverzeichnis

Lockshon, D., Surface, L.E., Kerr, E.O., Kaeberlein, M., and Kennedy, B.K. (2007). The sensitivity of yeast mutants to oleic acid implicates the peroxisome and other processes in membrane function. *Genetics* 175, 77-91.

Longo, V.D., Gralla, E.B., and Valentine, J.S. (1996). Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J Biol Chem* 271, 12275-12280.

Lowell, B.B., and Shulman, G.I. (2005). Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307, 384-387.

Lu, J., Esberg, A., Huang, B., and Bystrom, A.S. (2008). *Kluyveromyces lactis* gamma-toxin, a ribonuclease that recognizes the anticodon stem loop of tRNA. *Nucleic Acids Res* 36, 1072-1080.

Lu, J., Huang, B., Esberg, A., Johansson, M.J., and Bystrom, A.S. (2005). The *Kluyveromyces lactis* gamma-toxin targets tRNA anticodons. *RNA* 11, 1648-1654.

Marelja, Z., Stocklein, W., Nimtz, M., and Leimkuhler, S. (2008). A novel role for human Nfs1 in the cytoplasm: Nfs1 acts as a sulfur donor for MOCS3, a protein involved in molybdenum cofactor biosynthesis. *J Biol Chem* 283, 25178-25185.

Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395, 395-398.

Moradas-Ferreira, P., Costa, V., Piper, P., and Mager, W. (1996). The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Mol Microbiol* 19, 651-658.

Moreau, S., Ferguson, J.R., and Symington, L.S. (1999). The nuclease activity of Mre11 is required for meiosis but not for mating type switching, end joining, or telomere maintenance. *Mol Cell Biol* 19, 556-566.

Mueller, E.G. (2006). Trafficking in persulfides: delivering sulfur in biosynthetic pathways. *Nat Chem Biol* 2, 185-194.

Muller, S., Hoegel, C., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2001). SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 202-210.

Nakai, Y., Nakai, M., and Hayashi, H. (2008). Thio-modification of yeast cytosolic tRNA requires a ubiquitin-related system that resembles bacterial sulfur transfer systems. *J Biol Chem* 283, 27469-27476.

Nakai, Y., Nakai, M., Lill, R., Suzuki, T., and Hayashi, H. (2007). Thio modification of yeast cytosolic tRNA is an iron-sulfur protein-dependent pathway. *Mol Cell Biol* 27, 2841-2847.

7. Literaturverzeichnis

Nathan, I., Dizdaroglu, M., Bernstein, L., Junker, U., Lee, C., Muegge, K., and Durum, S.K. (2000). Induction of oxidative DNA damage in u937 cells by TNF or anti-Fas stimulation. *Cytokine* 12, 881-887.

Nijman, S.M., Luna-Vargas, M.P., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M., Sixma, T.K., and Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123, 773-786.

Noma, A., Sakaguchi, Y., and Suzuki, T. (2009). Mechanistic characterization of the sulfur-relay system for eukaryotic 2-thiouridine biogenesis at tRNA wobble positions. *Nucleic Acids Res* 37, 1335-1352.

Ozkaynak, E., Finley, D., Solomon, M.J., and Varshavsky, A. (1987). The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *EMBO J* 6, 1429-1439.

Paques, F., and Haber, J.E. (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 349-404.

Pearce, M.J., Mintseris, J., Ferreyra, J., Gygi, S.P., and Darwin, K.H. (2008). Ubiquitin-like protein involved in the proteasome pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 322, 1104-1107.

Pedrajas, J.R., Kosmidou, E., Miranda-Vizuete, A., Gustafsson, J.A., Wright, A.P., and Spyrou, G. (1999). Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274, 6366-6373.

Pedrioli, P.G., Leidel, S., and Hofmann, K. (2008). Urm1 at the crossroad of modifications. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. *EMBO Rep* 9, 1196-1202.

Pickart, C.M. (2001). Ubiquitin enters the new millennium. *Mol Cell* 8, 499-504.

Ploegman, J.H., Drent, G., Kalk, K.H., Hol, W.G., Henrikson, R.L., Keim, P., Weng, L., and Russell, J. (1978). The covalent and tertiary structure of bovine liver rhodanese. *Nature* 273, 124-129.

Rajagopalan, K.V. (1997). Biosynthesis and processing of the molybdenum cofactors. *Biochem Soc Trans* 25, 757-761.

Rich, T., Allen, R.L., and Wyllie, A.H. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* 407, 777-783.

Scheffner, M., Nuber, U., and Huibregtse, J.M. (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 373, 81-83.

Schlieker, C.D., Van der Veen, A.G., Damon, J.R., Spooner, E., and Ploegh, H.L. (2008). A functional proteomics approach links the ubiquitin-related

7. Literaturverzeichnis

modifier Urm1 to a tRNA modification pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18255-18260.

Schmidt, M., Hanna, J., Elsasser, S., and Finley, D. (2005). Proteasome-associated proteins: regulation of a proteolytic machine. *Biol Chem* **386**, 725-737.

Schmitz, J., Chowdhury, M.M., Hanzelmann, P., Nimtz, M., Lee, E.Y., Schindelin, H., and Leimkuhler, S. (2008). The sulfurtransferase activity of Uba4 presents a link between ubiquitin-like protein conjugation and activation of sulfur carrier proteins. *Biochemistry* **47**, 6479-6489.

Sen, G.C., and Ghosh, H.P. (1976). Role of modified nucleosides in tRNA: effect of modification of the 2-thiouridine derivative located at the 5'-end of the anticodon of yeast transfer RNA Lys2. *Nucleic Acids Res* **3**, 523-535.

Shintani, T., Mizushima, N., Ogawa, Y., Matsuura, A., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *EMBO J* **18**, 5234-5241.

Song, L., and Rape, M. (2008). Reverse the curse--the role of deubiquitination in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 156-163.

Soulas-Sprauel, P., Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Le Guyader, G., Abramowski, V., Revy, P., and de Villartay, J.P. (2007). V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene* **26**, 7780-7791.

Stadtman, E.R., and Berlett, B.S. (1997). Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol* **10**, 485-494.

Striebel, F., Imkamp, F., Sutter, M., Steiner, M., Mamedov, A., and Weber-Ban, E. (2009). Bacterial ubiquitin-like modifier Pup is deamidated and conjugated to substrates by distinct but homologous enzymes. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 647-651.

Sugawara, N., Wang, X., and Haber, J.E. (2003). In vivo roles of Rad52, Rad54, and Rad55 proteins in Rad51-mediated recombination. *Mol Cell* **12**, 209-219.

Svejstrup, J.Q. (2007). Elongator complex: how many roles does it play? *Curr Opin Cell Biol* **19**, 331-336.

Taylor, S.V., Kelleher, N.L., Kinsland, C., Chiu, H.J., Costello, C.A., Backstrom, A.D., McLafferty, F.W., and Begley, T.P. (1998). Thiamin biosynthesis in *Escherichia coli*. Identification of this thiocarboxylate as the immediate sulfur donor in the thiazole formation. *J Biol Chem* **273**, 16555-16560.

Trivelli, X., Krimm, I., Ebel, C., Verdoucq, L., Prouzet-Mauleon, V., Chartier, Y., Tsan, P., Lauquin, G., Meyer, Y., and Lancelin, J.M. (2003).

7. Literaturverzeichnis

- Characterization of the yeast peroxiredoxin Ahp1 in its reduced active and overoxidized inactive forms using NMR. *Biochemistry* 42, 14139-14149.
- Tsukamoto, Y., Taggart, A.K., and Zakian, V.A. (2001). The role of the Mre11-Rad50-Xrs2 complex in telomerase-mediated lengthening of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *Curr Biol* 11, 1328-1335.
- Urbonavicius, J., Skouloubris, S., Myllykallio, H., and Grosjean, H. (2005). Identification of a novel gene encoding a flavin-dependent tRNA:m5U methyltransferase in bacteria--evolutionary implications. *Nucleic Acids Res* 33, 3955-3964.
- Verdoucq, L., Vignols, F., Jacquot, J.P., Chartier, Y., and Meyer, Y. (1999). In vivo characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family. *J Biol Chem* 274, 19714-19722.
- Vignols, F., Brehelin, C., Surdin-Kerjan, Y., Thomas, D., and Meyer, Y. (2005). A yeast two-hybrid knockout strain to explore thioredoxin-interacting proteins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16729-16734.
- Wang, X., Jia, H., Jankowsky, E., and Anderson, J.T. (2008). Degradation of hypomodified tRNA(iMet) in vivo involves RNA-dependent ATPase activity of the DExH helicase Mtr4p. *RNA* 14, 107-116.
- Westley, J. (1973). Rhodanese. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 39, 327-368.
- White, C.I., and Haber, J.E. (1990). Intermediates of recombination during mating type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 9, 663-673.
- Wiborg, O., Pedersen, M.S., Wind, A., Berglund, L.E., Marcker, K.A., and Vuust, J. (1985). The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences. *EMBO J* 4, 755-759.
- Wilkinson, K.D. (1997). Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J* 11, 1245-1256.
- Williams, R.S., Williams, J.S., and Tainer, J.A. (2007). Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochem Cell Biol* 85, 509-520.
- Wiltzius, J.J., Hohl, M., Fleming, J.C., and Petrini, J.H. (2005). The Rad50 hook domain is a critical determinant of Mre11 complex functions. *Nat Struct Mol Biol* 12, 403-407.
- Xu, J., Zhang, J., Wang, L., Zhou, J., Huang, H., Wu, J., Zhong, Y., and Shi, Y. (2006). Solution structure of Urm1 and its implications for the origin of protein modifiers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11625-11630.

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich ganz herzlich bei Stefan Jentsch bedanken. Seine Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft hatten maßgeblichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit. Seine Tür stand immer offen für jegliche Fragen und Diskussionen.

Zudem möchte ich mich bei den Mitgliedern der Prüfungskommission bedanken. Insbesondere gilt mein Dank Prof. Dr. Angelika Böttger für die Begutachtung dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Jörg, Michi, Marian und Tim für das kritische Lesen dieser Arbeit bedanken.

Grosser Dank gilt der gesamten Jentsch-Abteilung. Es war mir eine sehr grosse Freude in der lockeren und ungezwungenen Atmosphäre zu arbeiten. Besonderer Dank geht an Chris-chan und Mikele, die zu guten Freunden wurden und auch außerhalb des Labors für eine gute Zeit in München sorgten. Auch bei Jörg, Sven, Max, Timmy, Steven, Natalie, Ivan, Dirk und Dirk möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und Stimmung in unserem Labor bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Moni, die mein Leben enorm bereichert und mir gerade zum Ende meiner Arbeit die nötige Ruhe und Kraft gegeben hat.

Bei meiner Mutter möchte ich mich für Ihre Unterstützung und für alles, was Sie während meiner Promotionszeit für mich getan hat, bedanken.

Zuletzt möchte ich meinem Vater danken, der mich immer ermutigt hat meinen Interessen nachzugehen und mich in allen meinen Entscheidungen unterstützt hat. Diese Arbeit wäre ohne seine Geduld und Hilfe so nicht möglich gewesen.

Lebenslauf

Name Karl Kenji Schorpp
Adresse Gabelsbergerstr. 48a, 80333 München
Geburtstag 27.09.1980
Geburtsort Würzburg

Schule

1986-1990 Grundschule in Randersacker
1990-1999 Wirsberg-Gymnasium Würzburg
Abschluss mit Abitur im Juni 1999

Studium

1999-2001 Grundstudium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vordiplom im Oktober 2001

2001-2004 Hauptstudium im Studiengang Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Diplom)

Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Universität Würzburg über die „Analyse der Initiation der chromosomalen DNA-Replikation mit Hilfe von siRNA“
(Prof. Dr. F. Grummt)

Abschluss mit Diplom im Juli 2004

Doktorarbeit

2004-2010 Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried/ München
Abteilung Molekulare Zellbiologie
(Prof. Dr. S. Jentsch)