Regulation des Rekombinationsfaktors Rad52 durch Modifikation mit SUMO

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

vorgelegt von
Diplom-Biologe
Meik Sacher

17. August 2006

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.

Meik Sacher

München, 17. 08. 2006

Promotionsgesuch eingereicht:	17.08.2006
Tag der mündlichen Prüfung:	18.09.2006
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Stefan Jentsch
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Peter B. Becker

“The process of genetic recombination is in danger of becoming popular.”

S. C. West (2003)

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen August 2001 und August 2006 unter der Anleitung von Prof. Dr. Stefan Jentsch am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Sacher, M., Pfander, B., Hoege, C., und Jentsch, S. (2006). Control of Rad52 recombination activity by double-strand-break-induced SUMO modification. *Nat Cell Biol*, 01. Oktober 2006, doi: 10.1038/ncb1488.

I ZUSAMMENFASSUNG 1

II EINLEITUNG 2

II.1 Proteine der Ubiquitin-Familie 2

II.1.1 Das Ubiquitin-Konjugationssystem und Funktionen von Ubiquitin 2

II.1.2 Das SUMO-Konjugationssystem 5

II.1.3 Funktionen und Substrate von SUMO 7

II.2 DNA-Reparatur 10

II.3 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen 13

II.3.1 Nicht-homologe Endverknüpfung 13

II.3.2 Homologe Rekombination 14

II.4 Zielsetzung 19

III ERGEBNISSE 20

III.1 Rad52 als SUMO-Substrat 20

III.1.1 Aufreinigung von SUMO-Substraten aus *S. cerevisiae* 20

III.1.2 Das SUMO-Substrat Rad52 in *S. cerevisiae* 21

III.1.3 Die Akzeptorlysine in *S. cerevisiae* 23

III.1.4 Das SUMO-Substrat Rad52 in *Homo sapiens* 26

III.2 Regulation der Rad52-SUMOylierung 26

III.2.1 Regulation der Rad52-SUMOylierung in meiotischen Zellen 26

III.2.2 Regulation der Rad52-SUMOylierung in mitotischen Zellen 29

III.3 Rolle der Rad52-SUMOylierung in DNA-Reparatur und Rekombination 33

III.3.1 SUMOylierungsdefiziente Rad52-Mutanten in der DNA-Reparatur 33

III.3.2 SUMOylierung von Rad52 ist pro-rekombinatorisch 33

III.4 Rad52-SUMOylierung beeinflusst die Proteinaktivität und die Proteinstabilität 38

III.4.1 Rad52-SUMOylierung ist toxisch in Helikasemutanten 38

III.4.2 SUMOylierung von Rad52 erhöht die Proteinstabilität 41

IV DISKUSSION 44

IV.1 Rad52-SUMOylierung wird reguliert 44

IV.2 Modifikation mit SUMO reguliert die Aktivität von Rad52 47

IV.3 Zusammenspiel von Ubiquitin und SUMO bei der Regulation von Rad52 49

V MATERIAL UND METHODEN 55

V.1 Computeranalysen 55

V.2 Mikrobiologische und genetische Techniken 55

V.2.1 Arbeitstechniken für *Escherichia coli* 55

V.2.2 Arbeitstechniken für *Saccharomyces cerevisiae* 57

V.3 Zellbiologische Techniken 69

V.4 Molekularbiologische Techniken 70

V.4.1 Isolierung von DNA 70

V.4.2 Polymerase-Kettenreaktion 71

V.4.3 Klonierung von Plasmidkonstrukten 72

V.5 Proteinbiochemische Techniken 73

V.5.1 Gel- und Westernblot-Techniken 73

V.5.2 Herstellung von Zellextrakten und Aufreinigungen 75

VI LITERATURVERZEICHNIS 80

Danksagung

Lebenslauf

I ZUSAMMENFASSUNG

Der Erhalt der genomischen Integrität ist für das Überleben von Organismen notwendig, jedoch können verschiedene DNA-Läsionen das genetische Material gefährden. DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) stellen dabei eine besonders toxische DNA-Läsion dar, und schon ein einzelner DSB kann bei ausbleibender oder fehlerhafter Reparatur zum Absterben der Zelle führen. In höheren Eukaryonten gibt es zwei Mechanismen für die Reparatur eines DSB: nicht-homologe Endverknüpfung und homologe Rekombination. Bei der homologen Rekombination spielt der Rekombinationsfaktor Rad52 eine zentrale Rolle und wurde zu Beginn dieser Arbeit als ein Substrat für eine posttranslationale Modifikation mit SUMO identifiziert. Daraufhin wurde die Regulation von Rad52 durch die Modifikation mit SUMO untersucht.

So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die SUMOylierung von Rad52 in *Saccharomyces cerevisiae* hauptsächlich an zwei nicht konservierten Lysinresten außerhalb der hoch konservierten Rad52-Domäne erfolgt und eng an Rekombinations- und DNA-Reparaturereignisse gekoppelt ist. So wird die Rad52-SUMOylierung durch enzymatische DSB während der Meiose und durch chemisch induzierte DSB in mitotischen Zellen ausgelöst. Hierfür ist der MRX-Komplex (bestehend aus Mre11, Rad50 und Xrs2) notwendig, der vor Rad52 im Rekombinationsprozess aktiv ist.

Des Weiteren zeigt die vorliegende Arbeit, dass Zellen mit einer Rad52-Mutante, die nicht mehr mit SUMO modifiziert werden kann, keine auffälligen Wachstumsdefekte aufweisen, beispielsweise weder in Gegenwart DNA-schädigender Agenzien noch in der Meiose. Allerdings hat die SUMOylierung einen pro-rekombinatorischen Einfluss auf Rad52. Denn zum einen können Zellen, in denen zwei der Helikasen Rrm3, Sgs1 oder Srs2 deletiert sind, in Gegenwart von SUMOylierungsdefizientem Rad52 wachsen, da vermutlich keine toxischen Rekombinationsintermediate mehr entstehen wie in Gegenwart von Wildtyp Rad52. Zum anderen weisen Zellen mit SUMOylierungsdefizientem Rad52 Defekte bei speziellen Rekombinationsreaktionen auf. Die SUMOylierung schützt Rad52 zudem vor dem Abbau durch das Proteasom und ist besonders für die Rad52-Moleküle relevant, die am Rekombinationsgeschehen beteiligt sind. Diese Arbeit zeigt somit, dass die SUMOylierung von Rad52 die Aktivität des Rekombinationsfaktors dadurch reguliert, dass die im Rekombinationsprozess involvierten Rad52-Moleküle vor einem vorzeitigen Abbau geschützt werden.

II EINLEITUNG

II.1 Proteine der Ubiquitin-Familie

Zu den Regulationsmechanismen, mit deren Hilfe eine Zelle die Funktion von Proteinen steuert, gehören posttranslationale Modifikationen. Diese kovalenten Veränderungen sind reversible, schnelle Mechanismen und werden an einzelnen oder mehreren Aminosäureresten des Zielproteins vollzogen. Durch die Abänderung der Substrateigenschaften können so je nach Modifikation verschiedene Prozesse wie die Lokalisierung, die Aktivität, der Abbau oder die Interaktion mit anderen Proteinen bestimmt werden. So regulieren Phosphorylierungen, Acetylierungen, Lipidierungen, Glykosylierungen, Methylierungen oder Modifikationen mit Proteinen der Ubiquitinfamilie verschiedene zelluläre Prozesse wie die DNA-Replikation, den Zellzyklus oder die Genexpression (Welchman *et al.*, 2005).

Bei Modifikationen mit Ubiquitin-ähnlichen Proteinen (UBL, *ubiquitin like*) werden kleine Proteine kovalent mit einem Zielprotein verbunden. Dabei wird eine für das jeweilige UBL konservierte Konjugationsmaschinerie eingesetzt, die den C-Terminus eines UBLs mit einem Lysin des Substrates über eine Isopeptidbindung verknüpft. Zudem ist für die UBLs charakteristisch, dass sie sich trotz einer geringen Sequenzhomologie in ihrer Raumstruktur (*ubiquitin fold*) ähneln und innerhalb der Eukaryonten hoch konserviert sind. Neben dem Namensgeber Ubiquitin gehören zur UBL-Familie die Proteine SUMO, Rub1 (NEDD8), Atg12, Atg8, Urm1, ISG15, FAT10 und FUB1 (Müller *et al.*, 2001; Schwartz und Hochstrasser, 2003; Welchman *et al.*, 2005). Während Ubiquitin und SUMO an eine Reihe von Substraten konjugiert werden und so eine Vielzahl von Proteinen und Prozessen regulieren (siehe Abschnitte II.1.1 und II.1.3), weisen die anderen UBLs ein wesentlich kleineres Substratspektrum auf bzw. sind in ihrer Funktion noch nicht charakterisiert.

II.1.1 Das Ubiquitin-Konjugationssystem und Funktionen von Ubiquitin

Ubiquitin ist ein hoch konserviertes Protein, das aus 76 Aminosäuren besteht. In seiner räumlichen Struktur sind nur die vier C-terminalen Aminosäuren exponiert,

darunter ganz am C-Terminus das Doppelglycinmotiv, das für die Konjugation von Ubiquitin essenziell ist (Vijay-Kumar *et al.*, 1987). Die Konjugation erfolgt in einer dreistufigen Enzymkaskade (**Abb. 1**), wobei als erstes das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) Ubiquitin in einer ATP-abhängigen Reaktion aktiviert (Pickart, 2001). Dabei wird Ubiquitin kovalent mit einem Cysteinrest im aktiven Zentrum des E1 zu einem Thioester verknüpft. Im zweiten Schritt erfolgt der Transfer von Ubiquitin auf das Cystein im aktiven Zentrum eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2 oder Ubc), wieder unter Ausbildung eines Thioesters. Schließlich katalysiert das E3 (Ubiquitin-ligierendes Enzym) die kovalente Verknüpfung von Ubiquitin mit der ε-Aminogruppe eines Lysins. Dabei kann Ubiquitin im Falle von RING E3-Ligasen direkt auf das Substrat übertragen werden oder im Falle von HECT E3-Ligasen erst nach Ausbildung eines zwischenzeitlichen Thioesters mit einem Cystein der Ubiquitinligase. Wird nur ein einzelner Ubiquitinrest auf das Substrat übertragen, spricht man von Mono-Ubiquitylierung. Die Reaktion kann aber auch mehrfach durchlaufen werden, wodurch sich Ubiquitinketten ausbilden. In einigen Fällen ist dieser Kaskade noch die Aktivität eines Multi-Ubiquitylierungsfaktors (E4) nachgeschaltet, der zur Verlängerung bereits vorhandener Ubiquitinketten beiträgt. Die große Zahl an Ubiquitinligasen, die die Substratspezifität bewerkstelligen, ermöglicht es somit, zahlreiche Proteine mit Ubiquitin zu modifizieren (Pickart und Eddins, 2004).

Proteine können mit einem einzelnen Ubiquitin oder mit Ubiquitinketten an einzelnen oder mehreren Lysinen modifiziert werden. Die Konsequenzen der Ubiquitylierung hängen dabei von der Länge der Ubiquitinkette ab und davon, über welche internen Lysine mehrere Ubiquitinreste zu einer Kette verknüpft sind. Ketten mit vier oder mehr Ubiquitinresten, die über den internen Lysinrest K48 oder K29 verbunden sind, bewirken den Abbau von Substraten (Pickart, 2001). In *S. cerevisiae* erkennen und binden Substratrezeptoren wie Dsk2, Rad23, Rpt5 und Rpn10 solche Substrate und vermitteln deren Interaktion zum 26S Proteasom (Madura, 2004; Richly *et al.*, 2005; Welchman *et al.*, 2005). Das Proteasom wiederum ist ein hoch konservierter Proteasekomplex, der für den eigentlichen Abbau verantwortlich ist, indem es die Substratproteine entfalten und proteolytisch verdauen kann, während die Ubiquitinreste recycelt werden (Bochtler *et al.*, 1999; Voges *et al.*, 1999). Zum einen werden nicht funktionelle, falsch gefaltete Proteine über das Proteasom abgebaut, zum anderen können auch die Aktivitäten

bestimmter Proteine in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen oder vom Zellzyklus durch den gezielten Abbau reguliert werden.

Im Gegensatz dazu haben die Mono-Ubiquitylierung oder die Verknüpfung mit Ubiquitinketten, die über K63 verbunden sind, andere Folgen für ein Substrat (Pickart und Fushman, 2004). Diese Arten der Ubiquitylierung sind an verschiedenen Prozessen wie der DNA-Reparatur (Garcia-Higuera *et al.*, 2001; Hoege *et al.*, 2002), dem Vesikeltransport (Hicke und Dunn, 2003), der Endozytose (Hicke und Dunn, 2003), der Kontrolle der Transkription (Muratani und Tansey, 2003) und der Aktivierung von Kinasen bei der Entzündungsantwort (Sun und Chen, 2004) beteiligt.

Die Ubiquitylierung ist ein reversibler Prozess, bei dem Ubiquitin mit Hilfe von deubiquitylierenden Enzymen (DUB) vom Substrat abgespalten wird (Amerik und Hochstrasser, 2004). Neben dem Recycling von Ubiquitin am Proteasom können DUB auch die Aktivität von Substraten durch die Revertierung der Ubiquitylierung regulieren. Zudem sind sie für die Prozessierung der Ubiquitin-Vorläufer notwendig, da DUB durch die hydrolytische Spaltung der Vorläufermoleküle die für die Konjugation wichtigen Doppelglycinmotive am C-Terminus von Ubiquitin generieren.

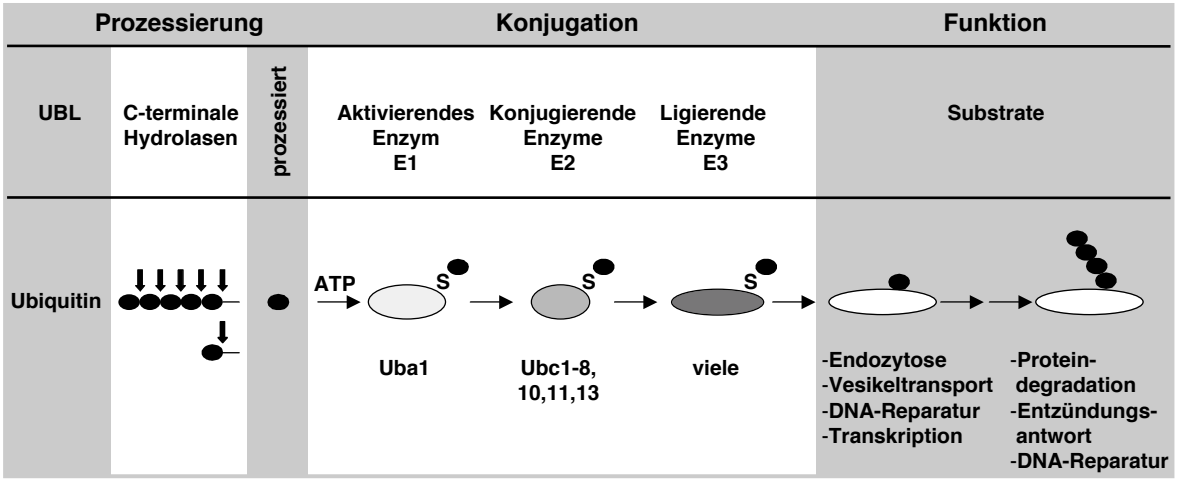

Abb. 1: Übersicht über das Ubiquitin-Konjugationssystem
Die spezifische Modifikation von Proteinen mit Ubiquitin erfolgt über das Ubiquitin-Konjugationssystem. Vor einer Konjugation müssen die Vorläuferformen von Ubiquitin am C-Terminus von einer Hydrolase prozessiert werden. Die Konjugation wird dann in einer dreistufigen Enzymkaskade aus aktivierenden, konjugierenden und ligierenden Enzymen vollzogen. Das „S“ steht für die Ausbildung eines Thioesters zwischen Enzym und Ubiquitin. Je nach Beschaffenheit der Modifikation durch Ubiquitin dient die Ubiquitylierung als Signal für verschiedene Vorgänge.

II.1.2 Das SUMO-Konjugationssystem

Genau wie Ubiquitin gehört SUMO zur UBL-Familie und stellt ein in allen Eukaryonten konserviertes Protein dar. In fast allen Organismen, in denen SUMO vorkommt, ist das entsprechende Gen essenziell bzw. für ein normales Wachstum wichtig. Während es in *S. cerevisiae* nur ein Gen für SUMO gibt (*SMT3*), gibt es im Menschen vier Isoformen von SUMO (SUMO-1, -2, -3, -4). Diese Isoformen unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer N-terminalen Domäne. Ob sie jedoch unterschiedliche Funktionen erfüllen, ist bislang unklar (Müller *et al.*, 2001; Dohmen, 2004; Johnson, 2004).

Wie Ubiquitin wird auch SUMO als Vorläuferprotein synthetisiert, das vor einer Konjugation erst durch eine SUMO-spezifische Protease (Ulp1) prozessiert werden muss (Li und Hochstrasser, 1999). Dadurch entsteht ein C-terminales Doppelglycinmotiv, das anschließend an die ε-Aminogruppe eines Lysins von Zielproteinen konjugiert werden kann. Der Konjugationsmechanismus ist dem von Ubiquitin sehr ähnlich und vollzieht sich ebenfalls in einer dreistufigen Enzymkaskade (**Abb. 2**). Zunächst wird maturiertes SUMO in einer ATP-abhängigen Reaktion von einem SUMO-aktivierenden Enzym aktiviert (E1, ein Heterodimer aus Aos1 und Uba2). Das E1 bildet dabei einen Thioester zwischen dem C-terminalen Glycin von SUMO und einem internen Cystein aus (Johnson *et al.*, 1997). Im darauf folgenden Schritt wird das aktivierte SUMO auf ein Cystein des SUMO-konjugierenden Enzyms Ubc9 (E2) übertragen (Johnson und Blobel, 1997; Schwarz *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu den E2-Enzymen des Ubiquitinsystems kann Ubc9 Substrate direkt binden, so dass nicht immer eine E3-Aktivität für eine SUMOylierung notwendig ist. Allerdings stimulieren SUMO-ligierende Enzyme (E3) häufig eine Konjugation. Diese SUMO-Ligasen werden in drei unterschiedliche Gruppen eingeteilt. So unterscheidet man E3-Ligasen der SP-RING-Familie von RanBP2 und PC2 (Johnson, 2004). In *S. cerevisiae* sind drei SUMO-Ligasen der SP-RING-Familie bekannt: Siz1, Siz2 und Mms21 (Johnson und Gupta, 2001; Takahashi *et al.*, 2001a; Takahashi *et al.*, 2001b; Zhao und Blobel, 2005). Die SUMOylierung von Substraten erfolgt häufig an so genannten Konsensusmotiven. Dabei werden die Lysine mit SUMO modifiziert, die Teil einer ψKxE-Sequenz sind (ψ steht für eine hydrophobe Aminosäure) (Johnson und Blobel, 1999), welche auch von Ubc9 erkannt werden kann (Bernier-Villamor *et al.*, 2002). Allerdings erfolgt

nicht an allen Konsensusmotiven eine SUMOylierung. Zudem gibt es verschiedene Beispiele für Akzeptorlysine, die nicht Bestandteil eines solchen Motivs sind. In diesen Fällen entscheiden offensichtlich andere Faktoren über die SUMOylierung. Meist werden Substrate an nur einem Akzeptorlysin mit SUMO modifiziert, in manchen Fällen wurde jedoch auch die SUMOylierung eines Proteins an mehreren Lysinresten beschrieben (Hoege *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2004). Analog zu Ubiquitin kann auch SUMO über interne Lysine zu Ketten verknüpft werden. Dies wurde sowohl für Smt3 als auch für SUMO-2 und SUMO-3 nachgewiesen (Tatham *et al.*, 2001; Bylebyl *et al.*, 2003). Jedoch ist bislang unklar, ob konjugierte SUMO-Ketten eine andere Funktion erfüllen als ein einzelnes konjugiertes SUMO-Molekül.

Auch die SUMOylierung ist ein reversibler Prozess, der von entsprechenden SUMO-dekonjugierenden Enzymen revertiert werden kann. In *S. cerevisiae* sind die beiden Proteine Ulp1 und Ulp2 für das Abspalten von SUMO von Substraten verantwortlich (Li und Hochstrasser, 1999; Li und Hochstrasser, 2000; Schwienhorst *et al.*, 2000). Beide sind Cysteinproteasen und wie auch die SUMO-dekonjugierenden Enzyme in höheren Eukaryonten gehören sie zur ULP-Familie. Dennoch unterscheiden sich Ulp1 und Ulp2 durch verschiedene Merkmale. So ist Ulp1 an der Kernpore, Ulp2 hingegen im Nukleus lokalisiert. Außerdem ist Ulp1 im Gegensatz zu Ulp2 für die Prozessierung des SUMO-Vorläuferproteins

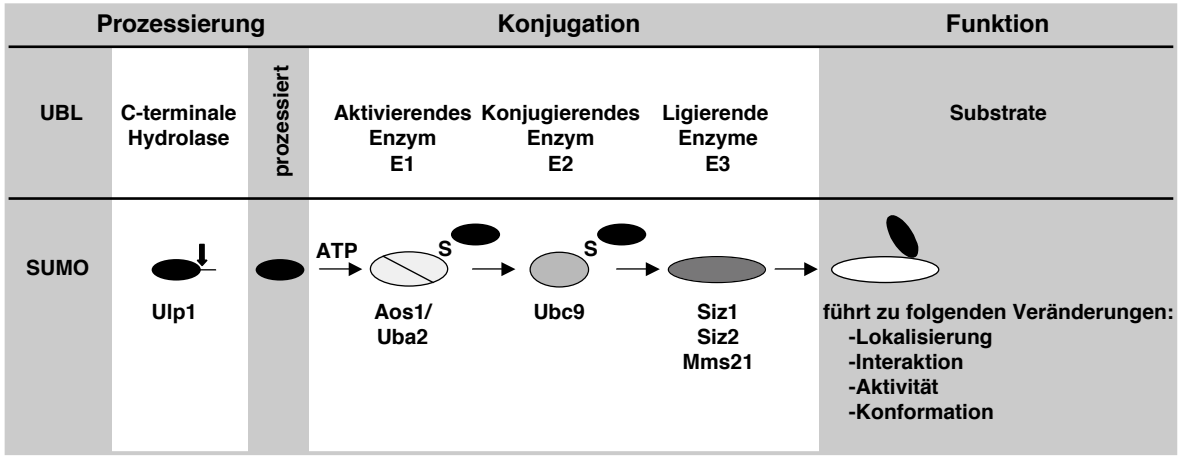

Abb. 2: Übersicht über das SUMO-Konjugationssystem
Die spezifische Modifikation von Proteinen mit SUMO erfolgt über das SUMO-Konjugationssystem. Vor einer Konjugation muss die Vorläuferform von SUMO am C-Terminus von einer Hydrolase prozessiert werden. Die Konjugation wird dann in einer dreistufigen Enzymkaskade aus aktivierenden, konjugierenden und ligierenden Enzymen vollzogen. Das „S“ steht für die Ausbildung eines Thioesters zwischen Enzym und SUMO. Je nach Beispiel führt die Modifikation mit SUMO zu verschiedenen Veränderungen der Substrateigenschaften.

verantwortlich. Darüber hinaus ist das Gen *ULP1* für Hefen essenziell (Li und Hochstrasser, 1999; Li und Hochstrasser, 2000). Ähnlich wie beim Ubiquitinsystem lässt sich vermuten, dass auch SUMO-Substrate über Konjugation und Dekonjugation reguliert werden, da Mutationen in *ULP1* oder *ULP2* zu ausgeprägten Phänotypen und schweren Wachstumsdefekten führen. Inwieweit diese Art der Regulation tatsächlich erfolgt, ist noch nicht geklärt.

II.1.3 Funktionen und Substrate von SUMO

Die Modifikation mit SUMO kann sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus erfolgen, wobei der Großteil der beschriebenen SUMO-Substrate Kernfunktionen erfüllt. Verschiedene proteomische Ansätze haben in den vergangenen Jahren die Anzahl der bekannten SUMO-Substrate auf über Hundert erhöht (Li *et al.*, 2004; Panse *et al.*, 2004; Vertegaal *et al.*, 2004; Wohlschlegel *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004; Denison *et al.*, 2005; Hannich *et al.*, 2005; Rosas-Acosta *et al.*, 2005; Wykoff und O'Shea, 2005; Zhou *et al.*, 2005). Generell kann eine Modifikation mit SUMO bewirken, dass sich Protein-Protein-Interaktionen, die Aktivität eines Substrates, die Lokalisierung oder die Stabilität verändern. Zum Teil werden diese Folgen durch Proteine vermittelt, die SUMOylierte Proteine und SUMO mit Hilfe eines SUMO-interagierenden Motivs (SIM) binden (Minty *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2004; Hannich *et al.*, 2005; Pfander *et al.*, 2005). Allerdings konnte die Funktion von SUMO im biologischen Kontext mit einem Substrat bisher nur in wenigen Fällen geklärt werden. Da dieser Zusammenhang jedoch für das Verständnis der SUMO-Modifikation wichtig ist, wird im Folgenden auf einige Beispiele eingegangen, anhand derer sich die Funktionen der SUMOylierung am besten zeigen lassen.

Viele der bekannten SUMO-Substrate in Säugetierzellen sind Transkriptionsfaktoren, die durch die Modifikation mit SUMO in ihrer Aktivität reguliert werden. In den meistens Fällen wird die Transkription reprimiert, in einigen Fällen jedoch auch aktiviert. Die Repression erfolgt auf drei verschiedenen Wegen (Dohmen, 2004; Gill, 2004; Müller *et al.*, 2004; Hay, 2005). Erstens scheint die DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren durch eine SUMOylierung inhibiert werden zu können (Anckar *et al.*, 2006). Zweitens wird durch die SUMOylierung eines Transkriptionsfaktors die Rekrutierung von weiteren Proteinen ermöglicht

(Corepressoren), die die Transaktivierung verhindern können (Gill, 2004; Müller *et al.*, 2004; Yang und Sharrocks, 2004). In einigen Fällen spielen hierbei auch Histondeacetylasen eine Rolle, die das *silencing* verstärken (Girdwood *et al.*, 2003; Shiio und Eisenman, 2003). Eine dritte Möglichkeit stellt die Lokalisierung von Transkriptionsfaktoren infolge ihrer SUMO-Modifikation in spezielle, subnukleäre Bereiche dar (Khan *et al.*, 2001). Diese so genannten *nuclear bodies* reprimieren die in ihnen enthaltenen Transkriptionsfaktoren unter Ausbildung von Komplexen aus Corepressoren und Histondeacetylasen. Diese Bereiche überlappen in einigen Fällen auch mit den PML *nuclear bodies*, in denen zahlreiche SUMO-Substrate lokalisiert sind (Gill, 2004; Müller *et al.*, 2004). Zu den Beispielen für ein Substrat, bei dem eine Modifikation mit SUMO transkriptionsfördernd ist, zählt der Glucocorticoidrezeptor, jedoch ist die Wirkungsweise unbekannt (Le Drean *et al.*, 2002).

Auch für den Zellzyklus spielt SUMO eine wichtige Rolle. So arretieren in *S. cerevisiae* Mutanten der SUMO-Konjugationsmaschinerie (E1- und E2-Enzyme) sowie des SUMO-dekonjugierenden Enzyms Ulp1 am Übergang von der G2-Phase zur Mitose (Seufert *et al.*, 1995; Johnson und Blobel, 1997; Li und Hochstrasser, 1999). Zudem zeigt eine bestimmte SUMO-Mutante einen Defekt bei der mitotischen Chromosomensegregation (Biggins *et al.*, 2001). Auch die durch den Zellzyklus gesteuerte Chromosomenkohäsion unterliegt einer Regulation durch SUMO (Bachant *et al.*, 2002; Stead *et al.*, 2003). Sowohl die SUMOylierung der Topoisomerase II (Top2) als auch des Kohäsionsfaktors Pds5 fördern die Auflösung der Chromosomenkohäsion (Bachant *et al.*, 2002; Stead *et al.*, 2003). Zudem wird in *S. cerevisiae* die SUMO-Modifikation von PCNA und von den Septinen zellzyklusspezifisch reguliert (Johnson und Blobel, 1999; Hoege *et al.*, 2002).

Eine weitere Funktion von SUMO zeigt sich beim Transport von Proteinen zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma. An den Kernporen lokalisieren Enzyme sowohl der SUMO-Konjugationsmaschinerie als auch der Dekonjugationsmaschinerie (Takahashi *et al.*, 2000; Pichler *et al.*, 2002; Seeler und Dejean, 2003). So weisen in *S. cerevisiae* und *Drosophila melanogaster* Mutanten mit Defekten in der SUMO-Konjugation einen gestörten Kernimport von Proteinen auf (Epps und Tanda, 1998; Stade *et al.*, 2002). Zudem ist in Säugetierzellen das häufigste SUMO-Substrat die GTPase RanGAP1, die den für den Import wichtigen Faktor Ran aktiviert (Matunis *et al.*, 1996; Mahajan *et al.*, 1997). Demnach könnte

der Transport in den Kern generell durch SUMO reguliert sein. Darüber hinaus gibt es konkrete Beispiele, bei denen die SUMOylierung von Proteinen entweder den Transport aus dem Zytoplasma in den Kern oder aber umgekehrt bewirkt (Sobko *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003; Wood *et al.*, 2003).

Eine weitere Funktionsweise von SUMO ergibt sich aus dessen antagonistischer Rolle gegenüber Ubiquitin. So kann der für die Entzündungsantwort wichtige Faktor IκBα an demselben Lysinrest entweder mit SUMO oder mit Ubiquitin modifiziert werden. Während die Modifikation mit SUMO IαBα vor einer Degradation schützt, führt die Ubiquitylierung zum Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System (Desterro *et al.*, 1998). Ein ähnlicher Mechanismus scheint für Phosducin zu gelten, welches G-Proteine in ihrer Signalgebung reguliert. Zwar wird in diesem Beispiel nicht dasselbe Lysin mit Ubiquitin und SUMO modifiziert, aber auch hier schützt die SUMOylierung vor dem Abbau. Gegenüber WT (Wildtyp) Phosducin wird eine SUMOylierungsdefiziente Phosducin-Mutante stärker ubiquityliert und ist instabiler (Klenk *et al.*, 2006). Auch der essenzielle Replikationsfaktor PCNA kann an ein und demselben Lysin mit SUMO und Ubiquitin modifiziert werden (Hoege *et al.*, 2002). Das führt je nach Modifikation zu unterschiedlichen Konsequenzen. Bei PCNA bewirkt die Ubiquitylierung anders als in den vorangegangenen Beispielen nicht den Abbau, sondern reguliert in Abhängigkeit von der Anzahl der Ubiquitinreste (Ubiquitinkette mit Verknüpfung über K63 gegenüber Mono-Ubiquitin), wie eine DNA-Läsion während der Replikation repariert wird (fehlerfrei oder möglicherweise fehlerhaft) (Hoege *et al.*, 2002). Dagegen verhindert die Modifikation mit SUMO Rekombinationsereignisse während der S-Phase, indem die Helikase Srs2 rekrutiert wird (Pfander *et al.*, 2005).

Neben PCNA werden noch weitere Proteine mit SUMO modifiziert, die für die Genomstabilität von Bedeutung sind. So werden in menschlichen Zellen der Tumorsuppressor p53, die Topoisomerasen I und II, die Helikasen WRN und BLM sowie der Nukleotid-Exzisions-Reparaturfaktor XPC mit SUMO modifiziert (Gostissa *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 1999; Kawabe *et al.*, 2000; Mao *et al.*, 2000a; Mao *et al.*, 2000b; Mo *et al.*, 2002; Eladad *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). In allen Fällen erfolgt dabei die SUMOylierung nach Induktion von DNA-Schäden. Die SUMO-Modifikation kann dabei verschiedene Konsequenzen nach sich ziehen. Bei p53 erhöhen sich durch die SUMOylierung die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften

(Gostissa *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 1999), während bei BLM und der Topoisomerase I infolge der Modifikation mit SUMO eine Relokalisierung innerhalb des Zellkerns stattfindet (Mo *et al.*, 2002; Eladad *et al.*, 2005). Ein weiteres Protein, dessen SUMOylierung wichtig für die Genomstabilität ist, ist das DNA-Reparatur-Enzym Thymin-DNA-Glycosylase (TDG) in Säugetierzellen, das bei der Basen-Exzisions-Reparatur eine zentrale Rolle spielt. Infolge der SUMOylierung vollzieht die TDG eine für den Reparaturprozess wichtige Konformationsänderung (Hardeland *et al.*, 2002; Baba *et al.*, 2005; Steinacher und Schar, 2005).

II.2 DNA-Reparatur

Für das Überleben von Organismen ist die Bewahrung der genetischen Integrität von größter Bedeutung. Dazu muss das Genom nicht nur fehlerfrei dupliziert und das genetische Material fehlerfrei an die nächsten Generationen weitergegeben werden, sondern auch der Erhalt der genetischen Information ist überaus wichtig. Denn das Genom einer jeden lebenden Zelle wird permanent von endogenen, metabolischen Nebenprodukten sowie von exogenen Einflüssen bedroht, die die DNA als Träger des Erbguts chemisch verändern können (Hoeijmakers, 2001; Shiloh, 2003). Aus diesem Grund steht kontinuierlich eine komplexe molekulare Maschinerie bereit, die zu jeder Zellzyklusphase das genetische Material überwacht und, sofern möglich, einen an der DNA entstandenen Schaden behebt. Die Detektion von DNA-Schäden und das Anpassen der Zelle an einen Schaden bewerkstelligen so genannte DNA *damage checkpoints*, während die Beseitigung von Schäden von DNA-Reparatur-Proteinen verrichtet wird (**Abb. 3**).

Angesichts der Fülle an möglichen DNA-Läsionen kann ein einzelner Reparaturmechanismus nicht alle Arten von DNA-Schäden bewältigen. Stattdessen hat die Evolution zum Schutz des Genoms ein ausgeklügeltes Netz an verschiedenen miteinander vernetzten Reparatursystemen hervorgebracht, das die Mehrzahl aller möglichen Schäden reparieren kann. In *Saccharomyces cerevisiae* sind mehrere verschiedene, zum Teil überlappende Reparaturwege beschrieben: Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER), Basen-Exzisions-Reparatur (BER), Reparatur von Fehlpaarungen (*mismatch*-Reparatur oder MMR), postreplikative Reparatur (PRR), nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) und homologe Rekombination (HR) (Hoeijmakers, 2001). Sowohl MMR, NER als auch BER haben gemein, dass diese

Reparaturwege nur bei Schäden an einem DNA-Strang operieren (Hoeijmakers, 2001; Cline und Hanawalt, 2003). Der geschädigte Bereich wird ausgeschnitten, und die Neusynthese erfolgt nach Vorlage des unbeschädigten Schwesterstranges. Je nach Schaden wird dabei entweder MMR, NER oder BER aktiv. Während MMR auch Exonukleasen einbindet und an die Replikation gekoppelt sein kann (Cline und Hanawalt, 2003), sind bei NER und BER Endonukleasen aktiv. Darüber hinaus unterscheiden sich NER und BER bei der Reparatur dadurch, dass die ausgeschnittenen Abschnitte bei NER etwas länger sind. Außerdem kann NER neben den globalen Reparaturaufgaben auch gekoppelt an die Transkription erfolgen (Hoeijmakers, 2001).

Einige DNA-Läsionen werden jedoch trotz der vorhandenen Mechanismen bis zur S-Phase nicht repariert, was zu einem Anhalten der Replikationsgabel

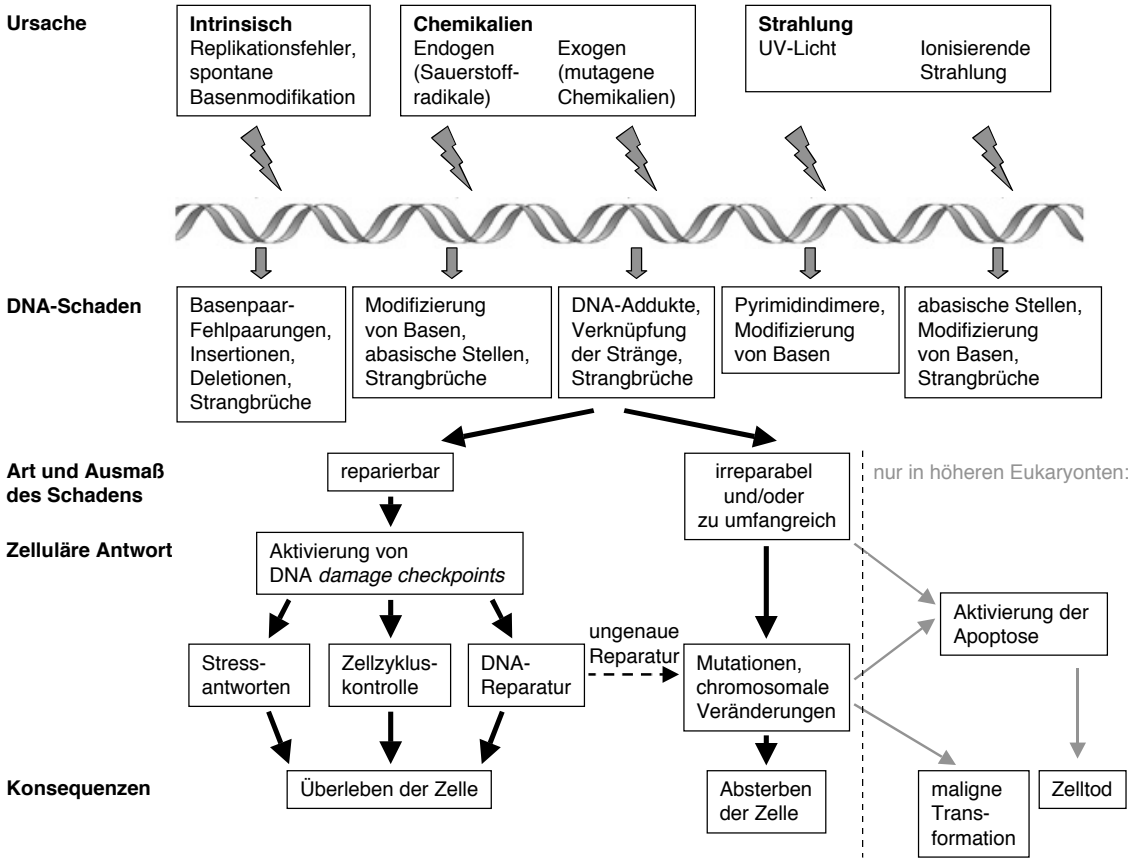

Abb. 3: Zelluläre Antworten auf DNA-Schädigung
Verschiedene Typen von Schädigungen führen zu unterschiedlichen Arten von DNA-Läsionen. Je nach Art und Ausmaß des DNA-Schadens wird daraufhin ein komplexes Netz aus Kontroll- und Reparaturmechanismen aktiv. Die zelluläre Antwort kann so das Überleben sicherstellen. Andernfalls stirbt die Zelle ab. In höheren Eukaryonten können genomische Veränderungen zur Aktivierung der Apoptose oder zu malignen Transformationen führen. (modifiziert nach Shiloh, 2003)

führen kann. Damit es nicht zu einem Zusammenbruch der Replikationsgabel kommt, muss die blockierende Läsion repariert oder umgangen werden. Das gewährleistet der PRR (oder *RAD6*-Reparaturweg). Zum einen kann vorübergehend eine so genannte Transläsionspolymerase rekrutiert werden, die DNA über einen Schaden hinweg polymerisieren kann. Da dieser Prozess jedoch häufig fehlerhaft ist, wirkt er oft mutagen. Alternativ kann PRR auch einen Schaden fehlerfrei beheben, indem die genetische Information des bereits replizierten, aber unbeschädigten Schwesterchromatids genutzt wird (Ulrich, 2005).

Ein besonders schwerwiegender DNA-Schaden liegt bei einem DNA-Doppelstrangbruch (DSB) vor, da in diesem Fall beide DNA-Stränge betroffen sind. Für die Reparatur solcher Läsionen gibt es zwei Mechanismen: homologe Rekombination und nicht-homologe Endverknüpfung (Hoeijmakers, 2001; van Gent *et al.*, 2001; Krogh und Symington, 2004), auf die im Abschnitt II.3 genauer eingegangen wird.

Letztlich gibt es für einige bestimmte Schäden an der DNA spezielle Reparaturenzyme, deren Aktivität keinem der oben genannten Reparaturwege zuzuordnen ist. Dazu zählen die O^6-Methylguanin-Methyltransferase, die O^6-Methylguanin-Basen repariert, und die Photolyase, die durch UV-Licht entstandene Pyrimidindimere revertiert.

Bevor es zu einer Reparatur kommen kann, muss in den meisten Fällen die Läsion zunächst detektiert werden. Für diese Detektion sowie die zelluläre Antwort auf den Schaden sind die DNA *damage checkpoints* verantwortlich (Melo und Toczyski, 2002; Nyberg *et al.*, 2002). Diese Kontrollmechanismen verzögern nicht nur die entsprechende Zellzyklusphase und räumen der Zelle so Zeit für die Behebung des Schadens ein, sondern unterstützen auch die Reparaturprozesse und induzieren die Transkription von für diesen Vorgang wichtigen Genen. Je nach Organismus, DNA-Schaden und Zellzyklusphase werden verschiedene Wege der Signaltransduktion unterschieden, die die Antwort eines *checkpoints* vermitteln. Alle *checkpoint*-Mechanismen weisen aber ein grundlegendes Prinzip auf, das den Ablauf bestimmt: Die DNA-Läsion fungiert als Ausgangssignal, und ein an die entsprechende Stelle bindendes so genanntes Sensorprotein kann den Schaden detektieren. Nach der Rekrutierung von Adaptoren leitet der Sensor das Signal an die Adaptoren weiter. Letztere transduzieren das Signal an Effektorkinasen, die die eigentliche *checkpoint*-Antwort auslösen (Melo und Toczyski, 2002; Nyberg *et al.*,

2002). Zu den von Effektorkinasen phosphorylierten Effektormolekülen zählen zum Beispiel Reparaturproteine wie RPA oder Rad17, Histon H2A, dessen Phosphorylierung für die DSB-Reparatur wichtig ist, und die Cdk-aktivierende Proteinphosphatase Cdc25, die an der Zellzyklusregulation beteiligt ist (Shiloh, 2003; van Attikum und Gasser, 2005). Insgesamt ist ein komplexes System an der Erkennung von DNA-Schäden beteiligt, das auf unterschiedlichen Wegen der Zelle eine Reparatur ermöglicht.

II.3 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

DNA-Doppelstrangbrüche bzw. gebrochene Chromosomen stellen eine ernsthafte Bedrohung für die Zelle dar, da bei ausbleibender oder fehlerhafter Reparatur chromosomale Anomalien entstehen können, die häufig tödlich für die Zelle sind (Haber, 2000). Für die Reparatur eines DSB stehen der Zelle die nicht-homologe Endverknüpfung und die homologe Rekombination zur Verfügung (Hoeijmakers, 2001; van Gent *et al.*, 2001; Krogh und Symington, 2004). Unter Rekombination versteht man dabei den Transfer genetischen Materials zwischen DNA-Molekülen. Homologe Rekombination (HR) bezieht sich auf Vorgänge, bei denen lange DNA-Abschnitte perfekter oder fast perfekter Homologie interagieren. Bei der nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ) findet Rekombination nur zwischen DNA-Enden ohne oder mit nur geringer Homologie statt. Während die in der S- und der G2-Phase operierende HR zu einer fehlerfreien Reparatur führt, ist die NHEJ, die in der G1-Phase aktiv ist, häufig fehlerhaft. Neben endogenen und exogenen Einflüssen führen auch Vorgänge zu einem DSB, die von der Zelle gesteuert werden. Dazu zählen die VDJ-Rekombination und der Isotypenwechsel bei der Variation von Immunglobulinen in Wirbeltieren, der so genannte *mating type switch* in *S. cerevisiae* und die Meiose (van Gent *et al.*, 2001; West, 2003).

II.3.1 Nicht-homologe Endverknüpfung

In Säugetieren kommt der NHEJ eine große Bedeutung bei der Reparatur eines DSB zu. Die wichtigsten Komponenten dieses Reparaturweges sind die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), bestehend aus dem Ku-Heterodimer und der katalytischen Untereinheit der DNA-PK, sowie der Komplex aus DNA-Ligase IV und

XRCC4 (Krogh und Symington, 2004). Kürzlich wurde zudem ein weiterer Faktor, XLF, mit struktureller Ähnlichkeit zu XRCC4 beschrieben (Ahnesorg *et al.*, 2006; Buck *et al.*, 2006). In *S. cerevisiae* werden beim NHEJ zunächst die DNA-Enden von dem Ku-Heterodimer aus Ku70 und Ku80 mit Unterstützung des MRX-Komplexes aus erkannt und stabilisiert. Nach der Rekrutierung des Komplexes aus Dnl4 und Lif1 (entsprechen DNA-Ligase IV und XRCC4 in höheren Eukaryonten) werden die Enden anschließend miteinander ligiert (**Abb. 4**) (Krogh und Symington, 2004). Die NHEJ spielt jedoch gegenüber der HR in *S. cerevisiae* nur eine untergeordnete Rolle bei der Reparatur eines DSB.

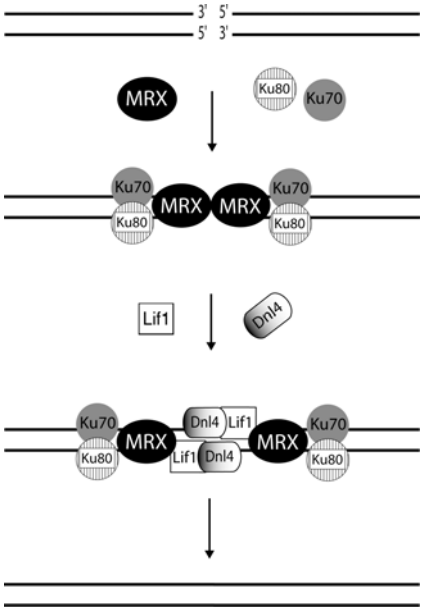

Abb. 4: Doppelstrangbruchreparatur über nicht-homologe Endverknüpfung in *S. cerevisiae*
DSB werden durch das Heterodimer aus Ku70 und Ku80 sowie einen Komplex aus Mre11, Rad50 und Xrs2 stabilisiert und zusammengehalten. Anschließend wird der DNA-Ligase-Komplex aus Dnl4 und Lif1 rekrutiert, um die freien DNA-Enden wieder zu verknüpfen. (modifiziert nach Krogh und Symington, 2004)

II.3.2 Homologe Rekombination

Der Prozess der homologen Rekombination ist im Gegensatz zur NHEJ wesentlich komplexer. Nicht nur die Anzahl der beteiligten Proteine ist größer, sondern auch die der möglichen Verläufe (Krogh und Symington, 2004). So wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen, um die molekularen Mechanismen der HR zu erklären. Im Folgenden werden vier Modelle vorgestellt, die sich am besten von den vorliegenden genetischen Daten ableiten lassen: Doppelstrangbruch-Reparatur (*double-strand break repair*, DSBR), Synthese-abhängige Stranghybridisierung (*synthesis-dependent strand annealing*, SDSA), Bruch-induzierte Replikation (*break-induced replication*, BIR) und Einzelstrang-Hybridisierung (*single strand annealing*, SSA) (Symington, 2002; Sung, 2005).

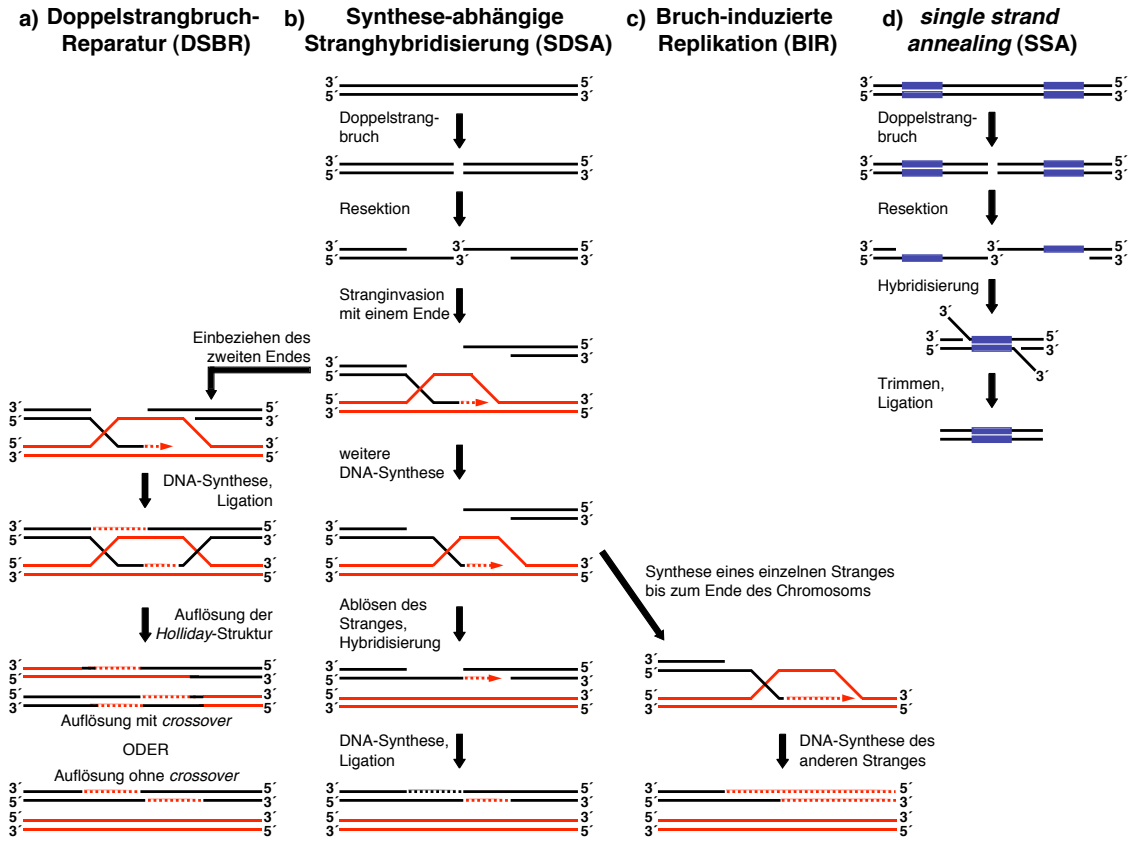

Abb. 5: Doppelstrangbruchreparatur über homologe Rekombination
a, Im DSBR-Modell werden DSB vom 5´-Ende resektiert, so dass Einzelstränge mit 3´-Ende entstehen. Diese Einzelstränge werden von der Rekombinationsmaschinerie dazu benutzt, einen homologen DNA-Abschnitt ausreichender Länge (in rot dargestellt) zu finden. Ein so genannter D-Bogen (*displacement loop*) zwischen 3´-Überhang und homologer DNA bildet sich aus und die DNA-Synthese beginnt. Auch der andere 3´-Überhang wird eingebunden. Nach der DNA-Synthese und der Ligation der DNA bilden sich *Holliday*-Strukturen aus. Je nach Auflösung der *Holliday*-Strukturen entstehen dabei Produkte mit oder ohne *crossover*. **b**, Im SDSA-Modell werden DSB vom 5´-Ende resektiert, so dass Einzelstränge mit 3´-Ende entstehen. Nach Findung homologer DNA-Abschnitte und Ausbildung des D-Bogens beginnt die DNA-Synthese, die sich weiter fortsetzt. Statt aber wie im DSBR-Modell den zweiten losen 3´-Überhang in eine Rekombinationsstruktur einzubinden, löst sich der eingedrungene Strang aus dem D-Bogen und hybridisiert mit dem anderen 3´-Überhang. Nach weiterer DNA-Synthese erfolgt die Ligation der DNA. **c**, Die ersten Schritte im BIR-Modell entsprechen denen des SDSA-Modells. Allerdings setzt sich im D-Bogen die DNA-Synthese des eingedrungenen Stranges bis zum Ende des DNA-Moleküls fort. Dieser Strang dient dann als Vorlage für die Synthese seines Gegenstranges. **d**, Beim SSA-Modell wird ein DSB zwischen zwei gleich orientierten, homologen DNA-Abschnitten (*direct repeats*, in blau) nach denselben Mechanismen wie in den anderen Modellen resektiert und lässt Einzelstränge mit 3´-Ende entstehen. Werden bei fortgeschrittener Resektion komplementäre Bereiche von homologen Sequenzen freilegt, die ursprünglich den DSB flankierten, können die Einzelstränge miteinander hybridisieren. Die 3´-Überhange, die nicht hybridisieren, werden entfernt und die DNA wird ligiert. Beim SSA wird ein *direct repeat* sowie die Sequenz zwischen den *direct repeats* deletiert. (modifiziert nach Symington, 2002, und Sung, 2005)

Allen Modellen ist gemein, dass sie einen DSB prozessieren, indem sie vom DSB aus die 5´-Enden resektieren und so Einzelstränge mit 3´-Enden entstehen (**Abb. 5**). Bei DSBR, SDSA und BIR muss zunächst ein Einzelstrang einen homologen DNA-Abschnitt ausreichender Länge gefunden und einen so genannten D-Bogen ausgebildet haben (Symington, 2002; Sung, 2005) (**Abb. 5**). Wenn auch das zweite, lose DNA-Ende mit in den D-Bogen eingebunden wird, folgt der weitere Ablauf nach dem DSBR-Modell. Die entstandenen *Holliday*-Strukturen können entweder unter Ausbildung eines *crossovers* oder auch ohne *crossover* aufgelöst werden (**Abb. 5**). Beim SDSA-Modell bleibt das Einbinden des zweiten, losen DNA-Endes aus. Stattdessen bindet der eingedrungene Strang an den anderen 3´-Überhang der anfänglichen Einzelstrangresektion. (**Abb. 5**). Auch bei BIR wird das zweite, lose DNA-Ende nicht eingebunden. Allerdings erfolgt hier keine Hybridisierung an den anderen 3´-Überhang. Vielmehr setzt sich am eingedrungenen Strang die DNA-Replikation bis zum Ende des Chromosoms fort. Sequenzen, die anfänglich distal zum DSB lagen, gehen dabei verloren (**Abb. 5**). Beim SSA werden komplementäre Bereiche von homologen Sequenzen freigelegt, die ursprünglich den DSB flankierten und sich nun aneinander lagern können. Dabei ist zu beachten, dass beim SSA immer eine Deletion entsteht (**Abb. 5**). Für SSA reichen bereits homologe Sequenzen von nur 30 Basen aus, wobei das Optimum bei 200 bis 400 Basen liegt (Sugawara *et al.*, 2000).

Von zentraler Bedeutung für den Prozess der homologen Rekombination sind die Gene der *RAD52*-Epistasisgruppe (*RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RDH54, RAD55*, *RAD57*, *RAD59*, *MRE11 (RAD58)*, *XRS2*) (Symington, 2002). Die meisten dieser Gene wurden auf der Suche nach Deletionen identifiziert, die zu Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung führen (*rad*iation *sensitive*). Während Mre11, Rad50 und Xrs2 auch Funktionen bei der nicht-homologen Endverknüpfung und beim DNA *damage checkpoint* übernehmen, sind die übrigen Proteine nur an der homologen Rekombination beteiligt. Dabei sind Rad51, Rad52, Rad54, Rad55 und Rad57 für die konservative DSB-Reparatur (DSBR und SDSA) essenziell. Rad52 und Rad59 spielen zusätzlich bei den nicht konservativen DSB-Reparaturwegen BIR und SSA eine Rolle. Die Beteiligung von Rad52 an allen Arten der homologen Rekombination in *S. cerevisiae* erklärt auch, dass die Deletion von *RAD52* den stärksten Phänotyp innerhalb der *RAD52*-Epistasisgruppe zeigt. Wie groß die Bedeutung von Rad52 in Säugetierzellen ist, ist noch unklar. Zwar weisen

Rad52-defiziente Zellen keine solch ausgeprägten Phänotypen auf, jedoch kompensieren vermutlich andere Faktoren diesen Defekt.

Verschiedene genetische, mikroskopische und biochemische Analysen haben geholfen, die molekularen Abläufe der homologen Rekombination auf molekularer Ebene zu verstehen (Sugawara *et al.*, 2003; Wolner *et al.*, 2003; Krogh und Symington, 2004; Lisby *et al.*, 2004; Miyazaki *et al.*, 2004). So lokalisiert der MRX-Komplex aus Mre11, Rad50 und Xrs2 als erste Komponente der homologen Rekombination an einen DSB (Lisby und Rothstein, 2005). Der MRX-Komplex besteht aus der 3´-5´ Exonuklease Mre11, dem *coiled-coil* Protein Rad50 und Xrs2 und verknüpft über Rad50 die beiden losen DNA-Enden, um diese in unmittelbarer Nachbarschaft beieinander zu halten (Krogh und Symington, 2004; Moreno-Herrero *et al.*, 2005). Auch für die effiziente, nun folgende Einzelstrangresektion in 3´-Richtung ist der MRX-Komplex essenziell. Hierbei wird der Exonuklease Mre11 nur eine unterstützende Funktion zugeschrieben, denn die eigentliche Exonuklease mit 5´-3´ Aktivität ist noch unbekannt (**Abb. 6**) (Krogh und Symington, 2004). Infolge der Freilegung eines einzelsträngigen 3´-DNA-Endes lagert sich das heterotrimere RPA, bestehend aus Rfa1, Rfa2 und Rfa3, an die Einzelstrang-DNA an (**Abb. 6**) (Alani *et al.*, 1992; Krogh und Symington, 2004). RPA erfüllt dabei zwei Funktionen: Zum einem stabilisiert es den Einzelstrang, indem es mögliche Sekundärstrukturen auflöst, und zum anderen fungiert es auch in der *checkpoint*-Antwort (Lisby *et al.*, 2004).

Im folgenden Schritt des Rekombinationsvorgangs wird RPA durch die Rekombinase Rad51 ausgetauscht, die homolog zum bakteriellen RecA-Protein ist (**Abb. 6**). Für diesen Vorgang sind so genannte Mediatoren verantwortlich, deren zentrale Rolle in *S. cerevisiae* von Rad52 übernommen wird (Sung, 1997b; Hays *et al.*, 1998; New *et al.*, 1998; Song und Sung, 2000). Rad52 liegt als großes ringförmiges Homooligomer in Zellen vor, das über eine Furche einzelsträngige DNA binden kann (Stasiak *et al.*, 2000; Kagawa *et al.*, 2002; Singleton *et al.*, 2002). Für die Oligomerisierung ist die N-terminale Rad52-Domäne verantwortlich, während die Bindung an RPA und Rad51 über den C-Terminus erfolgt (Jackson *et al.*, 2002; Kagawa *et al.*, 2002; Krejci *et al.*, 2002; Singleton *et al.*, 2002). Nach der Bildung des Rad51-Nukleoproteinfilaments dehnt sich dieses bei zunehmender Einzelstrangresektion weiter aus, wobei das Filament von den Rad51-Homologen Rad55 und Rad57 stabilisiert wird (**Abb. 6**) (Sung, 1997a).

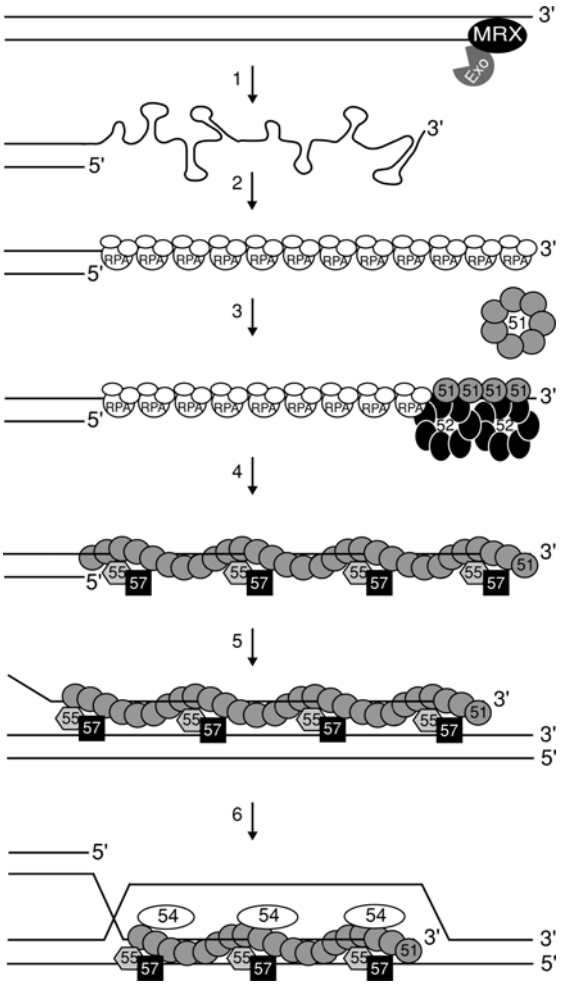

Abb. 6: Modell der molekularen Abläufe während der Stranginvasion bei der homologen Rekombination
Dargestellt ist eine Seite eines DSB. 1) Einzelsträngige DNA mit 3´-Ende wird mit Hilfe des MRX-Komplexes (Mre11, Rad50, Xrs2) und einer 5´-3´ Exonuklease generiert. 2) Das heterotrimere Protein RPA bindet an die freien einzelsträngigen 3´-Enden und eliminiert Sekundärstrukturen. 3) Rad52 rekrutiert Rad51 zum RPA-DNA-Komplex und bewirkt den Austausch von RPA zugunsten von Rad51. 4) Das Rad51-Nukleoproteinfilament dehnt sich weiter aus und wird von Rad55 und Rad57 stabilisiert. 5) Das Rad51-Nukleoproteinfilament macht eine homologe Donorsequenz ausfindig. 6) Rad54 interagiert mit Rad51 und sorgt für eine Umstrukturierung des Chromatins, das Aufwinden der DNA und das Annealing homologer Sequenzen zwischen Donor-DNA und Rad51-Nukleoproteinfilament. (nach Krogh und Symington, 2004)

Anschließend sucht das Rad51-Nukleoproteinfilament nach einer homologen Sequenz im unbeschädigten Schwesterchromatid oder Schwesterchromosom. Bei einer erfolgreichen Suche dringt das Filament in die DNA unter Ausbildung eines D-Bogens ein, worauf mit der Hilfe von Rad54, das zur Familie der Snf2/Swi2 DNA-ATPasen gehört und für Umstrukturierung des Chromatins notwendig ist, die DNA-Synthese einsetzt (**Abb. 6**) (Alexeev *et al.*, 2003; Krogh und Symington, 2004). Je nach Ablauf des Rekombinationsvorgangs werden nach Abschluss der DNA-Synthese die DNA-Enden miteinander ligiert und eventuelle *Holliday*-Strukturen aufgelöst (**Abb. 5**). Dieser komplexe Mechanismus gewährleistet die fehlerfreie Reparatur eines DSB.

Die Reparatur eines meiotischen DSB folgt denselben Prinzipien wie in mitotischen Zellen. Es werden jedoch zahlreiche zusätzliche Proteine mit in den Prozess einbezogen, die nur in der Meiose eine Funktion erfüllen. Zu diesen Proteinen gehören die Endonuklease Spo11, die an bis zu 200 Stellen innerhalb des Genoms einen DSB verursacht, das zu RecA homologe Protein Dmc1, das

Dimer Mnd1-Hop2, das für eine akkurate Chromosomenpaarung notwendig ist, sowie die Proteine Red1 und Hop1, die dafür sorgen, dass die Rekombination über einen Dmc1-abhängigen Rekombinationsweg zwischen homologen Chromosomen erfolgt (Keeney, 2001; Krogh und Symington, 2004; Gerton und Hawley, 2005). Rekombination in der Meiose wird durch einen DSB im Leptotän der ersten meiotischen Teilung initiiert. Die eigentlichen Rekombinationsvorgänge erfolgen jedoch erst im Pachytän, dem dritten Abschnitt der Prophase. In der zweiten meiotischen Teilung findet keine Rekombination statt.

Auch bei der homologen Rekombination scheint die Modifikation mit SUMO eine Rolle zu spielen. So wird in *Schizosaccharomyces pombe* der Rekombinationsfaktor Rad22, der homolog zu Rad52 ist, mit SUMO modifiziert (Ho *et al.*, 2001), und auch in Säugetierzellen könnte Rad52 mit SUMO modifiziert werden, da humanes Rad52 sowohl mit SUMO als auch mit Ubc9 interagiert (Shen *et al.*, 1996a; Shen *et al.*, 1996b). Außerdem scheint SUMO in humanen Zellen die homologe Rekombination auf noch unbekannte Weise zu regulieren, wie Überexpressionsstudien gezeigt haben (Li *et al.*, 2000). Darüber hinaus wird in *S. cerevisiae* das SUMO-konjugierende Enzym Ubc9 für eine effiziente Rekombination zwischen Chromosomen nach DNA-Schädigung in diploiden Zellen benötigt (Maeda *et al.*, 2004).

II.4 Zielsetzung

Nach der Entdeckung der Ubiquitin- und SUMO-Modifikation von PCNA im Zusammenhang mit der DNA-Reparatur (Hoege *et al.*, 2002) war es Ziel dieser Arbeit, weitere SUMO-Substrate zu identifizieren, die bei der DNA-Reparatur eine Rolle spielen. Nachdem zu Beginn dieser Arbeit mit Rad52 ein zentraler Faktor für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen gefunden worden war, sollte anschließend untersucht werden, wie die SUMOylierung von Rad52 reguliert wird und von welchen Faktoren die Modifikation abhängt. Zudem sollte eine SUMOylierungsdefiziente Rad52-Mutante hergestellt werden. Mit Hilfe dieser Mutante sollte ferner überprüft werden, ob und inwieweit die Modifikation von Rad52 mit SUMO für die DNA-Reparatur und für den Vorgang der homologen Rekombination von Bedeutung ist.

III ERGEBNISSE

III.1 Rad52 als SUMO-Substrat

III.1.1 Aufreinigung von SUMO-Substraten aus S. cerevisiae

Auf der Suche nach SUMO-Substraten wurde in Zusammenarbeit mit Carsten Hoege versucht, SUMO-Konjugate aus spezifischen Zellzyklusphasen aufzureinigen. Dazu wurde der Hefestamm SK1 benutzt, bei dem sich der Sporulationsvorgang, der mit den meiotischen Teilungen einhergeht, sehr effizient und synchron induzieren lässt. Für die Aufreinigungsexperimente war der SK1 Stamm in diesem Fall aber homozygot für das zu RecA homologe Protein Dmc1 deletiert, so dass der Sporulationsvorgang während des Pachytäns der meiotischen Prophase I abbricht (Bishop *et al.*, 1992). Zudem war in das Genom dieses Stammes ein mit sieben Histidinen markiertes SUMO-Konstrukt (^{His}SUMO) integriert worden, das unter der Kontrolle des konstitutiven, starken Promotors des *ADH1*-Gens stand. Die Hefezellen wurden in eine synchrone Sporulation geführt und nach sieben Stunden geerntet. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung von SUMO-Substraten des Pachytäns in zwei Schritten. Zunächst wurden die Zellen aufgeschlossen und die ^{His}SUMO-Substrate über NiNTA-Agarose angereichert. In einem zweiten Schritt wurden die eluierten Proteine in einer anti-SUMO-Immunpräzipitation weiter aufgereinigt. Nach Elution und elektrophoretischer Auftrennung der aufgereinigten Proteine war in der Coomassie-Färbung neben

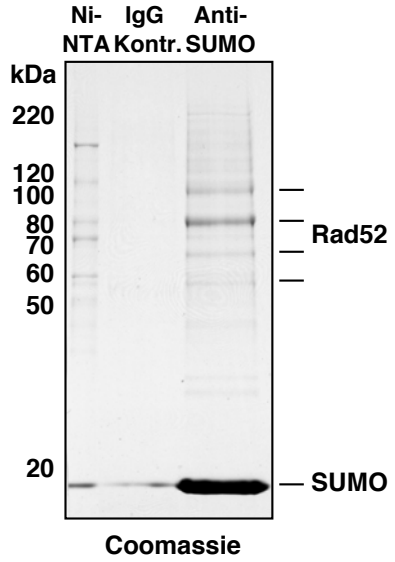

Abb. 7: Aufreinigung von Rad52 als SUMO-Substrat
Durch denaturierende NiNTA-Chromatographie wurden ^{His}SUMO-Substrate aus sporulierenden Zellen von *S. cerevisiae* angereichert, die aufgrund ihrer *dmc1/dmc1* Mutation im Pachytän-Stadium der ersten meiotischen Teilung arretierten. Die angereicherten Proteine wurden anschließend über eine anti-SUMO-Immunpräzipitation aufgereinigt. Als Kontrolle fungierten in einer Kontroll-Immunpräzipitation unspezifische Immunglobuline G (IgG). Nach Coomassie-Färbung wurden Proteine über Massenspektroskopie identifiziert, darunter der Rekombinationsfaktor Rad52 bei 60, 70, 85 und 105 kDa.

nicht-konjugiertem ^{His}SUMO eine Reihe spezifischer SUMO-Substrate nachweisbar, die nicht in der Kontroll-Immunpräzipitation auszumachen waren. Über Massenspektroskopie konnten folgende Proteine identifiziert werden: Rad52, Nog2, Ccp1, Ecm11 und Inh1, wobei Rad52 in insgesamt vier Banden nachgewiesen wurde (bei 60, 70, 85 und 105 kDa) (**Abb. 7**). Da für Rad52 ein Laufverhalten bei circa 62 kDa publiziert ist (Sung, 1997b), handelte es sich bei den Banden bei 85 und 105 kDa vermutlich um einfach bzw. zweifach SUMOyliertes Rad52, während die beiden anderen Banden wahrscheinlich Degradationsfragmente darstellten.

III.1.2 Das SUMO-Substrat Rad52 in S. cerevisiae

Um zu bestätigen, dass es sich bei Rad52 tatsächlich um ein SUMO-Substrat handelt, das auch in sich teilenden mitotischen Zellen modifiziert wird, wurde in einem haploiden WT (Wildtyp) Stamm ^{His}SUMO exprimiert. Nach Anreicherung der SUMO-Substrate aus logarithmischen Zellen wiesen zwei Banden in einem anti-Rad52 Westernblot Immunreaktivität auf, und zwar auf der Höhe von einfach bzw. zweifach SUMOyliertem Rad52 (**Abb. 8a**). Des Weiteren zeigte sich bei Zellextrakten in einem anti-Rad52 Westernblot eine Antikörper-spezifische Bande mit einem größeren Molekulargewicht als Rad52. Wenn ein mit Histidinen oder mit dem myc-Epitop markiertes SUMO überexprimiert wurde, verzögerte sich die Laufgeschwindigkeit dieser Bande entsprechend der Größe des fusionierten Epitops (**Abb. 8b**). Folglich wurde ein Teil der Rad52-Moleküle mit SUMO

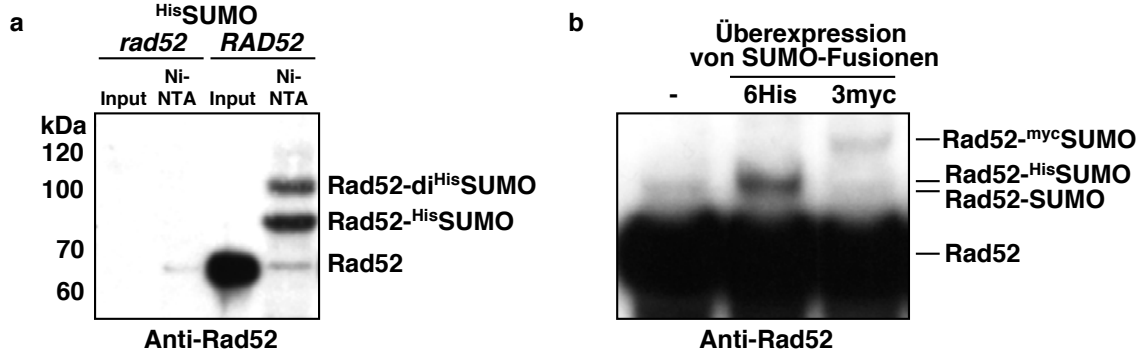

Abb. 8: Verifizierung von Rad52 als SUMO-Substrat
a, Anreicherung von ^{His}SUMO-Substraten über denaturierende NiNTA-Chromatographie aus sich teilenden mitotischen Zellen, die ^{His}SUMO überexprimierten und die entweder WT waren oder in denen *RAD52* deletiert war. **b**, Überexpression von SUMO-Fusionen verzögerte das Laufverhalten der Rad52-Konjugate im Vergleich zu Rad52, das mit endogenem SUMO modifiziert war. **a-b**, Rad52 und modifiziertes Rad52 wurden in einem anti-Rad52 Westernblot detektiert.

modifiziert, und demzufolge handelte es sich bei Rad52 sowohl in meiotischen als auch in mitotischen Zellen um ein SUMO-Substrat.

Zudem zeigte Rad52 im *two hybrid assay* eine Interaktion mit Komponenten der SUMO-Konjugationsmaschinerie. So interagierte Rad52 nicht nur mit dem SUMO-konjugierenden Enzym Ubc9, sondern auch mit Fragmenten der SUMO-Ligase Siz2 (**Abb. 9a**). Zugleich war in Zellextrakten von *siz2* bzw. *ubc9-ts* die durch Zugabe von Methyl-Methansulfonat (MMS) induzierte SUMOylierung von Rad52 stark reduziert, während dagegen Mutationen in *SIZ1* oder *MMS21* keinen Einfluss auf die Modifizierung von Rad52 mit SUMO zeigten (**Abb. 9b,c**). Auch ohne MMS-Behandlung, dafür nach Anreicherung von SUMO-Substraten aus Stämmen, die ^{His}SUMO exprimierten, war in *siz2* Zellen gegenüber WT Zellen eine Reduktion der

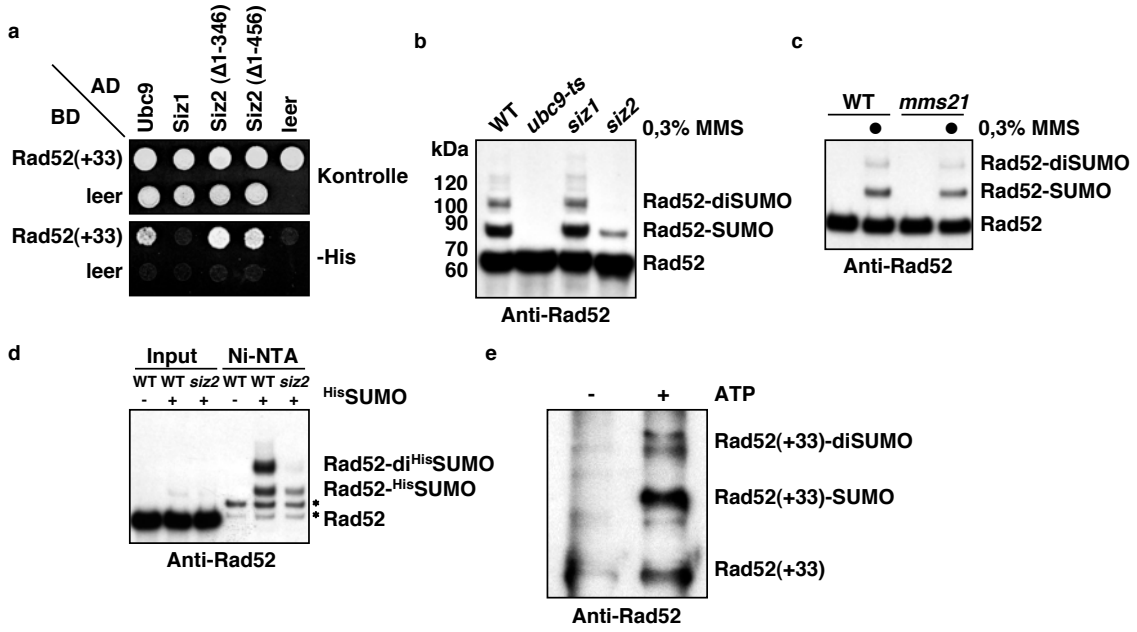

Abb. 9: Die an der SUMOylierung von Rad52 beteiligten Enzyme
a, Spezifische Interaktion von Rad52(+33), das für die 33 Aminosäuren vor dem eigentlichen Start-Codon sowie den Leserahmen von Rad52 kodierte, mit Ubc9 und Siz2, nachgewiesen durch einen *two hybrid assay*. **b-c**, WT und die Hefemutanten *ubc9-ts*, *siz1*, *siz2* und *mms21* wurden mit 0,3% MMS behandelt, um die Rad52-SUMOylierung zu induzieren. Rad52 und modifiziertes Rad52 wurden in einem anti-Rad52 Westernblot visualisiert. In *ubc9-ts* zeigte sich keine, in *siz2* eine verringerte Modifikation von Rad52 mit SUMO. **d**, Durch denaturierende NiNTA-Chromatographie wurden aus WT Zellen oder aus der *siz2* Hefemutante, die ^{His}SUMO überexprimierten, ^{His}SUMO-Substrate angereichert. Rad52 und modifiziertes Rad52 wurden in einem anti-Rad52 Westernblot nachgewiesen. Die Sterne kennzeichnen kreuzreaktive Proteine. **e**, *In vitro* SUMOylierung von Rad52(+33), das für die 33 Aminosäuren vor dem eigentlichen Start-Codon sowie den Leserahmen von Rad52 kodierte, mit rekombinanten, aufgereinigten Proteinen. Dazu reichten neben Rad52(+33) und SUMO bereits das SUMO-aktivierende Heterodimer Aos1/Uba2 sowie das SUMO-konjugierende Enzym Ubc9 in Abhängigkeit von ATP aus.

Modifikation mit SUMO zu beobachten (**Abb. 9d**). Folglich ist Ubc9 absolut notwendig für die SUMOylierung, während Siz2 die Modifikation nur zu stimulieren scheint. Auch *in vitro* reichte für die SUMOylierung von Rad52 bereits Ubc9 in Abhängigkeit von ATP aus (**Abb. 9e**).

III.1.3 Die Akzeptorlysine in S. cerevisiae

Die Modifizierung von Rad52 wurde zu Beginn dieser Arbeit in Zellen des Pachytäns gefunden (**Abb. 7**). Da während des Pachytäns Rekombinationsvorgänge stattfinden, stellte sich die Frage, ob die SUMOylierung von Rad52 möglicherweise den Prozess der homologen Rekombination beeinflusst. Um einen näheren Einblick in diese mögliche Funktion zu gewinnen, sollte zunächst ein Rad52-Protein generiert werden, das nicht mehr mit SUMO modifizierbar war. Eine Sequenzanalyse von Rad52 ergab, dass das Rad52-Molekül insgesamt 40 Lysine aufweist, die als potenzielle Akzeptorstelle für eine SUMOylierung fungieren können, darunter das Lysin K220, das in einem Konsensusmotiv für eine SUMOylierung liegt. K220 ist allerdings im Gegensatz zu einigen Lysinen der hoch konservierten Rad52-Domäne in anderen Spezies nicht konserviert.

Zunächst wurde K220 neben Lysinen der Rad52-Domäne individuell durch Arginin ersetzt, und die SUMOylierung von Rad52 durch Zugabe von 0,3% MMS induziert. In einem anti-Rad52 Westernblot zeigten die Mutantenproteine jedoch gegenüber WT Rad52 zunächst keine offensichtlichen Abweichungen in der Mobilität der Rad52-Banden. Daher wurden verschiedene Gelsysteme getestet, um die Einzelbande der Mono-SUMOylierung als Doppelbande (mögliche Mono-SUMOylierung an zwei verschiedenen Lysinen) detektieren zu können. In der Tat stellte sich die Bande der Mono-SUMOylierung in einem 8-12%igen Tris-Acetat-Gel (Gel gepuffert mit Tris und Essigsäure, Tricin-Puffer als Laufpuffer) als Doppelbande dar (**Abb. 10a**). Dieses Tris-Acetat-System wurde bei der weiteren Suche nach den Akzeptorlysinen der Rad52-SUMOylierung verwendet (siehe Mutationsstrategie in V.2.2).

Die Analyse potenzieller Akzeptorlysine ergab, dass Rad52 an den Lysinen K10, K11 und K220 mit SUMO modifiziert werden kann (**Abb. 10a**). Im Vergleich der K10, K11 und K220 Einzel-, Doppel- und Dreifachmutanten zeigte sich, dass K11 und K220 als Haupt-SUMOylierungsstellen fungieren. K10 spielte nur dann

eine Rolle, wenn K11 als Akzeptor ausfiel (**Abb. 10a**). Außerdem waren die SUMO-Modifikationen an K10/11 und K220 voneinander unabhängig. Diese Ergebnisse wurden durch die Anreicherung von SUMO-Substraten aus Zellen bestätigt, die nicht mit MMS behandelt worden waren, sondern ^{His}SUMO überexprimierten und deren Rad52-Deletion mit WT Rad52 bzw. Lysinmutanten komplementiert war (**Abb. 10b**). Die Akzeptorlysine liegen um die konservierte, für die Homo-Oligomerisierung wichtige Rad52-Domäne (Iyer *et al.*, 2002; Kagawa *et al.*, 2002; Singleton *et al.*, 2002) herum (**Abb. 10c**). Deshalb war davon auszugehen, dass die SUMO-Modifikation von Rad52 die Oligomerisierung nicht beeinflusst.

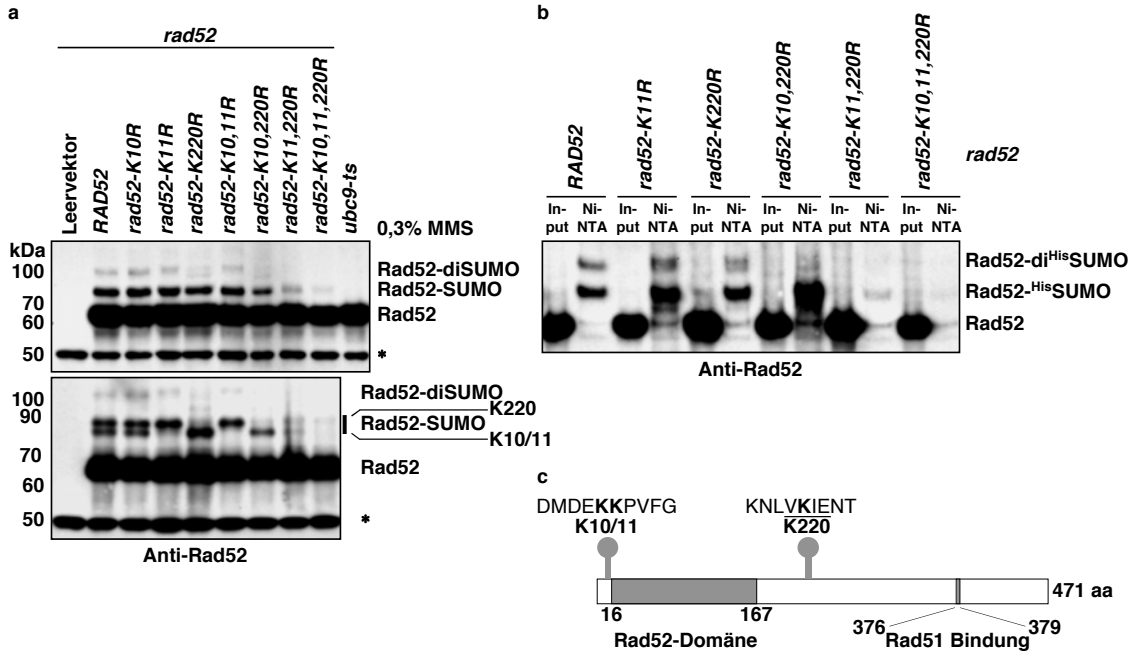

Abb. 10: Die Akzeptorlysine der Rad52-SUMOylierung
a, Identifizierung der Akzeptorlysine. Zellen, in denen *RAD52* deletiert war, exprimierten von Plasmiden entweder WT Rad52 oder die angezeigten Lysinmutanten. Um die Rad52-SUMOylierung zu induzieren, waren die Zellen mit 0,3% MMS behandelt worden. Die Proteine wurden entweder auf einem 4-12% Bis-Tris-Gel (oben) oder auf einem 8-12% Tris-Acetat-Gel (unten) elektrophoretisch aufgetrennt. Rad52 und modifiziertes Rad52 wurden in einem anti-Rad52 Westernblot detektiert. Der Stern kennzeichnet ein kreuzreaktives Protein. **b**, Bestätigung der Akzeptorlysine. Zellen, in denen *RAD52* deletiert war, exprimierten von Plasmiden entweder WT Rad52 oder die angezeigten Lysinmutanten, zugleich überexprimierten sie ^{His}SUMO. Nach Anreicherung der ^{His}SUMO-Substrate durch denaturierende NiNTA-Chromatographie wurden Rad52 und modifiziertes Rad52 in einem anti-Rad52 Westernblot visualisiert. **c**, Schema von Rad52, das die konservierte Rad52-Domäne, den Abschnitt zur Bindung von Rad51 und die Position der Akzeptorlysine anzeigt. Die unterstrichene Sequenz bei K220 stellt die ψKxD/E Konsensussequenz der SUMOylierung dar. **a-c**, Die Nummern der Aminosäuren (aa) beziehen sich auf die Zuordnung der SGD-Datenbank (http://www.yeastgenome.org).

Da in Extrakten aus Zellen, die nur das SUMOylierungsdefiziente Protein rad52-K10,11,220R exprimierten, immer noch eine schwache SUMOylierung zu erkennen war (**Abb. 10a,b**), scheint die verbleibende SUMOylierung an einem alternierenden Lysin zu erfolgen (siehe Mutationsstrategie in V.2.2). Alternativ könnte die verbleibende Akzeptorstelle ein Lysin sein, das eine Strukturveränderung nach sich zieht, wenn es durch ein Arginin ersetzt wird. So wurden bei der systematischen Analyse drei Lysine gefunden, die unabhängig von weiteren Mutationen überhaupt keine SUMOylierung mehr zeigten (**Abb. 11a**). Da jedoch *rad52-K126R*, *rad52-K134R* und *rad52-K200R* im Gegensatz zu den SUMOylierungsdefizienten Proteinen bei der Komplementation von *rad52* Zellen in Gegenwart von MMS einen Nullphänotyp aufwiesen (**Abb. 11b, 19**), handelt es sich bei ihnen vermutlich um Mutanten, die zu einer Fehlfaltung des Proteins führen, und nicht um Mutanten, die spezifisch der SUMOylierung entgehen.

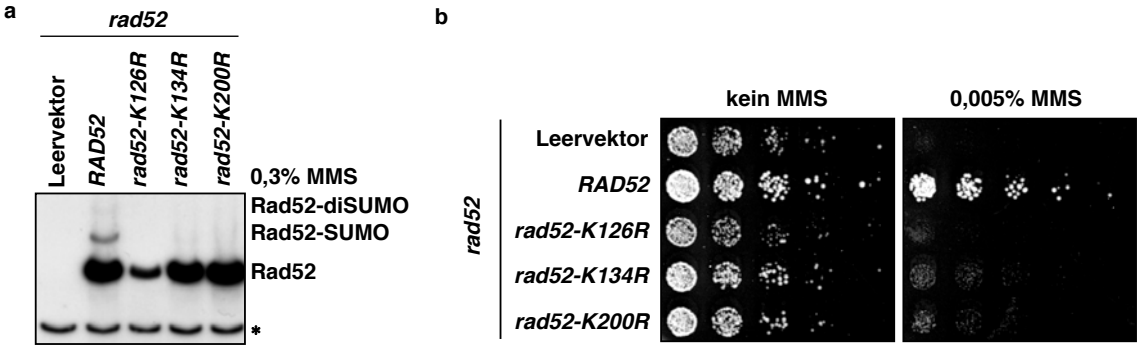

Abb. 11: Lysinmutanten von Rad52, die vermutlich zu einer Fehlfaltung führen
a, Lysinmutanten, die nicht mehr mit SUMO modifiziert werden. Zellen, in denen *RAD52* deletiert war, exprimierten von Plasmiden entweder WT Rad52 oder die angezeigten Mutanten. Um die Rad52-SUMOylierung zu induzieren, waren die Zellen mit 0,3% MMS behandelt worden. Rad52 und modifiziertes Rad52 wurden in einem anti-Rad52 Westernblot visualisiert. Der Stern kennzeichnet ein kreuzreaktives Protein. **b**, Zellen mit einer *RAD52* Deletion trugen entweder einen Leervektor oder die angegebenen Allele von *RAD52*. Serielle Verdünnungen dieser Stämme wurden auf Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen von MMS getüpfelt und zwei Tage bei 30°C inkubiert. Mutationen der Lysinreste 126, 134 oder 200 zu einem Argininrest führten zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber MMS.

III.1.4 *Das SUMO-Substrat Rad52 in Homo sapiens*

Ho *et al.* hatten bereits 2001 berichtet, dass auch in *Schizosaccharomyces pombe* Rad52 (Rad22 genannt) mit SUMO modifiziert wird. Da es sich bei Rad52 um ein in Eukaryonten konserviertes Protein handelt, stellte sich die Frage, ob auch Rad52 in anderen Eukaryonten mit SUMO modifiziert wird. Daher wurden menschliche Nierenzellen (HEK293T-Zellen) mit humanem Rad52 (hRad52), an das N-terminal ein myc-Epitop fusioniert war, sowie mit SUMO1 bzw. mit einem mit sechs Histidinen markierten SUMO-1-Konstrukt (^{His}SUMO-1) transfiziert. Nach Anreicherung der humanen SUMO-Substrate über NiNTA-Agarose zeigten sich zwei Banden unterschiedlicher Mobilität in einem anti-myc Westernblot, die höhere Molekulargewichte aufwiesen als unmodifiziertes hRad52 (**Abb. 12**). Da hRad52 eine Molare Masse von 55 kDa besitzt, handelte es sich bei den Banden bei 75 und 95 kDa vermutlich um einfach bzw. zweifach SUMOyliertes hRad52. Demzufolge wird auch in menschlichen Zellen Rad52 mit SUMO modifiziert.

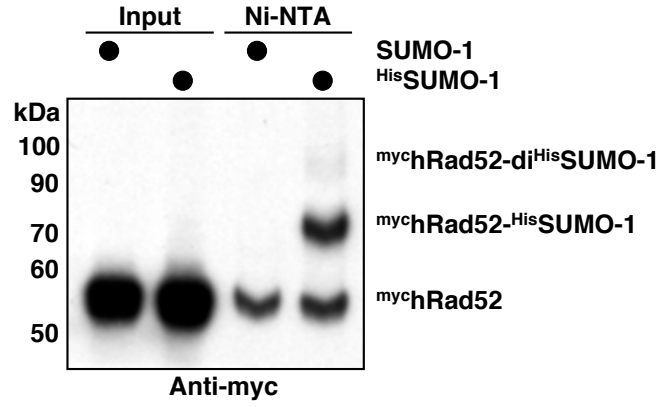

Abb. 12: SUMOylierung von humanem Rad52
Humane HEK293T Zellen wurden mit humanem Rad52 (hRad52), das mit einem myc-Epitop markiert war (^{myc}hRad52), sowie mit SUMO-1 oder ^{His}SUMO-1 transfiziert. Nach Anreicherung der ^{His}SUMO-1-Substrate durch denaturierende NiNTA-Chromatographie wurden hRad52 und modifiziertes hRad52 in einem anti-myc Westernblot detektiert.

III.2 Regulation der Rad52-SUMOylierung

III.2.1 Regulation der Rad52-SUMOylierung in meiotischen Zellen

Aufgrund der Identifizierung von Rad52 als meiotisches SUMO-Substrat stellte sich die Frage, ob die Modifikation mit SUMO in der Meiose einer bestimmten Regulation unterliegt. Die meiotischen Teilungen sind in *S. cerevisiae* sehr gut charakterisiert, so dass sich viele Prozesse unter Zuhilfenahme bekannter Mutanten genau beschreiben lassen. Für die Analyse der meiotischen Prozesse wurde der Hefestamm SK1 verwendet, da dieser sehr effizient sporuliert.

Zunächst wurde der WT Stamm mittels synchroner Sporulation untersucht. Dabei war im anti-Rad52 Westernblot zu beobachten, dass die SUMOylierung in der Meiose induziert wird und nach circa fünf bis sechs Stunden ein Maximum erreicht (**Abb. 13**). Daher wurden im Folgenden Hefemutanten analysiert, die zu verschiedenen Zeitpunkten während der meiotischen Teilungen arretieren, um so die Ereignisse zu identifizieren, die für die Rad52-SUMOylierung wichtig sind. In einem Stamm, in dem *SPO11* deletiert war, blieb die Induktion der SUMOylierung vollkommen aus (**Abb. 13**). Da *SPO11* für die Nuklease kodiert, die die Meiose-spezifischen Doppelstrangbrüche (DSB) setzt, ist die Rad52-SUMOylierung offensichtlich mit der Entstehung eines DSB verknüpft oder an spätere DNA-Transaktionen wie die Einzelstrangresektion gekoppelt. Bestätigt wurde diese Annahme durch die Untersuchung der *rad50* Mutante, in der durch die Deletion von *RAD50* die Funktionen des MRX-Komplexes deaktiviert waren und keine Einzelstrangresektion oder DSB-Stabilisierung mehr erfolgen konnte. Auch im *rad50* Stamm erfolgte keine Induktion der SUMOylierung. Vielmehr war nur eine basale, gleich bleibende SUMOylierung zu beobachten (**Abb. 13**).

Als nächstes wurden *dmc1* und *rad51* Hefemutanten untersucht, die im Pachytän der meiotischen Prophase I arretieren und übermäßig resektierte DNA-Einzelstränge akkumulieren (Bishop *et al.*, 1992). (Die Proteine Dmc1 und Rad51 erfüllen ihre Funktion nach der des MRX-Komplexes (Krogh und Symington, 2004)). In beiden Stämmen war bereits nach vier Stunden synchroner Sporulation eine Induktion der Rad52-SUMOylierung in einem anti-Rad52 Westernblot erkennbar, die bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes (24 Stunden nach Beginn der Sporulation) weiter zunahm (**Abb. 13** bzw. Daten nicht gezeigt). Bei der SUMOylierung von Rad52 in *dmc1* Mutanten spielte jedoch der 9-1-1 Komplex (aus Rad17, Ddc1, Mec3), der den Pachytän-*checkpoint* reguliert (Roeder und Bailis, 2000), keine Rolle, da die SUMOylierung in *dmc1 rad17* Doppelmutanten ebenso stark induziert war wie in *dmc1* alleine (**Abb. 13**). Das heißt, dass die Rad52-SUMOylierung nicht durch einen *checkpoint* induziert war. Dass in der Meiose dieselben Lysine SUMOyliert werden wie in mitotischen Zellen, konnte durch das Einbringen der SUMOylierungsdefizienten Rad52-Mutante in einen *dmc1* Stamm bestätigt werden, da in diesem Fall die SUMOylierung deutlich abgeschwächt war (Daten nicht gezeigt).

Um die Regulation der SUMOylierung während des Pachytäns genauer zu verstehen, wurden Mutanten untersucht, die auch im Pachytän oder am Übergang von der ersten zur zweiten meiotischen Teilung arretieren. Deletionen in *PCH2*, *RED1*, *ZIP1*, *RAD17*, *SGS1*, *NDT80* und *SPO13* führten nicht zu einer Induktion der Rad52-SUMOylierung. (Die leichte Induktion zu frühen Zeitpunkten in *rad17* Zellen ist wahrscheinlich auf *checkpoint*-Defekte zurückzuführen, zumal zu späten Zeitpunkten keine Akkumulation der SUMOylierung vorlag.) Dagegen war in Zellen,

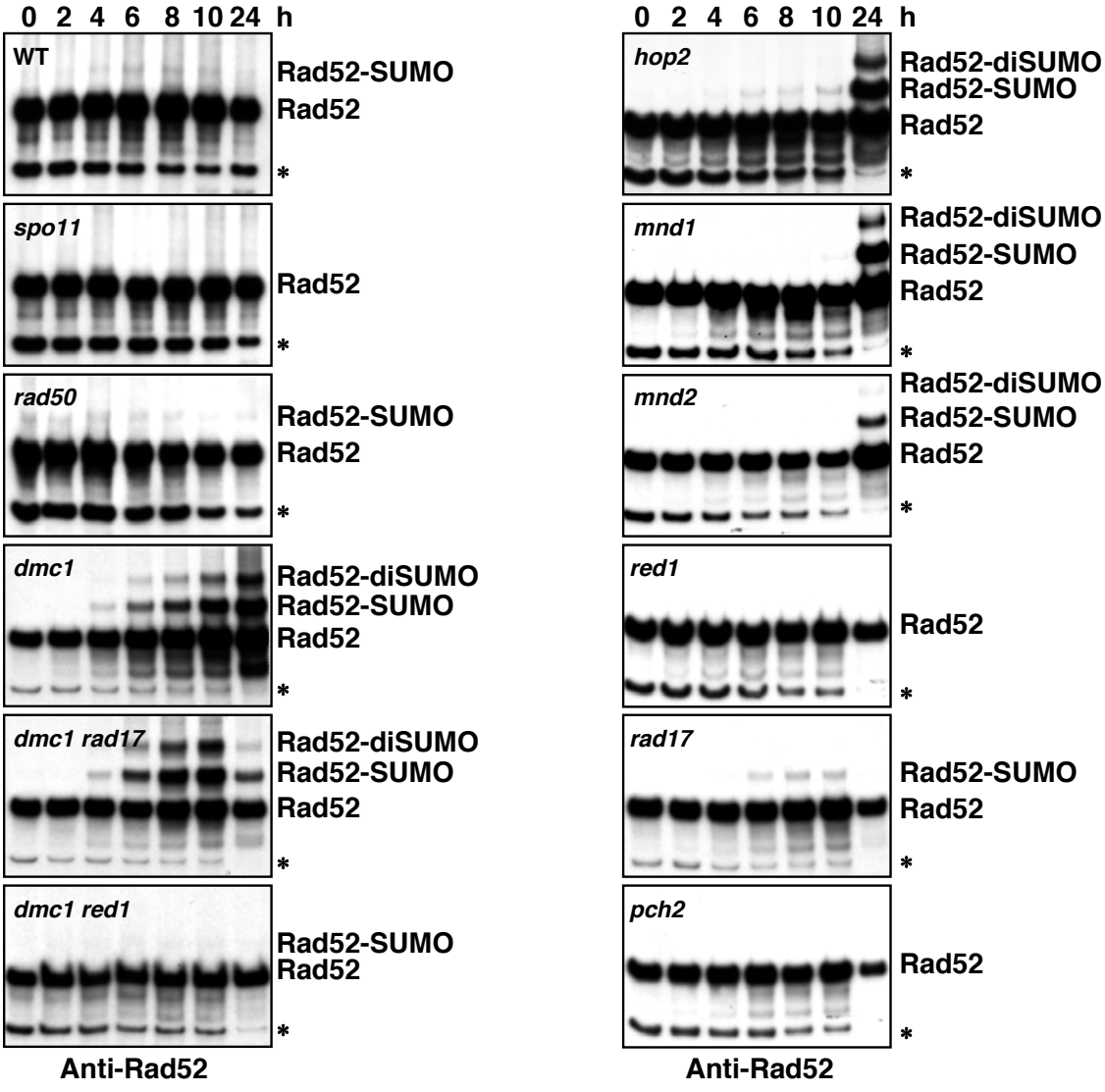

Abb. 13: Regulation der SUMOylierung von Rad52 in der Meiose
Synchrone Sporulation von homozygoten, diploiden SK1-Stämmen von *S. cerevisiae*, in denen die angegebenen Gene deletiert waren. Zellextrakte von verschiedenen Zeitpunkten wurden in anti-Rad52 Westernblots analysiert. Der Stern kennzeichnet ein kreuzreaktives Protein. Effiziente Sporulation von WT Zellen wurde mikroskopisch verifiziert.

in denen *MND1*, *MND2* oder *HOP2* deletiert war, die Rad52-SUMOylierung induziert (**Abb. 13** bzw. Daten nicht gezeigt). Interessanterweise weisen auch *mnd1*, *mnd2* und *hop2* Zellen übermäßig resektierte DNA-Einzelstränge auf (Leu *et al.*, 1998; Gerton und DeRisi, 2002; Penkner *et al.*, 2005), im Gegensatz zu Deletionsmutanten von *PCH2*, *RED1*, *ZIP1*, *RAD17*, *SGS1*, *NDT80* und *SPO13* (Schwacha und Kleckner, 1997; San-Segundo und Roeder, 1999; Roeder und Bailis, 2000; Allers und Lichten, 2001; Rockmill *et al.*, 2003). Zudem bilden Mnd1 und Hop2 ein Heterodimer, das Dmc1 in dessen rekombinatorischer Funktion unterstützt (Chen *et al.*, 2004).

Diese Daten lassen vermuten, dass durch den MRX-Komplex prozessierte DSB Auslöser für die SUMOylierung waren. Zudem schien die SUMOylierung durch übermäßig resektierte DNA induziert zu werden. Hierfür sprach auch, dass in einer *dmc1 red1* Doppelmutante keine Induktion der SUMOylierung mehr zu sehen war (**Abb. 13)**. Im Gegensatz zu *dmc1* Zellen ist in der *dmc1 red1* Doppelmutante nämlich Rekombination möglich (und somit akkumuliert keine einzelsträngige DNA), da aufgrund der *RED1* Deletion während der ersten meiotischen Teilung eine Dmc1-unabhängige Rekombination zwischen Schwesterchromatiden erfolgen kann (Schwacha und Kleckner, 1997).

III.2.2 Regulation der Rad52-SUMOylierung in mitotischen Zellen

Da offenbar in meiotischen Zellen prozessierte DSB der Auslöser für die SUMOylierung von Rad52 sind, wurde anschließend untersucht, ob auch in mitotischen Zellen eine ähnliche Regulation stattfindet. Zunächst wurde die Rad52-SUMOylierung nach DNA-Schädigung getestet. Logarithmisch wachsende Zellen wurden mit der alkylierenden Substanz MMS inkubiert und die SUMOylierung im anti-Rad52 Westernblot untersucht. Dabei war eine Dosis-abhängige SUMOylierung von Rad52 zu beobachten, die besonders bei tödlichen MMS-Konzentrationen (≥0,15% MMS) sehr stark induziert war (**Abb. 14a**). Zudem erfolgte die Induktion sehr rasch, da in Gegenwart von 0,3% MMS bereits nach 60 Minuten eine nahezu maximale Induktion auszumachen war (**Abb. 14a**). Ebenso zog die Behandlung logarithmisch wachsender Zellen mit dem UV-Mimetikum 4-Nitroquinolin-1-oxid (4-NQO) eine Dosis-abhängige SUMOylierung von Rad52 nach sich (**Abb. 14a**). Da vor allem MMS ein breites Spektrum an DNA-Schädigungen verursacht, wurde im

Folgenden der Einfluss von Röntgenstrahlung und von Zeocin untersucht, denn diese Behandlungen verursachen fast ausschließlich DSB. Bei der Behandlung von logarithmisch wachsenden Zellen mit Röntgenstrahlung war eine Dosis-abhängige SUMOylierung von Rad52 zu beobachten (**Abb. 14b**). Gleiches galt für Zeocin, und auch hier zeigte sich bereits nach 60 Minuten eine nahezu maximale Induktion der Rad52-SUMOylierung (**Abb. 14b**). Folglich besteht eine Korrelation zwischen der Anzahl (und Reparatur) von DSB und dem Ausmaß der Modifikation von Rad52 mit SUMO.

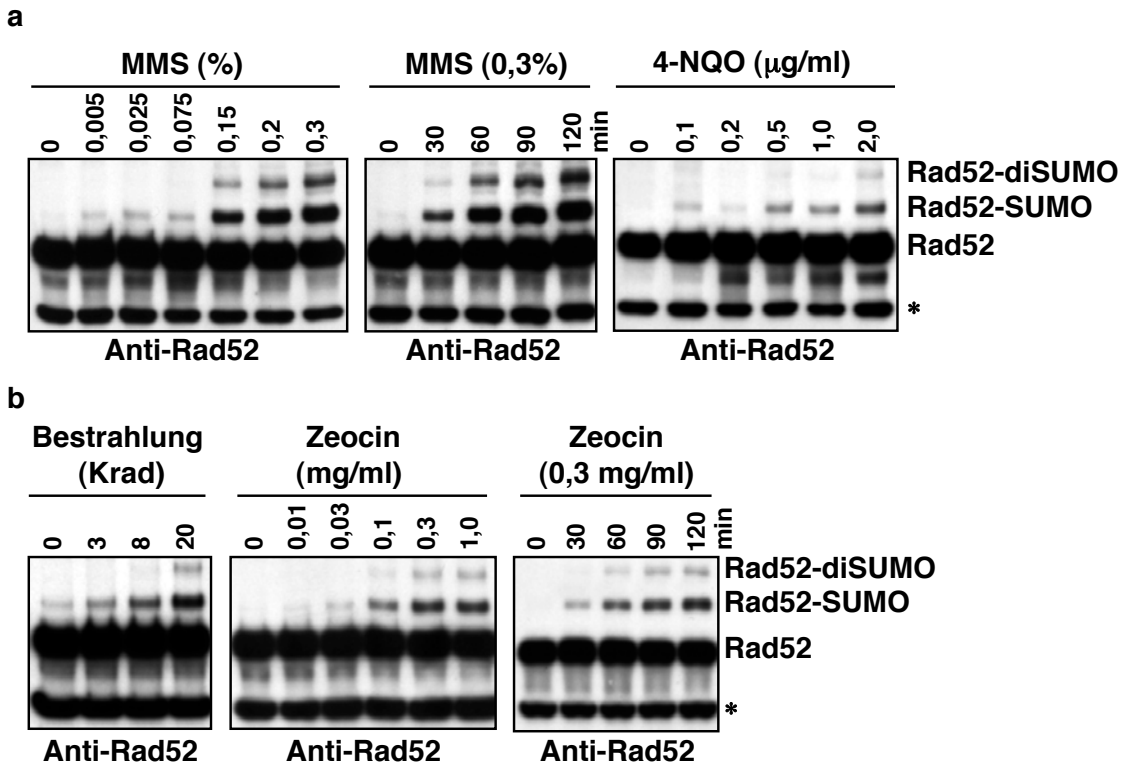

Abb. 14: Induktion der SUMOylierung von Rad52 durch genotoxische Agenzien
a, Modifikation von Rad52 mit SUMO nach Behandlung mit MMS oder 4-NQO veränderte sich in Abhängigkeit von der Konzentration (MMS, 4-NQO; Inkubation für 2 h) oder in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (0,3% MMS). **b**, Rad52-SUMOylierung nach Behandlung mit Röntgenstrahlen (links) sowie mit Zeocin (Mitte und rechts). **a-b**, Rad52 und modifiziertes Rad52 wurden in anti-Rad52 Westernblots nachgewiesen. Der Stern kennzeichnet ein kreuzreaktives Protein.

Um diese Korrelation zu bestätigen, wurden anschließend Mutanten untersucht, die *per se* eine erhöhte Rekombinationsrate aufweisen. Dazu wurde eine Mutante des *RAD6*-DNA-Reparaturweges näher betrachtet (Deletion von

RAD6), in der der *RAD52*-DNA-Reparaturweg hoch reguliert ist (Schiestl *et al.*, 1990). Rad6 ist ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym und maßgeblich an allen Funktionen des *RAD6*-DNA-Reparaturweges beteiligt (Ulrich, 2005). Für den experimentellen Ansatz wurden logarithmisch wachsende Zellen mit MMS inkubiert und die SUMOylierung im anti-Rad52 Westernblot untersucht. Sowohl die basale SUMOylierung (ohne Zugabe von MMS) als auch die durch MMS induzierte SUMOylierung von Rad52 war in *rad6* Hefemutanten gegenüber WT Zellen erhöht (**Abb. 15**). Demzufolge ergibt sich auch hier eine Korrelation von einer hoch regulierten Rekombinationsaktivität und der SUMOylierung von Rad52.

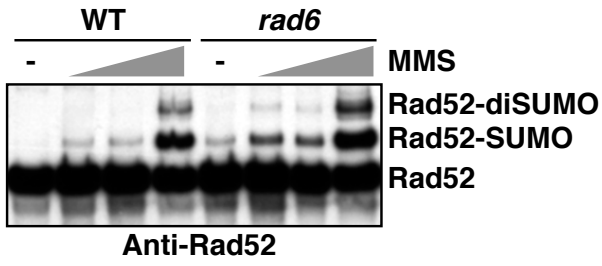

Abb. 15: SUMOylierung von Rad52 in *rad6* Hefemutanten
WT Zellen im Vergleich zu *rad6* Hefemutanten bei der Induktion der Rad52 SUMOylierung infolge einer Behandlung mit MMS (0%, 0,02%, 0,08%, 0,3% MMS). Rad52 und modifiziertes Rad52 wurden in einem anti-Rad52 Westernblot detektiert.

Wie in meiotischen Zellen so spielte auch in mitotischen Zellen der MRX-Komplex eine wichtige Rolle für die SUMOylierung von Rad52. Bei der Analyse der SUMOylierung in logarithmisch wachsenden Zellen der Hefemutanten *rad50*, *xrs2* oder *mre11* mit Hilfe eines anti-Rad52 Westernblots war in allen drei Mutanten des MRX-Komplexes in Gegenwart von MMS die Induktion der SUMOylierung stark eingeschränkt bzw. blieb komplett aus (**Abb. 16**). Dies bestätigte die Vermutung, dass durch den MRX-Komplex prozessierte DSB der Auslöser für die SUMOylierung von Rad52 waren bzw. dass die Präsenz eines intakten MRX-Komplexes für eine effiziente Modifikation wichtig war.

Dass auch ohne MMS-Zugabe in den Extrakten aus den Mutanten *rad50*, *xrs2* bzw. *mre11* eine leichte SUMOylierung von Rad52 zu beobachten war (wie auch in den meiotischen *rad50* Zellen) (**Abb. 13, 16**), lässt sich mit der Akkumulation von DNA-Schäden in diesen Zellen erklären. Denn wenn der MRX-Komplex als Sensor von DNA-Schädigungen ausfällt, häufen sich unreparierte DNA-Schäden an, die teilweise Rad52-abhängig repariert werden (Grenon *et al.*, 2001; D'Amours und Jackson, 2002; Lee *et al.*, 2003; Lisby *et al.*, 2004).

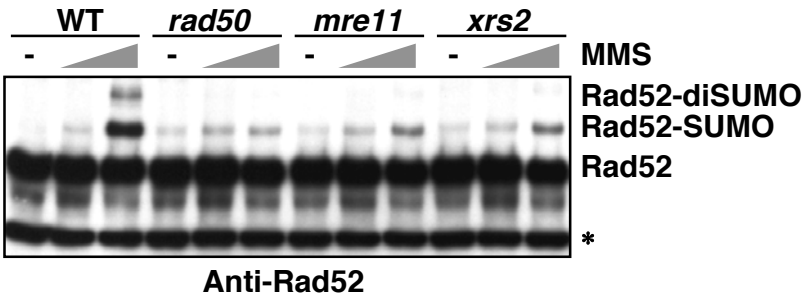

Abb. 16: Notwendigkeit des MRX-Komplexes für eine effiziente SUMOylierung von Rad52 nach DNA-Schädigung
SUMOylierung von Rad52 nach Inkubation mit MMS. Proteine aus WT Zellen sowie aus den Hefemutanten *rad50*, *mre11* und *xrs2* wurden in anti-Rad52 Westernblots analysiert. Die verwendeten MMS-Konzentrationen waren dabei 0%, 0,07% und 0,3% MMS. Der Stern kennzeichnet ein kreuzreaktives Protein.

Da viele DNA-Reparaturereignisse über *checkpoint*-Mechanismen reguliert werden, wurde im Folgenden der Einfluss von *checkpoint*-Kinasen auf eine effiziente Modifikation von Rad52 mit SUMO untersucht. Da jedoch in den entsprechenden Hefemutanten der Sensorkinasen Mec1 und Tel1 die SUMOylierung nach DNA-Schädigung im selben Maße (oder leicht stärker) induzierbar war als in den isogenen WT Stämmen, scheint die Rad52-SUMOylierung unabhängig von *checkpoint*-Mechanismen zu erfolgen (**Abb. 17**).

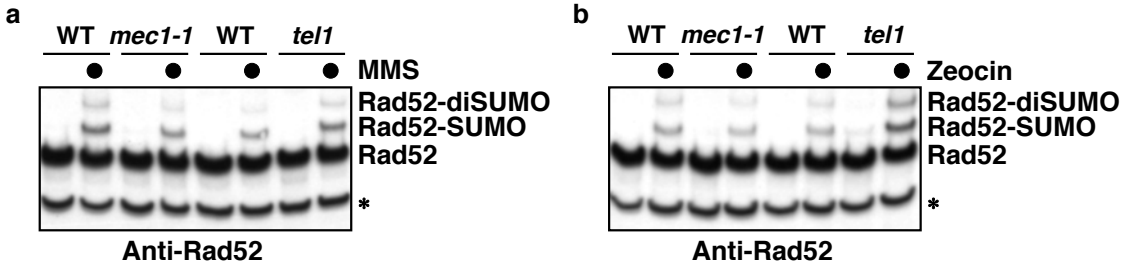

Abb. 17: Beteiligung von *checkpoint*-Kinasen an der Rad52 SUMOylierung
Die Sensorkinasen Mec1 und Tel1 (homolog zu ATR bzw. ATM) werden nicht für eine effiziente SUMOylierung von Rad52 nach DNA-Schädigung benötigt. **a-b**, Proteine aus den Hefemutanten *mec1-1* und *tel1* sowie den isogenen WT Stämmen wurden in anti-Rad52 Westernblots analysiert. Der Stern kennzeichnet ein kreuzreaktives Protein. **a**, Die verwendeten MMS-Konzentrationen waren 0% und 0,3% (●) MMS. **b**, Die verwendeten Zeocin-Konzentrationen betrugen 0 und 0,3 (●) mg/ml.

III.3 Rolle der Rad52-SUMOylierung in DNA-Reparatur und Rekombination

III.3.1 SUMOylierungsdefiziente Rad52-Mutanten in der DNA-Reparatur

Um die Relevanz der Rad52-SUMOylierung bei der Reparatur von DNA-Schäden zu untersuchen, wurden *rad52* Zellen mit verschiedenen *RAD52*-Allelen komplementiert, die entweder WT Rad52 exprimierten oder Varianten, in denen die Akzeptorlysine für die SUMOylierung durch Arginine ersetzt waren. Bei der phänotypischen Untersuchung zeigte sich, dass die Einzelmutanten von K10, K11 und K220 sowie deren Doppel- und Dreifachmutanten die Hypersensitivität von *rad52* Zellen gegenüber DNA-Schäden durch MMS oder Röntgenstrahlen vollständig komplementierten (**Abb. 18** bzw. Daten nicht gezeigt).

Auch sonst wiesen SUMOylierungsdefiziente Rad52-Mutanten keine detektierbaren mitotischen Wachstumsdefekte auf, auch nicht in diploiden Zellen (Daten nicht gezeigt). Um die Bedeutung der Rad52-SUMOylierung für die Meiose zu untersuchen, wurden sporulierende Zellen analysiert, die entweder WT Rad52 exprimierten oder die Rad52-Mutante, die nicht mehr mit SUMO modifiziert werden konnte. Jedoch war weder bei der Sporulationseffizienz noch bei der Überlebensrate der Sporen ein Unterschied zwischen den beiden Allelen feststellbar (Daten nicht gezeigt). Daher scheinen SUMOylierungsdefiziente Rad52-Mutanten in ihrer Funktion weder bei der DNA-Reparatur noch bei meiotischen Rekombination eingeschränkt zu sein.

III.3.2 SUMOylierung von Rad52 ist pro-rekombinatorisch

Da Rad52 an verschiedenen Rekombinationsprozessen beteiligt ist, wurde im Folgenden untersucht, wie sich Defekte in der SUMOylierung von Rad52 auf die Rekombination auswirken. Dazu wurde auf verschiedene Hefestämme zurückgegriffen, die artifizielle Substrate für eine Rekombination anbieten.

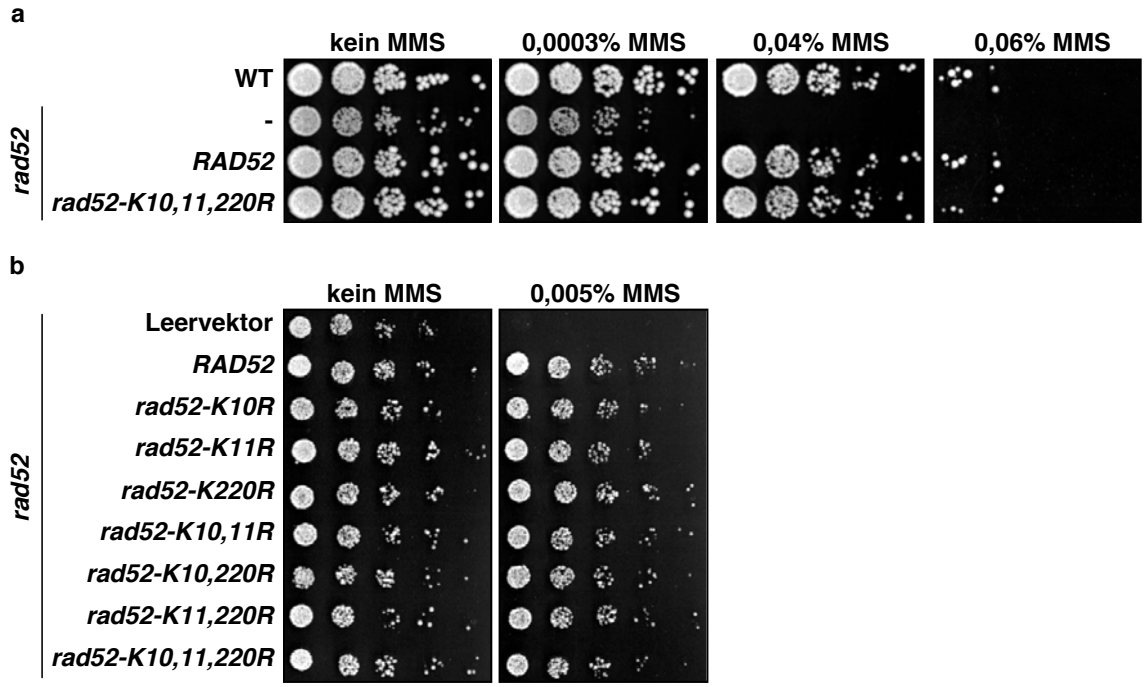

Abb. 18: Hefemutanten mit SUMOylierungsdefizientem Rad52 sind nicht hypersensitiv gegenüber MMS
a, Die verwendeten Stämme waren entweder WT oder *rad52* Hefemutanten. Zellen mit einer *RAD52* Deletion wurden entweder nicht komplementiert oder exprimierten WT RAD52 oder die rad52-K10,11,220R-Mutante vom Genom auf endogenem Niveau. Serielle Verdünnungen dieser Stämme wurden auf Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen von MMS getüpfelt. Platten ohne MMS oder mit 0,0003% MMS wurden zwei Tage bei 30°C inkubiert, Platten mit 0,04% MMS für drei Tage und Platten mit 0,06% MMS für vier Tage. **b**, *rad52* Hefemutanten waren entweder mit einem Leervektor transformiert worden oder exprimierten von Plasmiden die angegebenen Allele von *RAD52*. Serielle Verdünnungen dieser Stämme wurden auf Platten ohne oder mit MMS (0,005%) getüpfelt und zwei Tage bei 30°C inkubiert.

Zunächst wurde ein diploider Hefestamm verwendet, bei dem die interchromosomale Rekombination zwischen zwei Heteroallelen des *HIS1*-Gens untersucht werden konnte. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Rad52 WT und *rad52-K10,11,220R* (**Abb. 19a**).

Im zweiten Testsystems, in dem die intrachromosomale Rekombination zwischen zwei gegenläufig orientierten *ADE2*-Heteroallelen erfolgen konnte, wies die SUMOylierungsdefiziente Rad52-Mutante dagegen leicht geringere Rekombinationsraten gegenüber Rad52 WT auf (**Abb. 19b**).

Als drittes Testsystem wurde ein Hefestamm gewählt, bei dem die intrachromosomale Rekombination zwischen zwei gleich orientierten *LEU2*-Heteroallelen analysiert werden konnte (*direct repeat assay*). Das Besondere an

diesem System ist, dass es mehrere Rekombinationsereignisse zwischen den Substraten ermöglicht. So kann es entweder zu Genkonversionen (Leu^+ Ura^+-Ereignisse) oder aber zu Gendeletionen (Ura^--Ereignisse) führen (**Abb. 20a**). Im Hinblick auf die Anzahl aller Rekombinationsereignisse (Leu^+-Zellen, schwarz) zeigte sich eine signifikante Abnahme im Vergleich von WT Rad52 zu *rad52-K10,11,220R* (**Abb. 20b**). Allerdings war bei den Rekombinationsereignissen, die mit Gendeletionen verbunden sind (Leu^+ Ura^--Zellen, dunkelgrau), der Rekombinationsdefekt der SUMOylierungsdefizienten Rad52-Mutante gegenüber Rad52 WT noch stärker ausgeprägt (**Abb. 20b**). Dieser Defekt ging mit einer höheren Rekombinationsrate der *rad52-K10,11,220R*-Mutante bei den Genkonversionen (Leu^+ Ura^+ Ereignisse, hellgrau) einher.

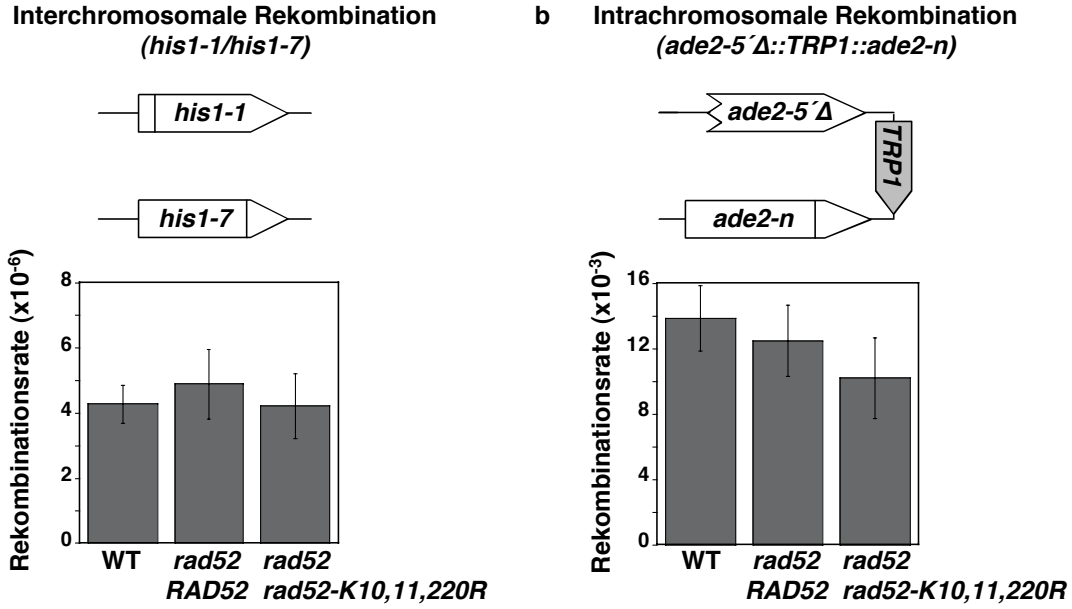

Abb. 19: Einfluss der Rad52-SUMOylierung auf interchromosomale Rekombination und intrachromosomale Rekombination (*inverted repeat*-System)
Die Rekombination wurde in den abgebildeten Systemen untersucht. Rekombination zwischen zwei nicht funktionalen Allelen eines Auxotrophiemarkers erlaubt das Wachstum auf einem entsprechenden Selektionsmedium. Mit Hilfe einer Fluktuationsanalyse wurden die Rekombinationsraten bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier bis dreizehn unabhängigen Fluktuationstests inklusive der Standardabweichung. In den schematischen Darstellungen repräsentieren die Pfeile die im Experiment untersuchten Gene. Die weißen Flächen markieren die zwischen den beiden Allelen homologen Sequenzbereiche. **a**, Rekombination in diploiden Zellen zwischen den Heteroallelen *his1-1* und *his1-7*, die auf homologen Chromosomen liegen. **b**, Intrachromosomale Rekombination zwischen zwei gegenläufig orientierten *ADE2*-Allelen (*inverted repeat*-System). **a-b**, Die verwendeten Stämme waren entweder WT oder *rad52* Hefemutanten. Zellen mit einer *RAD52* Deletion exprimierten WT RAD52 oder die rad52-K10,11,220R-Mutante vom Genom auf endogenem Niveau.

Die spezifisch geringere Rekombinationsrate der *rad52-K10,11,220R*-Mutante bei den Gendeletionen im *direct repeat assay* konnte also entweder einen Defekt in einem Rad51-unabhängigen Rekombinationsweg wie SSA (*single strand annealing*) widerspiegeln oder neben anderen Möglichkeiten bedeuten, dass die

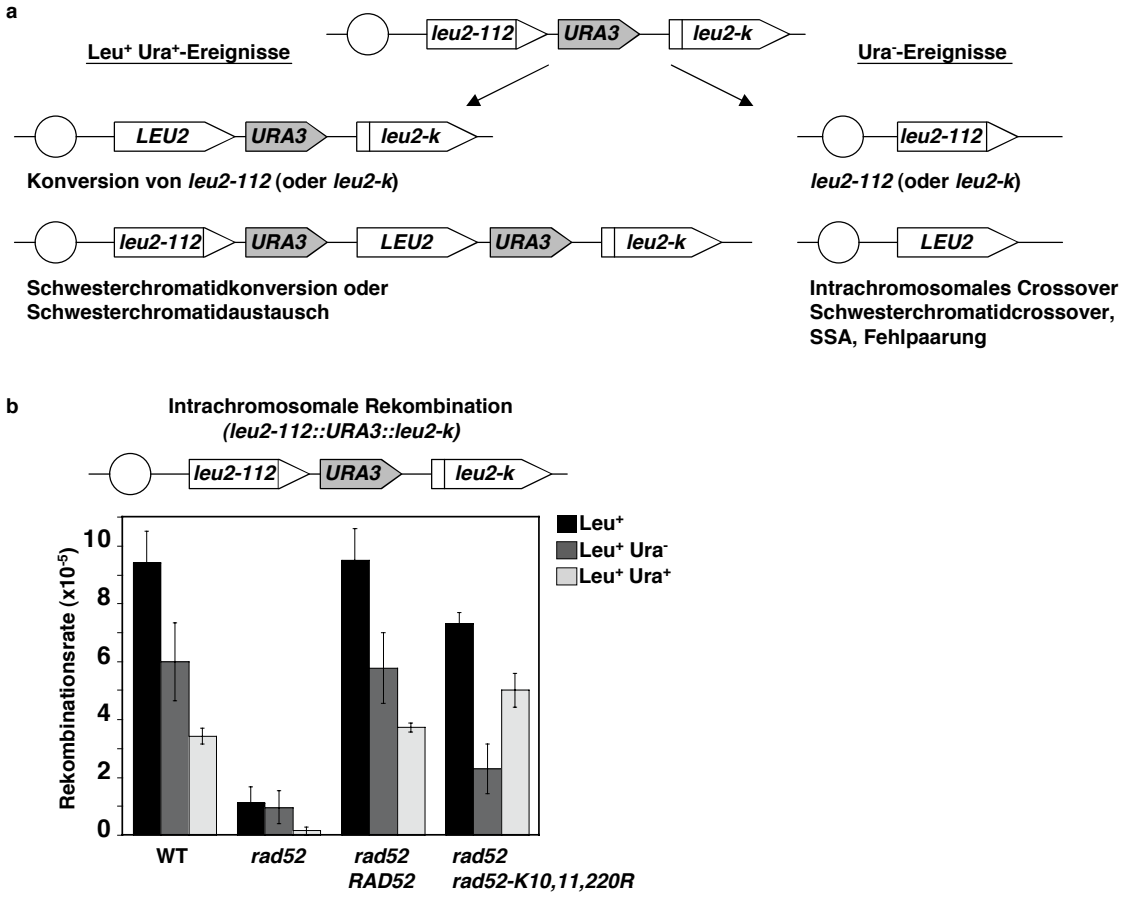

Abb. 20: Einfluss der Rad52-SUMOylierung auf intrachromosomale Rekombination (*direct repeat*-System)
a, Übersicht über die verschiedenen Rekombinationsmöglichkeiten des *direct repeat*-Systems (*leu2-112::URA3::leu2-k*), die zu Leu$^+$ Ura$^+$-Ereignissen oder zu Ura$^-$-Ereignissen führen. (nach Symington, 2002) **b**, Intrachromosomale Rekombination zwischen zwei gleich orientierten *LEU2*-Allelen (*direct repeat*-System). Rekombination zwischen den zwei nicht funktionalen Allelen erlaubt das Wachstum auf einem Selektionsmedium ohne Leucin. Mit Hilfe einer Fluktuationsanalyse wurden die Rekombinationsraten bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Fluktuationstests inklusive der Standardabweichung. In den schematischen Darstellungen repräsentieren die Pfeile die im Experiment untersuchten Gene, und die weißen Flächen geben die zwischen den beiden Allelen homologen Sequenzbereiche an. Dargestellt sind Rekombinationsereignisse insgesamt (Leu+; schwarz), Deletionsereignisse (Leu+, Ura-; dunkelgrau) und Konversionsereignisse (Leu+, Ura+; hellgrau). Die verwendeten Stämme waren entweder WT oder *rad52* Hefemutanten. Zellen mit einer *RAD52* Deletion wurden entweder nicht komplementiert oder exprimierten WT RAD52 oder die rad52-K10,11,220R-Mutante vom Genom auf endogenem Niveau.

SUMOylierung von Rad52 die Entscheidung von Genkonversion gegenüber *crossover* beeinflusst (**Abb. 20a**).

Daher wurde im Folgenden getestet, wie sich die SUMOylierungsdefiziente Rad52-Mutante in einem SSA-Assay verhält, bei dem ein induzierbarer DSB von gleich orientierten Abschnitten des URA3-Promotors flankiert wurde. Zugleich wurde in diesem Assay das epistatische Verhältnis zu dem zu Rad52 homologen Rekombinationsfaktor Rad59 überprüft, da Rad59 eine wichtige Rolle bei SSA spielt (Bai und Symington, 1996). Anscheinend erfüllt die SUMOylierung von Rad52 jedoch keine Funktion bei SSA. Denn sowohl in Gegenwart von Rad59 als auch in

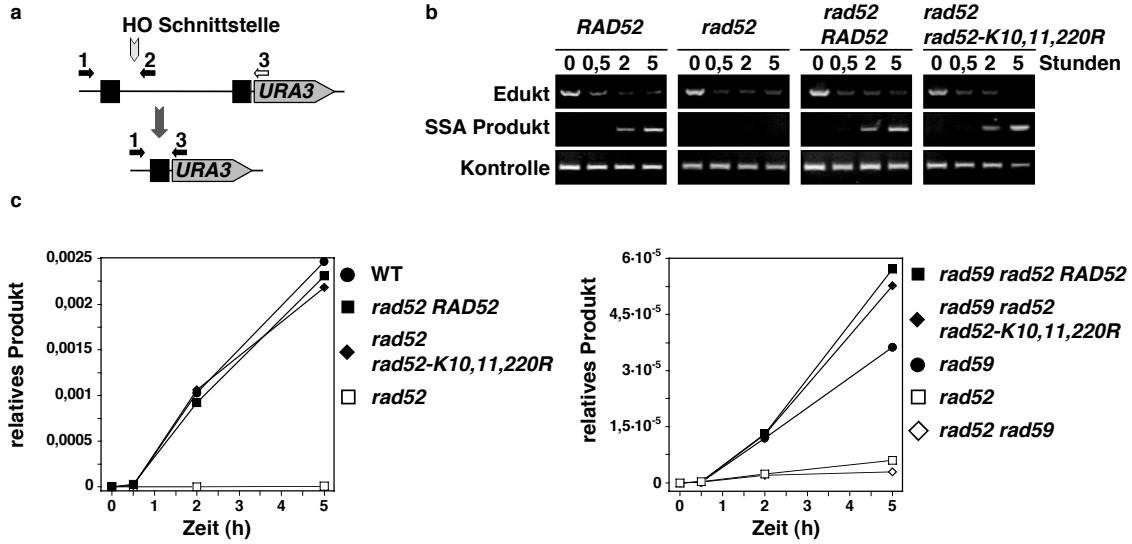

Abb. 21: Rad52-SUMOylierung wird nicht für *single stand annealing* (SSA) benötigt

a, Schema des SSA-Experiments. Durch Zugabe von Galaktose konnte die Expression der HO-Endonuklease induziert werden, welche dann an der Schnittstelle für die HO-Endonuklease einen DSB verursachte. Die Schnittstelle wurde von zwei gleich orientierten, 205 bp langen Abschnitten des *URA3*-Promotors flankiert (schwarze Rechtecke). Ein DSB initiierte das *single strand annealing* (SSA), was zu einem Deletionsereignis führte. Die mit 1, 2 und 3 gekennzeichneten Primer wurden zur Analyse der SSA-Ereignisse 0, 0,5, 2 oder 5 Stunden nach der Zugabe von Galaktose verwendet. **b**, SSA wurde in WT Zellen sowie in den Hefemutanten *rad52*, *rad59* und *rad52 rad59* analysiert. Zellen mit einer *RAD52* Deletion waren entweder mit einem Leervektor transformiert worden oder exprimierten WT RAD52 oder die rad52-K10,11,220R-Mutante von Plasmiden. Die Expression von Plasmiden wurde durch Westernblots überprüft und war vergleichbar mit der Expression der entsprechenden *RAD52*-Stämme. WT Zellen und die Hefemutante *rad59* waren mit einem Leervektor transformiert worden. Beispiele für die PCR-Produkte vom Edukt (Primer 1 und 2), vom SSA-Produkt (Primer 1 und 3) und einer Kontrolle (ARG5/6) für die vier angegebenen Stämme. Die Stunden geben die Zeit nach SSA-Initiierung durch Galaktose-Zugabe an. **c**, Zur Quantifizierung der SSA-Produkte wurde eine RealTime-PCR durchgeführt. Die Graphen zeigen die Quantifizierung eines einzelnen Experiments. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten waren vergleichbar.

Stämmen mit einer *RAD59*-Deletion verhielt sich die *rad52-K10,11,220R*-Mutante wie WT Rad52 bei der Reparatur eines DSB, der nur über SSA repariert werden konnte (**Abb. 21**). Insgesamt scheint die SUMOylierung von Rad52 also nur ganz bestimmte Rekombinationsprozesse zu beeinflussen (**Abb. 20b**) und in diesen Fällen pro-rekombinatorisch zu wirken.

III.4 Rad52-SUMOylierung beeinflusst die Proteinaktivität und die Proteinstabilität

III.4.1 Rad52-SUMOylierung ist toxisch in Helikasemutanten

Wie zuvor gezeigt schien die SUMOylierung von Rad52, eine pro-rekombinatorische Rolle zu spielen. Daher wurde nachfolgend analysiert, wie sich Defekte in der SUMOylierung von Rad52 auf das Zellwachstum auswirken, wenn Rad52 schädlich für das Überleben ist. Eine solche Situationen liegt vor, wenn zwei der drei folgenden Helikasen deletiert sind: Srs2, Sgs1, Rrm3 (Gangloff *et al.*, 2000; Ooi *et al.*, 2003; Schmidt und Kolodner, 2004; Torres *et al.*, 2004b). Während Rrm3 für die Replikation durch Telomer- und rDNA-Regionen notwendig ist (Ivessa *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2004a), regulieren Sgs1 und Srs2 die Rekombination im Allgemeinen negativ (Ira *et al.*, 2003). Für alle drei Helikasen ist dabei charakteristisch, dass ihre Deletion zu einem Phänotyp mit erhöhten Rekombinationsraten führt. Zudem werden Helikasedoppelmutanten, wie z.B. *rrm3 srs2*, in ihren Phänotypen durch Mutationen in frühen Faktoren der homologen Rekombination wie Rad51, Rad52, Rad55 und Rad57 gerettet (Gangloff *et al.*, 2000; Schmidt und Kolodner, 2004; Torres *et al.*, 2004b). Nach diesen Daten führt in den Helikasedoppelmutanten eine fehlerhaft regulierte Rekombination zu toxischen Rekombinationsintermediaten, an deren Entstehung auch Rad52 beteiligt ist.

Für die Analyse wurden Helikasedoppelmutanten generiert, die eine Helikase von einem *URA3*-Plasmid exprimierten, gegen das mittels 5-Fluor-Orotsäure (5-FOA) selektiert werden konnte. Außerdem war das *RAD52* Gen deletiert, und die Zellen trugen entweder noch einen Leervektor oder die *RAD52* Deletion wurde durch die Expression von WT Rad52 bzw. rad52-K10,11,220R komplementiert. Beim Ausbringen auf 5-FOA-haltigem Medium wurde so eine

Helikasedoppelmutante erzeugt, in der man die Auswirkung von den verschiedenen Rad52-Allelen untersuchen konnte. Wie erwartet zeigten Zellen mit WT *RAD52* kein Wachstum auf 5-FOA-haltigem Medium, während Rad52-defiziente Zellen mit Leervektor wuchsen (**Abb. 22a**). Überraschenderweise überlebten auch die *rad52-K10,11,220R*-Mutanten die 5-FOA-Selektion (**Abb. 22a**). Diese Rettung von Helikasedoppelmutanten war besonders in *rrm3 srs2* Zellen ausgeprägt. Das Wachstum war hier fast so gut wie in Zellen ohne Rad52, während in *sgs1 srs2* die Rettung nur gering ausfiel (**Abb. 22a**).

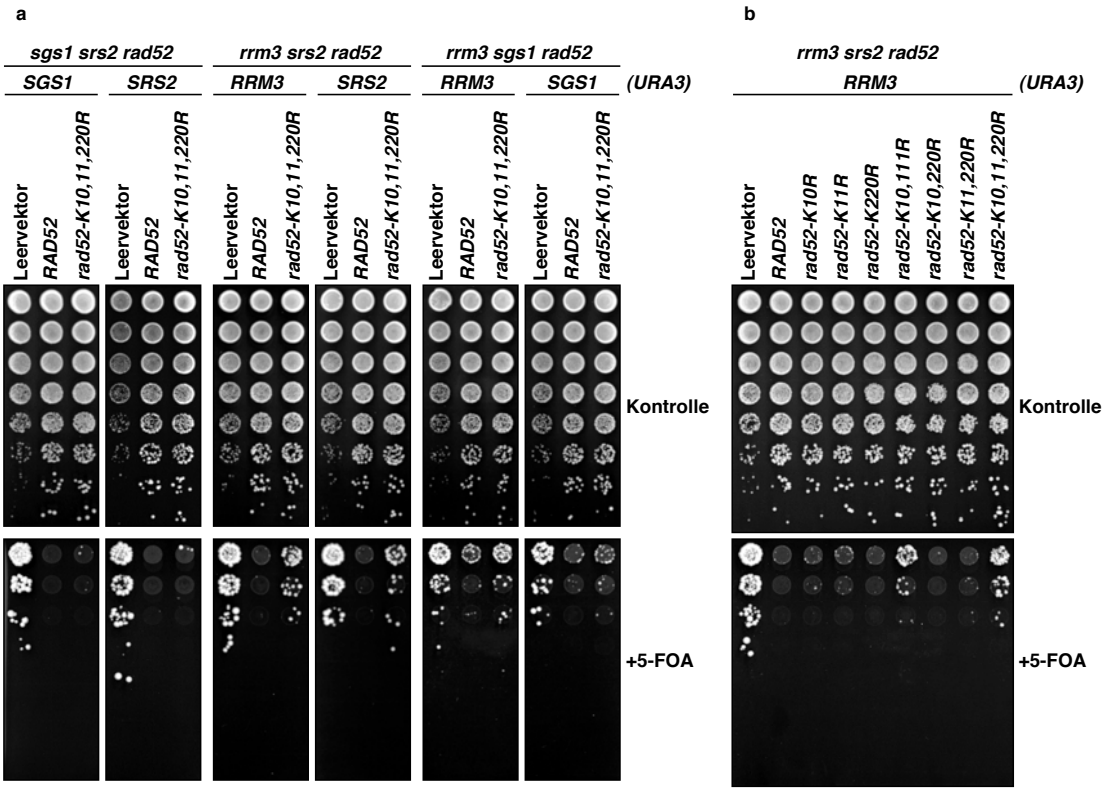

Abb. 22: Einfluss der Rad52-SUMOylierung auf das Überleben von Hefemutanten, in denen zwei Helikasen deletiert sind

a, Analyse von WT Rad52 und der rad52-K10,11,220R-Mutante beim Wachstum von Hefemutanten, in denen zwei der Helikasen Srs2, Sgs1 oder Rrm3 sowie Rad52 deletiert waren. (Wenn die Helikasen paarweise deletiert sind, sterben die Zellen, sofern WT Rad52 noch präsent ist.) Durch Ausbringen auf 5-FOA-haltigem Medium wurden die Zellen dazu gebracht, gegen *URA3*-Plasmide ("*URA3*") zu selektieren, welche die angegebene Helikase exprimierten. Dadurch wurden reine Helikasedoppelmutanten generiert. Zusätzlich waren die Zellen entweder mit einem Leervektor transformiert worden oder sie exprimierten WT *RAD52* oder die *rad52-K10,11,220R*-Mutante von Plasmiden. Während Zellen in Gegenwart von WT Rad52 das Ausbringen auf 5-FOA nicht überlebten, wurden Zellen mit der rad52-K10,11,220R-Mutante teilweise gerettet. Serielle Verdünnungen der Stämme wurden auf Kontrollplatten oder auf 5-FOA-haltiges Medium getüpfelt und bei 30°C inkubiert. **b**, Beteiligung der einzelnen Akzeptorlysine der Rad52-SUMOylierung an der Rettung der *rrm3 srs2* Helikasedoppelmutante. Der Versuchsaufbau ist identisch zu dem Versuchsaufbau in **a**.

Mit dem oben beschriebenen Ansatz wurde nun analysiert, inwieweit die einzelnen Akzeptorlysine der Rad52-SUMOylierung bei der Rettung von Helikasedoppelmutanten involviert sind. Während die Rad52-Einzelmutanten kaum zur Rettung beitrugen, supprimierten die *rad52-K10,11R* und die *rad52-K10,11,220R*-Mutanten am besten (**Abb. 22b**). Demzufolge ist die SUMOylierung an allen drei Akzeptorlysinen für eine Suppression wichtig, wobei der SUMOylierung an K10/11 eine besonders große Bedeutung zukommt. Außerdem ließen diese Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass durch die ausbleibende SUMOylierung (direkt oder indirekt) ein ansonsten toxisches Rekombinationsintermediat nicht mehr entsteht. Mit anderen Worten trägt die SUMOylierung von Rad52 zu dessen Aktivität beim Rekombinationsprozess bei.

Auch für die Untersuchung, ob die SUMOylierung von Rad52 im SSA-Prozess eine Rolle spielt, wurde der oben beschriebene 5-FOA-Selektionsansatz herangezogen und das epistatische Verhältnis von Rad59 und Rad52-SUMOylierung analysiert (**Abb. 21**). Dabei war festzustellen, dass sich bei der Rettung von Helikasedoppelmutanten *rad59* und *rad52-K10,11,220R* additiv zueinander verhalten (**Abb. 23**). Dies wiederum bestätigte das schon vorangegangene Ergebnis, dass die SUMOylierung von Rad52 nicht zum SSA beiträgt (**Abb. 21**).

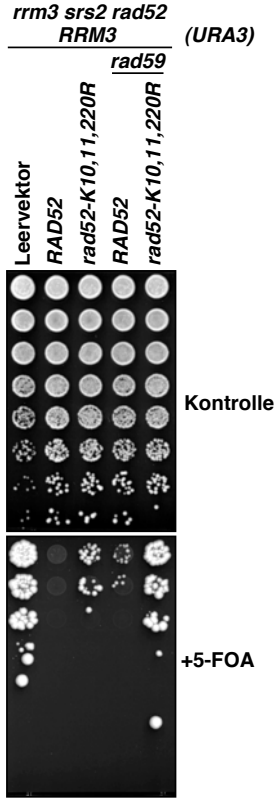

Abb. 23: Bei der Rettung der *rrm3 srs2* Helikasedoppelmutante verhält sich die SUMOylierungs-defiziente Rad52-Mutante additiv zur *RAD59*-Deletion
Wachstum von Zellen, in denen die zwei Helikasen Srs2 und Rrm3 sowie Rad52 deletiert waren. (Wenn diese Helikasen paarweise deletiert sind, sterben die Zellen, sofern WT Rad52 noch präsent ist.) Durch Ausbringen auf 5-FOA-haltigem Medium wurden die Zellen dazu gebracht, gegen *URA3*-Plasmide ("*URA3*") zu selektieren, welche Rrm3 exprimierten. Dadurch wurden reine *rrm3 srs2* Helikasedoppelmutanten generiert. Zusätzlich waren die Zellen entweder mit einem Leervektor transformiert worden oder sie exprimierten WT *RAD52* oder die *rad52-K10,11,220R-Mutante* von Plasmiden. Außerdem war *RAD59* deletiert (sofern angegeben). Während Zellen in Gegenwart von WT Rad52 das Ausbringen auf 5-FOA nicht überlebten, wurden Zellen mit der rad52-K10,11,220R-Mutante oder einer *RAD59*-Deletion teilweise gerettet. Serielle Verdünnungen der Stämme wurden auf Kontrollplatten oder auf 5-FOA-haltiges Medium getüpfelt und bei 30°C inkubiert.

III.4.2 SUMOylierung von Rad52 erhöht die Proteinstabilität

Es stellte sich die Frage, wie die SUMOylierung die Aktivität von Rad52 beeinflussen könnte. Da SUMO sich positiv auf die Stabilität eines Proteins auswirken kann (siehe II.1.3), wurde im Folgenden die Stabilität von Rad52

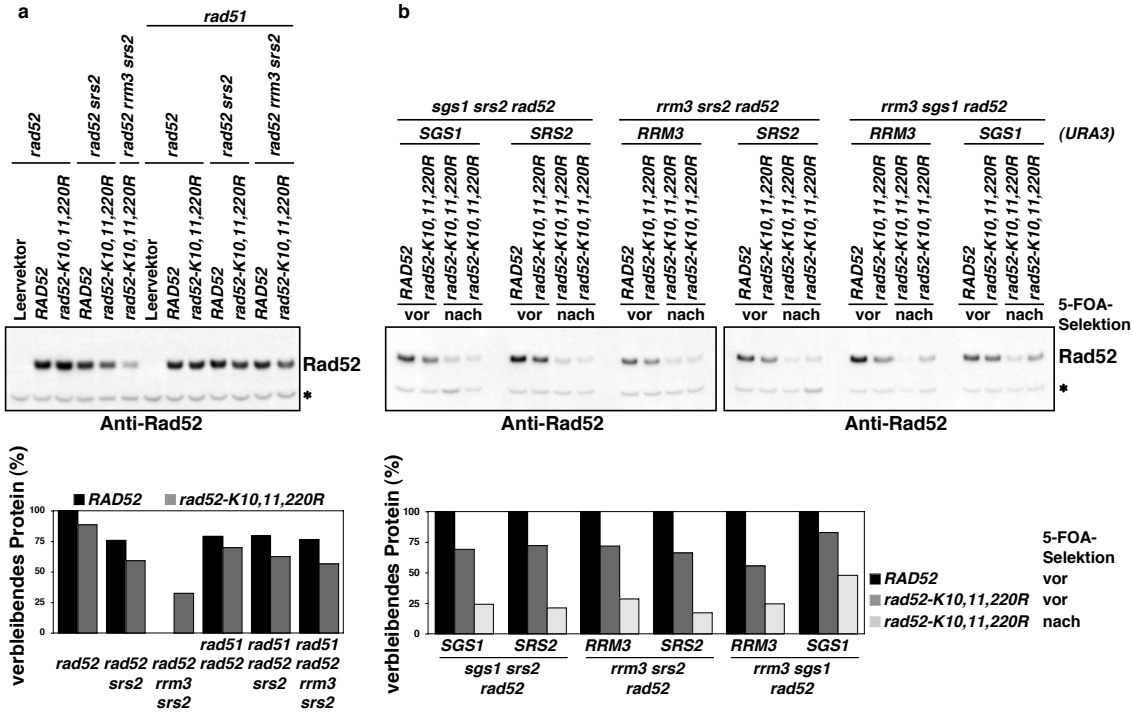

Abb. 24: Einfluss der Rad52-SUMOylierung sowie von Helikasemutationen auf die Proteinstabilität von Rad52

a, Mit Hilfe eines anti-Rad52 Westernblots wurde der *steady state*-Level des Rad52 WT Proteins und des rad52-K10,11,220R-Proteins in Helikase-WT-Zellen ("*rad52*"), in der *srs2* Helikaseeinzelmutante ("*srs2 rad52*") und in der *rrm3 srs2* Helikasedoppelmutante ("*rrm3 srs2 rad52*") visualisiert. Der Effekt, dass durch die Deletion von Helikasen der Proteinlevel von Rad52 abnahm (WT gegenüber Helikaseeinzelmutante gegenüber Helikasedoppelmutante), wurde durch eine zusätzliche Mutation in *RAD51* teilweise revertiert (die sieben rechten Spuren im Westernblot). Die Quantifizierung der Proteinlevel des Rad52 WT Proteins (schwarz) und des rad52-K10,11,220R-Proteins (dunkelgrau), normalisiert gegen das kreuzreaktive Protein (*), ist im unteren Teil der Abbildung dargestellt. **b**, *steady state*-Level des Rad52 WT Proteins und des rad52-K10,11,220R-Proteins in Helikasedoppelmutanten. Hefemutanten, in denen zwei der Helikasen Srs2, Sgs1 oder Rrm3 sowie Rad52 deletiert waren, wurden durch eine 5-FOA-Selektion dazu gebracht, gegen *URA3*-Plasmide ("*URA3*") zu selektieren, welche die angegebene Helikase exprimierten. Zellen vor der 5-FOA-Selektion waren Helikaseeinzelmutanten, Zellen nach der 5-FOA-Selektion Helikasedoppelmutanten. Zusätzlich waren die Zellen entweder mit einem Leervektor transformiert worden oder sie exprimierten WT *RAD52* oder die *rad52-K10,11,220R*-Mutante von Plasmiden. Der Proteinlevel des rad52-K10,11,220R-Proteins wurde in Duplikaten analysiert. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Quantifizierung der Rad52-Proteinlevel, normalisiert gegen das kreuzreaktive Protein (*).

eingehend untersucht. In Extrakten aus mitotischen Zellen zeigte sich ein etwas geringerer Level des rad52-K10,11,220R-Proteins im Vergleich zum Rad52 WT Protein (**Abb. 24a**). Dieser Unterschied war auch in *srs2* Hefemutanten zu beobachten; in diesen Zellen war aber zusätzlich der *steady state*-Level der Rad52-Proteine niedriger (**Abb. 24a**). Der größte Unterschied zu WT Zellen war in der *rrm3 srs2* Helikasedoppelmutante zu beobachten. Hier sank der *steady state*-Level der rad52-K10,11,220R-Mutante auf circa 30% im Vergleich zu WT Rad52 aus WT Zellen. Derselbe Effekt zeigte sich auch in den Helikasedoppelmutanten *rrm3 sgs1* und *sgs1 srs2* (**Abb. 24b**). Diese Beobachtung impliziert zum einen, dass rad52-K10,11,220R instabiler ist als WT Rad52, was möglicherweise zur Rettung der Helikasedoppelmutanten beiträgt. Zum anderen werden in Helikasemutanten offenbar mehr Rad52-Moleküle abgebaut als in WT Zellen. Interessanterweise wurden diese destabilisierenden Effekte in Helikasemutanten durch die Deletion des Rekombinationsfaktors Rad51, das ein Substrat des Rad52-Proteins ist, teilweise revertiert (**Abb. 24a**).

Um den Befund der unterschiedlichen Stabilität von SUMOylierungsdefizienten und -profizienten Proteinen zu bestätigen, wurden *expression shut-off* Experimente in der *srs2* Helikasemutante durchgeführt. Dabei zeigte das rad52-K10,11,220R-Protein mit circa 95 Minuten eine ungefähr halb so lange Halbwertszeit wie WT Rad52 (drei Stunden Halbwertszeit) (**Abb. 25a**). Demnach wird das SUMOylierungsdefiziente Mutantenprotein doppelt so schnell abgebaut wie das WT Protein. Zudem vermittelt das Proteasom den Abbau von Rad52. Denn in einer temperatursensitiven Proteasommutante, in der zusätzlich die Helikase *RRM3* deletiert war, waren die Proteinlevel von Rad52 WT und Mutantenprotein deutlich erhöht. Im Fall des Mutantenproteins war dieser Effekt sogar so ausgeprägt, dass fast das Niveau von WT Rad52 erreicht wurde (**Abb. 25b**). Insgesamt bedeutet dies, dass die SUMOylierung Rad52 vor beschleunigtem proteasomalen Abbau schützt und dieser Abbau anscheinend besonders die Moleküle betrifft, die aktiv an Rekombinationsprozessen beteiligt sind, beispielsweise in Helikasemutanten.

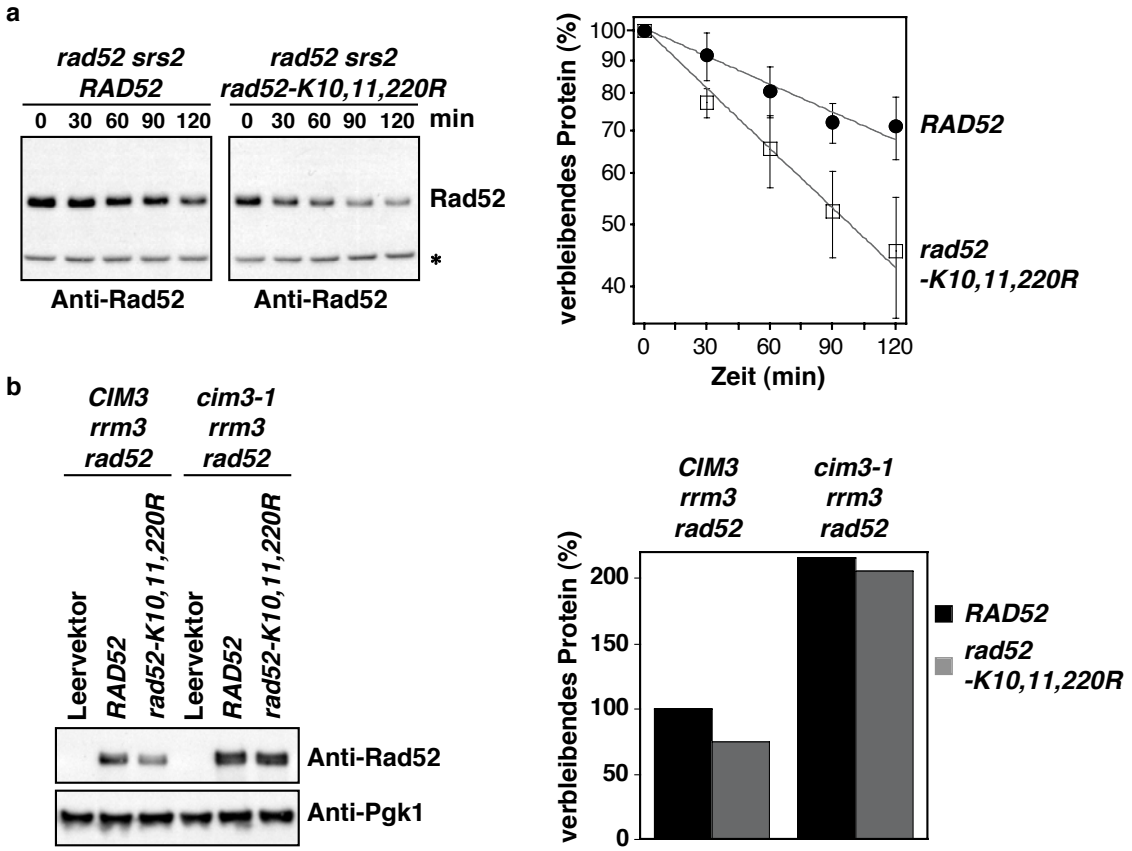

Abb. 25: Einfluss der Rad52-SUMOylierung auf die Halbwertszeit von Rad52 sowie Beteiligung des Proteasoms

a, Analyse des Proteinabbaus des Rad52 WT Proteins und des rad52-K10,11,220R-Proteins in *srs2* Hefemutanten mit Hilfe von *expression shut-off* Experimenten. Durch Zugabe von Cycloheximid wurde ab dem Zeitpunkt 0 Minuten jegliche Proteinbiosynthese inhibiert. Die Quantifizierung der Proteinlevel des Rad52 WT Proteins und des rad52-K10,11,220R-Proteins von vier unabhängigen Experimenten, normalisiert gegen das kreuzreaktive Protein (*), ist im rechten Teil der Abbildung dargestellt. **b**, Sowohl das Rad52 WT Protein als auch das rad52-K10,11,220R-Protein wurden in einer Proteasommutante stabilisiert. Die angegebenen *RAD52*-Allele wurden in *rrm3 rad52* Hefemutanten exprimiert. In Bezug auf die Untereinheit des Proteasoms Cim3 exprimierten die verwendeten Stämme entweder das WT Allel (*CIM3*) oder ein temperatursensitives Allel (*cim3-1*). Der rechte Teil der Abbildung zeigt die Quantifizierung der Rad52-Proteinlevel, normalisiert gegen die Ladekontrolle Pgk1.

IV DISKUSSION

Rad52 spielt eine zentrale Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB). In der vorliegenden Arbeit wurde Rad52 als ein Substrat für eine posttranslationale Modifikation mit SUMO identifiziert und festgestellt, dass die Modifikation mit SUMO Rad52 in seiner Aktivität reguliert. Dabei unterliegen nur die Rad52-Moleküle einer SUMOylierung, die aktiv am Reparaturgeschehen über die homologe Rekombination beteiligt sind. Die Modifikation mit SUMO erfordert die Prozessierung der DSB mit Hilfe des MRX-Komplexes und hat zur Folge, dass die im Rekombinationsprozess involvierten Rad52-Moleküle vor einem vorzeitigen Abbau durch das Proteasom geschützt werden.

IV.1 Rad52-SUMOylierung wird reguliert

Jeder Organismus muss in der Lage sein, sein Erbgut fehlerfrei an die nächste Generation weiterzugeben. Hierfür muss jedoch die genetische Information vor einem Schaden bewahrt werden. Deshalb wird das genetische Material permanent überwacht, damit, falls Schäden auftreten, diese detektiert und behoben werden können. Brüche in der DNA-Doppelhelix stellen dabei einen besonders schwerwiegenden Schaden dar, der bei ausbleibender oder fehlerhafter Reparatur das Überleben der Zelle gefährdet. In Eukaryonten werden DSB entweder über die nicht-homologe Endverknüpfung oder über die HR (homologe Rekombination) repariert. Besonders in *S. cerevisiae* ist Rad52 als ein früher Faktor für den Prozess der HR wichtig, da es als einziges Protein der *RAD52*-Epistasisgruppe an allen Rekombinationsprozessen (HR, *break-induced replication*, *single strand annealing*) beteiligt ist.

Bei der Reparatur von DNA-Schäden werden Proteine auf verschiedenen Ebenen reguliert. Dazu werden sowohl *checkpoint*-Proteine als auch Reparaturproteine posttranslational modifiziert, beispielsweise durch eine Phosphorylierung oder durch eine Modifikation mit Ubiquitin oder SUMO (Shiloh, 2003; Huang und D'Andrea, 2006). Diese Modifikationen dienen der Feinabstimmung zahlreicher Faktoren, die an einer Reparatur beteiligt sind. Häufig ist die Modifikation kurzzeitig und hat nur so lange Bestand, bis der Schaden repariert ist. Auf diese Weise werden enzymatische Aktivitäten verändert, die

Effizienz einer Reparatur moduliert, Reparaturfaktoren rekrutiert und der Zellzyklus reguliert (Huang und D'Andrea, 2006). Da Rad52 eine wichtige Rolle als früher Mediator bei der homologen Rekombination einnimmt, ist zu erwarten, dass auch Rad52 einer speziellen Regulation unterliegt.

In dieser Arbeit ist Rad52 als SUMO-Substrat sowohl in Hefe als auch in menschlichen Zellen identifiziert worden (siehe III.1). Die Rad52-SUMOylierung scheint also ein in Eukaryonten konservierter Vorgang zu sein. Bemerkenswerterweise sind jedoch die Akzeptorlysine in dem Protein aus *S. cerevisiae* nicht im humanen Protein konserviert. Dies könnte daran liegen, dass diese Lysine außerhalb der konservierten Rad52-Domäne liegen. Zudem gibt es mit K10/11 bzw. K220 zwei Stellen im Protein, die SUMOyliert werden und die sich in ihren Funktionen ergänzen. Hieraus lässt sich schließen, dass für die Regulation von Rad52 vermutlich das Ereignis der SUMOylierung wichtiger ist als die exakte Position der Modifikation.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt worden ist, erfolgt die posttranslationale Modifikation von Rad52 mit SUMO nur an einem Teil aller Rad52-Moleküle (siehe III.1 und III.2). Zudem korreliert die SUMOylierung mit der Anzahl (und der Reparatur) von DNA-Schäden, so dass vermutlich nur der Teil von Rad52 durch SUMO reguliert wird, der an einem Rekombinationsvorgang beteiligt ist. Für diese Überlegung spricht auch, dass die durch MMS oder Zeocin induzierte Rad52-SUMOylierung nach bereits circa 60 Minuten fast das maximale Niveau erreicht. Diese Beobachtung korreliert mit den Daten anderer Studien, die gezeigt haben, dass etwa eine Stunde nach der Induktion eines DSB über die HO-Endonuklease die Rekrutierung von Rad52 zum DSB beginnt (Wolner *et al.*, 2003; Miyazaki *et al.*, 2004). Folglich lässt sich die Rad52-SUMOylierung genau dann nachweisen, wenn das Rad52-Molekül seine Reparaturaufgaben erfüllt.

Zudem scheinen bestimmte Abläufe bei der Rekombination für die Rad52-SUMOylierung wichtig zu sein. Für eine solche Abhängigkeit spricht, dass die Modifikation von Rad52 mit SUMO offensichtlich nicht über *checkpoint*-Mechanismen reguliert wird, da die SUMOylierung unabhängig von *checkpoint*-Kinasen erfolgt. Demzufolge ist für die SUMOylierung nicht das Aufspüren eines DNA-Schadens entscheidend, sondern bestimmte Reparaturereignisse oder andere Reparaturfaktoren.

Diese Vermutung erwies sich als zutreffend, da tatsächlich ein sehr früher Faktor der DSB-Reparatur bei der Rad52-SUMOylierung eine wichtige Rolle spielt, denn ohne den MRX-Komplex ist die SUMOylierung kaum mehr induzierbar. Der MRX-Komplex ist eines der ersten Moleküle, die sich an einem DSB einfinden, und übernimmt als *checkpoint*-Sensor, als Stabilisator eines DSB und bei den initialen Rekombinationsschritten eine wichtige Funktion. Somit erscheint es nahe liegend, dass eine Regulation von Rad52, das erst nach dem MRX-Komplex aktiv wird, an Funktionen des MRX-Komplexes gekoppelt ist.

Beispielsweise könnte die SUMO-Konjugationsmaschinerie an den MRX-Komplex binden, damit gezielt die Rad52-Moleküle modifiziert werden, die sich schon in der Nähe eines DSB befinden. So ist es möglich, dass Ubc9 als SUMO-konjugierendes Enzym oder Siz2 als SUMO-ligierendes Enzym oder beide gleichzeitig mit einer Untereinheit des MRX-Komplexes interagieren. Diese Interaktion könnte *per se* existieren oder erst unter Reparaturbedingungen entstehen bzw. sich verstärken. Auf diese Weise könnten die Rad52-Moleküle mit Hilfe einer SUMOylierung auf ihre Reparaturaufgabe vorbereitet werden. Wie der MRX-Komplex die Rad52-SUMOylierung stimuliert, ist jedoch noch unklar.

Für die Abhängigkeit der Rad52-SUMOylierung vom MRX-Komplex und gegen eine Abhängigkeit von späteren Rekombinationsfaktoren oder -vorgängen spricht, dass in *sae2* Zellen die SUMOylierung noch induzierbar ist (Daten nicht gezeigt). Sae2 ist ein Regulator des MRX-Komplexes, und in der Meiose werden in *sae2* Zellen keine DSB mehr resektiert (Keeney und Kleckner, 1995; Prinz *et al.*, 1997). Folglich ist der MRX-Komplex der entscheidende Faktor bei der SUMOylierung und vermutlich nicht die Resektion. Alternativ ist auch folgender Vorgang denkbar: Der MRX-Komplex resektiert die DNA an einem DSB und ermöglicht so die Bindung des heterotrimeren RPA-Proteins an die einzelsträngige DNA. Die SUMO-Konjugationsmaschinerie bindet anschließend an RPA, um Rad52 zu SUMOylieren. Interessanterweise sind auch die Untereinheiten von RPA (Rfa1, Rfa2, Rfa3) SUMO-Substrate (Daten nicht gezeigt), so dass sich mit RPA und Rad52 die Substrate in Nachbarschaft zu einander befinden und so ihre SUMOylierung gekoppelt sein könnte. Zudem ist in Extrakten aus meiotischen Zellen die SUMOylierung maximal, wenn die DNA übermäßig resektiert ist, z.B. in einer *dmc1*-Mutante, wenn also lange Nukleoproteinfilamente mit RPA vorliegen. In beiden Fällen hängt jedoch die SUMOylierung von einer intakten Funktion des

MRX-Komplexes ab. Möglicherweise haben auch beide Alternativen Bestand, das heißt, der MRX-Komplex und RPA regulieren die Rad52-SUMOylierung.

IV.2 Modifikation mit SUMO reguliert die Aktivität von Rad52

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Modifikation mit SUMO einen pro-rekombinatorischen Einfluss auf die Aktivität von Rad52 hat. Allerdings könnte dieser Effekt nur für einen der Reparaturwege spezifisch sein, an denen Rad52 beteiligt ist. Hierfür spricht, dass SUMOylierungsdefiziente Rad52-Mutanten in Gegenwart von MMS oder in der Meiose keinen Phänotyp zeigen. Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit nur bei einem bestimmten Rekombinations-Experiment ein Unterschied zwischen WT (Wildtyp) Rad52 und der Rad52-Mutante beobachtet werden (**Abb. 20**). Bei dem *direct repeat assay* wurde die intrachromosomale Rekombination zwischen zwei gleich orientierten *LEU2*-Heteroallelen analysiert. Dabei wies die SUMOylierungsdefiziente Rad52-Mutante besonders bei den Rekombinationsereignissen Defekte auf, die mit Gendeletion verbunden sind. Warum sich gerade in diesem *assay* diese Differenzen zeigen, ist bislang unklar. Die Rad52-SUMOylierung ist jedoch nicht am SSA (*single strand annealing*) beteiligt, könnte aber alternativ die Entscheidung von Genkonversion gegenüber *crossover* beeinflussen. Zudem ist es möglich, dass die Modifikation von Rad52 mit SUMO bei allen Rekombinationsvorgängen involviert ist und in allen Fällen pro-rekombinatorisch wirkt, aber nur bei bestimmten Prozessen notwendig ist.

Neben dem *direct repeat assay* sieht man den deutlichsten Unterschied zwischen WT Rad52 und der SUMOylierungsdefizienten Mutante bei der Rettung der Überlebensfähigkeit von Helikasedoppelmutanten. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die SUMOylierung von Rad52 zu dessen Aktivität beim Rekombinationsprozess beiträgt und dass SUMOyliertes Rad52 an der Entstehung der Rekombinationsintermediate beteiligt ist, die in Helikasedoppelmutanten toxisch sind. Dass die Rettung der Doppelmutanten am stärksten ist, wenn *RRM3* deletiert ist, könnte daran liegen, dass Rrm3 möglicherweise mehr als Sgs1 und Srs2 zu der Entstehung von toxischen, Rad52-abhängigen Zwischenprodukten bei der Rekombination beiträgt. Das heißt, dass ohne die Aktivität von Rrm3 besonders viele Strukturen entstehen, die in Abhängigkeit von Rad52 bzw. der Rad52-

SUMOylierung in schädliche Intermediate umgewandelt werden. Diese Vermutung ist insofern interessant, als die Helikase Rrm3 für die Replikation durch die rDNA-Regionen wichtig ist, in denen häufig Rekombination stattfindet, und als entsprechende *rrm3* Hefemutanten erhöhte Rekombinationsraten in diesen Regionen zeigen (Keil und McWilliams, 1993; Park *et al.*, 1999; Ivessa *et al.*, 2000). Zudem ähnelt die prinzipielle Anordnung der homologen Sequenzen in diesen Regionen der Anordnung im *direct repeat assay*, bei dem wie oben beschrieben bei der SUMOylierungsdefizienten Mutante starke Rekombinationsdefekte zu beobachten sind. Folglich könnte die Rad52-SUMOylierung besonders bei der Rekombination der rDNA eine wichtige Rolle spielen.

Die drei Helikasen Rrm3, Sgs1 und Srs2 sind alle während der S-Phase aktiv. So verhindern beispielsweise Sgs1 und Srs2 ungewollte Rekombinationsprozesse an der Replikationsgabel. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die durch MMS induzierte SUMOylierung von Rad52 fast ausschließlich in der S-Phase erfolgt (Daten nicht gezeigt). Folglich entstehen durch MMS Schäden an der DNA, die über Rad52 in der S-Phase behoben werden. Zudem können auch durch 4-NQO entstandene Schäden in der S-Phase repariert werden, da sie in einigen Fällen zu einem Anhalten der Replikationsgabel führen. Auch durch Zeocin entstandene Schäden werden mit Hilfe von Rad52 in der S-Phase und zusätzlich in der G2-Phase repariert (Daten nicht gezeigt). Da MMS, 4-NQO und Zeocin eine Dosis-abhängige Modifikation von Rad52 mit SUMO induzieren, lässt sich folgern, dass Rad52 einen Großteil seiner Funktionen in der S-Phase erfüllt. Dieses gilt offensichtlich sowohl für Helikasemutanten (*rrm3*, *sgs1*, *srs2*) als auch für induzierte DNA-Schäden (MMS, 4-NQO, Zeocin). Im Falle von MMS und 4-NQO werden die DNA-Läsionen vermutlich erst während der S-Phase zu einem Substrat für Rad52, und zwar offenbar erst im Zusammenhang mit der Replikation.

Dass die SUMOylierung von Rad52 nur in der S- und in der G2-Phase mit Zeocin bzw. MMS induzierbar ist, passt auch zu der Art und Weise, wie ein DSB über die homologe Rekombination repariert wird. Denn dazu ist in haploiden Zellen immer die Information des Schwesterchromatids notwendig. Zudem findet in der G1-Phase die Reparatur eines DSB nur über die nicht-homologe Endverknüpfung statt, während in der S- und in der G2-Phase die homologe Rekombination für die fehlerfreie Reparatur zuständig ist (Lisby und Rothstein, 2005).

Darüber hinaus ist berichtet worden, dass während der S-Phase so genannte Rad52-Foci entstehen. Diese Foci spiegeln eine Ansammlung von Rad52-Molekülen wider, die an der Reparatur eines DSB beteiligt sind (Lisby *et al.*, 2001; Lisby *et al.*, 2003). Interessanterweise können diese Strukturen durch Röntgenstrahlung induziert werden, aber auch ohne Behandlung weisen WT Zellen während der S-Phase spontan solche Reparaturstrukturen auf. Dies deutet wiederum darauf hin, dass Rad52 während der S-Phase die Reparatur von Läsionen übernimmt, die erst im Zusammenhang mit der Replikation entstehen. Auch der MRX-Komplex bildet in der S-Phase Foci aus, die entweder spontan entstehen oder durch DNA-Schädigung induziert sein können (Lisby *et al.*, 2004; Robison *et al.*, 2004; Robison *et al.*, 2005). Da wie oben gezeigt der MRX-Komplex bei der Rad52-SUMOylierung eine wichtige Rolle spielt, könnte demnach in der S-Phase der MRX-Komplex einen Rekombinationsvorgang initiieren und die Modifikation von Rad52 mit SUMO regulieren. Zudem könnte die Rad52-SUMOylierung die Entstehung solcher Rad52-Foci beeinflussen. In diesem Zusammenhang ist der Hinweis auf andere Proteine wie beispielsweise PML interessant, bei denen die Modifikation mit SUMO die Lokalisierung reguliert und sich so verschiedene SUMO-Substrate räumlich konzentrieren (Zhong *et al.*, 2000). PML fungiert als Gerüst für die Entstehung der PML *nuclear bodies*, die bei der Regulation der Transkription und der DNA-Reparatur eine Rolle spielen. PML muss selbst erst mit SUMO modifiziert werden, damit sich die PML *nuclear bodies* bilden und andere SUMO-Substrate dort lokalisieren (Zhong *et al.*, 2000). Im Falle von Rad52 könnte demnach die SUMOylierung die gezielte Bildung von Reparatur-Foci beeinflussen und somit dafür sorgen, dass sich mehrere an der Reparatur eines DSB beteiligte SUMO-Substrate (wie RPA oder Rad51; Daten nicht gezeigt) zu einem Reparaturzentrum koordiniert zusammenfinden.

IV.3 Zusammenspiel von Ubiquitin und SUMO bei der Regulation von Rad52

Wie die vorliegende Arbeit beschreibt, reguliert die SUMOylierung die Stabilität von Rad52 und schützt Rad52 vor einem vorzeitigen Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System. In Übereinstimmung zu den vorangegangenen Überlegungen

werden dabei nur solche Rad52-Moleküle geschützt, die aktiv am Rekombinationsprozess beteiligt sind. Hierfür sprechen zwei Indizien: Zum einen sinkt die Proteinmenge von Rad52 in der Zelle umso mehr, je mehr Rekombination stattfindet. Dies ließ aus Experimenten mit Helikasemutanten hergeleiten. Denn je mehr Helikasen deletiert sind, desto größer ist die Anzahl der Rad52-Moleküle, die im Rekombinationsgeschehen involviert sind, und umso mehr Rad52 wird abgebaut. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt jedoch bei der SUMOylierungsdefizienten Rad52-Mutante. Zum anderen kann dieser verstärkte Abbau in Helikasemutanten fast komplett revertiert werden, wenn man *RAD51* deletiert. Da Rad51 als Rekombinase die katalytische Aktivität der Rekombination ist und erst nach Rad52 aktiv wird, geschieht demzufolge die Proteolyse von Rad52 erst, nachdem das Protein seine Mediator-Aufgaben bei der Reparatur eines DSB erfüllt hat. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass das Proteasom an DSB lokalisiert und wichtige Funktionen bei deren Reparatur übernimmt (Krogan *et al.*, 2004). Folglich ist Rad52 immer dann besonders durch einen Abbau über das Proteasom gefährdet, wenn sich in Zellen Rekombinationssubstrate anhäufen, wie beispielsweise in Helikasemutanten. In diesen Situationen wird der schützende Einfluss der SUMOylierung besonders wichtig.

Hinsichtlich der Art und Weise, wie eine SUMOylierungsdefiziente Rad52-Mutante Helikasedoppelmutanten rettet, lassen die Ergebnisse dieser Arbeit folgende Schlussfolgerung zu: Aufgrund der erhöhten Instabilität des Rad52-Moleküls, besonders in Helikasedoppelmutanten, werden vermutlich zahlreiche Moleküle aus dem aktiven Pool so frühzeitig abgebaut, dass die Aktivität von Rad52 drastisch reduziert und damit die Entstehung toxischer Rekombinationsintermediate deutlich eingeschränkt wird. Darüber hinaus könnte die SUMOylierung wie oben beschrieben noch über weitere Möglichkeiten die Aktivität von Rad52 stimulieren, beispielsweise durch die koordinierte Lokalisierung von Rad52 allein oder zusammen mit anderen Reparaturfaktoren. In jedem Fall deutet die spezifische Relevanz der Rad52-SUMOylierung darauf hin, dass unter bestimmten Umständen die lokalen Proteinkonzentrationen oder die Lokalisierung von Rad52 entscheidend sind.

Dass auch andere Proteine vor einem vorzeitigen Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System durch eine Modifikation mit SUMO geschützt werden, ist bereits für IκBα und Phosducin beschrieben (Desterro *et al.*, 1998; Klenk *et al.*, 2006; siehe

II.1.3). Während bei IκBα die Modifikation mit SUMO oder Ubiquitin an demselben Lysin erfolgt, werden bei Phosducin unterschiedliche Lysine modifiziert. Dies scheint auch für Rad52 zu gelten, da WT Rad52 ebenso wie die SUMOylierungsdefiziente Mutante noch ubiquityliert werden kann (Daten nicht gezeigt). Das heißt, dass die beiden Modifikationen nicht um denselben Lysinrest konkurrieren.

Wie die SUMOylierung Rad52 vor der Proteolyse durch das Proteasom schützt, ist bislang unklar. Es sind jedoch verschiedene Wirkungsweisen denkbar. Einerseits könnte die Modifikation mit SUMO einem Ubiquitin-ligierenden Enzym (E3-Ligase) direkt den Zugang zu Rad52 blockieren, und damit würde dem Proteasom das Abbausignal fehlen. Andererseits könnte die Rad52-SUMOylierung bewirken, dass ein weiteres Protein mit einem SUMO-interagierenden Motiv (SIM) SUMOyliertes Rad52 bindet und so als Schutzschild vor einer E3-Ligase oder dem Proteasom fungiert. Des Weiteren könnte die SUMOylierung ein deubiquitylierendes Enzym rekrutieren, das eine Modifikation mit Ubiquitin revertiert. Eine weitere Möglichkeit ist, dass durch die SUMOylierung die Interaktion von Rad52 zu einem der direkten Partner bei der Rekombination wie RPA oder Rad51 verstärkt und einer E3-Ligase so der Zugriff auf Rad52 erschwert wird. So interagiert beispielsweise die SUMOylierungsdefiziente Rad52-Mutante im *two hybrid*-System weniger stark mit Rad51 als WT Rad52 (Daten nicht gezeigt). Da jedoch das Expressionsniveau der Fusionen von einer Gal4-Domäne mit der Mutante geringer ausfällt als mit WT Rad52, lassen sich daraus keine eindeutigen Schlüsse ziehen. Das Heranführen eines abschirmenden Proteins mit einem SIM ist insofern interessant, als bereits bei anderen DNA-Reparaturproteinen die SUMOylierung zu einer Rekrutierung eines weiteren Proteins führt. So rekrutiert beispielsweise SUMOyliertes PCNA die Helikase Srs2, um während der S-Phase Rekombinationsereignisse zu verhindern (Pfander *et al.*, 2005). Alternativ zu den oben angeführten Überlegungen eines direkten oder indirekten Schutzes könnte Rad52 infolge einer ausbleibenden SUMOylierung falsch oder fehlerhaft lokalisieren. Dadurch würde für eine E3-Ligase der Zugang zu Rad52 leichter, und das Proteasom könnte den Rekombinationsfaktor abbauen. Außerdem ist denkbar, dass SUMOylierungsdefizientes Rad52 beim Rekombinationsprozess zu unproduktiv ist oder fehlerhaft arbeitet und daher abgebaut werden muss. Letztendlich wird durch die SUMOylierung von Rad52 ein Zwischenschritt bei der

Rekombination geschützt und verhindert über noch unbekannte Mechanismen die Proteolyse.

Die beschriebenen Daten deuten darauf hin, dass bei Rad52 ein gezielter Abbau zu einem definierten Zeitpunkt stattfindet. Im Zusammenhang mit der DNA-Reparatur gibt es weitere Beispiele, bei denen das Ubiquitin-Proteasom-System Reparaturfaktoren durch einen gezielten Abbau reguliert. Dies bietet der Zelle die Möglichkeit, Reparaturvorgänge feiner zu regulieren. So bewirken beispielsweise verschiedene DNA-Schäden bei der humanen Effektorkinase Chk1 den proteasomalen Abbau (Zhang *et al.*, 2005). Eigentlich wird diese Kinase durch die *checkpoint*-Kinase ATR aktiviert, um den Zellzyklus zu regulieren und verschiedene Reparaturereignisse zu steuern. Dauert die *checkpoint*-Kontrolle jedoch zu lange, wird Chk1 polyubiquityliert und proteasomal abgebaut. Dies dient vermutlich dem Zweck, in nur leicht geschädigten Zellen die Dauer des *checkpoints* zu begrenzen und soo zu verhindern, dass nicht zu viele Replikationsgabeln unnötig aufgehalten werden (Zhang *et al.*, 2005). Ist der Schaden jedoch zu umfangreich, hat die Wiederaufnahme des Zellzyklus vermutlich zur Folge, dass die Replikationsgabeln irreparabel geschädigt werden und die Zellen sterben (Zhang *et al.*, 2005). Auch bei der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) (siehe II.2) reguliert die Modifikation mit Ubiquitin den Reparaturvorgang (Huang und D'Andrea, 2006). Nach einem DNA-Schaden durch UV-Licht wird der DDB E3-Ligase-Komplex aus DDB1, DDB2, CUL4A und ROC1 infolge der Bindung an die DNA aktiviert. Anschließend rekrutiert dieser Komplex ein Proteindimer aus XPC und HR23B zur geschädigten DNA, und XPC, CUL4A und DDB2 werden ubiquityliert, jeweils mit unterschiedlichen Folgen. Während die Ubiquitylierung von XPC dessen Bindung an die DNA und somit dessen NER-Aktivität verstärkt, wird das ubiquitylierte DDB2 hingegen über das Proteasom abgebaut (Sugasawa *et al.*, 2005). Der verbleibende DDB E3-Ligase-Komplex (DDB1, CUL4A, ROC1), bei dem CUL4A ubiquityliert ist, dissoziiert wieder von der geschädigten DNA und steht einem neuen Reparaturzyklus zur Verfügung (Sugasawa *et al.*, 2005). Auch die RNA-Polymerase II (RNAPII) wird über eine Ubiquitylierung und das Proteasom reguliert (Somesh *et al.*, 2005). Bei der Transkription betrifft dieser Abbau die Moleküle, die bei der Elongation zu lange arretierten. Wenn bei einem DNA-Schaden die Reparatur mit Hilfe der so genannten Transkription-gekoppelten NER (TC-NER, *transcription coupled* NER), an der auch RNAPII beteiligt ist, nicht in einem angemessenen Zeitraum erfolgt,

wird RNAPII ebenfalls ubiquityliert und über das Proteasom abgebaut (Somesh *et al.*, 2005). Der verbleibende Schaden wird dann über die reguläre NER repariert. Die drei genannten Beispiele haben gemeinsam, dass gezielt und zu definierten Zeitpunkten bestimmte Proteine abgebaut werden. Eigentlich wären diese Proteine noch funktionsfähig, doch unter den beschriebenen Begleitumständen werden sie deaktiviert, um anderen Proteinen die Übernahme von Aufgaben zu ermöglichen. Solch eine Vorgehensweise ist auch im Zusammenhang mit Rad52 denkbar. So könnte der proteasomale Abbau dem Zweck dienen, nach einer Reparatur die Rad52-Moleküle von der DNA zu entfernen, die nicht mehr gebraucht werden und die möglicherweise andere Reparaturfaktoren bei DNA-Transaktionen behindern.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich zusammen mit den oben genannten Überlegungen in dem folgenden Modell zusammenfassen (**Abb. 26**): Nachdem ein DSB aufgetreten ist (spontan, enzymatisch, in der Meiose, durch Chemikalien oder durch Strahlung), erkennt der MRX-Komplex den DSB als solchen, stabilisiert die losen DNA-Enden und vollzieht die Einzelstrangresektion, so dass sich RPA an die einzelsträngige DNA anlagern kann. Bevor Rad52 den Austausch von RPA zugunsten von Rad51 vermittelt, wird es mit SUMO modifiziert. Hierbei ist der MRX-Komplex für eine effiziente SUMOylierung essenziell. Möglicherweise ist die Modifizierung mit dem MRX-Komplex gekoppelt oder mit anderen Reparaturproteinen wie RPA, welche erst nach dem MRX-Komplex ins Geschehen eingreifen. (Beispielsweise könnte die SUMO-Konjugationsmaschinerie an einen dieser Faktoren binden. Zusätzlich wäre es möglich, dass das Ausmaß der Rad52-SUMOylierung durch RPA stimuliert wird.) Die SUMOylierung schützt dabei genau die Rad52-Moleküle, die aktiv am Rekombinationsprozess beteiligt sind. Dieser Schutz gilt für die Zeit, in der Rad52 aktiv im Rekombinationsgeschehen involviert ist. Zwar liegen hierzu noch keine Daten vor, doch nach einem erfolgreichen Rekombinationsprozess wird SUMO vermutlich mit Hilfe von SUMO-dekonjugierenden Enzymen von Rad52 abgespalten. Diese nun unmodifizierten Rad52-Moleküle könnten anschließend ubiquityliert und vom Proteasom abgebaut werden (**Abb. 26**). Demnach reguliert ein definiertes Zusammenspiel aus SUMO und Ubiquitin das Schicksal von Rad52: Nach einem kurzzeitigen Schutz durch eine SUMOylierung resultiert die Ubiquitylierung im Abbau von Rad52.

Als weiterführende Untersuchung im Zusammenhang mit der Regulation von Rad52 und dem Zusammenspiel von Ubiquitin und SUMO bietet sich an zu

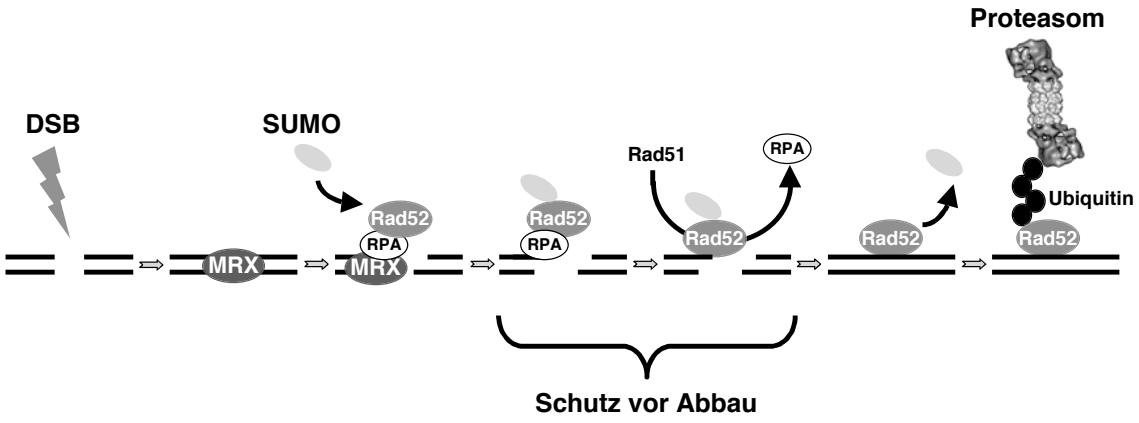

Abb. 26: Modell für die Funktion der Rad52-SUMOylierung
Dargestellt sind die Reparatur eines DSB und der Einfluss der SUMOylierung auf Rad52. Nach Auftreten eines DSB wird der MRX-Komplex rekrutiert, der für eine effiziente Modifikation von Rad52 mit SUMO essenziell ist. Die SUMOylierung schützt genau die Subpopulation der Rad52-Moleküle vor einem Abbau, die aktiv am Rekombinationsprozess beteiligt ist und den Austausch von RPA zugunsten von Rad51 vermittelt. Von den Rad52-Molekülen, die nach verrichteter Arbeit nicht mehr am Rekombinationsgeschehen beteiligt sind, wird SUMO abgespalten, und anschließend werden diese Moleküle ubiquityliert und vom Proteasom abgebaut. (Für weitere Erklärungen siehe Text.)

analysieren, ob von den SUMOylierten Rad52-Molekülen tatsächlich zunächst SUMO abgespalten wird, bevor die Ubiquitylierung erfolgt. Darüber hinaus wäre es interessant zu erfahren, welche Enzyme für die Ubiquitylierung und die vermeintliche Dekonjugation von SUMO verantwortlich sind und wie diese Prozesse reguliert werden. Gleiches gilt für die SUMOylierung, denn noch ist unklar, welche molekularen Begebenheiten nach einem DSB für die Modifikation mit SUMO verantwortlich sind und welche Rolle der MRX-Komplex in diesem Zusammenhang genau spielt. Ferner könnte die Lokalisierung von Rad52 unter verschiedenen Bedingungen untersucht und dabei das Verhalten von WT Rad52 und der SUMOylierungsdefiziente Mutante verglichen werden. So könnte man beispielsweise *live cell imaging*-Experimente durchführen, bei denen man Rekombinationsereignisse durch Behandlung der Zellen mit Röntgenstrahlen induziert oder das Proteasom und seine proteolytischen Funktionen inhibiert. Folglich scheint auch eine weiterführende Untersuchung der molekularen Mechanismen bei der Rad52-SUMOylierung interessant zu sein.

V MATERIAL UND METHODEN

Die nachfolgenden mikrobiologischen, molekularbiologischen und biochemischen Methoden richten sich im Wesentlichen nach Standardprotokollen (Sambrock *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1994) und nach den Angaben der Hersteller.

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

In fast allen der unten beschriebenen Methoden wurden entionisiertes, steriles Wasser, sterile Lösungen und sterile Gefäße eingesetzt.

V.1 Computeranalysen

Datenbankrecherchen (Sequenzsuche, Sequenzvergleiche und Literaturrecherchen) wurden mit Hilfe des *National Center for Biotechnology Information* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) und der *Saccharomyces Genome Database* (http://www.yeastgenome.org) durchgeführt. Für Sequenzanalysen (Erstellen von Restriktionskarten, Auswertung von DNA-Sequenzierungen, Vergleiche von DNA- und Proteinsequenzen und Design von Primern) wurde das Programmpaket DNAStar (DNA-Star Inc.) verwendet.

Filme von Westernblots wurden mit einem AGFA Scanner (Arcus II) digitalisiert und mit dem Programm Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.) bearbeitet. Alternativ wurden die Westernblots mit einer CCD-Kamera (LAS, Fujifilm) detektiert und die Daten mit den Softwareprogrammen Image Reader LAS 1000 (Fujifilm), Image Gauge (Fujifilm) und Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.) prozessiert. Die Erstellung von Texten, Tabellen, Graphiken und Abbildungen sowie die Auswertung von Messdaten erfolgte mit Hilfe des Microsoft Office Pakets (Microsoft Corp.) und mit Hilfe von Kaleidagraph (Synergy Software).

V.2 Mikrobiologische und genetische Techniken

V.2.1 Arbeitstechniken für Escherichia coli

***E. coli* Stämme**

TG1:	supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (r_K- m_K-) [F' traD36 proAB lacI^{q}ZΔM15] (Stratagene)
XL1-Blue:	hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi-1 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^{q}ZΔM15 Tn10(Tet^r)] (Stratagene)
XL10-Gold:	Tet^r Δ(mcrA)183 Δ(mcrB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^{q}ZΔM15 Tn10(Tet^r) Amy Cam^r]a (Stratagene)
BL21(DE3)/RIL:	B F$^-$ ompT hsdS(rB$^-$ mB$^-$) dcm Tet^r galλ (DE3) EndA Hte [argU ileY leuW Cam^r] (Stratagene)

E. coli Vektoren

pET28b,c	(Novagen)
pQE9	(Qiagen)
pQE32	(Qiagen)

E. coli Plasmidkonstrukte

Expressionskonstrukte für Pol30, Ubc9 und Smt3 entstammen früheren Studien der Arbeitsgruppe. Für die Reinigung von Rad52 als His-Fusionsprotein wurden die entsprechenden Sequenzen aus *two hybrid*-Konstrukten (siehe V.2.2) subkloniert. Die zwei verwendeten Konstrukte waren pET28c-Rad52(+33), das für die 33 Aminosäuren vor dem eigentlichen Start-Codon sowie den eigentlichen Leserahmen von Rad52 kodierte (insgesamt 504 Aminosäuren), und pET28b-Rad52ΔN294, das nur für die Aminosäuren 295 bis 471 von Rad52 kodierte.

Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Flüssigkulturen in LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl; sterilisiert durch Autoklavieren) wurden bei 37°C geschüttelt (200rpm) und Agarplatten (LB-Medium mit 1,5% Agar) bei 37°C inkubiert. Für die Selektion von transformierten Bakterien wurden dem Medium Antibiotika in einer Konzentration von 50µg/ml (Ampicillin), 30µg/ml (Kanamycin), 34µg/ml (Chloramphenicol) bzw. 10µg/ml (Tetracyclin) zugefügt. Die Dichte von *E. coli* Kulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) bestimmt. Kurzfristig wurden Bakterien als Ausstriche auf Agarplatten für circa eine Woche bei 4°C aufbewahrt. Für die langfristige Lagerung wurden stationäre Flüssigkulturen mit Glycerin versetzt (Endkonzentration 20%) und bei –80°C eingefroren.

Herstellung kompetenter Bakterien

Es wurden sowohl chemisch-kompetente als auch elektro-kompetente Zellen verwendet. In beiden Fällen wurde aus einer Einzelkolonie des entsprechenden *E. coli* Stammes eine Übernachtkultur in Flüssigmedium angeimpft. Mit 10ml dieser Kultur wurde 1l LB-Medium inokuliert und bis zu einer OD_{600} von 0,4 bis 0,6 bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlung der Kultur in Eiswasser (1 h) wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 5000g, 4°C) geerntet. Alle weiteren Schritte wurden im Kühlraum unter Verwendung von zuvor gekühlten sterilen Materialien und Lösungen durchgeführt.

Für die Herstellung chemisch-kompetenter Zellen wurde das Zellsediment in 25ml einer kalten $CaCl_2$-Lösung (60mM $CaCl_2$, 15% Glycerin, 10mM PIPES (Piperazin-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)) [pH 7,0]) vorsichtig resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 25ml kalter $CaCl_2$-Lösung für 1 h in Eiswasser inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 5ml $CaCl_2$-Lösung aufgenommen, wieder in Eiswasser (1 h) inkubiert und schließlich in Aliquots zu 100µl bei -80°C gelagert.

Für die Herstellung von elektro-kompetenten Zellen wurde das Zellpellet in 1l Wasser resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und der Waschschritt mit 0,5l Glycerin (10% v/v) wiederholt. Die Zellen wurden in 20ml Glycerin (10% v/v) resuspendiert und nach einer Inkubation (30 min) in Eiswasser erneut durch Zentrifugation geerntet. Schließlich wurden die Zellen in 3ml Glycerin (10% v/v) resuspendiert und in Aliquots zu 50µl bei -80°C gelagert.

Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen
Kurz vor einer Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Für eine chemische Transformation wurden 30µl der kompetenten Zellen, die kurz zuvor auf Eis aufgetaut worden waren, mit circa 10ng Plasmid gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 45 sek bei 42°C und einer anschließenden Abkühlung für 1 min auf Eis wurden die Bakterien in 1ml LB-Medium (ohne Antibiotika) aufgenommen. Nach einer Inkubation von 60 min bei 37°C wurde die Zellsuspension auf Selektionsplatten ausgestrichen.
Für eine Elektroporation wurden circa 10ng Plasmid bzw. 2µl eines gegen Wasser dialysierten Ligationsansatzes mit 25µl der elektrokompetenten Zellen gemischt. Die Suspension wurde in eine Elektroporationsküvette (0,1cm Spaltbreite) mit einem Puls von 1,8kV und 25µF bei einem Widerstand von 200Ω elektroporiert. Unmittelbar nach dem elektrischen Puls wurden die Zellen in 1ml LB-Medium (ohne Antibiotika) aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß transferiert und nach einer Inkubation für 1 h bei 37°C auf Selektionsplatten ausgebracht.

Im Anschluss an eine Transformation wurden Zellen auf den Selektionsplatten in der Regel über Nacht bei 37°C inkubiert.

Expression von Proteinen in *E. coli*
Für die Expression rekombinanter Proteine wurde der *E. coli* Stamm BL21(DE3)/RIL verwendet. In der Regel wurden Kulturen mit einem Volumen von 2l benutzt, für Expressiontests Kulturen mit einem Volumen von 10ml. Die Inokulation erfolgte jeweils mit einer 1:100 Verdünnung aus einer Übernachtkultur. Bei einer OD_{600} von circa 0,6 wurde die Expression durch Zugabe von IPTG (1mM Endkonzentration) bei RT (Raumtemperatur) oder 30°C induziert. Die IPTG-Induktion erfolgte in der Regel für 2 bis 4 h. Es wurden Proben vor oder nach der Induktion entnommen, um die Expression zu überprüfen. Die Zellen, aus denen später die rekombinanten Proteine aufgereinigt werden sollten, wurden abzentrifugiert (5 min, 5000g, 4°C), einmal in PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na_2HPO_4M, 1,4mM KH_2PO_4 [pH 7,4]) gewaschen und nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei –80°C gelagert.

V.2.2 Arbeitstechniken für Saccharomyces cerevisiae

***S. cerevisiae* Vektoren**
pYCplac33, *pYCplac22*, *pYCplac111*, *pYIplac204*, *pYIplac211*, *pYIplac128* (Gietz und Sugino, 1988)
pGAD-C, *pGBD-C* (James *et al.*, 1996)

***S. cerevisiae* Stämme**

Name	Genotyp	Referenz
DF5	*trp1-1 ura3-52 his3Δ200 leu2-3,11 lys2-801*	(Finley *et al.*, 1987)
YMS244	*LEU2::pYI-ADH-^{His}SMT3 rad52::URA3*	diese Arbeit
Y1094	*SMT3::pYI-ADH-^{His}SMT3::URA3*	diese Arbeit
YMS665	*SMT3::pYI-ADH-^{His}SMT3::URA3 siz2::HIS3MX6*	diese Arbeit
Y0762	*smt3::HIS3MX6 URA3::GAL-^{His}SMT3*	diese Arbeit
Y0764	*smt3::HIS3MX6 URA3::GAL-^{myc}SMT3*	diese Arbeit

Name	Genotyp	Referenz
Y0233	*ubc9::TRP1 ubc9-1::LEU2 bar1::HIS3*	(Seufert *et al.*, 1995)
YBP249	*siz1::HIS3MX6*	(Pfander *et al.*, 2005)
Y1136	*siz2::HIS3MX6*	diese Arbeit
Y1860	*mms21::HIS3MX6*	diese Arbeit
YMS258	*rad52::kanMX6*	diese Arbeit
Y0018	*rad6::HIS3MX6*	(Ulrich und Jentsch, 2000)
YMS628	*rad52::kanMX6 TRP1::pYI-RAD52*	diese Arbeit
YMS629	*rad52::kanMX6 TRP1::pYI-rad52-K10,11,220R*	diese Arbeit
YMS279	*srs2::HIS3MX6 sgs1::HIS3MX6 rad52::kanMX6*	diese Arbeit
YMS358	*srs2::HIS3MX6 rrm3::kanMX6 rad52::kanMX6*	diese Arbeit
YMS427	*sgs1::HIS3MX6 rrm3::kanMX6 rad52::kanMX6*	diese Arbeit
YMS657	*srs2::HIS3MX6 rrm3::kanMX6 rad52::kanMX6 rad59::natNT2 pYC33-RRM3 pYC111-RAD52*	diese Arbeit
YMS660	*srs2::HIS3MX6 rrm3::kanMX6 rad52::kanMX6 rad59::natNT2 pYC33-RRM3 pYC111-rad52-K10,11,220R*	diese Arbeit
YMS272	*srs2::HIS3MX6 rad52::kanMX6*	diese Arbeit
YMS270	*rad52::kanMX6 rad51::HIS3MX6*	diese Arbeit
YMS647	*srs2::natNT2 rad52::kanMX6 rad51::HIS3MX6*	diese Arbeit
YMS642	*rrm3::kanMX6 srs2::natNT2 rad52::kanMX6 rad51::HIS3MX6*	diese Arbeit
Y1096*	*ho::LYS2/ho::LYS2 lys2/lys2 ura3/ura3 leu2::hisG/leu2::hisG arg4-nsp/arg4-bgl his4X::LEU2(Bam)-URA3/his4B::LEU2 dmc1::LEU2/dmc1::LEU2 SMT3::pYI-ADH-^{His}SMT3::kanMX6*	diese Arbeit
Y1083* (LH177)	*ho::hisG/ho::hisG lys2/lys2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1ΔFA/trp1ΔFA*	(Huang *et al.*, 2005)
Y1087* (DKB490)	*ho::LYS2/ho::LYS2 lys2/lys2 ura3/ura3 leu2::hisG/leu2::hisG ade2::LK/ade2::LK his4XB/his4B::ADE2-his4X spo11::hisG-URA3-hisG/spo11::hisG-URA3-hisG*	(Gasior *et al.*, 1998)
YMS433*	*ho::hisG/ho::hisG lys2/lys2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1ΔFA/trp1ΔFA rad50::kanMX6/rad50::kanMX6*	diese Arbeit
Y1085* (ASY103)	*ho::LYS2/ho::LYS2 lys2/lys2 ura3/ura3 leu2::hisG/leu2::hisG arg4-NspI/arg4-BglII his4X::LEU2-BamHI-URA3/his4B::LEU2 dmc1::LEU2/dmc1::LEU2*	(Gasior *et al.*, 1998)
Y1084* (ASY102)	*ho::LYS2/ho::LYS2 lys2/lys2 ura3/ura3 leu2::hisG/leu2::hisG arg4-NspI/arg4-BglII his4X::LEU2-BamHI-URA3/his4B::LEU2 rad51::hisG-URA3-hisG/rad51::hisG-URA3-hisG*	(Gasior *et al.*, 1998)
YMS345*	*ho::hisG/ho::hisG lys2/lys2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1ΔFA/trp1ΔFA dmc1::HIS3MX6/dmc1::HIS3MX6 rad17::kanMX6/rad17::kanMX6*	diese Arbeit
YMS346*	*ho::hisG/ho::hisG lys2/lys2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1ΔFA/trp1ΔFA dmc1::HIS3MX6/dmc1::HIS3MX6 rad52::kanMX6/rad52::kanMX6 LEU2::pYI-RAD52/LEU2::pYI-RAD52*	diese Arbeit

Name	Genotyp	Referenz
YMS347*	*ho::hisG/ho::hisG lys2/lys2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1ΔFA/trp1ΔFA dmc1::HIS3MX6/dmc1::HIS3MX6 rad52::kanMX6/rad52::kanMX6 LEU2::pYI-rad52-K10,11,220R/ LEU2::pYI-rad52-K10,11,220R*	diese Arbeit
YMS437*	*ho::hisG/ho::hisG lys2/lys2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1ΔFA/trp1ΔFA dmc1::HIS3MX6/dmc1::HIS3MX6 red1::kanMX6/red1::kanMX6*	diese Arbeit
YMS376*	*ho::hisG/ho::hisG lys2/lys2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1ΔFA/trp1ΔFA hop2::kanMX6/hop2::kanMX6*	diese Arbeit
YMS377*	*ho::hisG/ho::hisG lys2/lys2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1ΔFA/trp1ΔFA mnd1::kanMX6/mnd1::kanMX6*	diese Arbeit
YMS378*	*ho::hisG/ho::hisG lys2/lys2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1ΔFA/trp1ΔFA mnd2::kanMX6/mnd2::kanMX6*	diese Arbeit
YMS380*	*ho::hisG/ho::hisG lys2/lys2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1ΔFA/trp1ΔFA red1::kanMX6/red1::kanMX6*	diese Arbeit
YMS202*	*ho::hisG/ho::hisG lys2/lys2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1ΔFA/trp1ΔFA rad17::kanMX6/rad17::kanMX6*	diese Arbeit
YMS379*	*ho::hisG/ho::hisG lys2/lys2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1ΔFA/trp1ΔFA pch2::kanMX6/pch2::kanMX6*	diese Arbeit
YMS205*	*ho::hisG/ho::hisG lys2/lys2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1ΔFA/trp1ΔFA sgs1::kanMX6/sgs1::kanMX6*	diese Arbeit
YMS434*	*ho::hisG/ho::hisG lys2/lys2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1ΔFA/trp1ΔFA spo13::kanMX6/spo13::kanMX6*	diese Arbeit
YMS435*	*ho::hisG/ho::hisG lys2/lys2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1ΔFA/trp1ΔFA ndt80::kanMX6/ndt80::kanMX6*	diese Arbeit
YMS439*	*ho::hisG/ho::hisG lys2/lys2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1ΔFA/trp1ΔFA zip1::kanMX6/zip1::kanMX6*	diese Arbeit
YMS307*	*ho::hisG/ho::hisG lys2/lys2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1ΔFA/trp1ΔFA rad52::kanMX6/rad52::kanMX6*	diese Arbeit
YMS308*	*ho::hisG/ho::hisG lys2/lys2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1ΔFA/trp1ΔFA rad52::kanMX6/rad52::kanMX6 LEU2::pYI-RAD52/LEU2::pYI-RAD52*	diese Arbeit
YMS311*	*ho::hisG/ho::hisG lys2/lys2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1ΔFA/trp1ΔFA rad52::kanMX6/rad52::kanMX6 LEU2::pYI-rad52-K10,11,220R/ LEU2::pYI-rad52-K10,11,220R*	diese Arbeit
YMS646*	*ho::hisG/ho::hisG lys2/lys2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1ΔFA/trp1ΔFA sae2::kanMX6/sae2::kanMX6*	diese Arbeit

Name	Genotyp	Referenz
Y0708	*his1-1/his1-1*	(Pfander *et al.*, 2005)
Y0709	*his1-7/his1-7*	(Pfander *et al.*, 2005)
Y0710	*his1-1/his1-7*	(Pfander *et al.*, 2005)
YMS312	*his1-1/his1-1 rad52::kanMX6/rad52::kanMX6 LEU2::pYI-RAD52/LEU2::pYI-RAD52*	diese Arbeit
YMS313	*his1-1/his1-7 rad52::kanMX6/rad52::kanMX6 LEU2::pYI-RAD52/LEU2::pYI-RAD52*	diese Arbeit
YMS314	*his1-7/his1-7 rad52::kanMX6/rad52::kanMX6 LEU2::pYI-RAD52/LEU2::pYI-RAD52*	diese Arbeit
YMS315	*his1-1/his1-1 rad52::kanMX6/rad52::kanMX6 LEU2::pYI-rad52-K10,11,220R/ LEU2::pYI-rad52-K10,11,220R*	diese Arbeit
YMS316	*his1-1/his1-7 1 rad52::kanMX6/rad52::kanMX6 LEU2::pYI-rad52-K10,11,220R/ LEU2::pYI-rad52-K10,11,220R*	diese Arbeit
YMS317	*his1-7/his1-7 1 rad52::kanMX6/rad52::kanMX6 LEU2::pYI-rad52-K10,11,220R/ LEU2::pYI-rad52-K10,11,220R*	diese Arbeit
YMS504† (yAR81)	*ade2-5´Δ::TRP1::ade2-n rad52::LEU2*	(Rattray und Symington, 1994)
YMS505† (yAR91)	*ade2-5´Δ::TRP1::ade2-n*	(Rattray und Symington, 1994)
YMS529†	*ade2-5´Δ::TRP1::ade2-n rad52::LEU2 kanMX6::pYI-RAD52*	diese Arbeit
YMS530†	*ade2-5´Δ::TRP1::ade2-n rad52::LEU2 kanMX6::pYI-rad52-K10,11,220R*	diese Arbeit
YBP390**	*leu2-112::URA3::leu2-k*	diese Arbeit
YMS489**	*leu2-112::URA3::leu2-k rad52::kanMX6*	diese Arbeit
YMS491**	*leu2-112::URA3::leu2-k rad52::kanMX6 TRP1::pYI-RAD52*	diese Arbeit
YMS496**	*leu2-112::URA3::leu2-k rad52::kanMX6 TRP1::pYI-rad52-K10,11,220R*	diese Arbeit
YMS520†† (tNS1379)	*ho HML mat::leu2::hisG hmrΔ3 leu2-3,112 ura3-52 trpl thr4* (*ura3* [205 bp]-cut site-*URA3*) pFH800	(Sugawara *et al.*, 2000)
YMS521†† (tNS1573)	tNS1379 *rad59::kanMX*	(Sugawara *et al.*, 2000)
YMS630††	tNS1379 *rad52::natNT2*	diese Arbeit
YMS631††	tNS1573 *rad52::natNT2*	diese Arbeit
YMS534#	*rrm3::natNT2 rad52::kanMX6*	diese Arbeit
YMS535#	*cim3-1 rrm3::natNT2 rad52::kanMX6*	diese Arbeit
Y06464##	BY4741 *rad50::kanMX4*	Euroscarf
Y00810##	BY4741 *mre11::kanMX4*	Euroscarf
Y04205##	BY4741 *xrs2::kanMX4*	Euroscarf
BY5563##	-	(Tong *et al.*, 2001)
Y03114##	BY4741 *tel1::kanMX4*	Euroscarf
Y1116@ (1830-2-4a)	WT	(Paulovich und Hartwell, 1995)
Y1117@ (DLY285)	*mec1-1*	(Paulovich und Hartwell, 1995)
PJ69-7a@@	*gal4 gal80 LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ*	(James *et al.*, 1996)

Alle Stämme sind isogen zu DF5 (Finley *et al.*, 1987) mit Ausnahme der folgenden Stämme:

* Diese Stämme sind Derivate des Hefestamms SK1, der sehr effizient sporuliert (Gasior *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2005).

** Diese Stämme sind Derivate von 344-109D, der von W303 abstammt (Aguilera und Klein, 1988).

† Diese Stämme sind Derivate der yAR-Serie, die von W303 abstammt (Rattray und Symington, 1994).

†† Diese Stämme basieren auf tNS1379 (Sugawara *et al.*, 2000).

Diese Stämme basieren auf CMY826, der ein Derivat von S288C ist. CMY826 stammt von Carl Mann.

Diese Stämme basieren auf BY4741, der ein Derivat von S288C ist, und stammen von Euroscarf bzw. Marc Sohrmann.

@ Diese Stämme basieren auf A364a (Paulovich und Hartwell, 1995).

@@ Dieser Stamm basiert auf DGY63::171 (James *et al.*, 1996).

S. cerevisiae Plasmidkonstrukte

Die DNA-Sequenz, die für das *RAD52* Gen kodiert, stammt aus einer genomischen Bibliothek (L9-Bibliothek, Labor M. Hall) und wurde in folgende Plasmide kloniert: *pYCplac33*, *pYCplac22*, *pYCplac111*, *pYIplac204*, *pYIplac211*, *pYIplac128*. Die Sequenz fängt 984 Basenpaare vor dem Start-Codon an und endet 318 Basenpaare nach dem Stop-Codon, wobei sich die Angaben auf die SGD-Datenbank (http://www.yeastgenome.org) beziehen. Wenn angegeben, ist das *kanMX6* Gen in die *URA3*-Sequenz des Plasmids *pYIplac211* integriert worden, um eine Selektion auf Kanamycin zu ermöglichen. Mutanten von Rad52 wurden mittels zielgerichteter Mutagenese generiert, indem Basentriplets, die ursprünglich für einen Lysinrest kodierten, zu Codons mutiert wurden, die dann für Argininreste kodierten. Zur Analyse von *two hybrid*-Interaktionen wurde *RAD52* durch PCR aus genomischer Hefe-DNA amplifiziert und im korrekten Leserahmen zur DNA-Bindedomäne von Gal4 in den Vektor *pGBD-C* eingefügt. Das Konstrukt *pGBD-RAD52(+33)* umfasste den eigentlichen Leserahmen von Rad52 sowie die 33 Aminosäuren vor dem eigentlichen Start-Codon (insgesamt 504 Aminosäuren).

Die für *SRS2* kodierende Sequenz inklusive der für den Promotor und den Terminator wurde nach der Amplifikation aus genomischer Hefe-DNA in *pYCplac33* kloniert. Derselbe Vektor und dieselbe Klonierungsstrategie wurden für die Expression von Rrm3 und Sgs1 verwendet. Hierbei erfolgte die Expressionskontrolle durch den eigenen Promotor bzw. den *ADH1*-Terminator.

Zur Überexpression von mit einem Epitop markierten SUMO wurde *SMT3* als Fusion mit mehreren Histidinresten oder dem myc-Epitop in die Plasmide *pYIplac128* oder *pYIplac211* kloniert und stand dabei unter der Kontrolle des *GAL1/10*- bzw. des *ADH1*-Promotors. Wenn angegeben ist das *kanMX6* Gen in die *URA3*-Sequenz des Plasmids *pYIplac211* integriert worden, um eine Selektion auf Kanamycin zu ermöglichen.

Weitere benutzte Plasmidkonstrukte entstammen vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe.

Kultivierung von *S. cerevisiae*

Flüssigkulturen wurden mit frisch gewachsenen Hefen von Ausstrichen auf Platte angeimpft. Es wurde stets mit Flüssigkulturen gearbeitet, welche aus einer frischen Übernachtkultur verdünnt worden waren. Das Wachstum erfolgte in der Regel bei

30°C. Bei temperatursensitiven Mutanten wurde die Wachstumstemperatur variiert. Die Zelldichte wurde photometrisch bestimmt und die Zellzahl berechnet (OD_{600}=1 entsprechen circa $1,5x10^7$ Zellen/ml). Für kurze Zeit (circa vier Wochen) wurden Hefen auf Platten bei 4°C gelagert. Für die Langzeitaufbewahrung wurde eine stationäre Kultur mit Glycerin (16,7% Endkonzentration) versetzt und bei –80°C aufbewahrt.

Bei der Verwendung DNA-schädigender Agenzien wie MMS, Zeocin oder 4-NQO wurden die Zellen für 2 h inkubiert, sofern nicht anders angegeben. Bei der Behandlung mit Röntgenstrahlen erfolgte die Bestrahlung an einem Röntgengerät (Siemens) im Max-Planck-Institut für Neurobiologie. Die Strahlungsintensität betrug dabei 1132 rad/min (100 rad entsprechen 1 Gy). Die Zellen wurden bei RT inkubiert und 45 min nach der Bestrahlung geerntet.

Medien für *S. cerevisiae*

Bei Platten enthält das entsprechende Medium 2% Agar. Bei Platten mit 5-FOA (5-Fluor-Orotsäure), Nourseothricin (100mg/l), Kanamycin (200mg/l), MMS, Zeocin oder 4-NQO wurde das Medium nach dem Aufkochen erst auf 55°C abgekühlt, bevor die angegebene Chemikalie hinzugefügt wurde.

YPD
1% Hefeextrakt
2% Bacto-Pepton
2% D-(+)-Glukose

SC-Medium
2% D-(+)-Glukose
0,67% *Yeast Nitrogen Base*
0,2% *drop out* Aminosäure-Mix (Herstellung je nach Bedarf, um die entsprechende Selektion zu ermöglichen)

5-FOA Platten
wie das SC-Medium, zusätzlich 30mg Uracil und 1g 5-FOA pro Liter Medium

YP Laktat Medium
1% Hefeextrakt
2% Bacto-Pepton
3,7% Milchsäure
(12g NaOH wurden in 900ml Wasser gelöst, und der pH-Wert mit 85%iger Milchsäure auf pH 5,5 eingestellt. Anschließend wurden Hefeextrakt und Bacto-Pepton hinzugefügt und das Medium sterilisiert.)

YP Glycerin Medium
1% Hefeextrakt
2% Bacto-Pepton
2% Glycerin

YP Acetat Medium
1% Hefeextrakt
2% Bacto-Pepton
2% Kaliumacetat

Sporulationsmedium
1,5% Kaliumacetat (Protokoll der Sporulation zwecks Tetradenanalyse)
0,4% Kaliumacetat (Protokoll der synchronen Sporulation)

Herstellung kompetenter Hefezellen
Hefezellen wurden aus einer Übernachtkultur auf eine OD_{600} von 0,1 inokuliert und bis zu einer OD_{600} von 0,5 bis 0,7 kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (500g, 5 min, RT) geerntet, mit sterilem Wasser und mit SORB (100mM LiOAc, 10mM Tris/HCl [pH 8,0], 1mM EDTA [pH 8,0], 1M Sorbitol; durch Filtration sterilisiert) gewaschen und schließlich in 360µl SORB pro 50ml Kulturvolumen resuspendiert. Nach Zugabe von 40µl Träger-DNA (Lachssperma-DNA, 10mg/ml) wurden die Zellen aliquotiert und bei –80°C eingefroren.

Transformation von Hefezellen
Für die Transformation von PCR-Produkten bzw. Plasmid-DNA wurden in der Regel 50µl bzw. 10µl kompetente Zellen verwendet. Hierfür wurde zu den kompetenten Hefezellen die zu transformierende DNA (PCR-Fragment, linearisierter Vektor oder Plasmid) gegeben und gut gemischt. Diese Suspension wurde in sechs Volumen PEG (100mM LiOAc, 10mM Tris/HCl [pH 8,0], 1mM EDTA [pH 8,0], 40% PEG-3350; durch Filtration sterilisiert) aufgenommen und bei RT für 30 min inkubiert. Nach der Zugabe von DMSO (Endkonzentration 10%) wurde der Ansatz für 15 min bei 42°C inkubiert. Diese Inkubationszeit betrug bei temperatursensitiven Stämmen nur 8 min. Nach einer Zentrifugation (3 min, 500g, RT) wurden die transformierten Zellen in 100µl Wasser aufgenommen und auf eine Selektionsplatte ausgebracht. Bei der Verwendung der Antibiotika Nourseothricin oder Kanamycin als Resistenzmarker erfolgte vor dem Ausplattieren eine Inkubation (3 h) der transformierten Zellen in YPD. Zudem war in diesen Fällen eine Replika-Plattierung auf eine weitere Selektionsplatte notwendig, um den Hintergrund an falsch-positiven Zellen zu reduzieren.

Genomische Integration mittels homologer Rekombination
Lineare DNA in Form linearisierter Plasmide wurde in Hefezellen transformiert, um eine Integration in das Genom durch homologe Rekombination zu erreichen. Die *pYIplac*-Plasmide (Gietz und Sugino, 1988) enthalten lediglich einen Auxotrophiemarker und kein autonomes Replikationselement. Das untersuchte Gen wurde so in einen integrativen Vektor kloniert, dass es unter der Kontrolle des eigenen Promotors oder eines anderen Hefepromotors stand, der die konstitutive oder konditionale Expression des Gens ermöglichte. Für die Transformation wurde das Plasmid im Gen des Selektionsmarkers linearisiert. Über die entstandenen Enden konnte die Integration in die entsprechenden homologen Bereiche im Genom durch homologe Rekombination erfolgen.

Eine Gendeletion erfolgte über eine PCR-Strategie (Longtine *et al.*, 1998; Knop *et al.*, 1999; Janke *et al.*, 2004). Circa 55 Basenpaare korrespondierend zur Sequenz des Promotors vor dem Start-Codon bzw. des Terminators nach dem Stop-Codon wurden als Oligonukleotide synthetisiert. An beide Primer wurde eine Standardsequenz angefügt, mit der eine Deletionskassette (Longtine *et al.*, 1998; Janke *et al.*, 2004) über PCR amplifiziert wurde. Das PCR-Produkt wurde gefällt (siehe V.4.1) und in kompetente Hefezellen transformiert. Rekombinationsereignisse wurden über Integration eines Auxotrophie- bzw. Resistenzmarkers selektiert. Die Gendeletion wurde mittels einer PCR (siehe V.4.2),

über die Analyse des Phänotyps und, sofern möglich, immunologisch im Westernblot verifiziert.

Analyse des mating type von haploiden *S. cerevisiae*
Für die Analyse des Konjugationstyps (*mating type*, MATa oder MATα) wurden die Testerstämme RC634a und RC75-α verwendet. Diese Stämme sind jeweils gegenüber dem Pheromon von Zellen des anderen *mating types* hypersensitiv. 50µl einer wässrigen Zellsuspension eines Testerstammes wurden mit 5ml einer geschmolzenen, 1%igen Agarlösung, die auf 45°C abgekühlt war, vermischt und als Top-Agar auf eine YPD-Platte gegossen. Die zu testenden Stämme wurden nach Erstarren des Agars auf den hergestellten Top-Agar replikaplattiert. Nach circa 24 h Inkubation bildeten sich aufgrund der Hypersensitivität Halos aus. Dabei kam es jeweils zur Ausbildung eines Halo um eine zu testende Kolonie, wenn der Testerstamm den reziproken Konjugationstyp besaß. Diploide Zellen bildeten mit keinem der beiden Testerstämme einen Halo aus, da sie kein *mating type*-Pheromon sekretieren.

Kreuzung von haploiden *S. cerevisiae* Stämmen
Zwei haploide Stämme von unterschiedlichem *mating type* (MATa und MATα) wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase inkubiert. Gleiche Zellmengen (10µl) wurden nacheinander auf eine vorgewärmte YPD-Agarplatte getüpfelt. Nach 3 h Inkubation konnten fusionierte Hefezellen aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie (so genannter *mexican hat* bzw. hantelförmige Zellen, die in der Mitte eine Knospe tragen) identifiziert und mit dem Mikromanipulator (Singer MSM System) vereinzelt werden. Enthielten die Ursprungsstämme unterschiedliche Auxotrophiemarker, wurden die Zellen alternativ auf die entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen und diploide Zellen durch ihr Wachstum selektiert.

Sporulation und Tetradenanalyse diploider *S. cerevisiae* Stämme
Diploide Hefezellen (500µl) einer stationären Kultur (Wachstum für mindestens 36 h) wurden durch Zentrifugation (2 min, 500g, RT) geerntet, viermal mit sterilem Wasser gewaschen und anschließend in 4ml Sporulationsmedium aufgenommen. Die Zellen wurden 72 h bei RT geschüttelt. 10µl der sporulierten Zellen wurden mit 10µl Zymolyase-20T-Lösung (0,9M Sorbitol, 0,1M EDTA, 0,1M Tris/HCl [pH 8,0], 50mM DTT, 0,5mg/ml Zymolyase 20T (ICN Biochemicals)) gemischt und 10 min bei RT verdaut. Hieraus wurden die Tetraden mit Hilfe eines Mikromanipulators (Singer MSM System) ausgelegt. Das Wachstum der Sporen erfolgte für 72 h ohne Selektion, bevor eine Replika-Plattierung auf Selektionsplatten und eine Analyse des *mating types* durchgeführt wurde.

Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit dem *two hybrid*-System
Protein-Protein-Interaktionen wurden durch das *two hybrid*-System getestet. Die zu untersuchenden Proteine wurden am N-Terminus mit der DNA-Binde- bzw. der Aktivierungsdomäne von Gal4 fusioniert. Diese Fusionskonstrukte wurden gleichzeitig im Hefestamm PJ69-7a exprimiert. Im Fall einer Interaktion zwischen den beiden Proteinen führte dies zur Rekonstitution des Gal4-Transkriptionsaktivators und Expression eines Reportergens, das unter der Transkriptionskontrolle von Gal4 lag. Als Reportergen dienten die Gene *HIS3* und *ADE2*, so dass die Hefezellen bei einer positiven Interaktion auf einem entsprechenden Selektionsmedium wachsen konnten.

Synchrone Sporulation von *S. cerevisiae*

Um Zellen von *S. cerevisiae* synchron sporulieren zu lassen, wurden ausschließlich SK1-Stämme verwendet, da diese sehr effizient sporulieren. Das vorliegende Protokoll erlaubt zudem einen synchronen Sporulationsvorgang, so dass sich die mit der Sporulation einhergehenden meiotischen Ereignisse gut charakterisieren lassen. Zunächst wurde von einem Ausstrich auf YP Glycerin eine diploide homozygote Einzelkolonie ausgewählt und auf einer YPD-Platte ausgestrichen. (Zellen von SK1, die nicht diploid sind oder Sauerstoff nicht mehr veratmen können, weisen auf YP Glycerin-Platten eine unterschiedliche Morphologie auf.) Von der YPD-Platte wurde eine Vorkultur in YPD angeimpft, aus der nach 24 h Inkubation 50ml YP Acetat auf OD_{600}=0,2 inokuliert wurden. Diese Zellen wurden nach 16 h zunächst mit Wasser (30°C) gewaschen und anschließend im doppelten Volumen Sporulationsmedium (0,4% Kaliumacetat, 30°C) resuspendiert, um die synchrone Sporulation zu starten. Die Probennahme erfolgte zu den gewünschten Zeitpunkten, und alle Inkubationsschritte fanden bei 30°C statt.

Phänotyp-Analyse durch Wachstumstests

Für diese Arbeit wurden unterschiedliche Hefestämme auf ihre Sensitivität gegenüber der DNA-alkylierenden Substanz MMS und gegenüber Röntgenstrahlen getestet. Hierzu wurden serielle Verdünnungen von Hefekulturen auf Platten getüpfelt, welche unterschiedliche Konzentrationen MMS enthielten oder mit einer unterschiedlichen Dosis an Röntgenstrahlung behandelt wurden. In diesen Versuchen wurden stationäre Hefekulturen verwendet. Die Kulturen wurden in sterilem Wasser auf eine OD_{600} von 0,5 eingestellt und in fünf Schritten jeweils 1:5 verdünnt. Jeweils gleiche Mengen der letzten fünf Verdünnungen wurden nebeneinander auf Platten ausgebracht, indem ein mit den Zellsuspensionen benetzter Stempel für 25 sek auf den Platten platziert wurde. Das Austüpfeln gleicher Zellzahlen wurde durch eine Kontrollplatte überprüft, welche kein MMS enthielt oder nicht bestrahlt wurde. Die Inkubation erfolgte zwei bis vier Tage bei 30°C.

Bestimmung der Rekombinationsraten

Die Häufigkeit von bestimmten Rekombinationsereignissen lässt sich mit Hilfe genetisch veränderter Testerstämme bestimmen. Diese besitzen zwei unterschiedliche, nicht-funktionale Allele eines Gens. Durch Rekombination kann aus diesen das funktionale WT Allel entstehen. In der Regel werden Auxotrophie-Marker verwendet, so dass sich Rekombinationsereignisse leicht durch das Wachstum auf einem entsprechenden Mangelmedium selektieren lassen. In dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Systeme zur Bestimmung von Rekombinationsraten benutzt.

Generell wurden die Rekombinationsfrequenzen für jeweils zehn unabhängige Kulturen eines Stammes bestimmt und daraus die Rekombinationsrate mit Hilfe eines Fluktuationstests ermittelt (Rosche und Foster, 2000). Hierfür wurde die Zahl der Mutanten aus jedem Ansatz auf die durchschnittliche Zellzahl der Kulturen normiert und aus der Verteilung der Mutanten mit einem *maximum likelihood*-Ansatz die wahrscheinlichste Rekombinationsrate ermittelt. Aus mindestens drei unabhängigen Fluktuationstests wurde die Rekombinationsrate gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

Zur Bestimmung der Rekombinationsfrequenzen wurden entweder die Kulturen mit einer geringen Zellzahl (1:20000 Verdünnung einer Übernachtkultur)

inokuliert und bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase inkubiert, oder es wurde mit einer kompletten, logarithmisch wachsenden Einzelkolonie von einer Platte gearbeitet. Ein Teil der Zellen wurde jeweils zur Bestimmung der Rekombinationsfrequenz plattiert, und durch das Plattieren einer Verdünnung auf eine Kontrollplatte konnte die gesamte Zellzahl der Kultur bzw. der Kolonie bestimmt werden. Die Platten wurden zwei bis drei Tage bei 30°C inkubiert und anschließend die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Insgesamt wurden für jeden Stamm zehn unabhängige Kulturen benutzt und hieraus die Rekombinationsrate mittels eines Fluktuationstests bestimmt (siehe oben).

Interchromosomale Rekombination wurde in diploiden Zellen zwischen zwei Allelen von *HIS1* untersucht. Dafür wurden Zellen verwendet, welche das Allel *his1-1* auf der einen Kopie des Chromosoms V und das Allel *his1-7* auf der anderen homologen Kopie des Chromosoms V trugen. Da die beiden Allele *his1-1* und *his1-7* jedoch durch Mutation spontan zu einem funktionalen Allel revertieren können, wurden auch die Reversionsraten von entsprechenden *his1-1* bzw. *his1-7* homozygoten Stämmen bestimmt. Diese Reversionsraten wurden von der zunächst berechneten Rekombinationsrate subtrahiert, um die tatsächliche interchromosomale Rekombinationsrate zu ermitteln. Bei diesem System wurden die Zellen auf SC^{-His} und YPD plattiert.

Zudem wurde in zwei unterschiedlichen Systemen die intrachromosomale Rekombination in haploiden Zellen untersucht. Einerseits wurde die intrachromosomale Rekombination zwischen zwei gegenläufig orientierten *ADE2*-Allelen bestimmt, die das Gen *TRP1* flankierten (*inverted repeat*-System, *ade2-5´∆::TRP1::ade2-n*) (Rattray und Symington, 1994). Bei diesem System wurden die Zellen auf SC^{-Ade} und SC^{-Trp} plattiert.

Des Weiteren wurde zur Bestimmung der intrachromosomalen Rekombination ein *direct repeat*-System verwendet, mit dem die Rekombination zwischen zwei gleich orientierten *LEU2*-Allelen analysiert werden konnte (*leu2-112::URA3::leu2-k*) (Palladino und Klein, 1992). Dabei sind bei einer Rekombination sowohl Leu^+ Ura^+-Ereignisse als auch Ura^--Ereignisse möglich. Letztere entstehen, wenn der ursprünglich flankierte Abschnitt mit *URA3* deletiert wird (**Abb. 20**). Bei diesem System wurden die Zellen auf SC^{-Leu} und $SC^{-Leu-Ura}$ plattiert.

Induzierbarer SSA-Assay

Inwieweit sich Proteine am *single strand annealing* (SSA) beteiligen, lässt sich mit Hilfe von bestimmten Testerstämmen untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde zu diesem Zweck ein Testerstamm gewählt, bei dem zwei gleich orientierte, 205 bp (Basenpaar) lange Abschnitte des *URA3*-Promotors die Schnittstelle für die HO-Endonuklease flankieren (Sugawara *et al.*, 2000, **Abb. 21a**). Durch Zugabe von Galaktose konnte die Expression der HO-Endonuklease induziert werden, da alle Stämme mit dem *TRP1*-Plasmid pFH800 transformiert wurden, welches die HO-Endonulease unter der Kontrolle des *GAL10*-Promotors (*GAL10::HO*) trug. Da die eigentliche HO-Schnittstelle im Genom deletiert war, verursachte die HO-Expression nur einen einzigen DSB, und zwar an der artifiziellen HO-Schnittstelle zwischen den *URA3*-Abschnitten. Dieser DSB konnte (fast) nur über SSA repariert werden (Sugawara *et al.*, 2000), was zu einem Deletionsereignis führte. Die Ereignisse nach der Induktion bzw. dem Entstehen eines DSB ließen sich anhand der physikalischen Beschaffenheit der DNA analysieren. So wurde zu gewünschten Zeitpunkten nach Zugabe der Galaktose das Zellmaterial geerntet, daraus die genomische DNA gewonnen und mit Hilfe einer RealTime-PCR die DNA

quantifiziert (ursprüngliche Struktur des Rekombinationssubstrates gegenüber Deletionsereignis).

SSA wurde in WT Zellen sowie in den Hefemutanten *rad52*, *rad59* und *rad52 rad59* analysiert. Zellen mit einer *RAD52* Deletion wurden entweder mit einem Leervektor transformiert oder exprimierten WT RAD52 oder die rad52-K10,11,220R-Mutante von Plasmiden. Die Expression von Plasmiden wurde durch Westernblots überprüft und war vergleichbar mit der Expression der entsprechenden *RAD52*-Stämme. WT Zellen und die Hefemutante *rad59* wurden mit einem Leervektor transformiert.

Zur Versuchsdurchführung wurden Kulturen in $SC^{-Leu-Trp}$ angeimpft, um für das Plasmid pFH800 und die *RAD52*-Allele bzw. den Leervektor zu selektieren. Aus der Übernachtkultur wurde auf eine OD_{600}=0,015 in YP Laktat inokuliert und bis zu einer OD_{600} von 0,5 bis 1,5 inkubiert (Dauer: 15 bis 20 h). Die Induktion der HO-Endonuklease erfolgte durch Zugabe von Galaktose (Endkonzentration von 2%). Zu den Zeitpunkten 0 h (unmittelbar vor der Induktion), 30 min, 2 h und 5 h wurden jeweils 7,5 OD_{600} geerntet und die DNA extrahiert (siehe V.4.1). Die Quantifizierung der DNA erfolgte mit dem Roche LightCycler 480 unter Verwendung der folgenden Primer:
Primer 1 (5´-GTAAGGAGAAAATACCGCATCAG-3´),
Primer 2 (5´-GTAGTGGGTGGCACACAAAG-3´) und
Primer 3 (5´-CAGCAACAGGACTAGGATGAG-3´). Die relativen Positionen der Primer im Rekombinationssubstrat kann man der **Abb. 21a** entnehmen. Primer 1 und 2 ergaben ein PCR-Produkt von 568 bp Länge, wenn die Originalstruktur erhalten war, während Primer 1 und 3 in einem PCR-Produkt von 315 bp Länge resultierten, sofern ein Deletionsereignis stattgefunden hatte. Als Kontrolle wurden die zwei folgenden Primer verwendet, die spezifisch für den *ARG5/6* Locus sind:
ARG5/6 for 5´-CAAGGATCCAGCAAAGTTGGGTGAAGTATGGTA-3´ und
ARG5/6 rev 5´-GAAGGATCCAAATTTGTCTAGTGTGGGAACG-3´.
Die Durchführung der RealTime-PCR folgte den Angaben und Empfehlungen von Roche. Die Hybridisierungstemperatur bei der PCR betrug 54°C bzw. 58°C. Jede Reaktion wurde dreimal angesetzt.

Zur Berechnung des relativen SSA-Produkts wurden die Werte des Deletionsereignisses zu den Werten des *ARG5/6* Locus normalisiert und anschließend durch den 0 h-Wert der Originalstruktur dividiert. Dieser Wert wurde zudem durch den Quotienten geteilt, der sich durch die Division der Zellzahl der Zellen, die das Plasmid pFH800 tragen, durch die absolute Zellzahl ergibt. Dazu wurden zum Zeitpunkt 0 h pro Stamm aus einer 1:20000 Verdünnung jeweils 100µl auf je drei Platten YPD und SC^{-Trp} plattiert. Dies diente der Normalisierung auf den Anteil der Zellen, bei denen überhaupt die Expression der HO-Endonuklease induziert werden konnte. Schließlich wurde der 0 h Wert von allen Werten subtrahiert, um eine Nulllinie zu generieren, denn einige Zellen wiesen bereits vor der HO-Induktion ein Deletionsereignis auf.

Plasmid-*shuffle* von Helikasen

Der Plasmid-*shuffle* von Helikasen über eine 5-FOA-Selektion erfolgte in Hefezellen, in denen neben *RAD52* noch die Gene für zwei der drei folgenden Helikasen deletiert waren: Sgs1, Srs2, Rrm3. Wenn diese Helikasen paarweise deletiert sind, sterben die Zellen, sofern WT Rad52 noch präsent ist. Die Stämme wurden mit einem *URA3*-Plasmid, welches eine der drei Helikasen exprimierte, sowie mit einem Leervektor oder einem *RAD52*-Allel transformiert. Durch

Ausbringen auf 5-FOA-haltigem Medium wurden die Zellen dazu gebracht, gegen *URA3*-Plasmide zu selektieren, so dass reine Helikasedoppelmutanten entstanden. So konnte man die Auswirkung der verschiedenen Rad52-Allele auf das Zellwachstum untersuchen.

Bei den Versuchen wurden Hefekulturen der spätlogarithmischen Wachstumsphase verwendet, die in sterilem Wasser auf eine OD_{600} von 12,5 eingestellt und in sieben Schritten jeweils 1:5 verdünnt wurden. Jeweils gleiche Mengen aller acht Verdünnungen wurden nebeneinander auf Platten ausgebracht, indem ein mit den Zellsuspensionen benetzter Stempel für 25 sek auf den Platten platziert wurde. Das Austüpfeln gleicher Zellzahlen wurde durch eine Kontrollplatte überprüft, die für das Plasmid mit dem *RAD52*-Allel und das Plasmid mit der Helikase selektierte. Beim Ausbringen auf 5-FOA-haltigem Medium wurde dagegen für das Plasmid mit dem *RAD52*-Allel, jedoch gegen das Plasmid mit der Helikase selektiert. Die Inkubation erfolgte bei 30°C, bei den Kontrollplatten für zwei Tage und bei den 5-FOA-haltigen Platten für vier bis fünf Tage.

***expression shut-off* Experimente**

Um die Halbwertszeiten von Proteinen zu bestimmen, wurden so genannte *expression shut-off* Experimente durchgeführt. Dabei wurde durch die Zugabe von Cycloheximid jegliche Proteinbiosynthese inhibiert, so dass sich die Abnahme eines bestimmten Proteins immunologisch im Westernblot verfolgen ließ. Die quantifizierten Proteinmengen (siehe V.5.1) ließen sich graphisch darstellen und ermöglichten damit die Bestimmung der Halbwertszeit. Bei der Durchführung wurden die Stämme aus Übernachtkulturen auf OD_{600}=0,2 angeimpft. Nach 6 h Wachstum wurden 15 OD_{600} geerntet und in 15ml frischem Medium resuspendiert. Nach der Zugabe von Cycloheximid (0,5 mg/ml) wurde kein neues Protein mehr synthetisiert. Die Probennahme erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten.

Strategie zur Suche der Akzeptorlysine für die SUMOylierung von Rad52

Bei der Suche nach Akzeptorlysinen für die Rad52-SUMOylierung (siehe III.1.3) wurde das Tris-Acetat-System (siehe V.5.1) verwendet, da man in diesem System die Mono-SUMOylierung an einem Akzeptorlysin von der Mono-SUMOylierung an einem anderen Akzeptorlysin unterscheiden kann (**Abb. 10a**).

Zunächst wurden mit diesem System Zellextrakte der *rad52-K220R*-Mutante im Westernblot untersucht (siehe III.1.3) und festgestellt, dass bei der Mono-SUMOylierung die Bande mit der langsameren Mobilität deutlich schwächer war als bei WT Rad52. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass K220 ein Akzeptorlysin für die SUMOylierung von Rad52 darstellt (**Abb. 10a**).

Im Folgenden wurden daher in der *rad52-K220R*-Mutante weitere Lysine des Proteins, die auch in anderen Pilzen konserviert sind, individuell durch Arginine ersetzt. So wurden Gesamtzellextrakte im anti-Rad52 Westernblot auf SUMOylierung hin überprüft und beobachtet, dass in einer *rad52-K11,220R*-Mutante beide Banden der Mono-SUMOylierung deutlich schwächer waren als in WT Rad52. Demzufolge wird Rad52 auch neben K220 an K11 SUMOyliert. Allerdings war in *rad52-K11,220R* immer noch eine Doppelbande auszumachen, so dass anzunehmen war, dass noch weitere Lysine als Akzeptorstelle fungieren können (**Abb. 10a**).

Daher wurden nacheinander alle verbleibenden 38 Lysine des Proteins in *rad52-K11,220R* individuell durch Arginine ersetzt. Bei der Mono-SUMOylierung war nur in einer *rad52-K10,11,220R*-Mutante im anti-Rad52 Westernblot die Bande mit

der schnelleren Mobilität weiter abgeschwächt. So war anzunehmen, dass auch K10 als Akzeptorlysin dient (**Abb. 10a**).

Da in allen Mutanten, die in *rad52-K11,220R* generiert worden waren, bei der Mono-SUMOylierung die Bande mit der langsameren Mobilität erhalten blieb und auch in *rad52-K10,11,220R* immer noch eine schwache SUMOylierung zu sehen war, scheint die verbleibende SUMOylierung an einem alternierenden Lysin zu erfolgen (siehe III.1.3).

V.3 Zellbiologische Techniken

Expressionsvektoren für die Zellkultur
pCMV Tag 3C (Stratagene)
pSG5 (Stratagene)

Zelllinien
Für Arbeiten in der Zellkultur wurden HEK293T-Zellen benutzt. Diese sind humane embryonale Nierenzellen und stellen ein mit dem SV40 *large T antigen* transformiertes Derivat der humanen 293 Zelllinie dar.

Plasmidkonstrukte für die Zellkultur
Humanes RAD52 wurde aus pEGFPC3-hRAD52 (Essers *et al.*, 2002) in pCMV Tag 3C kloniert, um eine Fusion mit dem myc-Epitop zu generieren, die unter der Kontrolle des konstitutiven CMV-Promotors steht. Weitere Expressionskonstrukte für SUMO-1 und ^{His}SUMO-1 stammen aus dem Labor von Dr. Stefan Müller (Müller *et al.*, 2000).

Kultivierung von Säugerzellen
Die HEK293T-Zellen wurden in Kulturschalen (Durchmesser 10 oder 15cm (Falcon)) bei 37°C, 7,5% CO_2 und 96% Luftfeuchtigkeit in Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO-BRL) kultiviert. Das Nährmedium wurde mit 10% FCS (durch Hitze inaktiviert (Biochrom)) supplementiert. Nach Erreichen einer Zelldichte von circa 80 bis 100% wurden die Zellen abgeerntet. Hierfür wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden 2ml Trypsin/ EDTA Lösung (GIBCO-BRL) pro circa 80cm^2 Kulturschale hinzugefügt und bis zum Ablösen der Zellen vom Gefäßboden bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden 1:1 mit Medium verdünnt und für 4 min bei 400g und RT abzentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in frischem Nährmedium resuspendiert und je nach Bedarf zur weiteren Kultivierung 1:5 bis 1:10 verdünnt, in frischen Kulturschalen angesetzt oder für Experimente in Platten ausgesät. Die Ermittlung der Zellzahl der Zellsuspension erfolgte durch Auszählen in einer Neubauerzählkammer.

Transfektion von Säugerzellen
HEK293T-Zellen wurden mittels der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Hierfür wurden 4x10^6 Zellen pro Kulturschale (Durchmesser 10cm) ausgesät und am folgenden Tag transfiziert. Für einen Transfektionsansatz wurden in einem 2ml Eppendorfgefäß 15µg Plasmid-DNA mit Wasser auf 450µl aufgefüllt und mit 50µl 2,5M $CaCl_2$ Lösung gemischt. Dann wurden 500µl 2xHBS Lösung (16,012g NaCl, 0,744g KCl, 9,532g HEPES (N-(2-hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)),

0,248g Na_2HPO_4, Angaben pro Liter) tropfenweise am Rand des Gefäßes dazugegeben, kurz durch Schütteln gemischt und 3 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubation wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen mit 40µM Chloroquine (Endkonzentration) supplementiert. Die Transfektionslösung wurde nach kurzem Mischen tropfenweise gleichmäßig zum Medium der vorbereiteten Zellen gegeben (1ml Lösung pro Schale) und diese dann für 5 h im Brutschrank inkubiert. Nach Wechseln des Mediums wurden die Zellen zur Expression der transfizierten cDNAs für weitere 36 bis 40 h inkubiert.

V.4 Molekularbiologische Techniken

V.4.1 Isolierung von DNA

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*
Plasmid-DNA wurde mit den Kits der Firmen Qiagen (Plasmid Mini Kit, Plasmid Maxi Kit) oder Macherey-Nagel (Nucleospin Plasmid Quick Pure) nach Angaben des Herstellers isoliert. Kleine Mengen DNA (Miniprep) wurden aus 4ml, größere Mengen (Maxiprep) aus 500ml Übernachtkultur gewonnen.

Isolierung von chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae*
Als Vorlage zur Amplifikation von Hefe-Genen mittels PCR wurde isolierte, chromosomale DNA benutzt. Als Ausgangsmaterial diente eine stationäre Hefekultur (10ml), von der aus der Hälfte der Kultur die Zellen durch Zentrifugation geerntet (3000g, 5min) wurden. Für die Extraktion chromosomaler DNA für den SSA-Assay dienten dagegen 7,5 OD_{600} Zellmaterial, welches nach der Ernte und Schockfrieren in flüssigem Stickstoff zwischenzeitlich bei –80°C gelagert wurde. Die Zellen wurden einmal mit Wasser gewaschen und in 200µl Lysepuffer (100mM NaCl, 1mM EDTA, 2% Triton-X-100, 1%SDS, 10mM Tris/HCl [pH 8,0]) resuspendiert. Hierzu wurden 300mg Glasperlen (Sigma, 425-600µm) sowie 200µl eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:25:1 (Roth)) hinzugefügt und die Zellen durch Mischen für 3 min mit dem Vortexer aufgeschlossen. Anschließend wurden 200µl TE-Puffer (1mM EDTA, 10mM Tris/HCl [pH 8,0]) dazugegeben, das Gemisch für 3 min bei 12000g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der wässrige Überstand in ein neues Gefäß überführt. Durch Zugabe von 1ml reinem Ethanol wurden die Nukleinsäuren gefällt. Diese wurden kurz abzentrifugiert (12000g, 3 min) und in 400µl TE-Puffer mit 30µl RNase A-Lösung (1mg/ml) gelöst. Die RNA wurde 5 min bei 37°C verdaut, die verbleibende Nukleinsäure erneut mit 10µl 4M Ammoniumacetat und 1ml reinem Ethanol gefällt. Nach einer kurzen Zentrifugation (12000g, 3 min) wurde die getrocknete, genomische DNA in 50µl bis 100µl TE-Puffer aufgenommen und durch Schütteln im Vortexer gelöst. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260nm bestimmt. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei RT.

Präzipitation von DNA
Für die Ethanol-Fällung wurden 1/10 Volumen 3M Natriumacetat [pH 4,8] und 2,5 Volumen Ethanol zur DNA-Lösung gegeben. Nach einer Inkubation des Ansatzes für 30 min bei -20°C wurde die DNA durch Zentrifugation bei 16000g und 4°C für 30 min pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, die DNA durch Zugabe

von 70%igem Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder in destilliertem Wasser aufgenommen.

Konzentrationsbestimmung von DNA
Die Bestimmung der Konzentration von DNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von λ=260nm. Für doppelsträngige DNA entspricht dabei OD260=1 einer Konzentration von 50µg/ml.

V.4.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde in dieser Arbeit zur Klonierung von Plasmidkonstrukten (siehe V.3.3), zur direkten Transformation von Deletionskassetten in Hefe (siehe V.2.2) und zur Analyse von Integrationen im Genom von *S. cerevisiae*-Stämmen (siehe V.2.2) benutzt.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 50µl mit circa 50ng Plasmid-DNA oder 0,2µg genomischer DNA in PCR-Puffer (Thermopol-Puffer (NEB), Pfu-Puffer (Stratagene)), jeweils 0,6µM der entsprechenden Primer, 1,75µl Desoxyribonukleotid-Mix (je 10mM (NEB)) und 0,2 bis 5 Units einer Polymerase durchgeführt (Pfu-Turbo Polymerase (Stratagene), Mischung aus der Taq- und Vent-Polymerase im Verhältnis 4:1 (NEB) oder eine in der Arbeitsgruppe aufgereinigte Taq-Polymerase).

Die Amplifikation erfolgte in einem Mastercycler (Eppendorf). Das Profil der Reaktion richtete sich nach der Quantität und Qualität der Ausgangs-DNA, der Länge und dem G/C-Gehalt der beiden Oligonukleotide und der Länge des erwarteten PCR-Fragments. Falls notwendig wurden die Temperaturen für die Bindung der Primer und die Elongationszeiten optimiert.

Standard PCR-Reaktionen folgten dem folgenden Schema, wobei die Zugabe der Polymerasen nach der initialen Denaturierung erfolgte:

Initiale Denaturierung	94°C	10 min
10 Amplifikationszyklen	94°C	20 sek
	45°C	30 sek
	68°C	1 min/1 kb (Kilobasen)
20 Amplifikationszyklen	94°C	20 sek
	54°C	30 sek
	68°C	1 min/1 kb
Endverlängerung	68°C	7 min
Abkühlung	4°C	

Zur Amplifikation von Deletionskassetten wurde folgendes Programm verwendet:

Initiale Denaturierung	94°C	5 min
10 Amplifikationszyklen	94°C	20 sek
	45°C	30 sek
	68°C	1 min 40 sek
20 Amplifikationszyklen	94°C	20 sek
	54°C	30 sek
	68°C	1 min 40 sek + 20 sek/Zyklus
Abkühlung	4°C	

Zur Verifizierung von chromosomalen Integrationsereignissen, in der Regel der Deletion eines Gens, wurde die Technik der Kolonie-PCR benutzt. Hierfür wurde ein Teil einer Hefekolonie in 20µl Natronlauge (0,02 M) resuspendiert, eine Spatelspitze Glasperlen (Sigma, Durchmesser 425-600nm) dazugegeben und 5 min im Thermomixer bei 99°C stark geschüttelt. Nach kurzer Zentrifugation (15 sek) in der Tischzentrifuge wurden 4µl des Überstandes abgenommen und als Vorlage für die PCR-Reaktion benutzt. Zusätzlich wurden 5µl PCR-Puffer (Thermopol-Puffer (NEB)), 0,6µM der entsprechenden Primer, 1,75µl Desoxyribonukleotid-Mix (je 10mM (NEB)) und 2 Units Taq-Polymerase in einem 50µl Ansatz eingesetzt.

Dabei wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

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

Zielgerichtete Punktmutagenese

Es wurde eine auf der PCR basierende Methode verwendet, die sich an das QuickChange-Protokoll (Stratagene) anlehnt. Hierfür wurden zwei komplementäre Primer benutzt, die in der Mitte eine Punktmutation gegenüber der Zielsequenz aufwiesen und an beiden Enden um jeweils 15 bp der Originalsequenz verlängert waren. Die PCR-Reaktionen wurden in 25µl-Ansätzen mit 2,5µl Pfu-Puffer (Stratagene), je 62,5ng Primer, 0,625µl Desoxyribonukleotid-Mix (je 10mM (NEB)), 0,5µl Pfu-Turbo (Stratagene) und circa 50ng Plasmid-DNA durchgeführt.

Dabei wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

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

Um die DNA des Ausgangsplasmids zu beseitigen, wurde 150 min mit DpnI bei 37°C verdaut, das spezifisch methylierte DNA schneidet. Anschließend wurde ein Teil des Ansatzes direkt in *E. coli* transformiert. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierungen überprüft.

V.4.3 Klonierung von Plasmidkonstrukten

Restriktionsverdau von DNA

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

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

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

Ligation von DNA
Die Mengenverhältnisse der für die Ligationsreaktion eingesetzten DNA- Fragmente wurden aus Agarosegelen abgeschätzt. Für die Ligation wurden Vektor und einzufügendes Fragment im Verhältnis 1:3 bis 1:10 eingesetzt. Für einen Ligationsansatz (10µl) wurden circa 100ng des Vektors und 1µl T4 DNA-Ligase (NEB) benutzt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend 4 h oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Vor der Transformation in *E. coli* wurde der Ligationsansatz für 30 min gegen Wasser auf einem Nitrozellulosefilter (Porengröße: 0,05µm (Millipore)) dialysiert.

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

V.5 Proteinbiochemische Techniken

V.5.1 Gel- und Westernblot-Techniken

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
In dieser Arbeit wurden 4-12%ige Bis-Tris-Polyacrylamid-Gele sowie 8-12%ige Tris-Acetat-Polyacrylamid-Gele verwendet. Für das Bis-Tris-System wurden die Gele in dem *mighty small*-Gelsystem (Hoefer) selbst gegossen, oder es wurden kommerziell erhältliche Fertiggele (Invitrogen) benutzt. Im Gegensatz zu

klassischen Tris-SDS-Polyacrylamid-Gelen ermöglicht der niedrigprozentige Teil des Bis-Tris-Systems ein Sammeln der Proben, so dass kein spezielles Sammelgel gegossen werden muss.

Für die 4-12%igen Bis-Tris-Gele wurden 500ml einer Stammlösung aus 261,55g Bis-Tis-Base (Bis(2-Hydroxyethyl)Amino-Tris(Hydroxymethyl)Methan) und 62,1ml HCl (37%, w/v) angesetzt.

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

Die Gellösung wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers und einer Peristaltikpumpe von unten in die Gelform gegossen, wobei die Geltaschen mit einem geeigneten Teflonkamm gesteckt wurden. Sowohl bei den selbst gegossenen als auch bei den kommerziellen Bis-Tris-Gelen diente ein MOPS Puffer (50mM MOPS (Morpholinoethansulfonsäure), 50mM Tris-Base, 0,1% SDS, 1mM EDTA) als Laufpuffer, und die Proteine wurden bei einer konstanten Spannung von 140V aufgetrennt.

Für das Tris-Acetat-System wurden die Gele in dem *mighty tall*-Gelsystem (Hoefer) gegossen. Für die 8-12%igen Tris-Acetat-Gele wurde die Gellösung mit Tris-Base und Essigsäure auf pH 7,0 gepuffert.

Gellösung (für ein Gel):	8%	12%
Wasser	1,4ml	0,8ml
65% Saccharose	-	225µl
1,5M Tris/Acetat [pH 7,0]	750µl	750µl
30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid	0,8ml	1,2ml
10% SDS	15µl	15µl
TEMED	2µl	2µl
10% APS	30µl	30µl

Die Gellösung wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers und einer Peristaltikpumpe von oben in die Gelform gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde der Alkohol entfernt, die Geloberfläche mit Wasser gespült und ein 3,75%iges Sammelgel (für 2ml: 250µl 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid, 250µl 0,5M Tris/Acetat [pH 6,8], 1,45ml Wasser, 20µl 10% SDS, 20µl 10% APS, 3µl TEMED) auf das Trenngel gegossen, wobei die Geltaschen mit einem geeigneten Teflonkamm gesteckt wurden. Als Laufpuffer diente ein Tricin-Puffer (50mM Tris-Base, 50mM Tricin, 0,1% SDS), und die Proteine wurden bei einer konstanten Stromstärke von 30mA aufgetrennt.

Proteinproben wurden in Probenpuffer (Laemmli-Puffer: 2% SDS, 100mM DTT, 1% Bromphenolblau, 20% Glycerin, 60mM Tris/HCl [pH 6,8]; HU-Puffer: 8M Harnstoff, 5% SDS, 1mM EDTA, Bromphenolblau, 1,5% DTT, 200mM Tris/HCl [pH 6,8]) aufgenommen, durch Erhitzen (5 min bei 95°C in Laemmli-Puffer bzw. 15 min bei 65°C in HU-Puffer) denaturiert und in dem Gel aufgetrennt. Als Molekulargewichts-Standard wurde PEQ Gold II (PEQLab) benutzt.

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

Westernblot
SDS-Polyacrylamid-Gele wurden nach der Elektrophorese mit Hilfe einer Tankblot-Apparatur (Hoefer) in Transferpuffer (250mM Tris-Base, 1,92M Glycin, 0,1% SDS, 20% Methanol) auf eine Membran aus PVDF (Polyvinylidenfluorid) (Immobilon P, Millipore) überführt. Der Transfer erfolgte in der Regel für 90 min bei einer konstanten Spannung von 70V.

Zum immunologischen Nachweis der immobilisierten Proteine wurde die PVDF-Membran mindestens 30 min bei RT in TBST-Milch (5% Magermilchpulver (w/v) in TBST (25mM Tris/HCl [pH 7,5], 137mM NaCl, 2,6mM KCl, 0,1% Tween-20)) blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in der Regel über Nacht in TBST-Milch. Danach wurde die Membran fünfmal für 5 min mit TBST gewaschen und anschließend mit einem sekundären Antikörper in einer 1:5000 Verdünnung in TBST-Milch für 2 h bei RT inkubiert. Nach erneutem, sechsmaligem Waschen mit TBST erfolgte die Detektion mittels Chemolumineszenz (ECL-Western Kit, Amersham Pharmacia) nach Herstellerangaben auf ECL-Hyperfilm (Amersham Pharmacia) oder mittels einer CCD-Kamera (LAS, Fujifilm). Zur Detektion von Rad52 wurden polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen Rad52 eingesetzt, welche im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und aufgereinigt wurden (siehe unten). Des Weiteren wurden folgende kommerzielle Antikörper benutzt: der polyklonale anti-myc Antikörper (A-14) aus Kaninchen sowie der monoklonale Maus-Antikörper anti-Pgk1 (Molecular Probes). Als sekundäre Antikörper wurden mit Peroxidase gekoppelte anti-Kaninchen-IgG bzw. anti-Maus-IgG eingesetzt (Dianova).

Quantifizierung von Proteinen mit Hilfe einer CCD-Kamera
Um die *steady state*-Level von Proteinen quantifizieren zu können, wurden die Westernblots mit einer CCD-Kamera (LAS, Fujifilm) detektiert und die Daten mit den Softwareprogrammen Image Reader LAS 1000 (Fujifilm) und Image Gauge (Fujifilm) ausgewertet. Zur Detektion von Chemolumineszenzsignalen wurden mit Hilfe von Image Reader folgende Einstellungen gewählt, um Westernblots für 10 bis 30 sek zu exponieren: Iriseinstellung von 0,85, *precision mode*, *dark frame subtraction*, *flat frame correction*. Bei der Quantifizierung der relativen Intensität der Chemolumineszenz wurde mit Image Gauge gearbeitet. Die Hintergrundsignale konnten dabei von den spezifischen Signalen abgezogen werden, um die relativen Proteinmengen zu berechnen.

V.5.2 Herstellung von Zellextrakten und Aufreinigungen

Herstellung von denaturierten Hefe-Extrakten
Um Proteolyse zu vermeiden und posttranslationale Modifikationen zu erhalten, wurden für analytische Zwecke ausschließlich denaturierte Extrakte hergestellt. Logarithmisch wachsende Hefezellen, korrespondierend zur Zellmenge von 1ml mit OD_{600}=1, wurden geerntet und in 1ml kaltem Wasser resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 150µl 1,85M NaOH/ 7,5% β-Mercaptoethanol gemischt

und 15 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 150µl 55% Trichloressigsäure (TCA) wurden die Proteine ausgefällt und anschließend pelletiert (15 min, 14000g, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, die Proteine nochmals kurz abzentrifugiert und die TCA-Reste gründlich abgesaugt. Das Pellet wurde in 50µl HU-Puffer (siehe V.5.1) aufgenommen.

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

Reinigung rekombinanter Proteine unter nativen Bedingungen
Für diese Arbeit wurden Proteine in *E. coli* (BL21 DE3/RIL) exprimiert und aus diesen aufgereinigt. Die Reinigung erfolgte mittels Affinitätschromatographie über das His_6-Epitop. Für die Reinigung von His-Fusionsproteinen wurden 2l Bakterienkultur verwendet. Als Lysepuffer diente der NiNTA-Lysepuffer (300mM NaCl, 10mM Imidazol, 50mM NaH_2PO_4 [pH 8,0]), versetzt mit Proteaseinhibitoren (complete mix (Roche) sowie 20mM NEM, 5mM Benzamidin, 6µg/ml Antipain, 6µg/ml Leupeptin, 4,5µg/ml Aprotinin, 5µg/ml Trypsin-Inhibitor, 2mM PMSF, 5µg/ml Pepstatin, 6µg/ml Chymostatin (alle von Sigma)). Das Zellpellet wurde in 30ml Puffer resuspendiert, und die Zellen durch viermaliges Durchpressen durch einen Emulsiflex C5 Zelldisruptor lysiert. Nach einer Zentrifugation (30 min, 20000g, 4°C) erfolgte für 3 h die Bindung des Überstandes an NiNTA-Agarose (Qiagen). Gebundene Proteine wurden mit 100ml NiNTA-Waschpuffer (300mM NaCl, 20mM Imidazol, 50mM NaH_2PO_4 [pH 8,0]) gewaschen und anschließend in Fraktionen mit NiNTA-Elutionspuffer (300mM NaCl, 250mM Imidazol, 50mM NaH_2PO_4 [pH 8,0]) eluiert. Alle Schritte der Aufreinigung wurden durch SDS-PAGE überprüft. Für diese Aufreinigung erfolgten alle Schritte mit vorher gekühlten Materialien bei 4°C.

Reinigung rekombinanter Proteine unter denaturierenden Bedingungen
Für diese Arbeit wurden die C-terminalen 177 Aminosäuren von Rad52 als His-Fusion in *E. coli* (BL21 DE3/RIL) exprimiert und aus den Zellen unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Zur Aufreinigung wurde das Zellpellet aus 2l Kultur in Puffer A (6M Guanidiniumhydrochlorid, 100mM NaH_2PO_4, 10mM Tris/HCl [pH 8,0]) resuspendiert und die Zellen dabei lysiert. Nach einer Zentrifugation (30 min, 10000g, RT) wurde der Überstand für 3 h an 3ml NiNTA-Agarose (Qiagen) gebunden. Mit dieser Suspension wurde eine Säule geladen und anschließend mit 60ml Puffer B (8M Harnstoff, 100mM NaH_2PO_4, 10mM Tris/HCl [pH 8,0]) gewaschen sowie mit 150ml Puffer C (8M Harnstoff, 100mM NaH_2PO_4, 10mM Tris/HCl [pH 6,3]), bis die OD_{280} einen Wert kleiner 0,02 hatte. Die Elution erfolgte mit Puffer D (8M Harnstoff, 100mM NaH_2PO_4, 10mM Tris/HCl [pH 5,9]) und mit Puffer E (8M Harnstoff, 100mM NaH_2PO_4, 10mM Tris/HCl [pH 4,5]), jeweils in zehn Fraktionen zu je 2ml. Die Fraktionen, in denen das Protein eluierte, wurden vereint und gegen PBS dialysiert.

NiNTA-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen
Diese Technik wurde zur Analyse der posttranslationalen SUMO-Modifikationen in *S. cerevisiae* benutzt. Hierfür wurden Hefe-Stämme verwendet, welche mit einem His_6-Epitop modifiziertes SUMO exprimierten. 200 OD Zellen wurden mit 4ml 1,85M NaOH/ 7,5% β-Mercaptoethanol für 15 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die

Proteine durch Zugabe von 4ml 55% TCA und Inkubation auf Eis für 10 min präzipitiert. Nach einer Zentrifugation (15 min, 3000g, 4°C) wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet zweimal mit Aceton (-20°C) gewaschen. Anschließend wurde es in Puffer A (6M Guanidiniumhydrochlorid, 100mM NaH_2PO_4, 10mM Tris/HCl [pH 8,0], 20mM Imidazol) mit 0,05% Tween-20 mit der Pipette resuspendiert und 1 h auf einem Schüttler bei RT solubilisiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch eine Zentrifugation (20 min, 23000g, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde mit 50µl magnetischen NiNTA-magnetic-beads (Qiagen) versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Bindung wurden die magnetic-beads durch einen Magnetständer pelletiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und dreimal mit Puffer A mit 0,05% Tween-20 und viermal mit Puffer C (8M Harnstoff, 100mM NaH_2PO_4, 10mM Tris/HCl [pH 6,3]) mit 0,05% Tween-20 gewaschen. Die Elution erfolgte mit 20µl 1% SDS bei 65°C. Nach einer Lyophilisierung mit Hilfe einer SpeedVac (Eppendorf) wurden die Proteine in 10µl Wasser mit 15µl HU-Puffer aufgenommen und 10 min bei 65°C denaturiert.

Tandemaufreinigung von SUMO-Substraten

Zur Aufreinigung von SUMO-Substraten wurde eine Tandemaufreinigung durchgeführt, die erst ^{His}SUMO-Substrate über eine denaturierende NiNTA-Chromatographie anreicherte und in einem zweiten Schritt über eine anti-SUMO-Immunpräzipitation weiter aufreinigte. Dafür wurden aus 40l Kultur (Y1096: SK1 a/α, *dmc1*/*dmc1*, *SMT3::pYI-ADH-^{His}SMT3::kanMX6*) die Zellen 7 h nach Beginn der synchronen Sporulation pelletiert. Dieses Zellpellet wurde einmal mit PBS gewaschen, in 380ml 1,85M NaOH/ 7,5% β-Mercaptoethanol resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Zur Präzipitation der Proteine wurden 380ml 50% TCA hinzugefügt und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (20 min, 3500rpm, 4°C) wurde das Pellet einmal in kaltem Wasser gewaschen und anschließend in Puffer A (6M Guanidiniumhydrochlorid, 100mM NaH_2PO_4, 10mM Tris/HCl [pH 8,0], 15mM Imidazol) mit einer Pipette resuspendiert. Durch eine Inkubation für 1 h bei RT auf einem Schüttler wurden die Proteine solubilisiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch eine Zentrifugation (20 min, 15000g, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde mit 6ml NiNTA-Agarose (Qiagen) sowie 20mM Imidazol versetzt. Nach Bindung über Nacht an die NiNTA-Agarose wurde mit der Suspension eine Säule geladen. Nach Waschen der Säule mit 30ml Puffer A und 100ml Puffer C (8M Harnstoff, 100mM NaH_2PO_4, 10mM Tris/HCl [pH 6,3]) erfolgte die Elution in zwei aufeinander folgenden Schritten mit jeweils 2ml Puffer C, welcher mit 200mM Imidazol supplementiert war. 1ml des Eluats wurde mit TCA präzipitiert, während je 1,5ml mit RIPA-Puffer (150mM NaCl, 50mM Tris/HCl [pH 8,0], 1% Triton-X-100, 0,5% DOC (Deoxycholat), 0,1% SDS, 20mM NEM) auf je 40ml aufgefüllt wurden. Zur weiteren Aufreinigung erfolgte eine Immunpräzipitation über Nacht mit unspezifischen Immunglobulinen (IgG) oder mit anti-SUMO IgG in RIPA-Puffer. Für die jeweilige Immunpräzipitation waren zuvor jeweils 500µg Antikörper an magnetische Protein A Dynabeads (Dynal) gekoppelt worden. Nach der Bindung wurden die Immunkomplexe viermal mit RIPA-Puffer gewaschen und Tenside durch Waschen mit 50mM Tris/HCl [pH 8,0] entfernt. Immunkomplexe wurden zweimal mit 60µl 1% SDS für 10 min bei 65°C eluiert, mit Hilfe einer SpeedVac (Eppendorf) getrocknet und in 10µl Wasser mit 25µl HU-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden auf ein 4-12%iges Bis-Tris-Gel (Invitrogen) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Coomassiefärbung wurden spezifische Banden ausgeschnitten, aus dem Gel eluiert und anschließend im MALDI-TOF

Massenspektrometer analysiert. Die Identifikation der Proteine erfolgte über deren Peptidmassen unter Verwendung des Suchwerkzeugs Mascot (www.matrixscience.com).

NiNTA-Chromatographie aus Extrakten von Säugerzellen

Diese Technik wurde benutzt, um aus Extrakten von HEK293T-Zellen SUMO-Substrate anzureichern und zu analysieren. Hierfür wurden Zellen in der vorliegenden Arbeit mit ^{myc}hRad52 sowie ^{His}SUMO-1 oder SUMO-1 transfiziert (siehe V.3). Die Zellen wurden 36 bis 40 h nach der Transfektion zweimal mit PBS gewaschen, in 1ml denaturierendem Puffer A (6M Guanidiniumhydrochlorid, 100mM NaH_2PO_4, 10mM Tris/HCl [pH 8,0], 20mM Imidazol) mit 0,05% Tween-20 aufgenommen und in Rundbodenröhrchen aus Polystyrol (Falcon) für insgesamt 15 sek bei 20% Power sonifiziert (Sonoplus HD2200, Bandelin). Nach einer Zentrifugation (13000g, 10 min, RT) in frischen Eppendorfgefäßen wurde der Überstand zur Anreicherung verwendet. 50µl davon wurden einer TCA-Präzipitation unterzogen und dienten später als Ladekontrolle. (Durch Zugabe von 50µl 10% TCA wurden die Proteine ausgefällt, und nach einer Zentrifugation (15 min, 14000g, 4°C) wurde das Pellet mit 200µl eiskaltem, reinem Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet dann mit Hilfe einer SpeedVac (Eppendorf) getrocknet und in 50µl Laemmli-Puffer aufgenommen.) Zu den restlichen 950µl wurden 20µl magnetische NiNTA-magnetic-beads (Qiagen) gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Bindung wurden die magnetic-beads durch einen Magnetständer pelletiert und mehreren Waschschritten unterzogen: viermal Waschen mit Puffer B (8M Harnstoff, 100mM NaH_2PO_4, 10mM Tris/HCl [pH 8,0]) mit 0,05% Tween-20, dreimal Waschen mit Puffer C (8M Harnstoff, 100mM NaH_2PO_4, 10mM Tris/HCl [pH 6,8]) mit 0,05% Tween-20 und einmal Waschen mit PBS. Zwischen den Waschschritten wurde jeweils für 5 min auf Eis inkubiert Die Elution erfolgte durch Zugabe von 40µl Laemmli-Puffer und einer anschließenden Denaturierung bei 95°C.

Herstellung von Antikörpern in Kaninchen

Antiseren gegen die C-terminalen 177 Aminosäuren von Rad52 wurden hergestellt, indem ein Kaninchen mit einem gereinigten His-Fusionsprotein immunisiert wurde. Für die Herstellung von Seren wurden 650µg rekombinantes gereinigtes His_6-Fusionsprotein in 500µl PBS durch Erhitzen auf 95°C für 10 min denaturiert und 1:1 mit Freund´schem Adjuvanz (complete, Sigma) gemischt. Das Gemisch wurde mit Hilfe von zwei Spritzen und einem 3-Wege-Hahn in Emulsion gebracht und dem Kaninchen an mehreren Stellen subkutan gespritzt. Nach sechs Wochen erfolgte die erste Auffrischung, weitere vier Wochen später die zweite Auffrischung. Für die Auffrischungen wurden jeweils 650µg Protein mit Freund´schem Adjuvanz (incomplete, Sigma) emulgiert und dem Kaninchen gespritzt. Zehn Tage nach der zweiten Auffrischung wurde Testblut entnommen und das Serum immunologisch im Westernblot überprüft. Da das Serum eine starke Immunreaktivität mit Rad52 aufwies, was für das Erreichen eines hohen Titers spezifischer Antikörper sprach, wurde dem Kaninchen noch am selben Tag das Blut entnommen. Das Blut wurde 1 h bei 37°C im Wasserbad und anschließend 30 min bei 4°C inkubiert. Nach zwei Zentrifugationen (4°C) bei 3000g bzw. 12000g und Schockfrieren in Stickstoff wurde das Serum bei –80°C gelagert.

Affinitätsaufreinigung von Antikörpern

Hochaffine IgG wurden über eine Immuno-Affinitätschromatographie angereichert, wofür das Antigen mit einem His-Epitop verwendet wurde. Die Aufreinigung des Serums erfolgte über zwei hintereinander geschaltete Säulen. An die erste Säule (Vorsäule) wurden 8mg eines nicht-verwandten Proteins gekoppelt, das auch ein His-Epitop aufwies (His_6-Pol30). An die zweite Säule (Hauptsäule) wurden 10mg des gereinigten Antigens (His_6-Rad52ΔN294) gekoppelt. Nach Auftragen des Serums auf die Säulen banden die spezifischen Antikörper an die Hauptsäule und konnten von dieser eluiert werden.

Zur Aufreinigung wurde CnBr Sepharose 4CLB (Amersham Pharmacia) als Säulenmatrix verwendet. Die Kopplung der Proteine an die Matrix erfolgte im Kopplungspuffer (100mM $NaHCO_3$, 0,5M NaCl [pH 8,3]) für 3 h bei RT. Proteine waren zuvor gegen den Kopplungspuffer dialysiert worden. Freie Bindungsstellen wurden nach der Kopplung durch eine Inkubation mit 0,2M Glycin [pH 8,0] über Nacht bei 4°C blockiert. Anschließend wurden die beiden Säulen verbunden und mit Hilfe von verschiedenen Waschschritten vorbereitet (Vorsäule und Hauptsäule: sechs Volumen 100mM NaAc/ 0,5M NaCl [pH 4,0], drei Volumen PBS, drei Volumen PBS/ 1% SDS; Trennen der Säulen und Inkubation beider Säulen für 40 min bei 65°C; Hauptsäule: drei Volumen PBS/ 1% Triton-X-100, drei Volumen PBS/ 1% Triton-X-100/ 1% BSA; Vorsäule: sechs Volumen PBS/ 1% Triton-X-100). Die Vorsäule wurde über die Hauptsäule gehängt und beide Säulen wieder miteinander verbunden. 10ml des Serums wurden für drei langsame Läufe auf die Säulen gegeben und mit zwei Volumen PBS nachgespült. Nach Abhängen der Vorsäule wurde die Hauptsäule mit fünf Volumen PBS/ 1% Triton-X-100 sowie mit sechs Volumen PBS gewaschen. Ab diesem Zeitpunkt erfolgten alle weiteren Schritte bei 4°C. Die gebundenen, spezifischen IgG wurden mit Glycin-Puffer (0,2M Glycin, 1mM EGTA [pH 2,5]) in acht Fraktionen zu je 1ml eluiert und sofort mit 300µl 1M Tris/HCl [pH 8,0] neutralisiert. Positive Eluate wurden vereinigt und gegen PBS bei 4°C dialysiert. Die gereinigten IgG wurden bei -80°C gelagert oder nach Zusatz von 50% Glycerin und 0,2% BSA bei -20°C.

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

Für diese Arbeit wurde Rad52 *in vitro* mit rekombinanten aus *E. coli* aufgereinigten Proteinen mit SUMO modifiziert. Die verwendeten Proteine wurden wie oben beschrieben nativ aufgereinigt. Für einen 50µl Ansatz wurden His-Rad52 (200ng), Aos1/Uba2 (1µg (Boston Biochem)), His-Ubc9 (500ng) und His-Smt3-GG (2µg) in SUMOylierungs-Puffer (100mM NaCl, 5mM $MgCl_2$, 0,1mM DTT, 10nM ATP, 50mM Tris/HCl [pH 7,5]) für 2 h bei 30°C inkubiert.

VI LITERATURVERZEICHNIS

Aguilera, A., und Klein, H. L. (1988). Genetic control of intrachromosomal recombination in Saccharomyces cerevisiae. I. Isolation and genetic characterization of hyper-recombination mutations. *Genetics* **119**, 779-790

Ahnesorg, P., Smith, P., und Jackson, S. P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* **124**, 301-313

Alani, E., Thresher, R., Griffith, J. D., und Kolodner, R. D. (1992). Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of y-RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein. *J Mol Biol* **227**, 54-71

Alexeev, A., Mazin, A., und Kowalczykowski, S. C. (2003). Rad54 protein possesses chromatin-remodeling activity stimulated by the Rad51-ssDNA nucleoprotein filament. *Nat Struct Biol* **10**, 182-186

Allers, T., und Lichten, M. (2001). Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell* **106**, 47-57

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

Anckar, J., Hietakangas, V., Denessiouk, K., Thiele, D. J., Johnson, M. S., und Sistonen, L. (2006). Inhibition of DNA binding by differential sumoylation of heat shock factors. *Mol Cell Biol* **26**, 955-964

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

Baba, D., Maita, N., Jee, J. G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugasawa, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H., und Shirakawa, M. (2005). Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1. *Nature* **435**, 979-982

Bachant, J., Alcasabas, A., Blat, Y., Kleckner, N., und Elledge, S. J. (2002). The SUMO-1 isopeptidase Smt4 is linked to centromeric cohesion through SUMO-1 modification of DNA topoisomerase II. *Mol Cell* **9**, 1169-1182

Bai, Y., und Symington, L. S. (1996). A Rad52 homolog is required for RAD51-independent mitotic recombination in Saccharomyces cerevisiae. *Genes Dev* **10**, 2025-2037

Bernier-Villamor, V., Sampson, D. A., Matunis, M. J., und Lima, C. D. (2002). Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* **108**, 345-356

Biggins, S., Bhalla, N., Chang, A., Smith, D. L., und Murray, A. W. (2001). Genes involved in sister chromatid separation and segregation in the budding yeast Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **159**, 453-470

Bishop, D. K., Park, D., Xu, L., und Kleckner, N. (1992). DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of E. coli recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* **69**, 439-456

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

Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., Barraud, A., Fondaneche, M. C., Sanal, O., Plebani, A., Stephan, J. L., Hufnagel, M., le Deist, F., Fischer, A., Durandy, A., de Villartay, J. P., und Revy, P. (2006). Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* **124**, 287-299

Bylebyl, G. R., Belichenko, I., und Johnson, E. S. (2003). The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast. *J Biol Chem* **278**, 44113-44120

Chen, Y. K., Leng, C. H., Olivares, H., Lee, M. H., Chang, Y. C., Kung, W. M., Ti, S. C., Lo, Y. H., Wang, A. H., Chang, C. S., Bishop, D. K., Hsueh, Y. P., und Wang, T. F. (2004). Heterodimeric complexes of Hop2 and Mnd1 function with Dmc1 to promote meiotic homolog juxtaposition and strand assimilation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10572-10577

Cline, S. D., und Hanawalt, P. C. (2003). Who's on first in the cellular response to DNA damage? *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 361-372

D'Amours, D., und Jackson, S. P. (2002). The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 317-327

Denison, C., Rudner, A. D., Gerber, S. A., Bakalarski, C. E., Moazed, D., und Gygi, S. P. (2005). A proteomic strategy for gaining insights into protein sumoylation in yeast. *Mol Cell Proteomics* **4**, 246-254

Desterro, J. M., Rodriguez, M. S., und Hay, R. T. (1998). SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell* **2**, 233-239

Dohmen, R. J. (2004). SUMO protein modification. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 113-131

Eladad, S., Ye, T. Z., Hu, P., Leversha, M., Beresten, S., Matunis, M. J., und Ellis, N. A. (2005). Intra-nuclear trafficking of the BLM helicase to DNA damage-induced foci is regulated by SUMO modification. *Hum Mol Genet* **14**, 1351-1365

Epps, J. L., und Tanda, S. (1998). The Drosophila semushi mutation blocks nuclear import of bicoid during embryogenesis. *Curr Biol* **8**, 1277-1280

Essers, J., Houtsmuller, A. B., van Veelen, L., Paulusma, C., Nigg, A. L., Pastink, A., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H., und Kanaar, R. (2002). Nuclear dynamics of RAD52 group homologous recombination proteins in response to DNA damage. *Embo J* **21**, 2030-2037

Finley, D., Ozkaynak, E., und Varshavsky, A. (1987). The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* **48**, 1035-1046

Gangloff, S., Soustelle, C., und Fabre, F. (2000). Homologous recombination is responsible for cell death in the absence of the Sgs1 and Srs2 helicases. *Nat Genet* **25**, 192-194

Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M. S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M., und D'Andrea, A. D. (2001). Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* **7**, 249-262

Gasior, S. L., Wong, A. K., Kora, Y., Shinohara, A., und Bishop, D. K. (1998). Rad52 associates with RPA and functions with rad55 and rad57 to assemble meiotic recombination complexes. *Genes Dev* **12**, 2208-2221

Gerton, J. L., und DeRisi, J. L. (2002). Mnd1p: an evolutionarily conserved protein required for meiotic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6895-6900

Gerton, J. L., und Hawley, R. S. (2005). Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nat Rev Genet* **6**, 477-487

Gietz, R. D., und Sugino, A. (1988). New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**, 527-534

Gill, G. (2004). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* **18**, 2046-2059

Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O. A., Thain, A., Anderson, L. A., Snowden, A. W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N. D., und Hay, R. T. (2003). P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* **11**, 1043-1054

Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S. E., Scheffner, M., und Del Sal, G. (1999). Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J* **18**, 6462-6471

Grenon, M., Gilbert, C., und Lowndes, N. F. (2001). Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Nat Cell Biol* **3**, 844-847

Haber, J. E. (2000). Partners and pathways: repairing a double-strand break. *Trends Genet* **16**, 259-264

Hannich, J. T., Lewis, A., Kroetz, M. B., Li, S. J., Heide, H., Emili, A., und Hochstrasser, M. (2005). Defining the SUMO-modified proteome by multiple approaches in Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* **280**, 4102-4110

Hardeland, U., Steinacher, R., Jiricny, J., und Schar, P. (2002). Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *Embo J* **21**, 1456-1464

Hay, R. T. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell* **18**, 1-12

Hays, S. L., Firmenich, A. A., Massey, P., Banerjee, R., und Berg, P. (1998). Studies of the interaction between Rad52 protein and the yeast single-stranded DNA binding protein RPA. *Mol Cell Biol* **18**, 4400-4406

Hicke, L., und Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 141-172

Ho, J. C., Warr, N. J., Shimizu, H., und Watts, F. Z. (2001). SUMO modification of Rad22, the Schizosaccharomyces pombe homologue of the recombination protein Rad52. *Nucleic Acids Res* **29**, 4179-4186

Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G., und Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135-141

Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**, 366-374

Huang, L. S., Doherty, H. K., und Herskowitz, I. (2005). The Smk1p MAP kinase negatively regulates Gsc2p, a 1,3-beta-glucan synthase, during spore wall morphogenesis in Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12431-12436

Huang, T. T., Wuerzberger-Davis, S. M., Wu, Z. H., und Miyamoto, S. (2003). Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell* **115**, 565-576

Huang, T. T., und D'Andrea, A. D. (2006). Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 323-334

Ira, G., Malkova, A., Liberi, G., Foiani, M., und Haber, J. E. (2003). Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast. *Cell* **115**, 401-411

Ivessa, A. S., Zhou, J. Q., und Zakian, V. A. (2000). The Saccharomyces Pif1p DNA helicase and the highly related Rrm3p have opposite effects on replication fork progression in ribosomal DNA. *Cell* **100**, 479-489

Ivessa, A. S., Zhou, J. Q., Schulz, V. P., Monson, E. K., und Zakian, V. A. (2002). Saccharomyces Rrm3p, a 5' to 3' DNA helicase that promotes replication fork progression through telomeric and subtelomeric DNA. *Genes Dev* **16**, 1383-1396

Iyer, L. M., Koonin, E. V., und Aravind, L. (2002). Classification and evolutionary history of the single-strand annealing proteins, RecT, Redbeta, ERF and RAD52. *BMC Genomics* **3**, 8

Jackson, D., Dhar, K., Wahl, J. K., Wold, M. S., und Borgstahl, G. E. (2002). Analysis of the human replication protein A:Rad52 complex: evidence for crosstalk between RPA32, RPA70, Rad52 and DNA. *J Mol Biol* **321**, 133-148

James, P., Halladay, J., und Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436

Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., und Knop, M. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**, 947-962

Johnson, E. S., und Blobel, G. (1997). Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J Biol Chem* **272**, 26799-26802

Johnson, E. S., Schwienhorst, I., Dohmen, R. J., und Blobel, G. (1997). The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *Embo J* **16**, 5509-5519

Johnson, E. S., und Blobel, G. (1999). Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J Cell Biol* **147**, 981-994

Johnson, E. S., und Gupta, A. A. (2001). An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* **106**, 735-744

Johnson, E. S. (2004). Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* **73**, 355-382

Kagawa, W., Kurumizaka, H., Ishitani, R., Fukai, S., Nureki, O., Shibata, T., und Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of the homologous-pairing domain from the human Rad52 recombinase in the undecameric form. *Mol Cell* **10**, 359-371

Kawabe, Y., Seki, M., Seki, T., Wang, W. S., Imamura, O., Furuichi, Y., Saitoh, H., und Enomoto, T. (2000). Covalent modification of the Werner's syndrome gene product with the ubiquitin-related protein, SUMO-1. *J Biol Chem* **275**, 20963-20966

Keeney, S., und Kleckner, N. (1995). Covalent protein-DNA complexes at the 5' strand termini of meiosis-specific double-strand breaks in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11274-11278

Keeney, S. (2001). Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr Top Dev Biol* **52**, 1-53

Keil, R. L., und McWilliams, A. D. (1993). A gene with specific and global effects on recombination of sequences from tandemly repeated genes in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **135**, 711-718

Khan, M. M., Nomura, T., Kim, H., Kaul, S. C., Wadhwa, R., Shinagawa, T., Ichikawa-Iwata, E., Zhong, S., Pandolfi, P. P., und Ishii, S. (2001). Role of PML and PML-RARalpha in Mad-mediated transcriptional repression. *Mol Cell* **7**, 1233-1243

Klenk, C., Humrich, J., Quitterer, U., und Lohse, M. J. (2006). SUMO-1 controls the protein stability and the biological function of phosducin. *J Biol Chem* **281**, 8357-8364

Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., und Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**, 963-972

Krejci, L., Song, B., Bussen, W., Rothstein, R., Mortensen, U. H., und Sung, P. (2002). Interaction with Rad51 is indispensable for recombination mediator function of Rad52. *J Biol Chem* **277**, 40132-40141

Krogan, N. J., Lam, M. H., Fillingham, J., Keogh, M. C., Gebbia, M., Li, J., Datta, N., Cagney, G., Buratowski, S., Emili, A., und Greenblatt, J. F. (2004). Proteasome involvement in the repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* **16**, 1027-1034

Krogh, B. O., und Symington, L. S. (2004). Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet* **38**, 233-271

Le Drean, Y., Mincheneau, N., Le Goff, P., und Michel, D. (2002). Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation. *Endocrinology* **143**, 3482-3489

Lee, S. E., Pellicioli, A., Vaze, M. B., Sugawara, N., Malkova, A., Foiani, M., und Haber, J. E. (2003). Yeast Rad52 and Rad51 recombination proteins define a second pathway of DNA damage assessment in response to a single double-strand break. *Mol Cell Biol* **23**, 8913-8923

Leu, J. Y., Chua, P. R., und Roeder, G. S. (1998). The meiosis-specific Hop2 protein of S. cerevisiae ensures synapsis between homologous chromosomes. *Cell* **94**, 375-386

Li, S. J., und Hochstrasser, M. (1999). A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* **398**, 246-251

Li, S. J., und Hochstrasser, M. (2000). The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein. *Mol Cell Biol* **20**, 2367-2377

Li, T., Evdokimov, E., Shen, R. F., Chao, C. C., Tekle, E., Wang, T., Stadtman, E. R., Yang, D. C., und Chock, P. B. (2004). Sumoylation of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, zinc finger proteins, and nuclear pore complex proteins: a proteomic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8551-8556

Li, W., Hesabi, B., Babbo, A., Pacione, C., Liu, J., Chen, D. J., Nickoloff, J. A., und Shen, Z. (2000). Regulation of double-strand break-induced mammalian homologous recombination by UBL1, a RAD51-interacting protein. *Nucleic Acids Res* **28**, 1145-1153

Lin, X., Liang, M., Liang, Y. Y., Brunicardi, F. C., und Feng, X. H. (2003). SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem* **278**, 31043-31048

Lisby, M., Rothstein, R., und Mortensen, U. H. (2001). Rad52 forms DNA repair and recombination centers during S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8276-8282

Lisby, M., Mortensen, U. H., und Rothstein, R. (2003). Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nat Cell Biol* **5**, 572-577

Lisby, M., Barlow, J. H., Burgess, R. C., und Rothstein, R. (2004). Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* **118**, 699-713

Lisby, M., und Rothstein, R. (2005). Localization of checkpoint and repair proteins in eukaryotes. *Biochimie* **87**, 579-589

Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., und Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast* **14**, 953-961

Madura, K. (2004). Rad23 and Rpn10: perennial wallflowers join the melee. *Trends Biochem Sci* **29**, 637-640

Maeda, D., Seki, M., Onoda, F., Branzei, D., Kawabe, Y., und Enomoto, T. (2004). Ubc9 is required for damage-tolerance and damage-induced interchromosomal homologous recombination in S. cerevisiae. *DNA Repair (Amst)* **3**, 335-341

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

Mao, Y., Desai, S. D., und Liu, L. F. (2000a). SUMO-1 conjugation to human DNA topoisomerase II isozymes. *J Biol Chem* **275**, 26066-26073

Mao, Y., Sun, M., Desai, S. D., und Liu, L. F. (2000b). SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4046-4051

Matunis, M. J., Coutavas, E., und Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **135**, 1457-1470

Melo, J., und Toczyski, D. (2002). A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 237-245

Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M., und Caput, D. (2000). Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J Biol Chem* **275**, 36316-36323

Miyazaki, T., Bressan, D. A., Shinohara, M., Haber, J. E., und Shinohara, A. (2004). In vivo assembly and disassembly of Rad51 and Rad52 complexes during double-strand break repair. *Embo J* **23**, 939-949

Mo, Y. Y., Yu, Y., Shen, Z., und Beck, W. T. (2002). Nucleolar delocalization of human topoisomerase I in response to topotecan correlates with sumoylation of the protein. *J Biol Chem* **277**, 2958-2964

Moreno-Herrero, F., de Jager, M., Dekker, N. H., Kanaar, R., Wyman, C., und Dekker, C. (2005). Mesoscale conformational changes in the DNA-repair complex Rad50/Mre11/Nbs1 upon binding DNA. *Nature* **437**, 440-443

Müller, S., Berger, M., Lehembre, F., Seeler, J. S., Haupt, Y., und Dejean, A. (2000). c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* **275**, 13321-13329

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

Müller, S., Ledl, A., und Schmidt, D. (2004). SUMO: a regulator of gene expression and genome integrity. *Oncogene* **23**, 1998-2008

Muratani, M., und Tansey, W. P. (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 192-201

New, J. H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., und Kowalczykowski, S. C. (1998). Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* **391**, 407-410

Nyberg, K. A., Michelson, R. J., Putnam, C. W., und Weinert, T. A. (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* **36**, 617-656

Ooi, S. L., Shoemaker, D. D., und Boeke, J. D. (2003). DNA helicase gene interaction network defined using synthetic lethality analyzed by microarray. *Nat Genet* **35**, 277-286

Palladino, F., und Klein, H. L. (1992). Analysis of mitotic and meiotic defects in Saccharomyces cerevisiae SRS2 DNA helicase mutants. *Genetics* **132**, 23-37

Panse, V. G., Hardeland, U., Werner, T., Kuster, B., und Hurt, E. (2004). A proteome-wide approach identifies sumoylated substrate proteins in yeast. *J Biol Chem* **279**, 41346-41351

Park, P. U., Defossez, P. A., und Guarente, L. (1999). Effects of mutations in DNA repair genes on formation of ribosomal DNA circles and life span in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* **19**, 3848-3856

Paulovich, A. G., und Hartwell, L. H. (1995). A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in S. cerevisiae in response to DNA damage. *Cell* **82**, 841-847

Penkner, A. M., Prinz, S., Ferscha, S., und Klein, F. (2005). Mnd2, an essential antagonist of the anaphase-promoting complex during meiotic prophase. *Cell* **120**, 789-801

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

Pichler, A., Gast, A., Seeler, J. S., Dejean, A., und Melchior, F. (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* **108**, 109-120

Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* **70**, 503-533

Pickart, C. M., und Eddins, M. J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 55-72

Pickart, C. M., und Fushman, D. (2004). Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 610-616

Prinz, S., Amon, A., und Klein, F. (1997). Isolation of COM1, a new gene required to complete meiotic double-strand break-induced recombination in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **146**, 781-795

Rattray, A. J., und Symington, L. S. (1994). Use of a chromosomal inverted repeat to demonstrate that the RAD51 and RAD52 genes of Saccharomyces cerevisiae have different roles in mitotic recombination. *Genetics* **138**, 587-595

Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoege, C., und Jentsch, S. (2005). A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell* **120**, 73-84

Robison, J. G., Elliott, J., Dixon, K., und Oakley, G. G. (2004). Replication protein A and the Mre11.Rad50.Nbs1 complex co-localize and interact at sites of stalled replication forks. *J Biol Chem* **279**, 34802-34810

Robison, J. G., Lu, L., Dixon, K., und Bissler, J. J. (2005). DNA lesion-specific co-localization of the Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN) complex and replication protein A (RPA) to repair foci. *J Biol Chem* **280**, 12927-12934

Rockmill, B., Fung, J. C., Branda, S. S., und Roeder, G. S. (2003). The Sgs1 helicase regulates chromosome synapsis and meiotic crossing over. *Curr Biol* **13**, 1954-1962

Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Midgley, C. A., Lane, D. P., und Hay, R. T. (1999). SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo J* **18**, 6455-6461

Roeder, G. S., und Bailis, J. M. (2000). The pachytene checkpoint. *Trends Genet* **16**, 395-403

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

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

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

San-Segundo, P. A., und Roeder, G. S. (1999). Pch2 links chromatin silencing to meiotic checkpoint control. *Cell* **97**, 313-324

Schiestl, R. H., Prakash, S., und Prakash, L. (1990). The SRS2 suppressor of rad6 mutations of Saccharomyces cerevisiae acts by channeling DNA lesions into the RAD52 DNA repair pathway. *Genetics* **124**, 817-831

Schmidt, K. H., und Kolodner, R. D. (2004). Requirement of Rrm3 helicase for repair of spontaneous DNA lesions in cells lacking Srs2 or Sgs1 helicase. *Mol Cell Biol* **24**, 3213-3226

Schwacha, A., und Kleckner, N. (1997). Interhomolog bias during meiotic recombination: meiotic functions promote a highly differentiated interhomolog-only pathway. *Cell* **90**, 1123-1135

Schwartz, D. C., und Hochstrasser, M. (2003). A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem Sci* **28**, 321-328

Schwarz, S. E., Matuschewski, K., Liakopoulos, D., Scheffner, M., und Jentsch, S. (1998). The ubiquitin-like proteins SMT3 and SUMO-1 are conjugated by the UBC9 E2 enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 560-564

Schwienhorst, I., Johnson, E. S., und Dohmen, R. J. (2000). SUMO conjugation and deconjugation. *Mol Gen Genet* **263**, 771-786

Seeler, J. S., und Dejean, A. (2003). Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 690-699

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

Shen, Z., Pardington-Purtymun, P. E., Comeaux, J. C., Moyzis, R. K., und Chen, D. J. (1996a). Associations of UBE2I with RAD52, UBL1, p53, and RAD51 proteins in a yeast two-hybrid system. *Genomics* **37**, 183-186

Shen, Z., Pardington-Purtymun, P. E., Comeaux, J. C., Moyzis, R. K., und Chen, D. J. (1996b). UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. *Genomics* **36**, 271-279

Shiio, Y., und Eisenman, R. N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13225-13230

Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**, 155-168

Singleton, M. R., Wentzell, L. M., Liu, Y., West, S. C., und Wigley, D. B. (2002). Structure of the single-strand annealing domain of human RAD52 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13492-13497

Sobko, A., Ma, H., und Firtel, R. A. (2002). Regulated SUMOylation and ubiquitination of DdMEK1 is required for proper chemotaxis. *Dev Cell* **2**, 745-756

Somesh, B. P., Reid, J., Liu, W. F., Sogaard, T. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., und Svejstrup, J. Q. (2005). Multiple mechanisms confining RNA polymerase II ubiquitylation to polymerases undergoing transcriptional arrest. *Cell* **121**, 913-923

Song, B., und Sung, P. (2000). Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange. *J Biol Chem* **275**, 15895-15904

Song, J., Durrin, L. K., Wilkinson, T. A., Krontiris, T. G., und Chen, Y. (2004). Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14373-14378

Stade, K., Vogel, F., Schwienhorst, I., Meusser, B., Volkwein, C., Nentwig, B., Dohmen, R. J., und Sommer, T. (2002). A lack of SUMO conjugation affects cNLS-dependent nuclear protein import in yeast. *J Biol Chem* **277**, 49554-49561

Stasiak, A. Z., Larquet, E., Stasiak, A., Muller, S., Engel, A., Van Dyck, E., West, S. C., und Egelman, E. H. (2000). The human Rad52 protein exists as a heptameric ring. *Curr Biol* **10**, 337-340

Stead, K., Aguilar, C., Hartman, T., Drexel, M., Meluh, P., und Guacci, V. (2003). Pds5p regulates the maintenance of sister chromatid cohesion and is sumoylated to promote the dissolution of cohesion. *J Cell Biol* **163**, 729-741

Steinacher, R., und Schar, P. (2005). Functionality of Human Thymine DNA Glycosylase Requires SUMO-Regulated Changes in Protein Conformation. *Curr Biol* **15**, 616-623

Sugasawa, K., Okuda, Y., Saijo, M., Nishi, R., Matsuda, N., Chu, G., Mori, T., Iwai, S., Tanaka, K., und Hanaoka, F. (2005). UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* **121**, 387-400

Sugawara, N., Ira, G., und Haber, J. E. (2000). DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of Saccharomyces cerevisiae RAD59 in double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **20**, 5300-5309

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

Sun, L., und Chen, Z. J. (2004). The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 119-126

Sung, P. (1997a). Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase. *Genes Dev* **11**, 1111-1121

Sung, P. (1997b). Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase. *J Biol Chem* **272**, 28194-28197

Sung, P. (2005). Mediating repair. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 213-214

Symington, L. S. (2002). Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 630-670, table of contents

Takahashi, Y., Mizoi, J., Toh, E. A., und Kikuchi, Y. (2000). Yeast Ulp1, an Smt3-specific protease, associates with nucleoporins. *J Biochem (Tokyo)* **128**, 723-725

Takahashi, Y., Kahyo, T., Toh, E. A., Yasuda, H., und Kikuchi, Y. (2001a). Yeast Ull1/Siz1 is a novel SUMO1/Smt3 ligase for septin components and functions as an adaptor between conjugating enzyme and substrates. *J Biol Chem* **276**, 48973-48977

Takahashi, Y., Toh-e, A., und Kikuchi, Y. (2001b). A novel factor required for the SUMO1/Smt3 conjugation of yeast septins. *Gene* **275**, 223-231

Tatham, M. H., Jaffray, E., Vaughan, O. A., Desterro, J. M., Botting, C. H., Naismith, J. H., und Hay, R. T. (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* **276**, 35368-35374

Tong, A. H., Evangelista, M., Parsons, A. B., Xu, H., Bader, G. D., Page, N., Robinson, M., Raghibizadeh, S., Hogue, C. W., Bussey, H., Andrews, B., Tyers, M., und Boone, C. (2001). Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* **294**, 2364-2368

Torres, J. Z., Bessler, J. B., und Zakian, V. A. (2004a). Local chromatin structure at the ribosomal DNA causes replication fork pausing and genome instability in the absence of the S. cerevisiae DNA helicase Rrm3p. *Genes Dev* **18**, 498-503

Torres, J. Z., Schnakenberg, S. L., und Zakian, V. A. (2004b). Saccharomyces cerevisiae Rrm3p DNA helicase promotes genome integrity by preventing replication fork stalling: viability of rrm3 cells requires the intra-S-phase checkpoint and fork restart activities. *Mol Cell Biol* **24**, 3198-3212

Ulrich, H. D., und Jentsch, S. (2000). Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *Embo J* **19**, 3388-3397

Ulrich, H. D. (2005). The RAD6 pathway: control of DNA damage bypass and mutagenesis by ubiquitin and SUMO. *Chembiochem* **6**, 1735-1743

van Attikum, H., und Gasser, S. M. (2005). The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 757-765

van Gent, D. C., Hoeijmakers, J. H., und Kanaar, R. (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* **2**, 196-206

Vertegaal, A. C., Ogg, S. C., Jaffray, E., Rodriguez, M. S., Hay, R. T., Andersen, J. S., Mann, M., und Lamond, A. I. (2004). A proteomic study of SUMO-2 target proteins. *J Biol Chem* **279**, 33791-33798

Vijay-Kumar, S., Bugg, C. E., und Cook, W. J. (1987). Structure of ubiquitin refined at 1.8 A resolution. *J Mol Biol* **194**, 531-544

Voges, D., Zwickl, P., und Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* **68**, 1015-1068

Wang, Q. E., Zhu, Q., Wani, G., El-Mahdy, M. A., Li, J., und Wani, A. A. (2005). DNA repair factor XPC is modified by SUMO-1 and ubiquitin following UV irradiation. *Nucleic Acids Res* **33**, 4023-4034

Welchman, R. L., Gordon, C., und Mayer, R. J. (2005). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 599-609

West, S. C. (2003). Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 435-445

Wohlschlegel, J. A., Johnson, E. S., Reed, S. I., und Yates, J. R., 3rd (2004). Global analysis of protein sumoylation in Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* **279**, 45662-45668

Wolner, B., van Komen, S., Sung, P., und Peterson, C. L. (2003). Recruitment of the recombinational repair machinery to a DNA double-strand break in yeast. *Mol Cell* **12**, 221-232

Wood, L. D., Irvin, B. J., Nucifora, G., Luce, K. S., und Hiebert, S. W. (2003). Small ubiquitin-like modifier conjugation regulates nuclear export of TEL, a putative tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3257-3262

Wykoff, D. D., und O'Shea, E. K. (2005). Identification of sumoylated proteins by systematic immunoprecipitation of the budding yeast proteome. *Mol Cell Proteomics* **4**, 73-83

Yang, S. H., und Sharrocks, A. D. (2004). SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Mol Cell* **13**, 611-617

Zhang, Y. W., Otterness, D. M., Chiang, G. G., Xie, W., Liu, Y. C., Mercurio, F., und Abraham, R. T. (2005). Genotoxic stress targets human Chk1 for degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell* **19**, 607-618

Zhao, X., und Blobel, G. (2005). A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4777-4782

Zhao, Y., Kwon, S. W., Anselmo, A., Kaur, K., und White, M. A. (2004). Broad spectrum identification of cellular small ubiquitin-related modifier (SUMO) substrate proteins. *J Biol Chem* **279**, 20999-21002

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

Zhou, F., Xue, Y., Lu, H., Chen, G., und Yao, X. (2005). A genome-wide analysis of sumoylation-related biological processes and functions in human nucleus. *FEBS Lett* **579**, 3369-3375

Zhou, W., Ryan, J. J., und Zhou, H. (2004). Global analyses of sumoylated proteins in Saccharomyces cerevisiae. Induction of protein sumoylation by cellular stresses. *J Biol Chem* **279**, 32262-32268

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Stefan Jentsch für seine unermüdliche Diskussions- und Hilfsbereitschaft und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe bedanken. Seine permanente Unterstützung und sein großes Interesse waren mir bei der Durchführung dieser Arbeit eine große Hilfe ebenso wie die gute Atmosphäre in seiner Abteilung. Besonders dankbar bin ich für sein Vertrauen und die große Freiheit, die er mir bei der Bearbeitung des Themas gelassen hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Peter B. Becker vom Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung und die Begutachtung dieser Arbeit.

Zudem möchte ich den Mitgliedern der Prüfungskommission an der Ludwig-Maximilians-Universität meinen Dank aussprechen.

Boris, Lucian und Michael aus dem SUMO-Labor danke ich für das überaus gute Arbeitsklima, die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Etliche Diskussionen und Vorschläge innerhalb und außerhalb des SUMO-Clubs haben mir und dem Projekt sehr geholfen. Ein ganz besonderer Dank gilt Ulla, die mich mit großem Einsatz bei dieser Arbeit tatkräftig und zuverlässig unterstützt hat.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitgliedern der Abteilung Molekulare Zellbiologie für die große Kollegialität, die stete Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit danken, sowohl innerhalb als auch außerhalb der Abteilung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Meik Sacher
Adresse	Engelhardstr. 30, 81369 München
Geburtsdatum	20.06.1974
Geburtsort	Kiel

Schulbildung

1981 – 1985	Grundschule in Heikendorf/ Kiel
1985 – 1994	Heinrich-Heine-Gymnasium Heikendorf/ Kiel
	Abschluss mit Abitur im Juni 1994

Zivildienst

1994 – 1995	Park-Klinik in Kiel

Studium

1995 – 1997	Christian-Albrechts-Universität Kiel Grundstudium im Studiengang Biologie (Diplom)
	Vordiplom im September 1997
1997 – 2000	Universität Regensburg Hauptstudium im Studiengang Biologie (Diplom)
	Diplomarbeit über „Weitergehende Untersuchungen zum Stoffwechselpotential von Vertretern der Thermoproteales“ am Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie (PD Dr. R. Huber)
	Abschluss mit Diplom im September 2000

Forschungsaufenthalt

2000 – 2001	Gastwissenschaftler am Molecular Biophysics and Biochemistry Department, Yale University, New Haven, USA Thema: „Charakterisierung von bakteriellen and archaeellen Threonyl-tRNA-Synthetasen“ (Prof. Dr. D. Söll)

Doktorarbeit

2001 – 2006	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried/ München Abteilung Molekulare Zellbiologie (Prof. Dr. S. Jentsch)