

# **Charakterisierung des Ubiquitin-ähnlichen Proteins Urm1 in *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Angefertigt im Fachbereich 10 - Mathematik und Naturwissenschaften,

Institut für Biologie, Fachgebiet Mikrobiologie,

Universität Kassel

vorgelegt von

André Jüdes

März 2016

1. Gutachter: Prof. Dr. Raffael Schaffrath

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Nellen

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2016

## **Veröffentlichungen:**

- Scheidt V., **Jüdes A.**, Bär B., Klassen R. and Schaffrath R. (2014) Loss of wobble uridine modification in tRNA anticodons interferes with TOR pathway signaling. *Microbial Cell*. 1: 416-424.
- Jüdes A.**, Ebert F., Bär C., Thüring K.L., Harrer A., *et al.* (2015) Urmylation and tRNA thiolation functions of ubiquitin-like Uba4·Urm1 systems are conserved from yeast to man. *FEBS Lett.* 589: 904-909.

## **Konferenzen:**

- Jüdes A., Ebert F., Thüring K.L., Klassen R., Helm M. and Schaffrath R. (2015)** The bifunctional Urm1-Uba4 system is conserved in eukaryotes. VAAM-Jahrestagung 2015; 01.-04.03.2015; Marburg, Deutschland.
- Jüdes A., Bruch A., Thüring K.L., Klassen R., Helm M. and Schaffrath R. (2015)** Urm1: a conserved ubiquitin-like protein with a specific activation mechanism. Ubiquitin and ubiquitin-like modifiers: From molecular mechanisms to human diseases; 18.-22.09.2015; Cavtat, Kroatien.
- Jüdes A., Bruch A., Thüring K.L., Klassen R., Helm M. and Schaffrath R. (2016)** Urm1 – a unique ubiquitin-like protein that functions in protein and tRNA modification. VAAM-Jahrestagung 2016; 13.-16.03.2016; Jena, Deutschland.

## **Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Abschlussarbeiten betreut:**

- Ebert F. (2012)** Studien zur Proteinurmylierung, einem Ubiquitin-ähnlichen Modifikationsweg aus Hefe. Bachelorarbeit (BSc. Bio).
- Harrer A. (2013)** Funktionelle Analysen der Proteinurmylierung in Hefe. Diplomarbeit (Dipl.-Biol.).
- Ebert F. (2014)** Funktionelle Konservierung des Urm1-Modifikationsweges zwischen Mensch und Hefe. Masterarbeit (MSc. Bio).
- Wunsch A. (2015)** Analyse der Urmylierung, einem Ubiquitinierungs-ähnlichen Proteinmodifikationsweg, in Thioredoxinmutanten. Bachelorarbeit (BSc. Bio).
- Bruch A. (2015)** Untersuchung der Modifikation putativer und bekannter Zielproteine durch das Ubiquitin-ähnliche Protein Urm1. Masterarbeit (MSc. Bio).



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Posttranslationale Modifikationen .....	1
1.2 Ubiquitin als posttranslationaler Modifikator .....	1
1.3 Die Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine.....	4
1.4 Ubiquitin-ähnliche Schwefelträger und Proteinmodifikatoren in Prokaryoten.....	6
1.5 Urm1, ein bifunktionales UBL in Eukaryoten.....	8
1.5.1 Aktivierung von Urm1 .....	9
1.5.2 Beteiligung von Urm1 an der tRNA-Thiolierung .....	11
1.5.3 Bedeutung der Urm1-vermittelten tRNA-Thiolierung.....	13
1.5.4 Urm1 als Proteinmodifikator .....	14
1.6 Oxidativer Stress .....	16
1.6.1 Das Thioredoxinsystem in Hefe .....	17
1.6.2 Ahp1 ist ein Teil der oxidativen Stressantwort .....	19
1.7 Zielstellung der Arbeit.....	22
<b>2. Ergebnisse</b> .....	<b>23</b>
2.1 Analyse der Urmylierung in Hefe .....	23
2.1.1 Nachweis der Urmylierung mittels EMSA.....	23
2.1.2 Urm1 bildet $\beta$ -Mercaptoethanol-sensitive Konjugate .....	26
2.2 Die Urmylierung des Peroxiredoxins Ahp1 .....	28
2.2.1 Ahp1 wird als Monomer und Dimer durch Urm1 modifiziert .....	28
2.2.2 Das Cystein C62 ist im Gegensatz zum C31 essentiell für die Ahp1-Funktion.....	31
2.2.3 Für die Urmylierung von Ahp1 wird das Cystein C62 benötigt .....	33
2.2.4 Die Mutation des Cysteins C31 stabilisiert die Ahp1-Urmylierung .....	34
2.2.5 t-BOOH hemmt die Urmylierung des Ahp1-Monomers und –Dimers .....	36
2.2.6 t-BOOH hemmt die NEM-unabhängige Modifikation von ahp1-C31S nicht.....	37
2.2.7 Der Verlust des Thioredoxinsystems beeinflusst die Ahp1-Urmylierung .....	38
2.2.8 Das Thioredoxinsystem vermittelt die t-BOOH-abhängige Hemmung der Ahp1-Urmylierung .....	39

2.3	Identifikation von Urm1-Zielproteinen in Hefe .....	41
2.3.1	Tandem-Affinitäts-Aufreinigung von Urm1-Konjugaten .....	41
2.3.2	Urm1 modifiziert Uba4 in Hefe .....	43
2.4	Untersuchung der mechanistischen Verknüpfung von Urm1-Modifikation und tRNA-Thiolierung .....	45
2.4.1	Schwefelmangel führt zu einer verminderten Urm1-Modifikation .....	45
2.4.2	Urm1-Modifikation und tRNA-Thiolierung werden vermutlich durch den gleichen Schwefeltransferweg vermittelt .....	47
2.4.3	Die Urm1-Modifikation von Uba4 ist Tum1-unabhängig .....	49
2.5	Analyse der Urm1-Aktivierung durch das E1-ähnliche Enzym Uba4 .....	51
2.5.1	Die Cysteine C225 und C397 sind nicht essentiell für die Uba4-Funktion .....	51
2.5.2	Der Verlust der Uba4-RHD erlaubt weiterhin eine reduzierte Urm1-Aktivierung .....	54
2.5.3	Die durch Uba4 <sub>1-328</sub> -vermittelte Urm1-Aktivierung ist Tum1-unabhängig .....	57
2.5.4	Durch das zusätzliche Einbringen der Uba4-RHD wird die Uba4 <sub>1-328</sub> -vermittelte Urm1-Aktivierung nicht verbessert .....	59
2.5.5	Uba4 <sub>1-328</sub> wird vermutlich durch Urm1 modifiziert .....	60
2.6	Konservierung von Urm1-Modifikation und tRNA-Thiolierung zwischen Mensch und Hefe .....	62
2.6.1	hURM1, das humane Urm1-Homolog, erlaubt tRNA-Thiolierung in Hefe .....	62
2.6.2	Ahp1 wird in Hefe durch hURM1 modifiziert .....	64
2.6.3	Für die hURM1-Konjugation an Ahp1 wird ebenfalls das Cystein C62 benötigt .....	66
2.6.4	hURM1 modifiziert Uba4 .....	67
<b>3.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>70</b>
3.1	Die Urm1-Modifikation von Ahp1 ist vermutlich mit dessen peroxidatischen Zyklus verknüpft .....	70
3.2	Der Oxidationsstatus von Ahp1 wirkt sich auf dessen Urm1-Modifikation aus .....	72
3.3	Der Einfluss der Urm1-Modifikation auf die Ahp1-Funktion bleibt ungeklärt .....	77
3.4	Beide Urm1-Funktionen sind mechanistisch miteinander verknüpft .....	79
3.5	Der Mechanismus der Urm1-Aktivierung ist komplexer als bisher angenommen .....	83
3.6	Uba4 liegt in Hefe urmyliert vor .....	89
3.7	Der Urm1-Weg ist in Eukaryoten konserviert .....	91
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>94</b>
<b>5.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>95</b>

5.1	Mikroorganismen .....	95
5.1.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme.....	95
5.1.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme.....	95
5.2	Plasmide .....	96
5.3	Primer .....	97
5.4	Nährmedien und Anzuchtbedingungen .....	99
5.4.1	<i>E. coli</i> -Nährmedien.....	99
5.4.2	<i>S. cerevisiae</i> -Nährmedien.....	100
5.4.3	Anzuchtbedingungen für <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i> .....	100
5.5	Phänotypische Analyse von Hefe mittels Tropfentest.....	100
5.6	Methoden zur Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Mikroorganismen .....	101
5.6.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	101
5.6.2	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	101
5.6.3	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Hefezellen .....	102
5.6.4	<i>one-step</i> Transformation von Hefe .....	102
5.7	DNA-Methoden.....	103
5.7.1	Plasmidisolation aus <i>E. coli</i> .....	103
5.7.2	Schnell-Isolation chromosomaler DNA aus Hefezellen.....	103
5.7.3	Ethanol-fällung von DNA.....	103
5.7.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	104
5.7.5	Gelelution von DNA-Fragmenten .....	104
5.7.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	104
5.7.7	PCR-basierende Gendisruption in Hefe .....	105
5.7.8	PCR-basierende <i>in vivo</i> Epitopmarkierung in Hefe .....	106
5.7.9	Ortsspezifische Mutagenese .....	106
5.7.10	Fusions-PCR.....	107
5.7.11	Aufreinigung von PCR-Produkten .....	108
5.7.12	Klonierung von PCR-Produkten.....	108
5.7.13	Restriktion .....	108
5.7.14	Ligation.....	109
5.7.15	Sequenzierung .....	109
5.8	RNA-Methoden .....	109
5.8.1	tRNA-Extraktion aus Hefe .....	109

---

5.8.2	Nachweis von mcm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> -modifiziertem Uridin in tRNA-Extrakten .....	110
5.9	Protein-Methoden .....	110
5.9.1	Proteinextraktion aus Hefe .....	110
5.9.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	111
5.9.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	111
5.9.4	<i>Western Blot</i> .....	112
5.9.5	Silberfärbung .....	113
5.9.6	Tandem-Affinitäts-Aufreinigung .....	113
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>116</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>131</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>132</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Ubiquitinierung und Deubiquitinierung eines Proteins.....	3
Abbildung 2:	Beteiligung von ThiS und ThiF an der Thiaminbiosynthese. ....	7
Abbildung 3:	Darstellung des Schwefeltransferwegs, der zur Urmyleierung und tRNA-Thiolierung führt. ....	10
Abbildung 4:	Urm1 vermittelt die Thiolierung der cytoplasmatischen tRNAs tQ <sup>UUG</sup> , tE <sup>UUC</sup> und tK <sup>UUU</sup> .....	12
Abbildung 5:	Aufbau und Funktionsweise des Thioredoxinsystems. ....	18
Abbildung 6:	Ahp1 trägt vermutlich auf zwei Wegen zur oxidativen Stressantwort bei.....	21
Abbildung 7:	Verlust von <i>URM1</i> führt zu einer erhöhten Rapamycinsensitivität. ....	24
Abbildung 8:	Nachweis der NEM-stabilisierten TAP-Urm1-Konjugation mittels EMSA..	25
Abbildung 9:	Darstellung möglicher Verknüpfungen, die Urm1 mit seinen Zielproteinen eingehen kann.....	26
Abbildung 10:	In Hefe kommt es zur Bildung von $\beta$ ME-sensitiven Urm1-Konjugaten. ....	27
Abbildung 11:	TAP-Urm1 modifiziert das Ahp1-Monomer und -Dimer. ....	29
Abbildung 12:	Auch mit HA-Urm1 zeigt sich eine Urmyleierung des Ahp1-Monomers und Dimers. ....	30
Abbildung 13:	Phänotypische Analyse verschiedener <i>ahp1</i> -Punktmutanten.....	32
Abbildung 14:	Der Verlust des C62 führt zu einem Ausbleiben der Ahp1-Urmyleierung.....	34
Abbildung 15:	Untersuchung einer NEM-unabhängigen Urmyleierung der <i>ahp1</i> -Punktmutanten.....	35
Abbildung 16:	Die Urmyleierung und Dimerisierung von Ahp1 wird durch t-BOOH gehemmt. ....	37
Abbildung 17:	t-BOOH hat keinen Einfluss auf die NEM-unabhängige Urmyleierung von <i>ahp1</i> -C31S. ....	38
Abbildung 18:	Das Thioredoxinsystem wird für eine effiziente Ahp1-Modifikation benötigt.....	39
Abbildung 19:	In einer <i>trr1</i> $\Delta$ -Mutante zeigt sich keine Hemmung der Ahp1-Urmyleierung durch t-BOOH. ....	40
Abbildung 20:	Nachweis der spezifischen Aufreinigung von Urm1-Konjugaten. ....	42
Abbildung 21:	Nachweis der Uba4-Urmyleierung in Hefe.....	44
Abbildung 22:	Die Schwefelverfügbarkeit beeinflusst die Urmyleierung .....	46

Abbildung 23: Die Schwefeltransferase Tum1 wird für eine effiziente Urmyleierung benötigt.....	48
Abbildung 24: Der Verlust von Tum1 hat keinen Einfluss auf die Uba4-Urmyleierung. ....	50
Abbildung 25: Das C225 wird ebenso wie das C397 nicht für die Urmyleierung benötigt. ...	52
Abbildung 26: Das C225 und das C397 sind nicht essentiell für die tRNA-Thiolierung. ....	54
Abbildung 27: Nach Verlust der Uba4-RHD ist weiterhin eine verminderte Urmyleierung möglich.....	55
Abbildung 28: Die Uba4-RHD wird für eine effiziente tRNA-Thiolierung benötigt. ....	57
Abbildung 29: Die Urm1-Aktivierung durch Uba4 <sub>1-328</sub> erfolgt unabhängig von Tum1. ....	58
Abbildung 30: Eine Koexpression von <i>UBA4</i> <sub>1-328</sub> und <i>UBA4</i> <sub>329-440</sub> verbessert die Urm1-Aktivierung nicht.....	60
Abbildung 31: Urm1 modifiziert Uba4 <sub>1-328</sub> .....	61
Abbildung 32: hURM1 ist in Hefe funktional.....	63
Abbildung 33: hURM1 ermöglicht eine reduzierte tRNA-Thiolierung in Hefe. ....	64
Abbildung 34: Das humane Urm1-Homolog vermittelt Urmyleierung in Hefe. ....	65
Abbildung 35: Das C62 wird benötigt, damit Ahp1 durch hURM1 modifiziert werden kann. ....	67
Abbildung 36: Uba4 wird in Hefe durch hURM1 urmyleiert. ....	68
Abbildung 37: DAZ-1 eignet sich für den Nachweis von Sulfensäureresten in Proteinen. ....	73
Abbildung 38: Eine Überoxidation von Ahp1 wirkt sich wahrscheinlich auf dessen Urmyleierung aus. ....	74
Abbildung 39: Modell für die Urmyleierung von Ahp1. ....	77
Abbildung 40: Möglicher Mechanismus für die Konjugation von Urm1 an Zielproteine. ....	82
Abbildung 41: Sequenzvergleich von Uba4-homologen Proteinen aus Eu- und Prokaryoten. ....	86
Abbildung 42: Möglicher Beitrag von Uba4 <sub>1-328</sub> zur Urm1-Thiocarboxylierung. ....	87
Abbildung 43: Sequenzvergleich von Urm1-homologen Proteinen.....	91
Abbildung 44: Schematische Übersicht zum Ablauf einer ortsspezifischen Mutagenese mittels PCR. ....	107
Abbildung 45: Schematischer Ablauf einer Fusions-PCR. ....	108

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über eukaryotische UBLs sowie deren E1-, E2- und E3-Enzyme. ....	5
Tabelle 2: Auswahl an Proteinen, die nach der Aufreinigung massenspektrometrisch bestimmt wurden. ....	43
Tabelle 3: Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme .....	95
Tabelle 4: Verwendete <i>S. cerevisiae</i> -Stämme .....	95
Tabelle 5: Verwendete Plasmide .....	96
Tabelle 6: Verwendete Primer .....	97
Tabelle 7: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.....	113

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
5-FOA	5-Fluororotsäure
$\alpha$	Anti
Abb.	Abbildung
AgNO <sub>3</sub>	Silbernitrat
Ala	Alanin
AMP	Adenosinmonosphat
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta$ ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CBP	<i>calmodulin binding peptide</i>
c-myc	<i>cellular myelocytomatosis oncogene</i>
C-terminal	Carboxyterminal
Cys	Cystein
DAz-1	N-(3-Azidopropyl)-3,5-dioxocyclohexanecarboxamid
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
DUB	<i>deubiquitinating enzyme</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alia</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
engl.	englisch
GSH	Glutathion

h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HA	Hämagglutinin
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
KCl	Kaliumchlorid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
LiAc	Lithiumacetat
LiCl	Lithiumchlorid
Lys	Lysin
M	Molar
mcm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U	5-Methoxycarbonylmethyl-2-Thiouridin
Mg	Magnesium
MgAc	Magnesiumacetat
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minuten
mg	Milligramm
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	Millimolar
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MoeBD	<i>MoeB-like domain</i>
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Natriumthiosulfat
NEM	N-Ethylmaleimid
ng	Nanogramm
NH <sub>4</sub> Ac	Ammoniumacetat
nM	Nanomolar
NP-40	Nonidet P-40
N-terminal	Aminoterminal
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
·O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid-Anion
OD <sub>595</sub>	optische Dichte bei 595 nm
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
·OH	Hydroxyl-Radikal
PCA	Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PLP	Pyridoxalphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphat
PRX	Peroxiredoxin
PSI-BLAST	<i>position-specific iterative BLAST</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RHD	<i>rhodanese homology domain</i>
ROOH	Alkylhydroperoxid
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
SH	Thiogruppe
SOB	<i>super optimal broth</i>
SOD	Superoxiddismutase
SOH	Sulfensäurerest

SO <sub>2</sub> H	Sulfinsäurerest
SO <sub>3</sub> H	Sulfonsäurerest
Tab.	Tabelle
TAP	<i>tandem affinity purification</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
t-BOOH	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
tE <sup>UUC</sup>	Glutamat-tragende tRNA mit UUC-Anticodon
tK <sup>UUU</sup>	Lysin-tragende tRNA mit UUU-Anticodon
TOR	<i>target of rapamycin</i>
tQ <sup>UUG</sup>	Glutamin-tragende tRNA mit UUG-Anticodon
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i>
TRR	Thioredoxin-Reduktase
TRX	Thioredoxin
U	<i>unit</i>
U <sub>34</sub>	<i>wobble</i> -Uridin
UBL	<i>ubiquitin-like protein</i>
V	Volt
v/v	<i>volume/volume</i>
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight/volume</i>
YNB	<i>yeast nitrogen broth</i>
YP	<i>yeast extract peptone</i>
YPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i>
z.B.	zum Beispiel

# 1. Einleitung

## 1.1 Posttranslationale Modifikationen

Das Proteom, als die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle oder eines Organismus, ist sehr komplex und ständig Veränderungen unterworfen. Posttranslationale Modifikationen tragen hierbei wesentlich zur Komplexität und Dynamik des Proteoms bei. Diese können die Aktivität, Lokalisation oder Stabilität eines Proteins beeinflussen, aber auch Auswirkungen auf die Interaktion mit anderen Proteinen, Nukleinsäuren, Lipiden oder Cofaktoren haben. Posttranslationale Modifikationen stellen chemische Veränderungen eines Proteins dar, die in der Regel durch spezifische Enzyme vermittelt werden und reversibel oder irreversibel sein können. Die proteolytische Spaltung eines Proteins ist eine typische irreversible Modifikation, die durch Proteasen vermittelt wird. Hierbei kann es zur Abtrennung spezifischer Signalsequenzen oder regulatorischer Domänen kommen. Bei reversiblen Modifikationen werden häufig weitere Moleküle an spezifische Aminosäurereste eines Proteins angehängt. So kommt es beispielsweise bei der Phosphorylierung, Methylierung oder Acetylierung zum Anhängen von Phosphat-, Methyl- bzw. Acetylgruppen. Diese Modifikationen sind eher klein, und es gibt im Gegensatz dazu auch die Möglichkeit, dass größere Moleküle mit einem Protein verknüpft werden. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Glykosylierung, bei der die Verknüpfung von Mono- oder Polysacchariden mit einem Protein erfolgt. Eine weitere mögliche Form der posttranslationalen Modifikation stellt auch das Anhängen ganzer Proteine dar. Das Ubiquitin ist hierbei das bekannteste Beispiel für ein Polypeptid, welches in der Lage ist, andere Proteine zu modifizieren.

## 1.2 Ubiquitin als posttranslationaler Modifikator

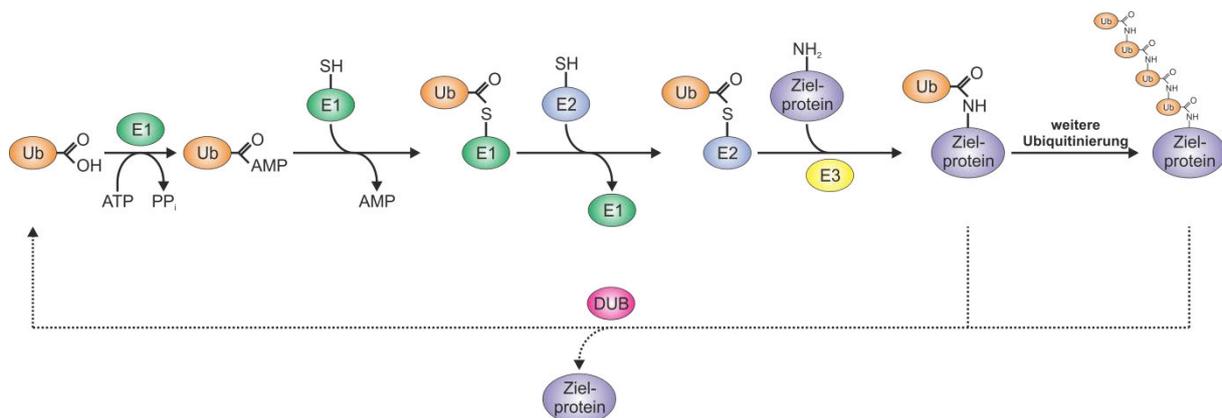
Ubiquitin ist ein 76 Aminosäuren umfassendes Protein, das hochkonserviert in allen Eukaryoten zu finden ist, aber in Prokaryoten nicht vorkommt (Schlesinger und Goldstein, 1975; Özkaynak *et al.*, 1984). Als posttranslationaler Modifikator kann Ubiquitin über seinen C-Terminus kovalent an Lysinreste in Zielproteinen angehängt werden (Goldknopf und Busch, 1977). Dieser Prozess der kovalenten Modifikation wird als Ubiquitinierung bezeichnet. Die Ubiquitinierung wird durch eine Enzymkaskade vermittelt, an deren Anfang die Aktivierung des Modifikators durch ein E1-Enzym steht (Abb. 1). Dieses sogenannte aktivierende Enzym bedingt die Adenylierung des Ubiquitins an dessen C-Terminus (Ciechanover *et al.*, 1981, 1982). Im Anschluss daran erfolgt der Aufbau einer

Thioesterverknüpfung zwischen der Carboxygruppe des Ubiquitins und der Thiogruppe eines aktiven Cysteinrests im E1 (Ciechanover *et al.*, 1982; Hershko *et al.*, 1982). Der Modifikator wird daraufhin auf ein aktives Cystein in einem E2-Enzym übertragen, wobei wiederum die Bildung einer Thioesterbindung stattfindet (Hershko *et al.*, 1983). Das E2, das auch als konjugierendes Enzym bezeichnet wird, interagiert anschließend mit einer E3-Ligase, welche die spezifische Verknüpfung der Carboxygruppe des Ubiquitins mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinrests im Zielprotein vermittelt (Hershko *et al.*, 1983). Durch diese Verknüpfung kommt es zum Aufbau einer kovalenten Isopeptidbindung zwischen dem Modifikator und seinem Substrat.

In eukaryotischen Zellen wird die spezifische Ubiquitinierung eines Zielproteins durch das Zusammenspiel vieler verschiedener E2- und E3-Enzyme erreicht. So sind beispielsweise in menschlichen Zellen 37 E2- und mehr als 600 E3-Enzyme beschrieben, wohingegen hier nur zwei E1-Enzyme an der Aktivierung des Ubiquitins beteiligt sind (Groettrup *et al.*, 2008; Deshaies und Joazeiro, 2009; Markson *et al.*, 2009; Michelle *et al.*, 2009). Dies zeigt, dass die Vermittlung der Substratspezifität während der Ubiquitinierung sehr variabel sein kann. Diese Variabilität wird zusätzlich dadurch erweitert, dass sich auch die Art und Weise der Modifikation durch Ubiquitin unterscheiden kann. Neben einem (Monoubiquitinierung) oder mehreren einzelnen Ubiquitinmolekülen (Mono-Multiubiquitinierung) können auch ganze Ubiquitinketten (Polyubiquitinierung) an Zielproteine angehängen werden (Hochstrasser, 2009; Komander, 2009b). Der Aufbau solcher Ketten erfolgt, indem ein weiteres Ubiquitin an das Lysin eines bereits konjugierten Ubiquitins angehängen wird. Da der Modifikator über sieben Lysine verfügt, ist der Aufbau unterschiedlich verknüpfter Ubiquitinketten möglich, die auch abweichende funktionelle Konsequenzen für ein modifiziertes Zielprotein haben können (Komander, 2009b). So wird die bekannteste Funktion des Ubiquitins, die Markierung von Proteinen für den proteasomalen Abbau, durch eine Polyubiquitinierung vermittelt, bei der eine Verknüpfung über das interne Lysin an Position 48 (K48) erfolgt (Chau *et al.*, 1989). Im Gegensatz dazu führt die Modifikation von Proteinen durch Ubiquitinketten, die beispielsweise durch Verknüpfung am K63 entstehen, nicht zu deren Proteolyse. Für solche K63-verknüpften Ketten konnte unter anderem eine Beteiligung an Signaltransduktionsprozessen oder der Reparatur von DNA-Schäden nachgewiesen werden (Arnason und Ellison, 1994; Spence *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2009). Neben der Poly- scheint aber auch die Monoubiquitinierung eine wichtige Rolle bei der Regulation verschiedener physiologischer Prozesse zu spielen. So wurde gezeigt, dass nicht nur die Reparatur von DNA-Schäden, sondern auch die Genexpression oder die Endozytose durch eine

Monoubiquitinierung bestimmter Proteine reguliert werden kann (Terrell *et al.*, 1998; Robzyk *et al.*, 2000; Pham und Sauer, 2000; Hoege *et al.*, 2002).

Desweiteren konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass es sich auch bei der Ubiquitinierung um eine reversible posttranslationale Modifikation handelt. Sogenannte deubiquitinierende Enzyme (DUB) können die Loslösung des Ubiquitins vom jeweiligen Zielprotein vermitteln, indem sie die Isopeptidbindung zwischen dem Modifikator und seinem Substrat spalten (Abb. 1) (Komander *et al.*, 2009a; Reyes-Turcu *et al.*, 2009). Somit tragen DUBs zum Recycling des Ubiquitins bei. Sie sind darüber hinaus aber ebenfalls am Umbau von Ubiquitinketten beteiligt. Demzufolge wird die Variabilität der Ubiquitinierung auch durch das Wirken der DUBs vermittelt.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Ubiquitinierung und Deubiquitinierung eines Proteins.**

Die Konjugation von Ubiquitin (Ub) an sein Zielprotein wird durch eine Kaskade von drei hintereinander geschalteten Enzymen vermittelt (E1, E2 und E3). Das E1 adenyliert Ubiquitin an dessen C-Terminus und bindet den Modifikator über ein aktives Cystein, wodurch es zur Ausbildung einer Thioesterverknüpfung kommt. Das Ubiquitin wird daraufhin auf das aktive Cystein eines E2-Enzyms transferiert, was ebenfalls zur Entstehung einer Thioesterbindung führt. Unter potentieller Beteiligung einer E3-Ligase erfolgt die spezifische Verknüpfung des Ubiquitins mit seinem Zielprotein. Indem der C-Terminus des Modifikators an die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinrests im Substrat angehängen wird, kommt es zur Ausbildung einer kovalenten Isopeptidbindung. Durch Anhängen weiterer Ubiquitinmoleküle an Lysinreste eines bereits konjugierten Ubiquitins kann eine Polyubiquitinierung stattfinden. Ein deubiquitinierendes Enzym (DUB) spaltet gebundenes Ubiquitin vom Substrat ab. Der so freigesetzte Modifikator kann für eine erneute Ubiquitinierungsreaktion verwendet werden. Abbildung verändert nach Hochstrasser (2009).

### 1.3 Die Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine

Im Laufe der letzten drei Jahrzehnte konnten in Eukaryoten verschiedene Ubiquitin-ähnliche Proteine (UBL = *ubiquitin-like proteins*) identifiziert werden, die größtenteils auch als Proteinmodifikatoren fungieren (Tab. 1) (Hochstrasser, 2000; Hochstrasser, 2009). Obwohl sich die meisten dieser UBLs teilweise sehr stark in ihrer Aminosäuresequenz von Ubiquitin unterscheiden, verfügen alle über eine Ubiquitin-ähnliche Struktur, die auch als  *$\beta$ -grasp fold* bezeichnet wird (Hochstrasser, 2000; Kerscher *et al.*, 2006). Das Anhängen von UBLs an entsprechende Substrate erfolgt in der Regel über einen Ubiquitinierungs-ähnlichen Mechanismus. So sind E1-, E2- und teilweise auch E3-Enzyme an der Konjugation eines UBLs beteiligt. Doch verglichen mit Ubiquitin ist die Zahl an E2- oder E3-Enzymen, die spezifisch für ein UBL sind, wesentlich geringer. Dies hat zur Folge, dass die Bandbreite an Substraten für die meisten UBLs begrenzt ist.

Zu den bekanntesten und am besten erforschten UBLs gehört SUMO (*small ubiquitin related modifier*). Ähnlich dem Ubiquitin kann es kovalent an Lysinreste eines Proteins angehängen werden (Rodriguez *et al.*, 2001). Das erste Protein, für das eine Modifikation durch SUMO beschrieben wurde, ist das Transportprotein RanGAP1 (*Ran GTPase-activating protein 1*) (Matunis *et al.*, 1996; Mahajan *et al.*, 1997). Die Konjugation von SUMO trägt dazu bei, dass ein Import von RanGAP1 in den Zellkern stattfindet. Daher wird davon ausgegangen, dass die sogenannte SUMOylierung am Kerntransport beteiligt ist. Seit seiner Entdeckung konnten jedoch weitere Zielproteine von SUMO identifiziert werden. Indem es deren Lokalisation in der Zelle beeinflusst oder als Antagonist anderer posttranslationaler Modifikationen wirkt, kann SUMO die Funktion seiner Zielproteine regulieren und verschiedene physiologische Prozesse steuern (Seeler und Dejean, 2003; Wilkinson und Henley, 2010).

Im Menschen konnten vier Isoformen von SUMO (SUMO1-4) nachgewiesen werden, wohingegen in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* mit Smt3 nur ein Homolog des Modifikators vorkommt (Johnson *et al.*, 1997). Neben Smt3 gibt es in Hefe aber noch weitere UBLs mit unterschiedlichen Funktionen. Dazu gehört unter anderem der Proteinmodifikator Rub1, der homolog zu dem in Menschen vorkommenden NEDD8 (*neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8*) ist (Kumar *et al.*, 1993). Sowohl für Rub1 als auch für NEDD8 ist nur eine begrenzte Zahl an Zielproteinen bekannt. Zu den nachgewiesenen Substraten gehören die sogenannten Culline (Lammer *et al.*, 1998; Osaka *et al.*, 1998). Diese sind wichtige Untereinheiten von heteromeren, Ubiquitin-spezifischen E3-Ligasen, da sie als Gerüstproteine zu deren Aufbau und Aktivität beitragen (Patton *et al.*, 1998; Seol *et al.*, 1999). Eine Modifikation der Culline durch Rub1 bzw. NEDD8 scheint die

Funktion der E3-Ligasen zu beeinflussen. Im entsprechenden eukaryotischen System ist der jeweilige Modifikator daher womöglich an der Regulation der Ubiquitinierung beteiligt (Rabut und Peter, 1998).

**Tabelle 1: Übersicht über eukaryotische UBLs sowie deren E1-, E2- und E3-Enzyme.**

Sofern die UBLs in *S. cerevisiae* vorkommen, erfolgen alle Angaben zum entsprechenden Modifikator nach der in Hefe gebräuchlichen Nomenklatur. Bekannte menschliche Orthologe eines UBLs sind in Klammern angegeben. ISG15, UFM1, FAT10 und FUBI sind bisher nur im Menschen und anderen Vertebraten nachgewiesen wurden. Daher folgen die Angaben zu diesen Modifikatoren, der dort gebräuchlichen Nomenklatur. Tabelle verändert nach Kerscher *et al.* (2006) und Hochstrasser (2009).

Modifikator	E1	E2	E3	Funktion
Ubiquitin	Uba1	Ubc1-8, -10, -11, Ubc13-Mms2	viele verschiedene	neben proteasomalem Abbau viele weitere Funktionen bekannt
Smt3 (SUMO1-4)	Uba2-Aos1	Ubc9	Siz1, Siz2, Mms21	beeinflusst z.B. die Proteinlokalisierung und -modifikation
Rub1 (NEDD8)	Uba3-Ula1	Ubc12	Dcn1	Regulation von Ubiquitin- spezifischen E3-Ligasen
Atg8	Atg7	Atg3	-	Autophagie
Atg12	Atg7	Atg10	-	Autophagie
Urm1	Uba4	-	-	oxidative Stressantwort, tRNA-Thiolierung
Hub1	-	-	-	Spleißen von Pre-mRNA
ISG15	UBEL1	UBCH8	HERC5, EFP	mögliche Rolle in der Immunantwort
UFM1	UBA5	UFC1	-	Funktion unbekannt
FAT10	-	-	-	proteasomaler Proteinabbau
FUBI	-	-	-	mögliche Rolle in der Immunantwort

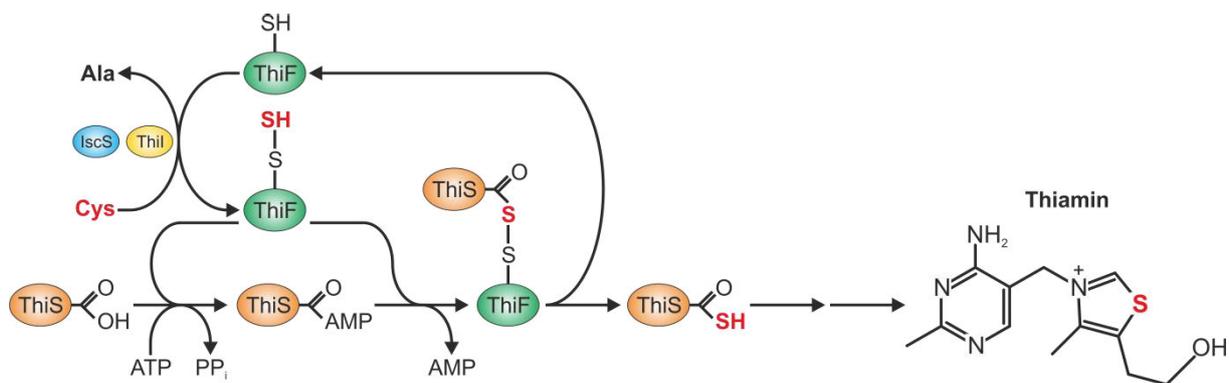
Atg8 und Atg12 sind zwei weitere UBLs, die in *S. cerevisiae* vorkommen. Beide werden für die Bildung von Autophagosomen benötigt und spielen demzufolge eine Rolle bei der Autophagie (Mizushima *et al.*, 1998). Die Aktivierungskaskade von Atg8 und Atg12 stellt unter allen bekannten eukaryotischen UBLs eine Besonderheit dar. So teilen sich beide mit Atg7 ein aktivierendes E1-Enzym, wohingegen sie über spezifische E2-Enzyme verfügen (Mizushima *et al.*, 1998; Shintani *et al.*, 1999; Ishimura *et al.*, 2000). Darüber hinaus ist auch die Substratspezifität der beiden UBLs besonders. Während das ebenfalls an der Autophagie beteiligte Protein Atg5, das einzige bekannte Substrat von Atg12 darstellt, erfolgt eine Konjugation von Atg8 an Lipide, die zur Klasse der Phosphatidylethanolamine gehören (Mizushima *et al.*, 1998; Ishimura *et al.*, 2000). Dies verdeutlicht, dass UBLs nicht zwangsläufig Proteine als Substrate haben müssen, sondern auch andere Moleküle modifizieren können.

#### 1.4 Ubiquitin-ähnliche Schwefelträger und Proteinmodifikatoren in Prokaryoten

Wie zuvor erwähnt, scheint ein Homolog des Ubiquitins in Prokaryoten nicht vorhanden zu sein. Trotzdem konnten mittlerweile verschiedene prokaryotische UBLs nachgewiesen werden, die unterschiedliche Funktionen in Bakterien und Archaeen übernehmen.

Zu diesen gehören die bakteriellen Schwefelträgerproteine ThiS und Moad. Hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz zeigen beide keine sehr starke Ähnlichkeit mit Ubiquitin. Trotzdem zeichnen sie sich durch eine UBL-typische  $\beta$ -grasp fold-Struktur aus und verfügen ebenso wie das Ubiquitin über ein C-terminales Di-Glycinmotiv, das essentiell für die Funktion der beiden Proteine ist (Rudolph *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; Schmitz *et al.*, 2007). Als Schwefelträger spielen ThiS und Moad eine Rolle bei der Biosynthese von schwefelhaltigen Enzym-Cofaktoren. Hierbei trägt ThiS zur Bildung von Thiamin bei, während Moad für die Erzeugung von Molybdopterin benötigt wird, welches ein Bestandteil des Molybdän-Cofaktors (MoCo) ist (Rajagopalan *et al.*, 1997; Begley *et al.*, 1999). Für die Synthese der genannten Cofaktoren muss ein Schwefeleinbau in ThiS und Moad erfolgen (Abb. 2). Wie bei der Ubiquitinierung ist hierfür im ersten Schritt eine Adenylierung des UBLs am C-Terminus erforderlich. Die Adenylierung von ThiS oder Moad wird durch das E1-ähnliche Enzym ThiF bzw. MoeB vermittelt (Taylor *et al.*, 1998; Leimkühler *et al.*, 2001b). Der im Anschluss daran stattfindende Einbau des Schwefels in ThiS und Moad erfolgt unter Ausbildung eines C-terminalen Thiocarboxylats (Taylor *et al.*, 1998; Rudolph *et al.*, 2001). Im Gegensatz zur Ubiquitinierung erfordert dieser Schritt keine Thioesterverknüpfung des UBLs mit dem entsprechenden Aktivatorprotein. Zumindest für die Thiaminsynthese konnte

gezeigt werden, dass es anstatt dessen zur Ausbildung einer Acyldisulfidverknüpfung zwischen ThiS und einem zuvor am ThiF gebildeten Persulfid kommt (Xi *et al.*, 2001). Eine vergleichbare Form der kovalenten Verknüpfung zwischen MoaD und MoeB ist jedoch nicht bekannt (Leimkühler *et al.*, 2001b). Es wird aber vermutet, dass MoaD eine Acyldisulfidbindung mit einer separaten Schwefeltransferase eingehen kann, was schlussendlich ebenfalls zur Thiocarboxylierung des UBLs führt (Leimkühler *et al.*, 2001a; Dahl *et al.*, 2011).



**Abbildung 2: Beteiligung von ThiS und ThiF an der Thiaminbiosynthese.**

Zu Beginn wird ThiS an seinem C-Terminus durch das E1-ähnliche ThiF adenyliert. Anschließend kommt es zum Aufbau einer Acyldisulfidverknüpfung zwischen der Carboxygruppe des ThiS und einem zuvor an ThiF gebildeten Persulfid. Der Schwefel für die Entstehung des Persulfids stammt von Cystein. Dieser wird durch das Zusammenspiel der Cysteindesulfurase IscS und der Schwefeltransferase ThiI auf einen Cysteinrest in ThiF übertragen (Lauhon und Kambampati, 2000). Nach Spaltung der Acyldisulfidverknüpfung wird thiocarboxyliertes ThiS freigesetzt, das als Schwefeldonor für folgende Reaktionen dient. Abbildung verändert nach Pedrioli *et al.* (2008).

Da die Aktivierung von ThiS und MoaD zum Teil der des Ubiquitins gleicht, wird von einer evolutionären Verknüpfung des prokaryotischen Schwefeltransfer- und des eukaryotischen Ubiquitinierungssystems ausgegangen. Trotzdem zeigen neuere Befunde, dass die Entstehung von proteinmodifizierenden UBLs nicht erst in Eukaryoten erfolgte, sondern entwicklungsgeschichtlich schon früher stattgefunden hat. Die im Archaeon *Haloverax volcanii* vorkommenden SAMPs (*small archaeal modifier protein*) waren die ersten prokaryotischen UBLs, für die eine kovalente Verknüpfung mit verschiedenen Proteinen nachgewiesen wurde. Bisher konnten in *H. volcanii* drei unterschiedliche SAMPs (SAMP1-3) identifiziert werden (Humbard *et al.*, 2010; Miranda *et al.*, 2014). Während SAMP3 nur als Proteinmodifikator wirkt, fungieren SAMP1 und SAMP2 darüber hinaus ebenfalls als Schwefelträgerproteine (Miranda *et al.*, 2011). Ähnlich dem bakteriellen MoaD ist SAMP1 an der Synthese von Molybdopterin beteiligt, wohingegen SAMP2 Teil eines

Schwefeltransferwegs ist, der zur Thiolierung von tRNAs (*transfer ribonucleic acid*) führt. Die nachgewiesene duale Funktionsweise von SAMP1 und SAMP2 ist ein weiterer Hinweis dafür, dass sich proteinmodifizierende UBLs vermutlich aus Schwefel-transferierenden Vorläufern entwickelt haben. Außerdem zeigt dies auch, dass die Spezialisierung des archaealen SAMP-Systems noch nicht so weit fortgeschritten ist wie beispielsweise beim eukaryotischen Ubiquitinierungssystem, welches nur noch der Proteinmodifikation dient. Dies wird ebenfalls dadurch deutlich, dass UbaA das einzige E1-ähnliche Enzym in *H. volcanii* ist und dieses die Aktivierung aller drei SAMPs vermittelt (Miranda *et al.*, 2011, 2014).

### 1.5 Urm1, ein bifunktionales UBL in Eukaryoten

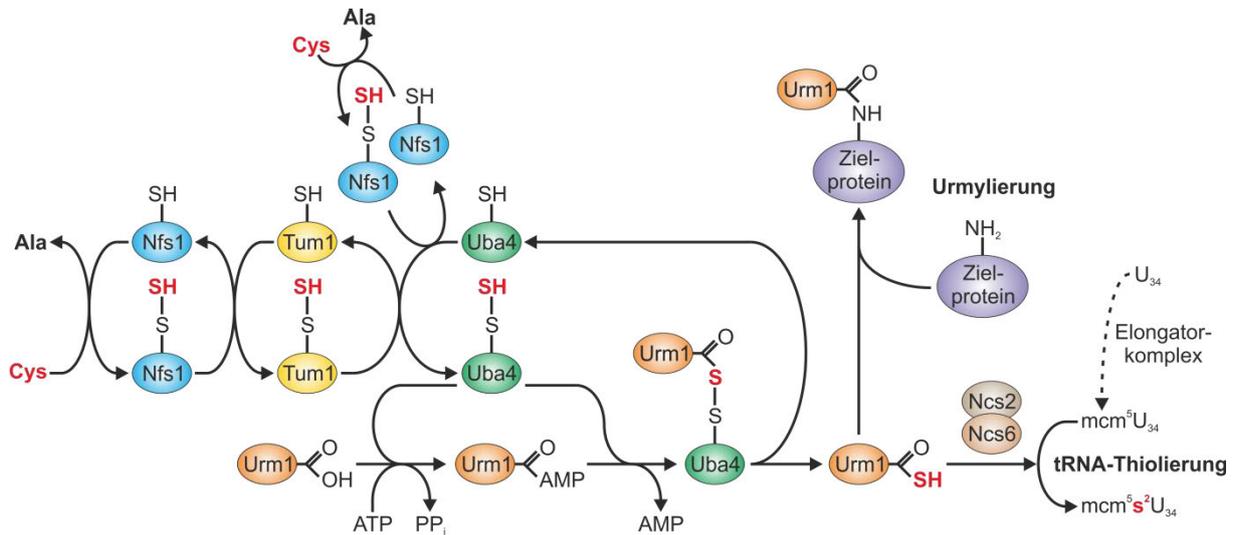
Im Jahr 2000 konnten Furukawa *et al.* mit Urm1 (*ubiquitin related modifier 1*) ein weiteres UBL in *S. cerevisiae* nachweisen. Die Identifikation dieses neuen UBLs gelang durch eine PSI-BLAST-Analyse. Hierbei wurde in Hefe nach Proteinen gesucht, die sich durch eine Aminosäuresequenz auszeichnen, welche mit der der bakteriellen Schwefelträger ThiS und MoaD vergleichbar ist. Tatsächlich zeigt Urm1 nicht nur eine starke Ähnlichkeit mit beiden prokaryotischen Proteinen, die Sequenz des 99 Aminosäuren umfassenden und 11 kDa großen UBLs stimmt sogar zu 20% bzw. 23% mit der von ThiS oder MoaD überein. Wie die beiden Schwefelträger verfügt Urm1 ebenfalls über ein C-terminales Di-Glycinmotiv und darüber hinaus besitzt es auch die UBL-typische  $\beta$ -grasp fold-Struktur (Furukawa *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2006).

Nach seiner Entdeckung in Hefe konnte eine Konservierung des Urm1 auch in höheren Eukaryoten nachgewiesen werden. So sind homologe Proteine im Menschen und in Pflanzen vorhanden (Schlieker *et al.*, 2008; Nakai *et al.*, 2012). Die allgemeine Konservierung des Urm1 in Eukaryoten deutet auf dessen funktionelle Relevanz hin. In der Tat konnten zwei Funktionen für Urm1 beschrieben werden. So fungiert es wie die meisten anderen eukaryotischen UBLs als posttranslationaler Modifikator, der kovalent mit Proteinen verknüpft werden kann (Furukawa *et al.*, 2000; Van der Veen *et al.*, 2011). Diese besondere Form der Proteinmodifikation durch Urm1 wird in Anlehnung an die Ubiquitinierung als Urmylierung bezeichnet. Des Weiteren kann Urm1 ähnlich dem ThiS oder MoaD auch als Schwefelträgerprotein fungieren. Hierbei ist es Teil eines Schwefeltransferwegs, der zur Thiolierung bestimmter cytoplasmatischer tRNAs führt (Nakai *et al.*, 2008; Leidel *et al.*, 2009; Noma *et al.*, 2009). Die Beteiligung von Urm1 an der tRNA-Thiolierung zeigt, dass es Gemeinsamkeiten zum archaealen SAMP2 besitzt, welches ebenfalls nicht nur als Proteinmodifikator agiert, sondern in *H. volcanii* auch an der Thiomodifikation von tRNAs

beteiligt ist (Humbard *et al.*, 2010; Miranda *et al.*, 2011). Dies ist ein Indiz dafür, dass sich das eukaryotische Urm1 vermutlich aus einem prokaryotischen SAMP-ähnlichen Vorläufer entwickelt hat. Somit kann es als das ursprünglichste eukaryotische UBL angesehen werden, welches die Fähigkeit zur Proteinmodifikation erworben hat.

### 1.5.1 Aktivierung von Urm1

Die besondere evolutionäre Stellung von Urm1 wird auch dadurch ersichtlich, dass es im Vergleich zu Ubiquitin und anderen eukaryotischen UBLs über eine abweichende Aktivierungskaskade verfügt. So umfasst die Aktivierung von Urm1 die Bildung eines Thiocarboxylats, welches nicht nur als Substrat für die tRNA-Thiolierung, sondern wahrscheinlich auch für die Urmylierung dient (Abb. 3) (Schmitz *et al.*, 2008; Leidel *et al.*, 2009; Noma *et al.*, 2009; Van der Veen *et al.*, 2011). Daher ist der Aktivierungsmechanismus des Modifikators eher mit dem der bakteriellen Schwefelträger ThiS und MoeD vergleichbar. Für den Schwefeleinbau in Urm1 wird Uba4 (*ubiquitin-activating 4*) benötigt. Dieses E1-ähnliche Enzym wurde ursprünglich durch *yeast-two-hybrid*-Analysen als Interaktionspartner von Urm1 identifiziert (Furukawa *et al.*, 2000). Der N-Terminus von Uba4 ist nicht nur homolog zu Uba1, dem E1 des Ubiquitins, sondern zeigt auch starke Ähnlichkeit zu ThiF und MoeB (Furukawa *et al.*, 2000; Noma *et al.*, 2009). Demzufolge wird diese N-terminale Region auch als MoeBD (*MoeB-like domain*) bezeichnet (Schmitz *et al.*, 2008). Darüber hinaus verfügt Uba4 am C-Terminus über eine zusätzliche Domäne, die jedoch in anderen E1-Enzymen sowie in ThiF und MoeB nicht zu finden ist (Furukawa *et al.*, 2000; Noma *et al.*, 2009). Die C-terminale Region des Uba4 ist aber homolog zu Enzymen, die der Rhodanese-Familie angehören. Daher wird diese auch als RHD (*rhodanese homology domain*) bezeichnet (Mueller, 2006; Leidel *et al.*, 2009). Rhodanesen fungieren als Schwefeltransferasen, die eine Übertragung von Schwefel auf andere Proteine vermitteln (Bordo und Bork, 2002; Mueller, 2006). Hierfür ist die Ausbildung eines Persulfids an einem katalytisch aktiven Cystein notwendig. Auch für Uba4 konnte die Bildung eines Persulfids an einem Cysteinrest in der RHD gezeigt werden (Schmitz *et al.*, 2008; Noma *et al.*, 2009). Dies scheint für die Aktivierung von Urm1 durch Uba4 essentiell zu sein, da es zur Entstehung des thiocarboxylierten Modifikators beiträgt (Schmitz *et al.*, 2008; Leidel *et al.*, 2009; Noma *et al.*, 2009; Van der Veen *et al.*, 2011).



**Abbildung 3: Darstellung des Schwefeltransferwegs, der zur Urmyleierung und tRNA-Thiolierung führt.**

Durch die Cysteindesulfurase Nfs1 wird Cystein zu Alanin umgesetzt. Der hierbei freigesetzte Schwefel wird als Persulfid am Nfs1 gebunden. Dieser wird vorzugsweise über die Schwefeltransferase Tum1 auf Uba4 übertragen. Ein direkter Transfer des Persulfids von Nfs1 auf das Urm1-Aktivatorprotein ist jedoch auch möglich. Uba4 adenyliert Urm1 an dessen C-Terminus. Das so aktivierte Urm1 kann daraufhin das Persulfid am Uba4 binden. Durch Spaltung der resultierenden Acyldisulfidverknüpfung wird thiocarboxyliertes Urm1 frei. Das Thiocarboxylat geht entweder in die Urmyleierung ein oder wird von Ncs2 und Ncs6 als Substrat für die Thiolierung des *wobble*-Uridins ( $U_{34}$ ) bestimmter tRNAs verwendet. Die Bildung der resultierenden  $s^2$ -Seitengruppe am  $U_{34}$  geht einher mit einer  $mcm^5$ -Modifikation, die unter anderem durch den Elongator-Komplex vermittelt wird. Abbildung verändert nach Noma *et al.* (2009) und Wang *et al.* (2011).

An der Generierung des Persulfids sind Nfs1 und Tum1 beteiligt (Abb. 3). Nfs1 ist ein essentielles Protein, das nicht nur die Thiomodifikation von mitochondrialen und cytoplasmatischen tRNAs vermittelt, sondern auch eine Rolle bei der Bildung von Eisen-Schwefel-*clustern* spielt (Li *et al.*, 1999; Nakai *et al.*, 2004). Ebenso wie das homologe, bakterielle NIFS stellt Nfs1 eine Cysteindesulfurase dar (Zheng *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 1994). Unter Beteiligung des Cofaktors Pyridoxalphosphat (PLP) vermittelt es die Umsetzung von Cystein zu Alanin. Der dabei frei werdende Schwefel wird in Form eines Persulfids am Nfs1 gebunden. Das Persulfid wird anschließend auf Uba4 übertragen, wobei Tum1 als dazwischengeschaltete Schwefeltransferase fungieren kann (Noma *et al.*, 2009; Marelja *et al.*, 2008). Bei Tum1 handelt es sich um ein Protein, das aus zwei in Tandem angeordneten RHDs besteht (Noma *et al.*, 2009). Während die N-terminale RHD vermutlich funktionslos ist, wird die C-terminale Domäne mit einem aktiven Cystein an Position 259 (C259) für einen effektiven Schwefeltransfer benötigt. Eine Beteiligung von Tum1 am Schwefeltransfer wird dadurch ersichtlich, dass die tRNA-Thiolierung in Hefe nach Verlust des Proteins drastisch reduziert ist (Huang *et al.*, 2008; Noma *et al.*, 2009). Außerdem konnte durch *in vitro*-

Analysen nachgewiesen werden, dass Nfs1 sein Persulfid nicht nur auf Uba4, sondern auch auf Tum1 transferieren kann (Noma *et al.*, 2009).

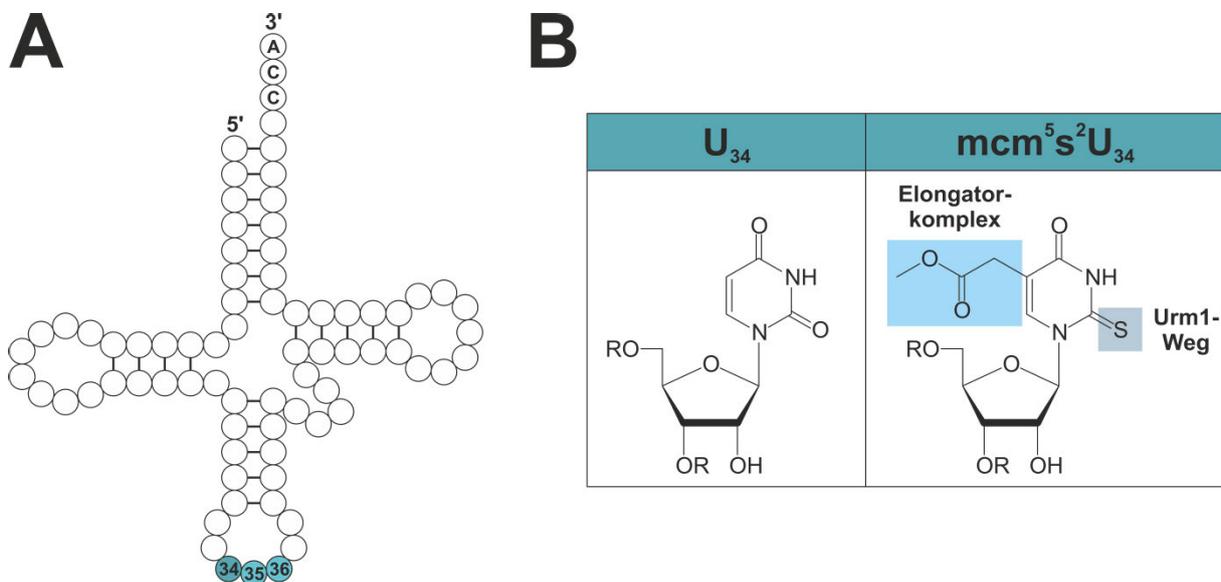
Das schlussendlich auf die Uba4-RHD übertragene Persulfid wird für den Aufbau einer Acylsulfidverknüpfung mit Urm1 benötigt. Damit der Modifikator diese Bindung eingehen kann, muss dieser zuvor an seinem C-Terminus durch die MoeBD des Aktivatorproteins adenyliert werden. Nach einer abschließenden Spaltung der Acylsulfidverknüpfung kommt es zur Freisetzung von thiocarboxyliertem Urm1, das für Folgereaktionen verwendet werden kann (Abb. 3).

### 1.5.2 Beteiligung von Urm1 an der tRNA-Thiolierung

tRNAs bestehen nicht nur aus Adenosin, Guanosin, Cytidin und Uridin. Sie setzen sich auch aus chemisch modifizierten Varianten dieser Nukleoside zusammen. Allein in *S. cerevisiae* konnten 25 verschiedene Modifikationen in cytoplasmatischen tRNAs nachgewiesen werden (Phizicky und Hopper, 2010). Während einige Modifikationen universell vorkommen, sind andere nur in bestimmten tRNA-Spezies zu finden. Je nach Art und Ort können diese Modifikationen unterschiedliche Funktionen haben. So wirken sie sich auf die Struktur und Stabilität oder auf die Aminoacylierung einer tRNA aus (Davanloo *et al.*, 1979; Muramatsu *et al.*, 1988; Kawai *et al.*, 1992; Helm *et al.*, 1999). Sie können aber auch die Interaktion zwischen tRNAs und mRNAs (*messenger ribonucleic acid*) beeinflussen. Hierbei spielen insbesondere Modifikationen, die am Anticodon stattfinden, eine wichtige Rolle (Abb. 4A). Die größte Vielfalt an modifizierten Nukleosiden lässt sich an Position 34 des Anticodons finden (Phizicky und Hopper, 2010). Modifikationen, die an dieser sogenannten *wobble*-Position stattfinden, sind für eine effiziente Erkennung und Bindung spezifischer Codons wichtig (Björk *et al.*, 2007). Sie scheinen aber auch zum *wobbling* beizutragen und sind womöglich daran beteiligt, dass tRNAs nicht-komplementäre Codons erkennen können (Johansson *et al.*, 2008).

In Eukaryoten gibt es 13 cytoplasmatische tRNAs, die über ein *wobble*-Uridin (U<sub>34</sub>) verfügen (Johansson *et al.*, 2008). Hierbei kann das U<sub>34</sub> abhängig von der jeweiligen tRNA-Spezies unterschiedlich modifiziert sein. So kommt es beispielsweise in den tRNAs tQ<sup>UUG</sup>, tE<sup>UUC</sup> und tK<sup>UUU</sup> als 5-Methoxycarbonylmethyl-2-Thiouridin (mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U) vor (Abb. 4B). Der Aufbau des mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U geschieht über zwei getrennte Modifikationswege. Die Bildung der Thiogruppe (s<sup>2</sup>) erfolgt, indem das Sauerstoffatom an Position 2 der Uracil-Base gegen ein Schwefelatom ausgetauscht wird. Wie zuvor beschrieben, wird diese als Thiolierung bezeichnete Modifikation durch einen Schwefeltransferweg vermittelt, an dem neben Urm1 auch Nfs1,

Tum1 und Uba4 beteiligt sind. Durch genetische Analysen in Hefe konnten jedoch auch Ncs2 und Ncs6 als Proteine identifiziert werden, die für die tRNA-Thiolierung essentiell sind (Björk *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008; Nakai *et al.*, 2008). Beide verfügen über eine PP-loop ATPase-Domäne, die ebenfalls in anderen tRNA-modifizierenden Enzymen vorhanden ist (Björk *et al.*, 2007; Schlieker *et al.*, 2008). Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass Ncs2 und Ncs6 als Heterodimer in der Zelle vorliegen (Dewez *et al.*, 2008; Leidel *et al.*, 2009). Vermutlich nutzt dieser Komplex den im Urm1-Thiocarboxylat enthaltenen Schwefel, um ihn auf das U<sub>34</sub> zu übertragen (Abb. 3). Durch *in vitro*-Analysen konnte gezeigt werden, dass Ncs6 in der Lage ist, tRNAs zu binden und zu adenylieren (Nakai *et al.*, 2008; Leidel *et al.*, 2009). Daher scheint es direkt am Schwefeleinbau beteiligt zu sein. Trotzdem ist der genaue Mechanismus, der zur U<sub>34</sub>-Thiolierung führt, bisher unklar. Ebenso ist auch nicht bekannt, welche Rolle Ncs2 hierbei spielt.



**Abbildung 4:** Urm1 vermittelt die Thiolierung der cytoplasmatischen tRNAs tQ<sup>UUG</sup>, tE<sup>UUC</sup> und tK<sup>UUU</sup>.

**A)** Schematischer Aufbau einer tRNA. Die drei Nucleotide an Position 34, 35 und 36, die zusammen das Anticodon bilden, sind in blau hervorgehoben. **B)** Struktur des wobble-Uridins (U<sub>34</sub>) in seiner unmodifizierten und modifizierten Form. Die Bildung des 5-Methoxycarbonylmethyl-2-Thiouridins an Position 34 (mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U<sub>34</sub>) wird durch zwei getrennte Modifikationswege vermittelt. An der Bildung des mcm<sup>5</sup> ist unter anderem der Elongator-Komplex beteiligt. Der Aufbau der s<sup>2</sup>-Seitengruppe ist von einem Schwefeltransferweg abhängig, der über das Schwefelträgerprotein Urm1 verläuft. Abbildungen verändert nach Pedrioli *et al.* (2008) sowie Phizicky und Hopper (2009).

Die Bildung der Methoxycarbonylmethyl-Seitengruppe (mcm<sup>5</sup>) im mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U wird durch verschiedene Proteine vermittelt. Unter anderem ist hieran der Elongator-Komplex beteiligt (Abb. 4B) (Huang *et al.*, 2005). In Hefe setzt sich dieser Komplex aus den sechs

Untereinheiten Elp1-6 zusammen (Krogan und Greenblatt, 1999). Ursprünglich als Interaktionspartner der RNA-Polymerase II identifiziert, wurde vermutet, dass der Elongator zur Transkriptionselongation beiträgt (Otero *et al.*, 1999). Darüber hinaus wurde auch eine Beteiligung an der Histon-Acetylierung und der Exocytose vorgeschlagen (Wittschieben *et al.*, 1999; Rahl *et al.*, 2005). Trotzdem scheint die eigentliche Funktion des Elongators die tRNA-Modifikation zu sein. Denn ein Großteil der Phänotypen, die in *S. cerevisiae* für Elongator-Mutanten beschrieben sind, gehen auf eine fehlende tRNA-Modifikation zurück (Esberg *et al.*, 2006).

### 1.5.3 Bedeutung der Urm1-vermittelten tRNA-Thiolierung

Hefestämme, deren *URM1*-Gen deletiert ist, verfügen ebenso wie Elongator-Mutanten über eine Vielzahl an unterschiedlichen Phänotypen. So zeigen *urm1Δ*-Stämme neben einer erhöhten Thermosensitivität auch eine verringerte Resistenz gegenüber chemischen Stressoren wie z.B. Koffein, Calcofluor-White, Rapamycin oder Diamid (Furukawa *et al.*, 2000; Fichtner *et al.*, 2003; Goehring *et al.*, 2003a, 2003b). Interessanterweise sind *ncs2Δ*- und *ncs6Δ*-Mutanten, in denen zwar keine tRNA-Thiomodifikation mehr stattfindet, aber eine Proteinmodifikation durch Urm1 weiterhin möglich ist, ebenso sensitiv gegenüber Koffein, Rapamycin oder Diamid wie ein *urm1Δ*-Stamm (Goehring *et al.*, 2003b; Leidel *et al.*, 2009). Außerdem lässt sich die Sensitivität einer *urm1Δ*-Mutante gegenüber diesen chemischen Stressoren durch Überexpression der hypomodifizierten tRNAs tQ<sup>UUG</sup>, tE<sup>UUC</sup> und tK<sup>UUU</sup> supprimieren (Leidel *et al.*, 2009). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die meisten Phänotypen im *urm1Δ*-Hintergrund vermutlich auf eine defekte tRNA-Thiolierung zurückgehen. Die Thiomodifikation des U<sub>34</sub> scheint somit wichtig zu sein, damit Zellen auf unterschiedliche Stressbedingungen reagieren können.

Ursprünglich wurde vermutet, dass die tRNA-Thiolierung zur Expression von Genen beiträgt, die für eine spezifische Stressantwort von Bedeutung sind (Leidel *et al.*, 2009). Demnach könnte sich ein Verlust der s<sup>2</sup>-Modifikation negativ auf deren Expression auswirken und eine verringerte Stresstoleranz zur Folge haben. In der Tat konnten Rezgui *et al.* (2013) demonstrieren, dass eine defekte tRNA-Thiolierung die Genexpression beeinträchtigt. So werden mRNAs, die reich an Codons sind, welche durch die thiolierten tRNAs tQ<sup>UUG</sup>, tE<sup>UUC</sup> und tK<sup>UUU</sup> abgelesen werden, in einer *urm1Δ*-Mutante schlechter translatiert. Doch die erhöhte Stresssensitivität von tRNA-Thiolierungsmutanten lässt sich vermutlich nicht allein durch eine veränderte Genexpression erklären. Neuere Untersuchungen zeigen, dass das Ribosom während der Translation nach Verlust der U<sub>34</sub>-Thiomodifikation spezifisch an den

Codons CAA und AAA pausiert (Nedialkova und Leidel, 2015). Diese gehemmte Translationselongation beeinflusst offensichtlich die cotranslationale Proteinfaltung, denn tRNA-Thiolierungsmutanten zeichnen sich durch eine vermehrte Bildung von Proteinaggregaten aus. Der daraus resultierende chronische proteotoxische Stress trägt vermutlich dazu bei, dass eine defekte U<sub>34</sub>-Thiolierung eine herabgesetzte Stresstoleranz zur Folge hat.

Obwohl ein vollständiger Verlust der tRNA-Thiomodifikation wahrscheinlich eher nachteilig ist, wurde mittlerweile durch verschiedene Arbeitsgruppen nachgewiesen, dass unter bestimmten Stressbedingungen sogar eine gezielte Reduktion der Urm1-vermittelten U<sub>34</sub>-Thiolierung stattfindet. In Hefe kommt es beispielsweise bei Schwefelmangel oder Hitzestress zu einem Rückgang in der s<sup>2</sup>-Modifikation des U<sub>34</sub> (Laxman *et al.*, 2013; Damon *et al.*, 2014). Es wird davon ausgegangen, dass eine reduzierte tRNA-Thiolierung unter diesen spezifischen Umweltbedingungen eher von Vorteil ist. Womöglich erlaubt dies eine bessere Anpassung der Translation an die gegebenen Stressbedingungen. Interessanterweise kodieren Gene, die reich an Codons sind, welche durch thiolierte tRNAs abgelesen werden, vorzugsweise für Proteine, die für anabole Prozesse von Bedeutung sind (Laxman *et al.*, 2013; Rezgui *et al.*, 2013). Einige davon sind selbst Teil der Translationsmaschinerie oder werden für die Biogenese von Ribosomen benötigt. Es ist bekannt, dass die Synthese dieser Proteine bei fehlender tRNA-Thiolierung herunterreguliert ist (Laxman *et al.*, 2013; Rezgui *et al.*, 2013). Bei Schwefelmangel oder Hitzestress hat eine reduzierte tRNA-Thiomodifikation womöglich einen vergleichbaren Effekt. Somit bewirkt eine Abnahme in der tRNA-Thiolierung vermutlich eine generelle Hemmung der Proteinsynthese und hat wahrscheinlich auch einen allgemeinen negativen Einfluss auf das Zellwachstum. Ein gehemmtes bzw. verlangsamtes Wachstum als Folge einer reduzierten U<sub>34</sub>-Thiolierung könnte dazu beitragen, dass Zellen bestimmte Stress- oder Mangelbedingungen besser überstehen können (Laxman *et al.*, 2013; Damon *et al.*, 2014).

#### 1.5.4 Urm1 als Proteinmodifikator

Seitdem Urm1 erstmals in Hefe beschrieben wurde, ist bekannt, dass es kovalent mit anderen Proteinen verknüpft werden kann (Furukawa *et al.*, 2000). Doch im Gegensatz zur Urm1-vermittelten tRNA-Thiolierung, sind wesentliche Punkte, die die sogenannte Urmylierung betreffen, immer noch unklar. Unter anderem wurde bisher nicht geklärt, wie eine spezifische Konjugation von Urm1 an Zielproteine erfolgt. Denn im Unterschied zur Ubiquitinierung konnten E2- oder E3-Enzyme als Komponenten des Urmylierungswegs bis heute nicht

nachgewiesen werden. Es ist jedoch bekannt, dass das E1-ähnliche Enzym Uba4 essentiell für die Urm1-Konjugation ist (Furukawa *et al.*, 2000). Außerdem konnten Van der Veen *et al.* (2011) zeigen, dass eine C-terminale Thiocarboxylierung des Modifikators erforderlich ist, damit dieser an Zielproteine angehängt werden kann (Abb. 3). Zum einen zeigt dies, dass die Urmylierung mechanistisch anders verläuft als die Ubiquitinierung. Zum anderen deutet dies aber auch darauf hin, dass beide Urm1-Funktionen vermutlich durch denselben Schwefeltransferweg vermittelt werden. Denn auch für die tRNA-Thiolierung ist die Bildung des Urm1-Thiocarboxylats erforderlich. Eine direkte Kopplung der beiden Urm1-vermittelten Funktionen liegt wahrscheinlich jedoch nicht vor. In einem *ncs2Δ*- oder *ncs6Δ*-Hintergrund, in dem die Thiomodifikation des U<sub>34</sub> nicht mehr möglich ist, bleibt die Urmylierung unverändert (Goehring *et al.*, 2003b). Im Gegensatz zur tRNA-Thiolierung ist somit nicht bekannt, was mit dem im Urm1-Thiocarboxylat enthaltenen Schwefel geschieht, wenn der Modifikator an andere Proteine angehängt wird. Ursprünglich wurde vermutet, dass Urm1 über schwefelhaltige Thioester- oder Acyldisulfidbindungen mit Cysteinresten in Zielproteinen verknüpft wird (Leidel *et al.*, 2009). Doch diese Vermutung konnte nicht bestätigt werden. So lassen sich Konjugate, die durch das humane Urm1-Homolog in menschlichen Zellen gebildet werden, durch die reduzierende Chemikalie Dithiothreitol (DTT) nicht auflösen (Van der Veen *et al.*, 2011). Außerdem wurde demonstriert, dass der Modifikator mit spezifischen Lysinresten in Zielproteinen verknüpft wird. Daher erfolgt eine Proteinmodifikation durch Urm1 vermutlich unter Ausbildung einer kovalenten Isopeptidbindung.

Nicht nur der Mechanismus der Urm1-Konjugation ist weitestgehend unklar, auch die Bedeutung der Urmylierung konnte bisher nicht geklärt werden. Durch phänotypische Analysen ließ sich eine funktionelle Relevanz der Urm1-vermittelten Proteinmodifikation nicht nachweisen. Zwar zeigen *urm1Δ*-Hefemutanten eine erhöhte Sensitivität gegenüber unterschiedlichen Stressoren, doch, wie zuvor erwähnt, gehen die meisten dieser Phänotypen allein auf eine defekte tRNA-Thiolierung zurück (Leidel *et al.*, 2009). Trotzdem gibt es Untersuchungen, die die Urmylierung mit der oxidativen Stressantwort in Verbindung bringen. Dementsprechend wurde gezeigt, dass die Urm1-Konjugation in *S. cerevisiae* und in menschlichen Zellen durch oxidativen Stress induziert wird (Van der Veen *et al.*, 2011). Hierbei bewirken jedoch verschiedene oxidative Stressoren wie z.B. Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oder Diamid, dass unterschiedliche Proteine in Hefe und in menschlichen Zellen urmyliert werden. Somit liegen abhängig vom verwendeten Stressor Unterschiede in der Urmylierungsspezifität vor. Trotz dessen konnte mit dem Peroxiredoxin Ahp1 (*alkyl*

*hydroperoxide reductase* 1) bisher nur ein spezifisches Urm1-Substrat in Hefe nachgewiesen werden (Goehring *et al.*, 2003a). Im Vergleich hierzu wurden in menschlichen Zellen 21 Proteine identifiziert, die in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Diamid urmyliert vorliegen (Van der Veen *et al.*, 2011). Einige davon spielen direkt eine Rolle bei der oxidativen Stressantwort, während andere beispielsweise an der tRNA-Modifikation beteiligt sind. Zu den nachgewiesenen, urmylierten Proteinen, die für die tRNA-Modifikation von Bedeutung sind, gehören IKAP, CTU1, CTU2 und MOCS3. Diese vier Proteine stellen die jeweiligen humanen Homologe von Elp1, Ncs2, Ncs6 und Uba4 aus Hefe dar. Der Nachweis dieser Proteine als Urm1-Substrate deutet darauf hin, dass die Modifikation des U<sub>34</sub> bei oxidativem Stress durch die Urmylierung beeinflusst wird. Doch auch andere physiologischen Prozesse könnten bei oxidativem Stress durch die Urm1-vermittelte Proteinmodifikation beeinflusst sein. Denn Proteine, die am Kerntransport, der RNA-Prozessierung oder der Ubiquitinierung beteiligt sind, wurden ebenfalls als Urmylierungssubstrate identifiziert. Trotzdem ist unklar, welche funktionelle Konsequenz die Urmylierung für ein Protein hat. Urm1 verfügt zwar über mehrere interne Lysinreste, doch eine Polyurmylierung ist bisher nicht gezeigt worden (Xu *et al.*, 2006). Somit unterscheidet es sich vom Ubiquitin, was die Variabilität der Proteinmodifikation betrifft. Und im Unterschied zum Ubiquitin ist Urm1 vermutlich auch nicht am Proteinabbau beteiligt. Proteine, die *in vivo* durch das humane Urm1-Homolog modifiziert werden, sind relativ stabil (Van der Veen *et al.*, 2011). Daher sind weitere Untersuchungen nötig, um zu klären, ob und wie Urm1 die Aktivität seiner Zielproteine regulieren kann.

## 1.6 Oxidativer Stress

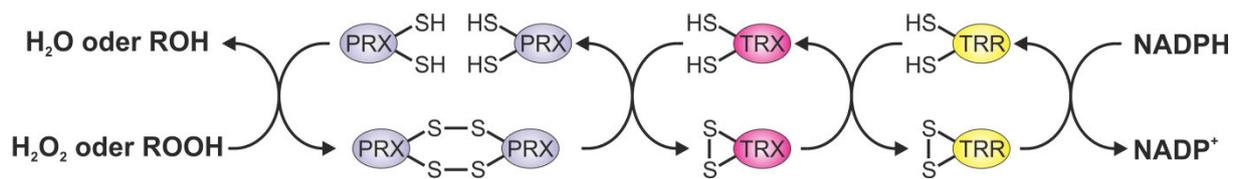
*reactive oxygen species* (ROS) sind toxische Verbindungen, die Abwandlungen des molekularen Sauerstoffs (O<sub>2</sub>) darstellen (Morano *et al.*, 2012). Typische ROS wie das Superoxid-Anion ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder das Hydroxyl-Radikal ( $\cdot\text{OH}$ ) entstehen im Zuge des normalen aeroben Metabolismus. In eukaryotischen Zellen erfolgt deren Bildung hauptsächlich über die mitochondriale Atmungskette, doch auch andere metabolische Prozesse können zu deren Entstehung beitragen (Murphy, 2009). In Hefe stellt beispielsweise die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren eine weitere ROS-Quelle dar (Hiltunen *et al.*, 2003). ROS entfalten ihre toxische Wirkung, indem sie unterschiedliche zelluläre Makromoleküle schädigen. So vermitteln sie beispielsweise eine Peroxidation von Lipiden oder eine Oxidation von Proteinen. Um solchen Schäden entgegenzuwirken, verfügen Zellen über spezifische Abwehrmechanismen. Einerseits können diese direkt zur ROS-Entgiftung

beitragen. Andererseits können sie aber auch daran beteiligt sein, Schäden zu beseitigen, die durch ROS verursacht wurden. Erst wenn diese Abwehrmechanismen nicht mehr in der Lage sind, auf ein Überangebot an ROS zu reagieren, liegt oxidativer Stress vor.

### 1.6.1 Das Thioredoxinsystem in Hefe

In Zellen gibt es unterschiedliche Antioxidantien, die zur ROS-Detoxifikation beitragen (Morano *et al.*, 2012). Hierzu zählen nicht nur kleinere Moleküle wie Glutathion (GSH) oder Ascorbinsäure. Auch verschiedene Enzyme können an der Beseitigung von ROS beteiligt sein. Zellen verfügen über mehrere solcher antioxidativen Enzyme, wobei deren Bildung bei oxidativem Stress meist hochreguliert ist. In der Regel unterscheiden sich diese nicht nur in ihrer intrazellulären Lokalisation, sondern auch in ihrer Spezifität gegenüber bestimmten ROS. So sind Superoxiddismutasen (SOD) an der Reduktion von  $\cdot\text{O}_2^-$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  beteiligt, wohingegen Katalasen  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$  umsetzen. Neben SODs und Katalasen stellen Peroxidasen ebenfalls antioxidative Enzyme dar. Hinsichtlich ihrer Funktionsweise unterscheiden sich diese jedoch von SODs und Katalasen. Denn die Aktivität der Peroxidasen beruht nicht auf Redox-aktiven Metallionen, sondern auf einem katalytischen bzw. peroxidatischen Cysteinrest (Herrero *et al.*, 2008). Über die Thiolgruppe (-SH) des peroxidatischen Cysteins können Peroxide zu entsprechenden Alkoholen reduziert werden. Dabei kommt es ebenfalls zur Oxidation der Thiolgruppe, sodass diese in einen Sulfensäurerest (-SOH) umgewandelt wird. Erst nach Reduktion des Sulfensäurerests kann eine Peroxidase erneut an der ROS-Detoxifikation teilhaben. Für die Reduktion können unterschiedliche Systeme genutzt werden. Je nachdem welches System hierbei als Elektronendonator dient, lassen sich Peroxidasen in zwei Klassen einteilen. Die Glutathion Peroxidasen nutzen beispielsweise GSH als Elektronenquelle. Im Gegensatz dazu erfolgt die Reduktion der auch als Peroxiredoxine bezeichneten Thioredoxin Peroxidasen durch das Thioredoxinsystem.

Dieses System besteht aus zwei Komponenten. Neben Thioredoxinen umfasst es ebenfalls Thioredoxin-Reduktasen. Die Thioredoxine wirken als Oxidoreduktasen und vermitteln die eigentliche Reduktion der Peroxiredoxine (Abb. 5) (Holmgren, 1989). Hierbei kommt es zur Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke zwischen zwei konservierten Cysteinen, die im aktiven Zentrum der Thioredoxine zu finden sind. Die anschließende Auflösung der Disulfidbrücke geschieht über die Thioredoxin-Reduktasen, wobei hierfür NADPH als Elektronenquelle verwendet wird.



**Abbildung 5: Aufbau und Funktionsweise des Thioredoxinsystems.**

Beispielhaft ist hier die Oxidation und Reduktion von typischen 2-Cys-Peroxiredoxinen (PRX) dargestellt. Diese sind in der Lage, anorganische und organische Peroxide wie z.B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Alkylhydroperoxide (ROOH) zu reduzieren. Durch den Aufbau von intermolekularen Disulfidbrücken kommt es daraufhin zur Bildung eines Homodimers, das aus zwei Peroxiredoxinen besteht. Thioredoxine (TRX) wirken als Oxidoreduktasen und lösen das Homodimer auf. Dabei entsteht eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen zwei konservierten Cysteinresten, die im aktiven Zentrum der Thioredoxine vorliegen. Die anschließende Reduktion der oxidierten Thioredoxine geschieht über Thioredoxin-Reduktasen (TRR), die hierfür NADPH als Elektronendonator verwenden. Bei der Reduktion der Thioredoxine kommt es zur Übertragung der intramolekularen Disulfidbrücke auf zwei konservierte Cysteinreste, die im aktiven Zentrum der Thioredoxin-Reduktasen vorhanden sind. Abbildung verändert nach Iwai *et al.* (2010) und Morano *et al.* (2012).

In *S. cerevisiae* sind zwei voneinander getrennte Thioredoxinsysteme vorhanden. Während das eine im Cytosol zu finden ist, liegt das andere in den Mitochondrien vor. Das cytosolische Thioredoxinsystem umfasst neben den zwei Thioredoxinen Trx1 und Trx2 auch die Thioredoxin-Reduktase Trr1 (Gonzalez Porqué *et al.*, 1970; Gan, 1991). Eine Hefemutante, der sowohl Trx1 als auch Trx2 fehlen, ist zwar weiterhin lebensfähig, sie zeigt jedoch eine erhöhte Sensitivität gegenüber anorganischen oder organischen Peroxiden (Garrido und Grant, 2002). Darüber hinaus führt ein Verlust beider Thioredoxine zu einer Auxotrophie für schwefelhaltige Aminosäuren und zu einer verlängerten S-Phase des Zellzyklus (Muller *et al.*, 1991). Dementsprechend wird das cytosolische Thioredoxinsystem nicht nur für die oxidative Stressantwort benötigt. Es dient auch als Elektronendonator für Enzyme, welche die Biosynthese von schwefelhaltigen Aminosäuren oder von Desoxyribonukleotiden vermitteln (Muller *et al.*, 1991; Koc *et al.*, 2006; Carnier *et al.*, 2007). Obwohl das cytosolische Thioredoxinsystem über zwei Thioredoxine verfügt, tragen beide in unterschiedlich starkem Maße zur oxidativen Stressantwort bei. So ist eine *trx2*Δ-Hefemutante hypersensitiv gegenüber Peroxiden, wohingegen eine *trx1*Δ-Mutante ebenso resistent ist wie ein WT-Stamm (Garrido und Grant, 2002). Außerdem wurde gezeigt, dass die *TRX2*-Expression bei oxidativem Stress stärker induziert wird als die des *TRX1*-Gens. Demnach spielt Trx2 womöglich eine wichtigere Rolle bei der oxidativen Stressantwort. Das ebenfalls in Hefe vorhandene mitochondriale Thioredoxinsystem umfasst das Thioredoxin Trx3 und die Thioredoxin-Reduktase Trr2 (Pedrajas *et al.*, 1999). Dieses System trägt vermutlich dazu bei, ROS zu beseitigen, die im Rahmen der mitochondrialen Atmung anfallen. Trotzdem wurde

nachgewiesen, dass eine *trr2Δ*-Mutante im Unterschied zu einem *trx3Δ*-Stamm eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress zeigt. Demnach kann Trr2 vermutlich unabhängig von Trx3 noch auf einem weiteren Weg zur oxidativen Stressantwort beitragen.

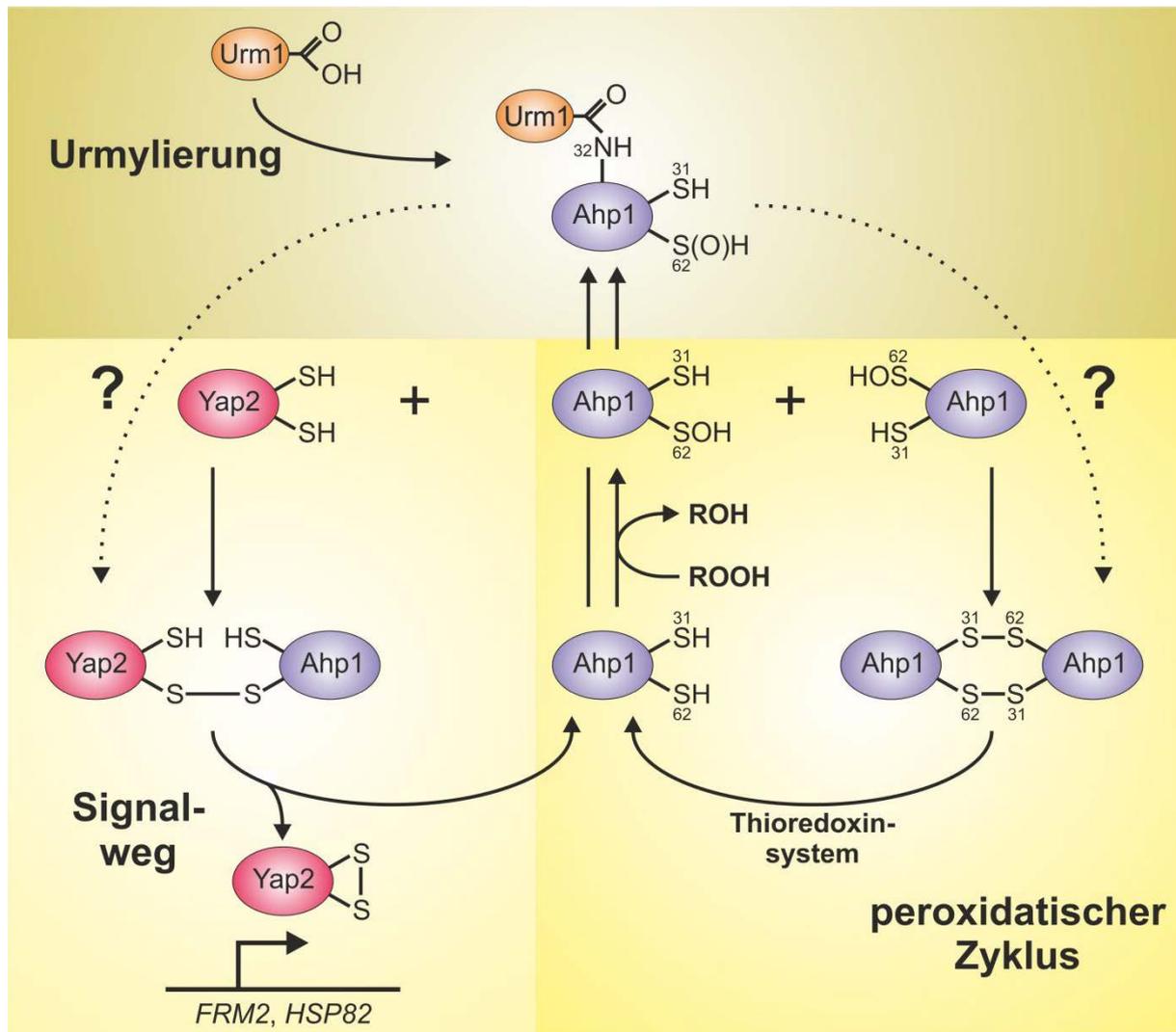
### 1.6.2 Ahp1 ist ein Teil der oxidativen Stressantwort

In *S. cerevisiae* konnten bisher fünf verschiedene Peroxiredoxine nachgewiesen werden (Herrero *et al.*, 2008; Morano *et al.*, 2012). Diese unterschieden sich nicht nur in ihrer Lokalisation, sondern auch in ihrer Funktionsweise voneinander. So gehört Prx1 zu den 1-Cys-Peroxiredoxinen, während Ahp1, Dot5, Tsa1 und Tsa2 den 2-Cys-Peroxiredoxinen zugeordnet werden (Park *et al.*, 2000; Pedrajas *et al.*, 2000; Cha *et al.*, 2003). Letztere unterscheiden sich von 1-Cys-Peroxiredoxinen, weil diese zusätzlich zum peroxidatischen Cystein noch über ein sogenanntes *resolving* Cystein verfügen. Je nachdem wie dieses *resolving* Cystein zur Reduktion von Peroxiden beiträgt, werden auch die 2-Cys-Peroxiredoxine unterschieden. Typische 2-Cys-Peroxiredoxine bilden als Teil ihres katalytischen Zyklus Homodimere aus (Chae *et al.*, 1994). Diese entstehen durch den Aufbau einer intermolekularen Disulfidbrücke zwischen dem oxidierten peroxidatischen Cystein des einen Monomers und dem *resolving* Cystein des anderen Monomers (Abb. 5). Im Gegensatz dazu kommt es im katalytischen Zyklus von atypischen 2-Cys-Peroxiredoxinen nicht zur Bildung eines Homodimers. Deren aktive Cysteinreste werden jedoch für den Aufbau einer intramolekularen Disulfidbrücke benötigt (Seo *et al.*, 2000).

Ahp1, Tsa1 oder Tsa2 stellen typische 2-Cys-Peroxiredoxine dar, die hauptsächlich im Cytoplasma vorliegen (Chae *et al.*, 1994; Park *et al.*, 2000). Doch im Unterschied zu Tsa1 und Tsa2 besitzt Ahp1 eine höhere Spezifität gegenüber Alkylhydroperoxiden (ROOH) als gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Jeong *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999a). Somit spielt es in Hefe womöglich eine wichtige Rolle bei der Reduktion von organischen Peroxiden. Dementsprechend zeigen *ahp1Δ*-Mutanten auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber *tert*-Butylhydroperoxid (t-BOOH), welches ein synthetisches Alkylhydroperoxid darstellt (Lee *et al.*, 1999a; Park *et al.*, 2000). Als 2-Cys-Peroxiredoxin besitzt Ahp1 ein peroxidatisches Cystein an Position 62 (C62) und ein *resolving* Cystein an Position 31 (C31) (Jeong *et al.*, 1999; Lian *et al.*, 2012). Beide Cysteine werden womöglich dafür benötigt, dass Ahp1 seinen peroxidatischen Zyklus durchlaufen kann (Abb. 6). Hierbei kommt es nach Oxidation des C62 zur Bildung eines Homodimers, das anschließend durch das cytosolische Thioredoxinsystem wieder reduziert wird (Iwai *et al.*, 2010). Durch seinen peroxidatischen Zyklus ist Ahp1 in der Lage, organische Peroxide direkt zu reduzieren. Doch neuere Untersuchungen deuten darauf hin,

dass das Peroxiredoxin vermutlich noch auf einem weiteren Weg zur oxidativen Stressantwort beitragen kann. So wurde gezeigt, dass Ahp1 bei oxidativem Stress mit Yap2 interagiert (Iwai *et al.*, 2010). Yap2 ist ein Transkriptionsfaktor, der vermutlich ebenfalls an der Abwehr von oxidativem Stress beteiligt ist (Bossier *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1993). Dementsprechend zeichnen sich Hefemutanten, deren *YAP2*-Gen deletiert ist, durch eine erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- oder t-BOOH-Sensitivität aus (Stephen *et al.*, 1995; Iwai *et al.*, 2010). Darüber hinaus konnte eine t-BOOH-abhängige Akkumulation von Yap2 im Zellkern nachgewiesen werden (Bilsland *et al.*, 2004). Diese induzierte Akkumulation trägt vermutlich dazu bei, dass Yap2-abhängige Gene aktiviert werden, die an der oxidativen Stressantwort beteiligt sind. Doch der genaue Mechanismus, der zur Anreicherung von Yap2 im Zellkern führt, ist bisher unklar. Beim Transkriptionsfaktor Yap1, der strukturell ähnlich aufgebaut ist wie Yap2, kommt es bei oxidativem Stress zur Oxidation von spezifischen Cysteinresten, die daraufhin intramolekulare Disulfidbrücken aufbauen (Delaunay *et al.*, 2000, 2002). Durch diese Disulfidbrücken wird die Struktur des Yap1 so verändert, dass ein Kernexportsignal nicht mehr zugänglich ist und daraufhin eine Anreicherung des Transkriptionsfaktors im Nukleus erfolgt. Vermutlich findet die Yap2-Akkumulation im Zellkern über einen vergleichbaren Mechanismus statt. Hierbei spielt Ahp1 wahrscheinlich eine wichtige Rolle. Durch *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen wurde gezeigt, dass Ahp1 nicht nur die Oxidation von Yap2 vermittelt, sondern auch am Aufbau von intramolekularen Disulfidbrücken im Transkriptionsfaktor beteiligt ist (Iwai *et al.*, 2010). Darüber hinaus wurde ebenfalls nachgewiesen, dass Ahp1 für die t-BOOH-induzierte Expression von Yap2-Zielgenen benötigt wird. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Aktivierung von Yap2 bei oxidativem Stress durch Ahp1 vermittelt wird. Dementsprechend scheint Ahp1 neben seiner eigentlichen Funktion als Peroxiredoxin noch eine Signalfunktion in Hefe zu haben.

Obwohl Urm1 verschiedene Proteine modifizieren kann, stellt Ahp1 bisher das einzige bekannte Urm1-Modifikationssubstrat in Hefe dar (Goehring *et al.*, 2003a). Durch die Analyse von *ahp1*-Punktmutanten wurde gezeigt, dass das Peroxiredoxin am Lysin an Position 32 (K32) durch Urm1 modifiziert wird (Abb. 6) (Van der Veen *et al.*, 2011). Somit erfolgt eine Modifikation von Ahp1 direkt neben dem C31. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass sich die Urm1-Modifikation auf den peroxidatischen Zyklus von Ahp1 auswirkt. Trotzdem ist es ebenso möglich, dass auch die vermutete Signalfunktion von Ahp1 durch die Urm1-Konjugation beeinflusst wird. Weiterführende Untersuchungen, die den Einfluss der Urm1-Modifikation auf beide Ahp1-Funktionen betrachten, wurden bisher jedoch nicht durchgeführt.



**Abbildung 6: Ahp1 trägt vermutlich auf zwei Wegen zur oxidativen Stressantwort bei.**

Über seinen peroxidatischen Zyklus kann Ahp1 Alkylhydroperoxide (ROOH) direkt reduzieren. Hierbei kommt es zur Oxidation des peroxidatischen Cysteins (C62), wodurch dessen Thiolgruppe (-SH) zu einem Sulfensäurerest (-SOH) umgesetzt wird. Durch Reaktion des oxidierten C62 mit dem *resolving* Cystein (C31) eines weiteren Ahp1-Monomers kommt es zum Aufbau einer intermolekularen Disulfidbrücke. Dies führt zur Bildung eines Homodimers, das anschließend durch das cytosolische Thioredoxinsystem wieder reduziert wird. Es wird vermutet, dass Ahp1 ebenfalls an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Yap2 beteiligt ist. Womöglich kommt es hierbei nach Oxidation des Ahp1 zum Aufbau einer intermolekularen Disulfidbrücke mit Yap2. Durch die Übertragung der Disulfidbrücke auf Yap2 erfolgt vermutlich eine Akkumulation des Transkriptionsfaktors im Zellkern. Dies führt zur Aktivierung von Genen (z.B. *FRM2* und *HSP82*), die wahrscheinlich zur oxidativen Stressantwort beitragen. Ahp1 kann durch Urm1 am Lysin an Position 32 (K32) modifiziert werden. Hierbei ist jedoch unbekannt, wie der Oxidationsstatus von Ahp1 dessen Urmylierung beeinflusst. Ebenso wenig wurde bisher untersucht, wie sich die Urm1-Konjugation auf eine der beiden möglichen Ahp1-Funktionen auswirkt.

## 1.7 Zielstellung der Arbeit

Urm1 ist ein bifunktionales UBL, das als Schwefelträger an der tRNA-Thiolierung beteiligt ist und als posttranslationaler Modifikator die Urm1-Mylierung von Proteinen vermittelt (Furukawa *et al.*, 2000; Nakai *et al.*, 2008; Leidel *et al.*, 2009; Noma *et al.*, 2009). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass die Urm1-abhängige tRNA-Thiolierung wichtig ist, damit in eukaryotischen Zellen eine effiziente Translation erfolgt (Rezgui *et al.*, 2013; Nedialkova und Leidel, 2015). Doch im Unterschied hierzu ist die Bedeutung der Urm1-Mylierung immer noch unbekannt. Neuere Befunde zeigen, dass oxidativer Stress die Urm1-Konjugation induziert (Van der Veen *et al.*, 2011). Demzufolge könnte die Urm1-Mylierung Teil der oxidativen Stressantwort sein. Dies wird auch dadurch unterstützt, dass das Peroxiredoxin Ahp1 in Hefe urmyliert vorliegt (Goehring *et al.*, 2003a). Um zu überprüfen, ob die Urm1-Mylierung an der oxidativen Stressantwort beteiligt ist, sollte die Urm1-Konjugation an Ahp1 näher untersucht werden. Hierbei sollte auch geklärt werden, wie sich die Urm1-Mylierung auf eine der beiden möglichen Ahp1-Funktionen auswirkt.

Des Weiteren sollten im Rahmen dieser Arbeit weitere Urm1-Zielproteine in Hefe identifiziert werden. So ist in *S. cerevisiae* bisher nur Ahp1 als Urm1-Substrat bekannt (Goehring *et al.*, 2003a). Durch den Nachweis neuer Urm1-Zielproteine sollten weitere physiologische Prozesse aufgezeigt werden, die die Urm1-Mylierung möglicherweise beeinflussen kann.

Nicht nur die Bedeutung der Urm1-Mylierung ist bisher unbekannt. Auch der Mechanismus, der zur Urm1-Konjugation führt, ist weitestgehend unklar. Es ist bekannt, dass nicht nur für die tRNA-Thiolierung, sondern auch für die Urm1-Mylierung die Bildung eines Urm1-Thiocarboxylats erforderlich ist (Leidel *et al.*, 2009; Noma *et al.*, 2009; Van der Veen *et al.*, 2011). Demnach wird die Urm1-Mylierung vermutlich durch denselben Schwefeltransferweg vermittelt, der auch zur tRNA-Thiolierung beiträgt. Doch weiterführende Untersuchungen, die diese Vermutung bestätigen, wurden bisher nicht durchgeführt. Dementsprechend sollte eine Beteiligung dieses Schwefeltransferwegs an der Urm1-Mylierung überprüft werden. In diesem Zusammenhang sollte ebenfalls untersucht werden, wie das E1-ähnliche Uba4 zur Urm1-Aktivierung beiträgt.

Darüber hinaus sollte auch eine mögliche Konservierung beider Urm1-Funktionen in Eukaryoten überprüft werden. Während eine Konservierung der Schwefelträgerfunktion von Urm1 bereits demonstriert wurde, konnte dies für die Urm1-Mylierung bisher nicht nachgewiesen werden (Nakai *et al.*, 2012). Dementsprechend sollte untersucht werden, ob Urm1 in Hefe durch sein humanes Homolog funktional ersetzt werden kann.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Analyse der Urmyleerung in Hefe

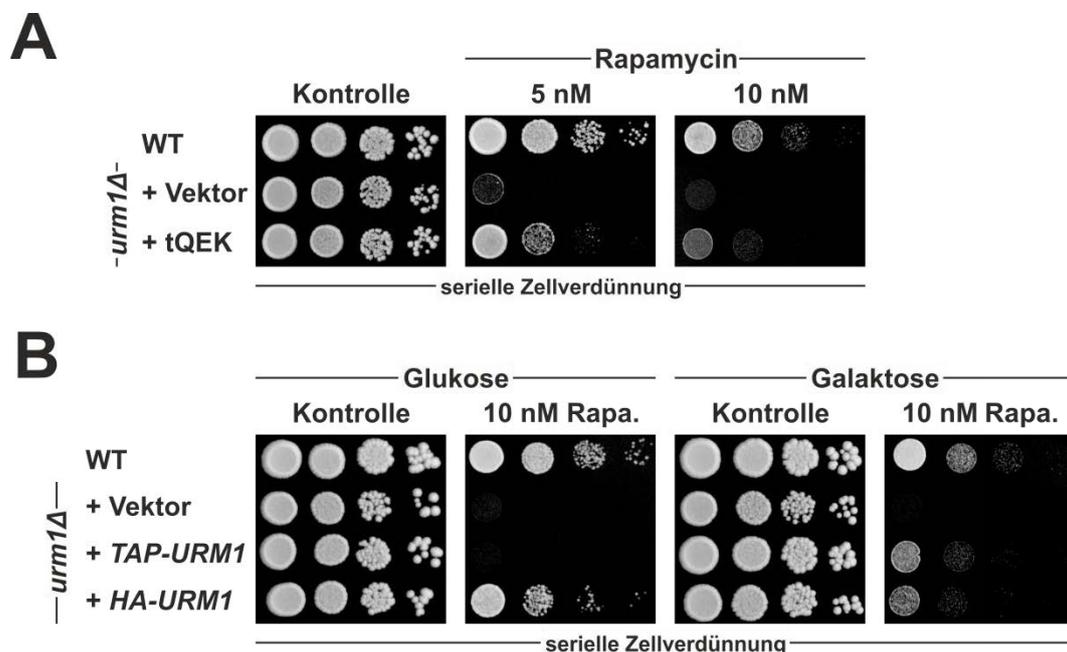
Urm1 ist ein bifunktionales Ubiquitin-ähnliches Protein. Zum einen agiert es als Schwefelträger, der im Zusammenspiel mit anderen Proteinen die Thiolierung des *wobble*-Uridins der tRNAs tQ<sup>UUG</sup>, tE<sup>UUC</sup> und tK<sup>UUU</sup> vermittelt (Nakai *et al.*, 2008; Leidel *et al.*, 2009; Noma *et al.*, 2009). Zum anderen kann es ähnlich dem Ubiquitin als posttranslationaler Proteinmodifikator fungieren und kovalent mit anderen Proteinen konjugieren (Furukawa *et al.*, 2000; Van der Veen *et al.*, 2011). Dieser Prozess der Proteinmodifikation durch Urm1 wird als Urmyleerung bezeichnet. Obwohl nachgewiesen wurde, dass die Urmyleerung in Hefe und im Menschen durch oxidativen Stress induziert werden kann, ist nicht bekannt, welche Bedeutung die Modifikation von Zielproteinen durch Urm1 hat (Van der Veen *et al.*, 2011). So wurden zwar für Hefemutanten mit einer *URM1*-Deletion verschiedene Phänotypen beschrieben, diese scheinen jedoch alle auf das Fehlen der tRNA-Thiolierung zurückzugehen (Fichtner *et al.*, 2003; Goehring *et al.*, 2003a, 2003b; Leidel *et al.*, 2009). Demnach sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Bedeutung der Urmyleerung als posttranslationalen Modifikationsweg aufzuklären.

#### 2.1.1 Nachweis der Urmyleerung mittels EMSA

In früheren Arbeiten konnte die Konjugation von Urm1 an andere Proteine mittels *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) nachgewiesen werden (Furukawa *et al.*, 2000; Goehring *et al.*, 2003a; Goehring *et al.*, 2003b; Van der Veen *et al.*, 2011). Hierfür wurden meist modifizierte Varianten des Urm1-Proteins verwendet, die an ihrem N-Terminus ein zusätzliches Epitop trugen. Um die Urmyleerung in Hefe mit dieser Methode näher untersuchen zu können, wurde daher eine Urm1-Variante erzeugt, die mit einem N-terminalen TAP-Epitop versehen war.

Das resultierende TAP-Urm1 wurde phänotypisch auf seine Funktionalität in Hefe überprüft. Hierfür wurde untersucht, ob sich die Sensitivität einer *urm1Δ*-Mutante gegenüber dem TOR-Inhibitor Rapamycin durch Einbringen des *TAP-URM1*-Gens supprimieren lässt. Wie bereits von Leidel *et al.* (2009) gezeigt, führte eine Überexpression der hypomodifizierten tRNAs tQ<sup>UUG</sup>, tE<sup>UUC</sup> und tK<sup>UUU</sup> zu einer Suppression der Rapamycinsensitivität des *urm1Δ*-Stamms (Abb. 7A). Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass der Phänotyp dieser Mutante nicht auf ausbleibender Urmyleerung, sondern auf fehlender tRNA-

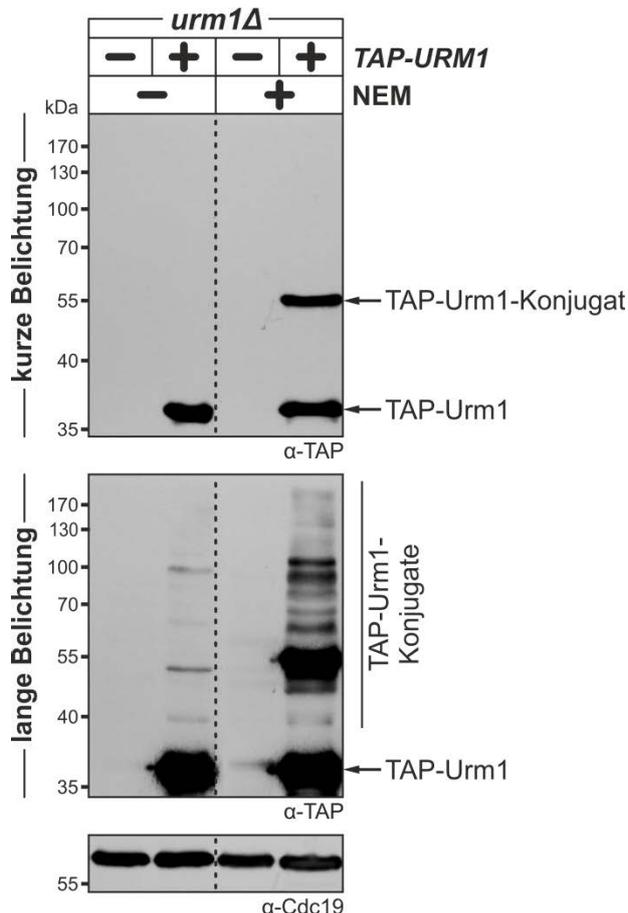
Thiolierung beruht. Eine Suppression der Rapamycinsensitivität durch TAP-Urm1 würde daher auf eine Wiederherstellung der tRNA-Thiolierung im *urm1Δ*-Stamm hindeuten. Tatsächlich supprimierte *TAP-URMI* die Rapamycinsensitivität der *urm1Δ*-Mutante. Da das *TAP-URMI*-Gen jedoch unter der Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors stand, erlaubte es nur auf Galaktose-haltigem Medium eine erhöhte Resistenz gegenüber Rapamycin (Abb. 7B). Auf Glukose-haltigem Medium war keine Suppression des Phänotyps nachweisbar. Interessanterweise zeigten *urm1Δ*-Mutanten, die entweder das *TAP-URMI* oder *HA-URMI* exprimierten, eine vergleichbare Resistenz gegenüber Rapamycin auf Galaktose-haltigem Medium. Demnach scheint TAP-Urm1 ebenso funktional zu sein, wie eine HA-Epitop-markierte Variante des Modifikators, die bereits in früheren Studien zur Analyse der Urmyleierung in Hefe verwendet wurde (Furukawa *et al.*, 2000).



**Abbildung 7: Verlust von *URMI* führt zu einer erhöhten Rapamycinsensitivität.**

**A)** Durch Überexpression der hypomodifizierten tRNAs tQ<sup>UUG</sup>, tE<sup>UUC</sup> und tK<sup>UUU</sup> (tQEK) wird die Rapamycinsensitivität einer *urm1Δ*-Mutante supprimiert. **B)** Nach Galaktose-induzierter *TAP-URMI*-Expression zeigt sich eine erhöhte Rapamycinresistenz des *urm1Δ*-Stammes. Während das Plasmid-kodierte *TAP-URMI*-Gen unter der Kontrolle des Galaktose-induzierbaren *GALI*-Promotors stand, erfolgte die Expression von *HA-URMI* über den ursprünglichen *URMI*-Promotor, der auf Glukose- und Galaktose-haltigem Medium aktiv ist. Serielle Verdünnungen der dargestellten Stämme wurden auf Vollmedium aufgetropft, welches unterschiedliche Konzentrationen an Rapamycin enthielt. Die Inkubation erfolgte für 3 (**A**) bzw. 4 (**B**) Tage bei 30°C.

Die phänotypischen Tests deuteten darauf hin, dass TAP-Urm1 in der Lage ist, tRNA-Thiolierung zu vermitteln. Um zu zeigen, dass es auch Urmyleerung erlaubt, wurde die Proteinmodifikation durch TAP-Urm1 mittels EMSA untersucht. Hierfür erfolgte eine Proteinextraktion aus der mit *TAP-URM1* transformierten *urm1Δ*-Mutante. Die Extraktion fand dabei in An- und Abwesenheit des Isopeptidaseinhibitors N-Ethylmaleimid (NEM) statt. NEM hemmt Ubiquitin-dekonjugierende Enzyme und wurde darüber hinaus als Stabilisator von Urm1-Konjugaten nachgewiesen (Goehring *et al.*, 2003a, 2003b). In der Tat konnte dessen stabilisierende Wirkung auf die TAP-Urm1-vermittelte Urmyleerung bestätigt werden. Wenn NEM während der Proteinextraktion fehlte, war in einem  $\alpha$ -TAP-*Western Blot* nach kurzer Belichtung des Films nur freies TAP-Urm1 (ca. 35 kDa) detektierbar (Abb. 8). War jedoch NEM vorhanden, konnte ein zusätzliches ca. 55 kDa großes TAP-Urm1-Konjugat nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte eine längere Belichtung des  $\alpha$ -TAP-Immunoblots, dass nach Proteinextraktion mit NEM wesentlich mehr Urmyleerungsbanden sichtbar waren. Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse die Funktionalität des TAP-Urm1. Da es kovalent andere Proteine modifiziert, scheint es für weiterführende Untersuchungen der Urmyleerung in Hefe geeignet zu sein.

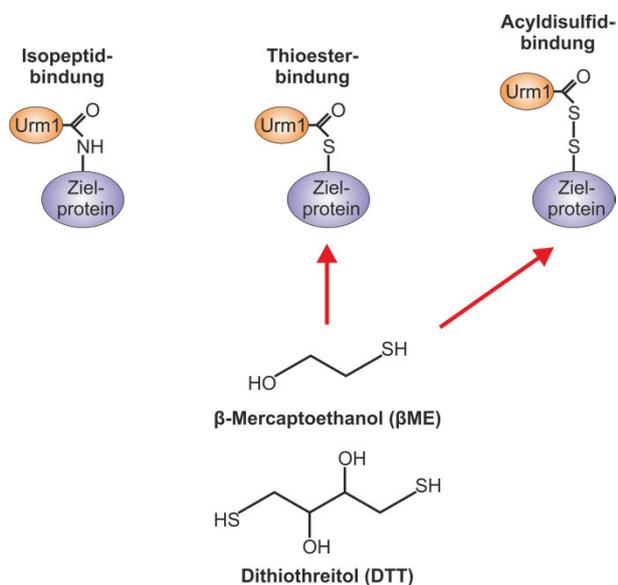


**Abbildung 8: Nachweis der NEM-stabilisierten TAP-Urm1-Konjugation mittels EMSA.**

Es erfolgte eine Proteinextraktion aus einem *urm1Δ*-Stamm, der das *TAP-URM1*-Gen enthielt, und zur Kontrolle aus einem *urm1Δ*-Stamm, der das Gen nicht trug. Die Proteinextraktion fand dabei in Ab- oder Anwesenheit von 10 mM NEM statt. Anschließend wurden die Extrakte mittels SDS-PAGE aufgetrennt und der *Western Blot* wurde mit spezifischen  $\alpha$ -TAP-Antikörpern entwickelt. Zusätzlich fand eine  $\alpha$ -Cdc19-Detektion statt (Ladekontrolle: Pyruvatkinase Cdc19). Freies TAP-Urm1 und entsprechende Konjugate sind hervorgehoben. Für diese Darstellung wurden weitere Spuren der jeweiligen *Western Blots* ausgespart (gestrichelte Linie).

### 2.1.2 Urm1 bildet $\beta$ -Mercaptoethanol-sensitive Konjugate

Es wurde gezeigt, dass das Peroxiredoxin Ahp1 an einem Lysinrest durch Urm1 modifiziert wird (Van der Veen *et al.*, 2011). Auf diesem Befund beruht die Annahme, dass die kovalente Proteinmodifikation durch Urm1 unter Ausbildung einer Isopeptidbindung stattfindet (Abb. 9). Da für die Urm1-Aktivierung der Einbau eines Schwefelatoms in Form eines Thiocarboxylats notwendig zu sein scheint, wurde vermutet, dass der Modifikator ebenfalls an Cysteinreste in Zielproteinen angehängt werden kann (Leidel *et al.*, 2009). Solch eine kovalente Modifikation könnte dabei zur Ausbildung von Thioester- oder Acyldisulfidbindungen führen, die im Gegensatz zu Isopeptidbindungen sensitiv gegenüber reduzierenden Chemikalien wie DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ ME) sind (Abb. 9). In menschlichen Zellen zeigte sich aber, dass das humane Urm1-Homolog keine DTT-sensitiven Konjugate bildet (Van der Veen *et al.*, 2011). Demnach scheint eine kovalente Modifikation von Cysteinresten während der Urm1-Modifikation nicht möglich zu sein. Bisher wurden jedoch keine Untersuchungen durchgeführt, die diesen Befund auch für das Urm1-Modifikationssystem in Hefe bestätigen.



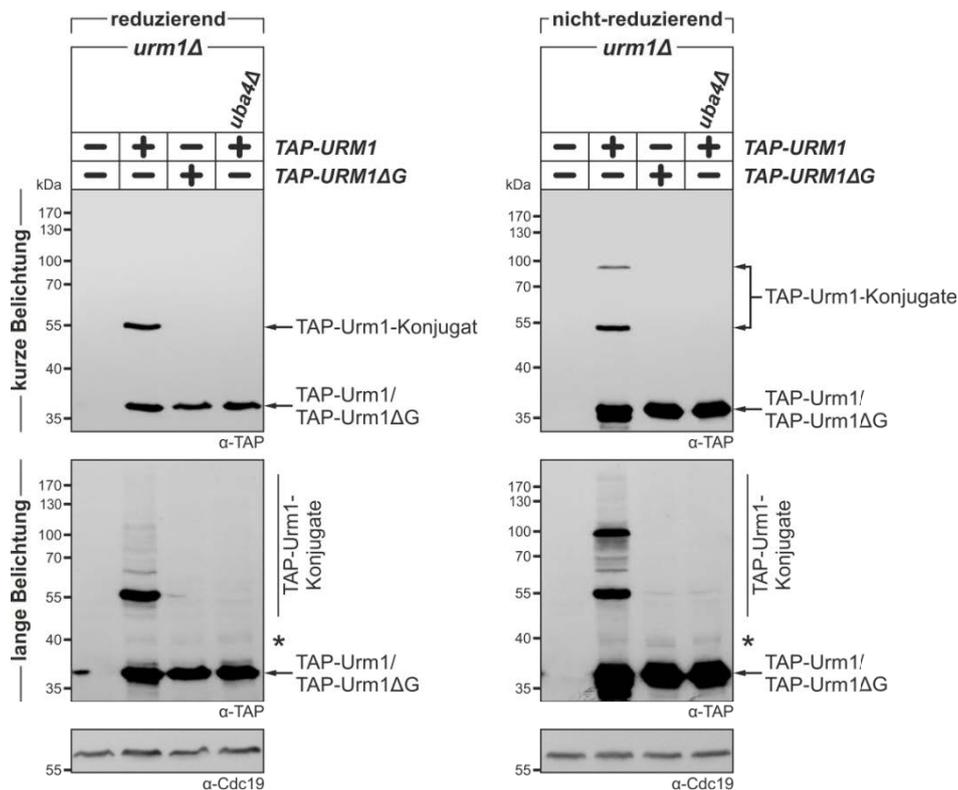
**Abbildung 9: Darstellung möglicher Verknüpfungen, die Urm1 mit seinen Zielproteinen eingehen kann.**

Urm1 modifiziert Lysinreste unter Ausbildung einer Isopeptidbindung (Van der Veen *et al.*, 2011). Ebenso ist es denkbar, dass der Modifikator kovalent an Cysteinreste angehängt wird. Hierbei könnte es zur Bildung von Thioester- oder Acyldisulfidbindungen kommen. Diese sind im Gegensatz zur Isopeptidbindung sensitiv gegenüber  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ ME) oder Dithiothreitol (DTT).

Dementsprechend wurde überprüft, ob es in einem mit *TAP-URM1* komplementierten *urm1* $\Delta$ -Stamm zur Bildung von NEM-stabilisierten Urm1-Konjugaten kommt, die sensitiv gegenüber  $\beta$ ME sind. Tatsächlich zeigte sich im  $\alpha$ -TAP-*Western Blot*, dass ohne  $\beta$ ME-Behandlung der Proteinextrakte (nicht-reduzierend) mehr Urm1-Konjugate nachweisbar waren als mit Behandlung der Proben (reduzierend) (Abb. 10). So war beispielsweise unter nicht-reduzierenden Bedingungen ein prominentes, ca. 100 kDa großes Urm1-Modifikationssignal nachweisbar, das unter reduzierenden Bedingungen nicht detektiert werden konnte.

Interessanterweise war die Bildung der  $\beta$ ME-resistenten und -sensitiven Konjugate abhängig vom C-terminalen Glycin des Urm1 und von Uba4, da die entsprechenden Urmylierungssignale sowohl in einem *urm1 $\Delta$* -Stamm, transformiert mit *TAP-URM1 $\Delta$ G*, als auch in einem *uba4 $\Delta$* -Hintergrund nicht nachweisbar waren. Demnach ist wahrscheinlich derselbe Aktivierungsmechanismus für den Aufbau von  $\beta$ ME-resistenten und -sensitiven Urm1-Konjugaten notwendig.

Insgesamt widersprechen diese Befunde den Beobachtungen zur Urmylierung in menschlichen Zellen, da die Bildung von  $\beta$ ME-sensitiven Urm1-Konjugaten in Hefe nachgewiesen werden konnte. Demzufolge ist Urm1 womöglich auch in der Lage, Cysteinreste in Zielproteinen zu modifizieren.



**Abbildung 10: In Hefe kommt es zur Bildung von  $\beta$ ME-sensitiven Urm1-Konjugaten.**

Aus einem *urm1 $\Delta$* -Stamm, transformiert mit *TAP-URM1* oder *TAP-URM1 $\Delta$ G*, und aus einer *urm1 $\Delta$ uba4 $\Delta$* -Mutante, die das *TAP-URM1* enthielt, wurden Proteine extrahiert. Die Extrakte wurden unter reduzierenden oder nicht-reduzierenden Bedingungen (mit oder ohne  $\beta$ ME) aufbereitet, bevor die NEM-stabilisierte Urmylierung mittels EMSA überprüft wurde. Durch einen  $\alpha$ -TAP-Western Blot wurde die Bildung von TAP-Urm1-Konjugaten nachgewiesen, während parallel auch eine  $\alpha$ -Cdc19-Detektion stattfand (Ladekontrolle). Durch ein Sternchen (\*) ist eine modifizierte Form des TAP-Urm1 hervorgehoben, die unabhängig vom C-terminalen Glycin des Modifikators oder unabhängig von Uba4 gebildet wurde.

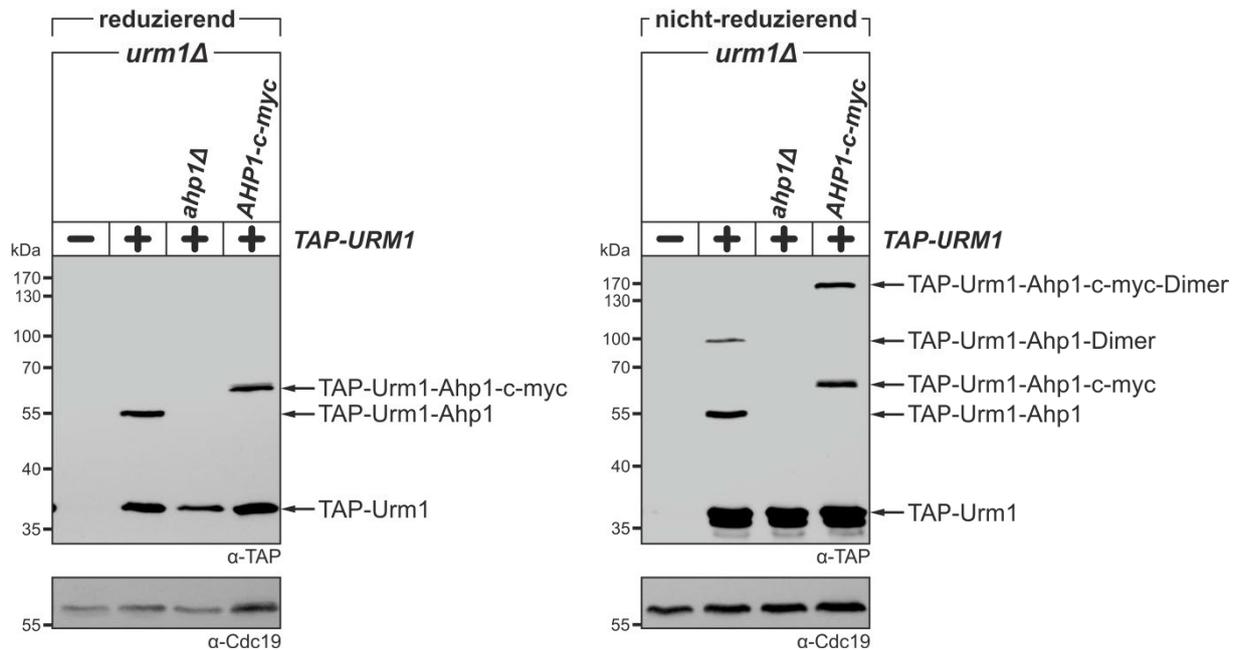
## 2.2 Die Urmylieung des Peroxiredoxins Ahp1

Es wird angenommen, dass die Urmylieung Teil der oxidativen Stressantwort sein könnte (Goehring *et al.*, 2003a; Van der Veen *et al.*, 2011). Bisher konnten jedoch keine eindeutigen Hinweise hierfür geliefert werden. So ist zwar bekannt, dass Urm1 das Peroxiredoxin Ahp1 modifiziert, welches in Hefe an der Bekämpfung von oxidativem Stress beteiligt ist (Lee *et al.*, 1999a; Goehring *et al.*, 2003a; Van der Veen *et al.*, 2011). Trotzdem ist nicht klar, ob diese Modifikation einen Einfluss auf die Funktion von Ahp1 hat. Weiterführende Untersuchungen hierzu könnten daher neue Einblicke erlauben, welche Rolle die Urmylieung während der oxidativen Stressantwort spielt.

### 2.2.1 Ahp1 wird als Monomer und Dimer durch Urm1 modifiziert

Bisherige Untersuchungen zur Urmylieung haben gezeigt, dass NEM vor allem die Urm1-Konjugation an das Peroxiredoxin Ahp1 stabilisiert (Goehring *et al.*, 2003a; Van der Veen *et al.*, 2011). Die prominente, ca. 55 kDa große Urmylieungsbande, die in den vorherigen Experimenten unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen detektiert werden konnte (Abb. 8; Abb. 10), entsprach in ihrer Größe tatsächlich einem möglichen Konjugat aus TAP-Urm1 (ca. 32,8 kDa) und Ahp1 (ca. 19,1 kDa).

Um dies zu bestätigen, wurde die NEM-stabilisierte Urmylieung mit TAP-Urm1 in einem *ahp1Δ*- und *AHP1-c-myc*-Hintergrund untersucht. Unter reduzierenden Bedingungen führte der Verlust des Peroxiredoxins in einer *ahp1Δ*-Mutante dazu, dass das ursprünglich im WT-Hintergrund vorhandene Urmylieungssignal nicht mehr detektierbar war (Abb. 11). In *AHP1-c-myc*-Zellen hatte jedoch die zusätzliche Epitop-Markierung des Ahp1 zur Folge, dass das entsprechende Konjugat elektrophoretisch weniger mobil war. Demnach bestätigen diese Ergebnisse, dass mit TAP-Urm1 ebenfalls eine Ahp1-Modifikation erfolgt. Interessanterweise zeigte sich unter nicht-reduzierenden Bedingungen, dass auch die Bildung eines weiteren ca. 100 kDa großen Urm1-Konjugats im *ahp1Δ*- und *AHP1-c-myc*-Hintergrund beeinflusst war. So konnte das entsprechende Urmylieungssignal in einer *ahp1Δ*-Mutante nicht mehr detektiert werden, während es in einem *AHP1-c-myc*-Hintergrund nach oben verschoben war. Demnach scheint es sich hierbei ebenfalls um eine urmylierte Form des Ahp1 zu handeln, die jedoch sensitiv gegenüber  $\beta$ ME ist.



**Abbildung 11: TAP-Urm1 modifiziert das Ahp1-Monomer und -Dimer.**

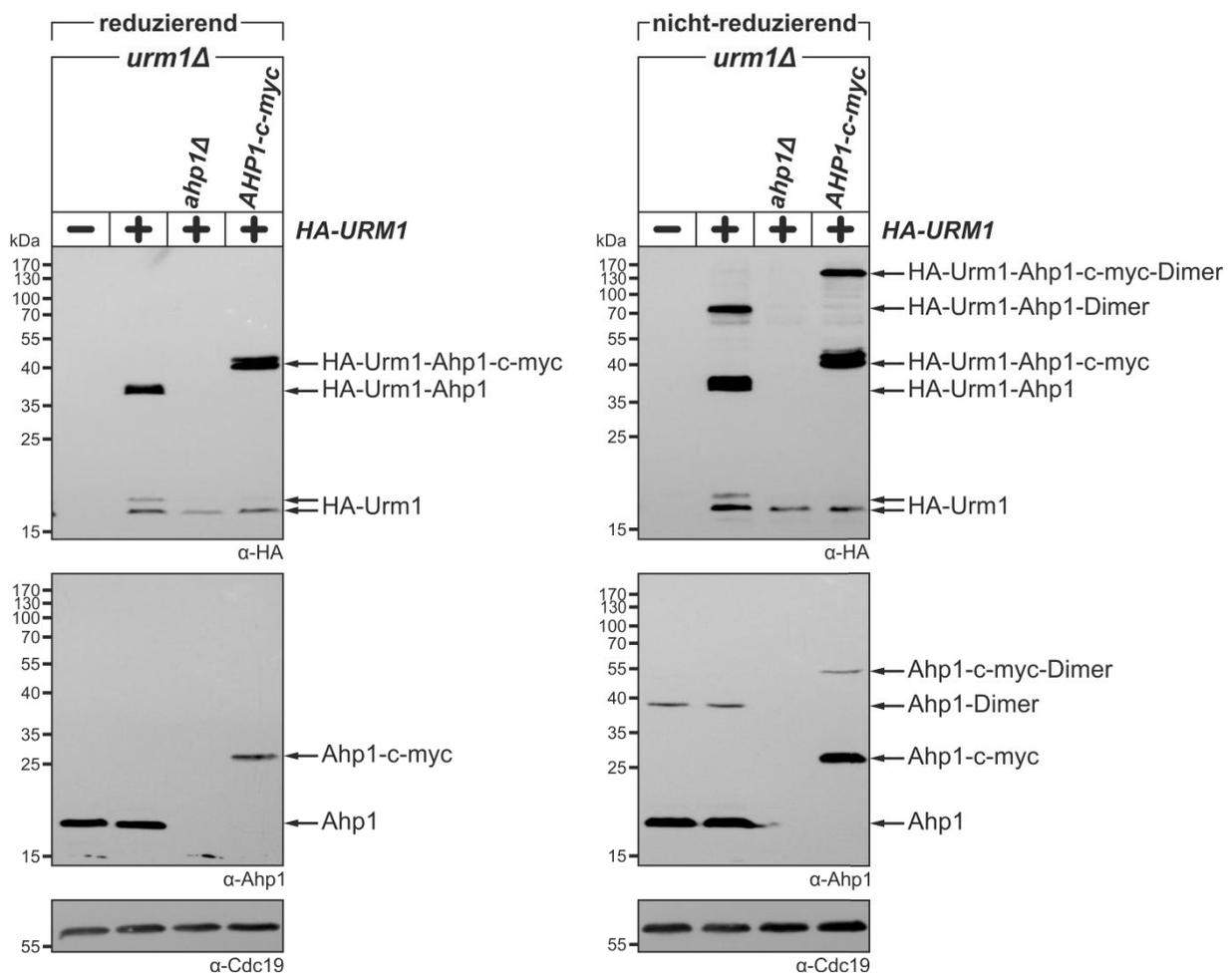
Die NEM-stabilisierte Urmylie rung mit TAP-Urm1 wurde entweder im WT-, im *ahp1Δ*- oder im *AHP1-c-myc*-Hintergrund untersucht. Die Proteinextrakte aus diesen Stämmen wurden unter reduzierenden oder nicht-reduzierenden Bedingungen präpariert. Nach einer Auftrennung der Extrakte mittels SDS-PAGE erfolgte eine Entwicklung der *Western Blots* mit spezifischen  $\alpha$ -TAP- oder  $\alpha$ -Cdc19-Antikörpern.

Es ist bekannt, dass der Aufbau von intermolekularen Disulfidbrücken die Bildung eines Ahp1-Homodimers ermöglicht (Jeong *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999a; Verdoucq *et al.*, 1999). Daher könnte es sich bei dem  $\beta$ ME-sensitiven Urm1-Konjugat um ein urmyliertes Ahp1-Dimer handeln und nicht, wie im vorherigen Abschnitt postuliert, um ein Protein, das möglicherweise an einem Cysteinrest durch Urm1 modifiziert wurde (Abb. 10).

Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde zusätzlich die NEM-abhängige Ahp1-Modifikation durch HA-Urm1 untersucht. Nach der Proteinextraktion aus einer mit *HA-URM1* komplementierten *urm1Δ*-Mutante war im  $\alpha$ -HA-*Western Blot* ein ca. 37 kDa großes Urmylie rungssignal detektierbar, das mit oder ohne  $\beta$ ME-Behandlung vorhanden war und in seiner Größe einem Konjugat aus HA-Urm1 (ca. 15,5 kDa) und Ahp1 (ca. 19,1 kDa) entsprach (Abb. 12). Wie zuvor in den Untersuchungen mit TAP-Urm1 konnte jedoch unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine weitere Bande nachgewiesen werden, die auf einer Höhe von ca. 70 kDa lief. Beide Urmylie rungssignale waren in einer *ahp1Δ*-Mutante nicht detektierbar, wohingegen die Migrationsgeschwindigkeiten der entsprechenden Banden in einem *AHP1-c-myc*-Hintergrund verzögert waren. Demnach handelt es sich bei beiden Konjugaten vermutlich um urmyliertes Ahp1. Obwohl die Ahp1-Dimerisierung unter nicht-reduzierenden Bedingungen mittels  $\alpha$ -Ahp1-*Western Blot* bestätigt werden konnte, ließen sich

die zuvor im  $\alpha$ -HA-Immunoblot ermittelten, urmylierten Formen des Peroxiredoxins nicht nachweisen (Abb. 12). Vermutlich ist dies darauf zurückzuführen, dass eine Modifikation durch HA-Urm1 die Epitop-Bindung des Ahp1-spezifischen Antikörpers blockiert.

Trotzdem deuten die Ergebnisse zur Urmylieung mit TAP- oder HA-Urm1 darauf hin, dass Ahp1 nicht nur als Monomer, sondern auch als Dimer urmyliert wird. Interessanterweise konnte dabei stets nur ein  $\beta$ ME-sensitives Konjugat nachgewiesen werden, sodass es vermutlich nur eine modifizierte Form des Dimers gibt. Abgeleitet vom Laufverhalten scheint sich das urmylierte Homodimer hierbei aus zwei Ahp1-Proteinen zusammzusetzen, die jeweils durch ein Urm1 modifiziert sind.



**Abbildung 12: Auch mit HA-Urm1 zeigt sich eine Urmylieung des Ahp1-Monomers und -Dimers.**

Die NEM-stabilisierte HA-Urm1-Konjugation wurde im WT-, im *ahp1* $\Delta$ - und im *AHP1-c-myc*-Hintergrund untersucht. Nach Aufbereitung der Proteinextrakte unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen erfolgte der Urmylieungsnachweis mittels EMSA unter Verwendung von  $\alpha$ -HA-Antikörpern. Parallel fand ebenfalls eine  $\alpha$ -Ahp1- und  $\alpha$ -Cdc19-Detektion statt.

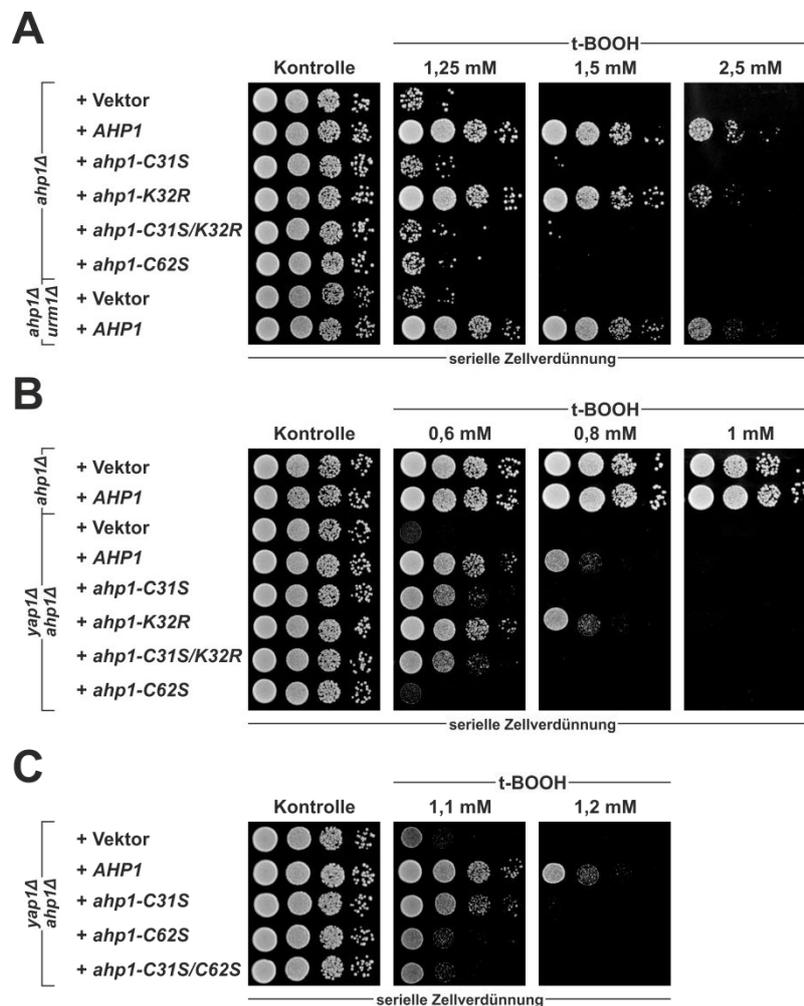
### 2.2.2 Das Cystein C62 ist im Gegensatz zum C31 essentiell für die Ahp1-Funktion

Ahp1 ist ein aus 176 Aminosäuren bestehendes Protein, das in Hefe vor allem an der Reduktion von Alkylhydroperoxiden beteiligt ist (Jeong *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999a; Iwai *et al.*, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass der Lysinrest an Position 32 (K32) durch Urm1 modifiziert wird (Van der Veen *et al.*, 2011). Bisher wurde jedoch nicht untersucht, wie sich eine Mutation dieses Lysins auf die Funktionalität des Ahp1 auswirkt. Obwohl beschrieben ist, dass Ahp1 als 2-Cys-Peroxiredoxin ein *resolving* Cystein (C31) und ein peroxidatisches Cystein (C62) für die Reduktion von Alkylhydroperoxiden benötigt, ist deren Bedeutung bisher noch nicht phänotypisch überprüft wurden (Jeong *et al.*, 1999; Lian *et al.*, 2012). Daher wurde untersucht, wie sich eine Mutation der genannten Aminosäurereste auf die Sensitivität gegenüber t-BOOH auswirkt.

Es zeigte sich, dass die Mutation des K32 keinen Einfluss auf die Ahp1-Funktionalität hat. So war die t-BOOH-Sensitivität einer *ahp1Δ*-Mutante, die die *ahp1-K32R*-Substitution trug, im Vergleich zu einer Mutante, die mit WT-*AHP1* komplementiert war, unverändert (Abb. 13A). Ähnlich verhielt es sich auch in einer *yap1Δahp1Δ*-Doppelmutante. Durch die zusätzliche Deletion des *YAP1*-Gens, welches für einen an der oxidativen Stressantwort beteiligten Transkriptionsfaktor kodiert, ist dieser Stamm im Vergleich zu einer *ahp1Δ*-Mutante t-BOOH-hypersensitiv (Harshman *et al.*, 1988; Hirata *et al.*, 1994; Kuge und Jones, 1994; Wu und Moye-Rowley, 1994). Demnach sollten sich leichte Unterschiede in der Funktionalität der *ahp1*-Punktmutanten in diesem Stammhintergrund besser nachweisen lassen. Die *ahp1-K32R*- und *AHP1*-Transformante zeigten jedoch ein vergleichbares Wachstum auf t-BOOH (Abb. 13B). Somit sind das K32 und womöglich auch die daran stattfindende Urmylierung nicht entscheidend für die Detoxifikation von t-BOOH durch Ahp1. Auch allgemein scheint Urm1 keine Rolle bei der Entgiftung von t-BOOH zu spielen, da eine *ahp1Δ*- und *ahp1Δurm1Δ*-Mutante komplementiert mit *AHP1* eine vergleichbare Sensitivität gegenüber dem Peroxid vorwies.

Wie erwartet, beeinflussten die Mutationen am C31 und C62 die Funktionalität des Ahp1. Nach dem Einbringen der *ahp1-C31S*- oder *ahp1-C62S*-Substitutionen in eine *ahp1Δ*-Mutante konnte für beide Transformanten eine erhöhte t-BOOH-Sensitivität nachgewiesen werden (Abb. 13A). Da eine Leervektortransformante eine vergleichbare t-BOOH-Sensitivität aufwies, deutete dies darauf hin, dass eine Mutation der Cysteine zu einem vollständigen Verlust der Ahp1-Aktivität führt. In einem *yap1Δahp1Δ*-Hintergrund zeigte sich jedoch, dass mit *ahp1-C31S* eine leicht erhöhte Resistenz gegenüber t-BOOH vorhanden war (Abb. 13B). Ebenso verhielt es sich mit *ahp1-C31S/K32R*. Im Gegensatz dazu war das *ahp1-C62S* nicht in

der Lage, eine Verbesserung der t-BOOH-Resistenz in der *yap1Δahp1Δ*-Doppelmutante zu vermitteln. Demnach haben beide Cysteinreste einen unterschiedlich starken Einfluss auf die Ahp1-Funktionalität. Dabei scheint das C62 im Gegensatz zum C31 essentiell für die Aktivität des Peroxiredoxins zu sein. Dies wird auch dadurch deutlich, dass die Mutation beider Cysteine (*ahp1-C31S/C62S*) ebenfalls zu einem vollständigen Funktionsverlust führt (Abb. 13C). Somit geht die nach der Mutation des C31 immer noch vorhandene Restaktivität des Ahp1 auf das C62 zurück.



**Abbildung 13: Phänotypische Analyse verschiedener *ahp1*-Punktmutanten.**

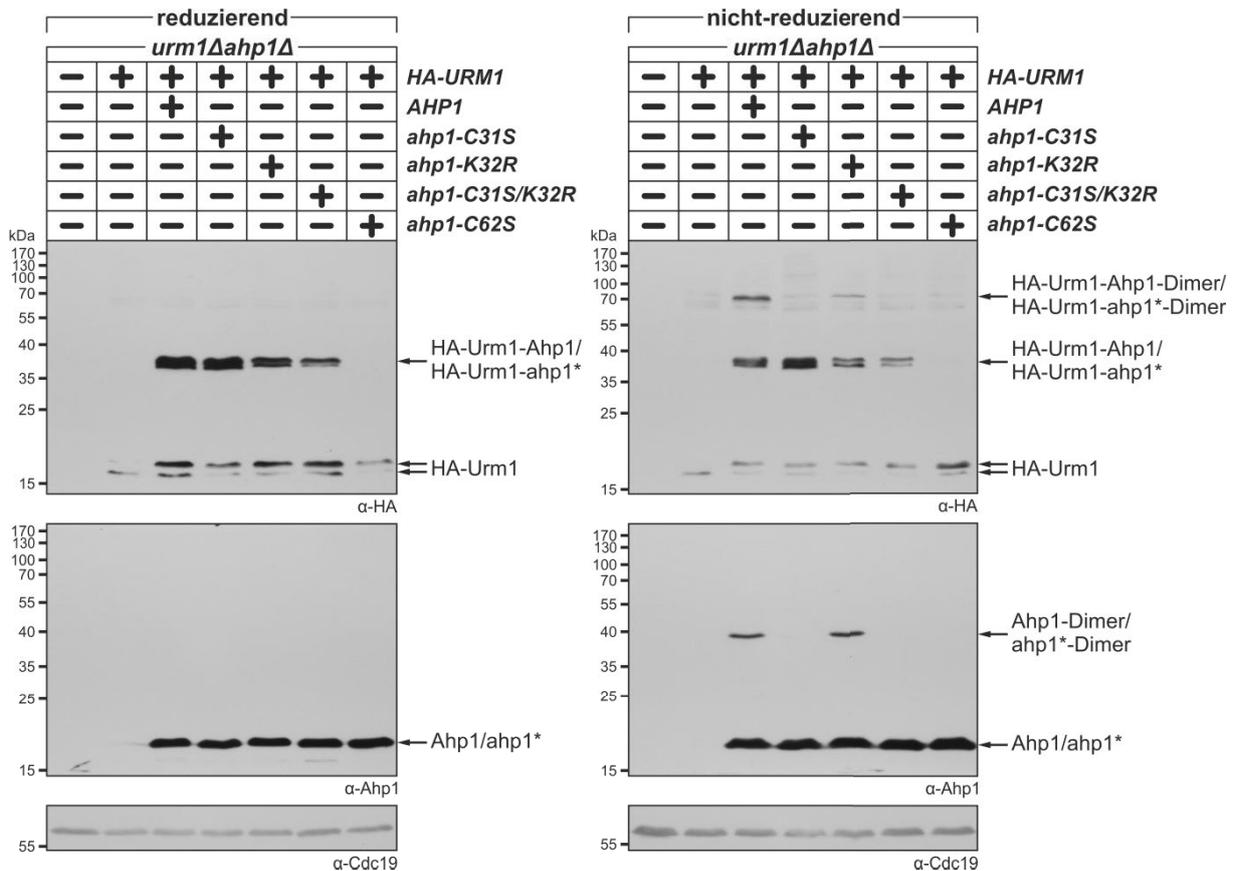
**A)** Der Verlust des K32 hat keinen Einfluss auf die Ahp1-Funktionalität. **B)** Die Mutation des C31 führt zu einer stark verminderten Ahp1-Aktivität. **C)** Das C62 ist essentiell für die Funktionalität des Peroxiredoxins. Die Gene der verschiedenen *ahp1*-Punktmutanten wurden in eine *ahp1Δ*- oder *yap1Δahp1Δ*-Mutante eingebracht. Von den Transformanten wurden serielle Verdünnungen erstellt. Diese wurden auf Vollmedium mit unterschiedlichen t-BOOH-Konzentrationen getropft. Die Inkubation erfolgte für 2 Tage bei 30°C.

### 2.2.3 Für die Urmyleerung von Ahp1 wird das Cystein C62 benötigt

Die phänotypischen Tests auf t-BOOH demonstrierten, dass die Mutation des K32 nicht zu einer Einschränkung der Ahp1-Funktionalität führt. Um zu verifizieren, ob dieser Lysinrest essentiell für die Ahp1-Urmyleerung ist, wurde überprüft, wie sich eine Mutation des K32 auf die Modifikation des Peroxiredoxins auswirkt. Ebenso wurde untersucht, wie der Verlust des C31 oder C62 die Urm1-Konjugation an Ahp1 beeinflusst. Durch das Zusammenspiel beider Cysteinreste kann Ahp1 seinen peroxidatischen Zyklus durchlaufen, bei dem es zur Reduktion von Alkylhydroperoxiden kommt (Jeong *et al.*, 1999; Lian *et al.*, 2012). Während dieses Zyklus können zwei Ahp1-Monomere durch den Aufbau einer intermolekularen Disulfidbrücken zwischen dem C31 und C62 ein Homodimer bilden. Die zuvor nachgewiesene Modifikation des Dimers durch Urm1 war ein Indiz dafür (Abb. 11; Abb. 12), dass die Urmyleerung in den peroxidatischen Zyklus eingreifen könnte.

Zur Untersuchung der Modifikation der *ahp1*-Punktmutanten wurden die entsprechenden Gene zusammen mit *HA-URM1* in einen *urm1Δahp1Δ*-Stamm eingebracht. Die NEM-stabilisierte Urmyleerung wurde unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert. Wie im  $\alpha$ -Ahp1-*Western Blot* zu sehen war, hatte die Mutation des K32 keinen Einfluss auf die Dimerisierung des Peroxiredoxins (Abb. 14). Überraschenderweise zeigte sich jedoch im  $\alpha$ -HA-Immunoblot, dass nach Verlust des Lysins weiterhin eine verminderte Urmyleerung des *ahp1*-K32R-Monomers und -Dimers möglich war. Dies lässt den Schluss zu, dass es im Ahp1 womöglich noch einen weiteren Lysinrest gibt, der alternativ durch Urm1 modifiziert werden kann, wenn das K32 fehlt.

Wie erwartet, führte die Mutation des C31 und des C62 dazu, dass keine Dimerisierung des Peroxiredoxins mehr stattfand. Es konnte aber festgestellt werden, dass weiterhin eine Urmyleerung des *ahp1*-C31S oder *ahp1*-C31S/K32R erfolgte, während diese für *ahp1*-C62S nicht mehr vorhanden war. Demnach scheint das C62 im Gegensatz zum C31 essentiell für die Ahp1-Modifikation zu sein. Über das katalytische C62 erfolgt die Reduktion von Alkylhydroperoxiden, indem der Thiolrest des Cysteins zu einem Sulfensäurerest oxidiert wird (Jeong *et al.*, 1999; Lian *et al.*, 2012). Die Abhängigkeit der Ahp1-Urmyleerung von diesem Cystein, könnte daher ein Hinweis dafür sein, dass der Oxidationsstatus des Peroxiredoxins die Modifikation durch Urm1 beeinflusst.



**Abbildung 14: Der Verlust des C62 führt zu einem Ausbleiben der Ahp1-Urmylierung.**

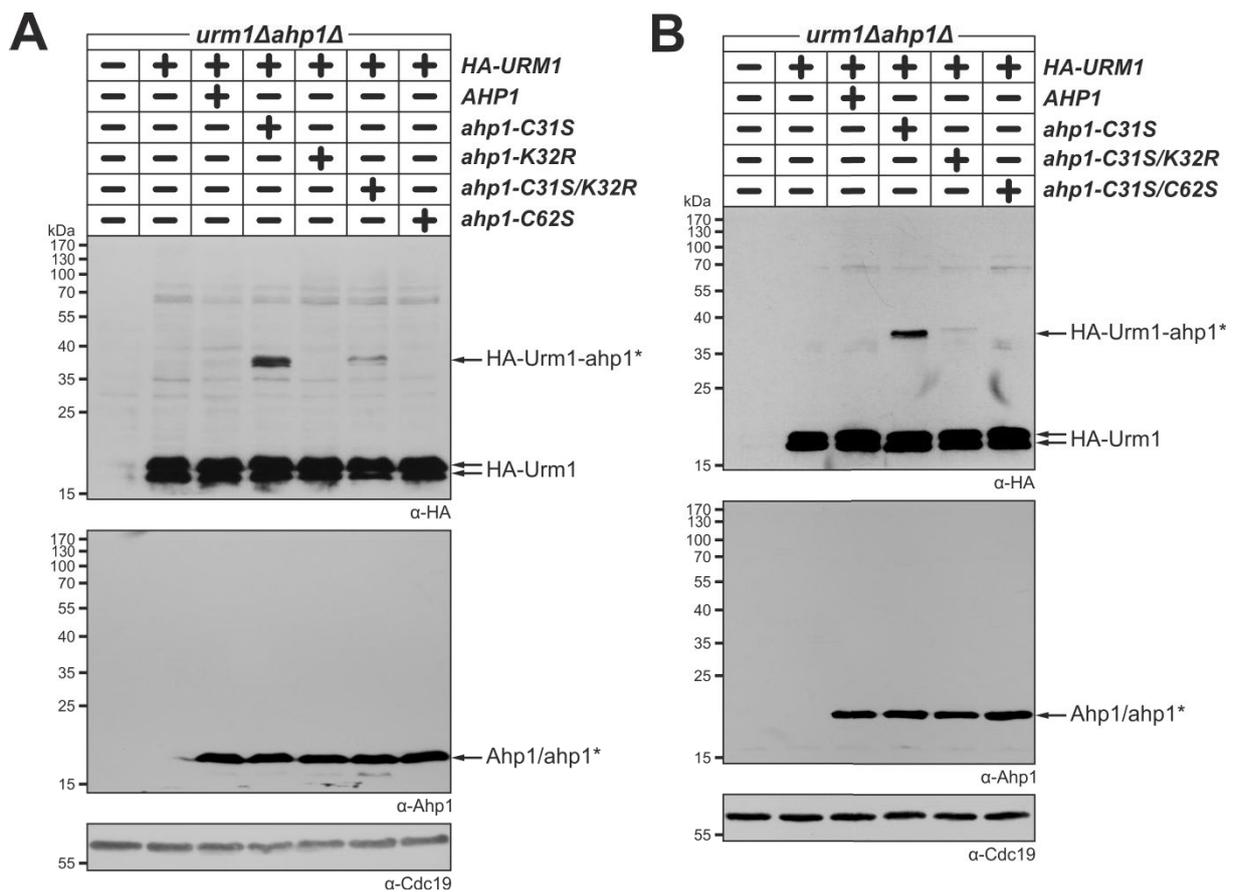
Die NEM-stabilisierte Konjugation von HA-Urm1 an verschiedene *ahp1*-Punktmutanten wurde unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen untersucht. Die Detektion der Immunoblots erfolgte mit  $\alpha$ -HA-,  $\alpha$ -Ahp1- und  $\alpha$ -Cdc19-Antikörpern. Um die modifizierten und unmodifizierten Varianten der unterschiedlichen *ahp1*-Punktmutanten übersichtlich darzustellen, sind die Mutanten als *ahp1\** zusammengefasst.

#### 2.2.4 Die Mutation des Cysteins C31 stabilisiert die Ahp1-Urmylierung

Zusätzlich zur NEM-stabilisierten Urmylierung der *ahp1*-Punktmutanten wurde überprüft, ob sich deren Modifikation durch Urm1 auch in Abwesenheit des Isopeptidaseinhibitors nachweisen lässt. Wie bereits in dieser Arbeit bestätigt wurde, stabilisiert NEM die Urm1-Konjugation an Ahp1. So konnte kein urmyliertes Peroxiredoxin nachgewiesen werden, wenn NEM während der Proteinextraktion fehlte (Abb. 8). Daher wurde vermutet, dass eine Urmylierung der Punktmutanten in Abwesenheit von NEM wahrscheinlich nicht nachweisbar ist.

Wie erwartet, konnte im  $\alpha$ -HA-Western Blot kein urmyliertes Ahp1 detektiert werden und auch für die K32R- oder C62S-Mutante ließ sich eine Modifikation durch HA-Urm1 nicht zeigen (Abb. 15A). Interessanterweise war jedoch urmyliertes *ahp1*-C31S nachweisbar. Demnach wird die Urmylierung des Peroxiredoxins durch die C31S-Mutation NEM-unabhängig stabilisiert. Für das *ahp1*-C31S/K32R erfolgte ebenfalls eine Modifikation in

Abwesenheit von NEM, welche aber im Vergleich zur der des *ahp1-C31S* vermindert war. Diese Reduktion in der Urmylierungseffizienz ist ein Indiz dafür, dass die NEM-unabhängige Modifikation der C31S-Mutante auch am K32 stattfindet und dass Urm1 nach dem Verlust des Lysins an einen alternativen Rest angehängt werden kann. Ebenso ist das C62 essentiell für die Urmylierung in Abwesenheit von NEM. So konnte urmyliertes *ahp1-C31S/C62S* nicht nachgewiesen werden (Abb. 15B). Somit scheint auch die hier gezeigte NEM-unabhängige Urmylierung vom Oxidationsstatus des Peroxiredoxins abzuhängen.



**Abbildung 15: Untersuchung einer NEM-unabhängigen Urmylierung der *ahp1*-Punktmutanten.**

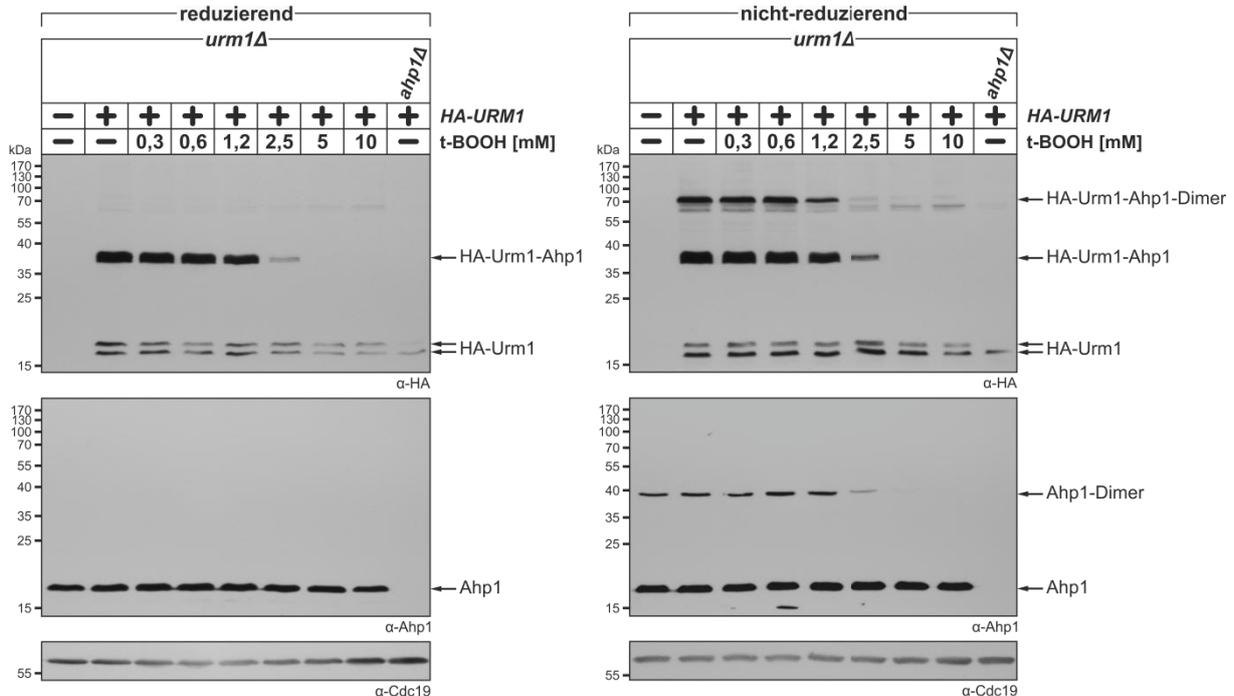
**A)** Durch Mutation des C31 wird die Urm1-Konjugation stabilisiert. **B)** Für die NEM-unabhängige Urmylierung des Peroxiredoxins wird das C62 benötigt. Aus den angegebenen Stämmen wurden Proteine extrahiert. Dabei erfolgte die Extraktion in Abwesenheit von NEM unter reduzierenden Bedingungen. Der Nachweis der HA-Urm1-Konjugation an die *ahp1*-Punktmutanten fand mittels EMSA unter Verwendung von  $\alpha$ -HA-Antikörpern statt. Zusätzlich wurde ebenfalls eine  $\alpha$ -Ahp1- und  $\alpha$ -Cdc19-Detektion durchgeführt. Die *ahp1*-Punktmutanten sind als *ahp1\** zusammengefasst, um eine übersichtlichere Darstellung der verschiedenen modifizierten und unmodifizierten Varianten zu ermöglichen.

### 2.2.5 t-BOOH hemmt die Urmyleerung des Ahp1-Monomers und –Dimers

Wie sich auch in den vorherigen phänotypischen Tests zeigte (Abb. 13), wird Ahp1 für die Entgiftung des Alkylhydroperoxids t-BOOH benötigt (Jeong *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999a; Iwai *et al.*, 2010). Es wird vermutet, dass die Reduktion von t-BOOH über den peroxidatischen Zyklus des Ahp1 erfolgt (Jeong *et al.*, 1999; Lian *et al.*, 2012). So konnte eine Induktion der Dimerisierung des Peroxiredoxins nach t-BOOH-Behandlung von Hefezellen festgestellt werden (Iwai *et al.*, 2010). Gleichzeitig scheint das Peroxid aber auch die Ahp1-Urmyleerung zu hemmen, da diese in t-BOOH-behandelten Hefezellen nicht mehr vorhanden war (Goehring *et al.*, 2003a). Demnach lässt sich vermuten, dass die t-BOOH-induzierte Dimerisierung des Ahp1 mit einer Dekonjugation von Urm1 einhergeht.

Um diese Vermutung zu belegen, wurde überprüft, wie sich t-BOOH auf die Urmyleerung und Dimerisierung von Ahp1 auswirkt. Hierfür wurde ein *urm1Δ*-Stamm, der das *HA-URM1* trug, mit unterschiedlichen t-BOOH-Konzentrationen behandelt. Im  $\alpha$ -HA-Western Blot war eine Abnahme der NEM-stabilisierten Urmyleerung des Ahp1-Monomers und –Dimers mit steigender t-BOOH-Konzentration erkennbar (Abb. 16). Diese ging so weit, dass keine Ahp1-Modifikation in den höheren Konzentrationen nachweisbar war. Somit bestätigt dies, dass t-BOOH die Ahp1-Urmyleerung hemmt. Erstaunlicherweise korrelierte die abnehmende Urmyleerung jedoch nicht mit einer zunehmenden Ahp1-Dimerisierung. So war im  $\alpha$ -Ahp1-Immunoblot zu sehen, dass kein Dimer mehr vorhanden war, wenn die Zellen mit höheren t-BOOH-Konzentrationen behandelt wurden.

Demnach scheint t-BOOH den Oxidationsstatus des Ahp1 so zu verändern, dass es nicht mehr dimerisieren kann. Dies könnte sich auch auf die Urmyleerung des Peroxiredoxins auswirken.



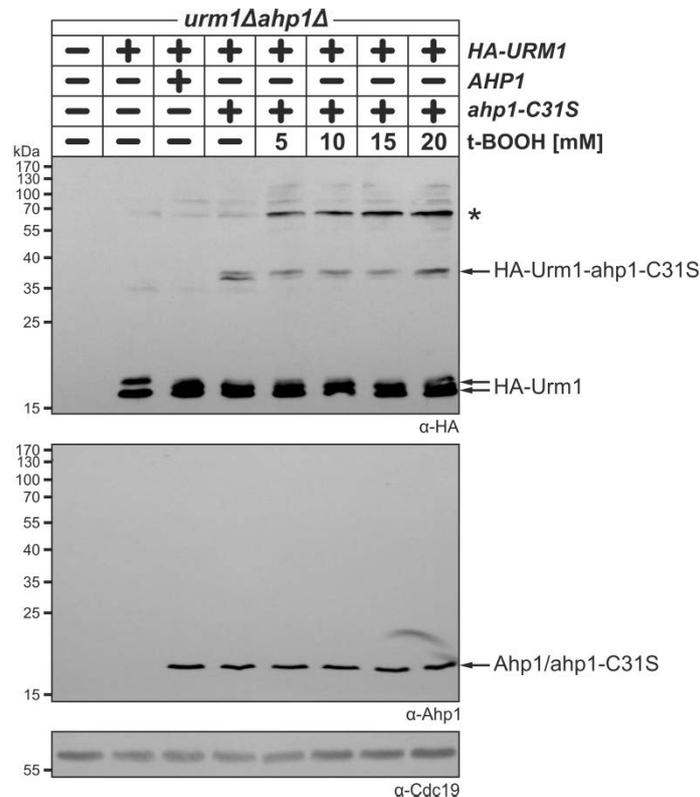
**Abbildung 16: Die Urmylierung und Dimerisierung von Ahp1 wird durch t-BOOH gehemmt.**

Ein *urm1Δ*-Stamm, der *HA-URM1* enthielt, wurde für 5 min mit unterschiedlichen t-BOOH-Konzentrationen behandelt. Der Einfluss von t-BOOH auf die NEM-stabilisierte HA-Urm1-Konjugation wurde unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen untersucht. Ebenso fand eine Analyse der Ahp1-Dimerisierung statt. Die *Western Blots* wurden dementsprechend mit  $\alpha$ -HA-,  $\alpha$ -Ahp1- sowie  $\alpha$ -Cdc19-Antikörpern entwickelt.

### 2.2.6 t-BOOH hemmt die NEM-unabhängige Modifikation von *ahp1-C31S* nicht

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich eine Urmylierung des *ahp1-C31S* in Abwesenheit des Isopeptidaseinhibitors NEM nachweisen lässt (Abb. 15). Es wurde untersucht, wie sich t-BOOH auf die NEM-unabhängige Modifikation des mutierten Peroxiredoxins auswirkt.

Interessanterweise hatte t-BOOH keinen Einfluss auf die NEM-unabhängige Urmylierung des *ahp1-C31S* (Abb. 17). Es zeigte sich, dass die Modifikation des mutierten Peroxiredoxins auch mit steigender Konzentration des Peroxids unverändert blieb. Demnach ist das Urm1-Konjugat, das durch die Mutation des C31 stabilisiert wird, t-BOOH-resistent.



**Abbildung 17: t-BOOH hat keinen Einfluss auf die NEM-unabhängige Urmylierung von *ahp1-C31S*.**

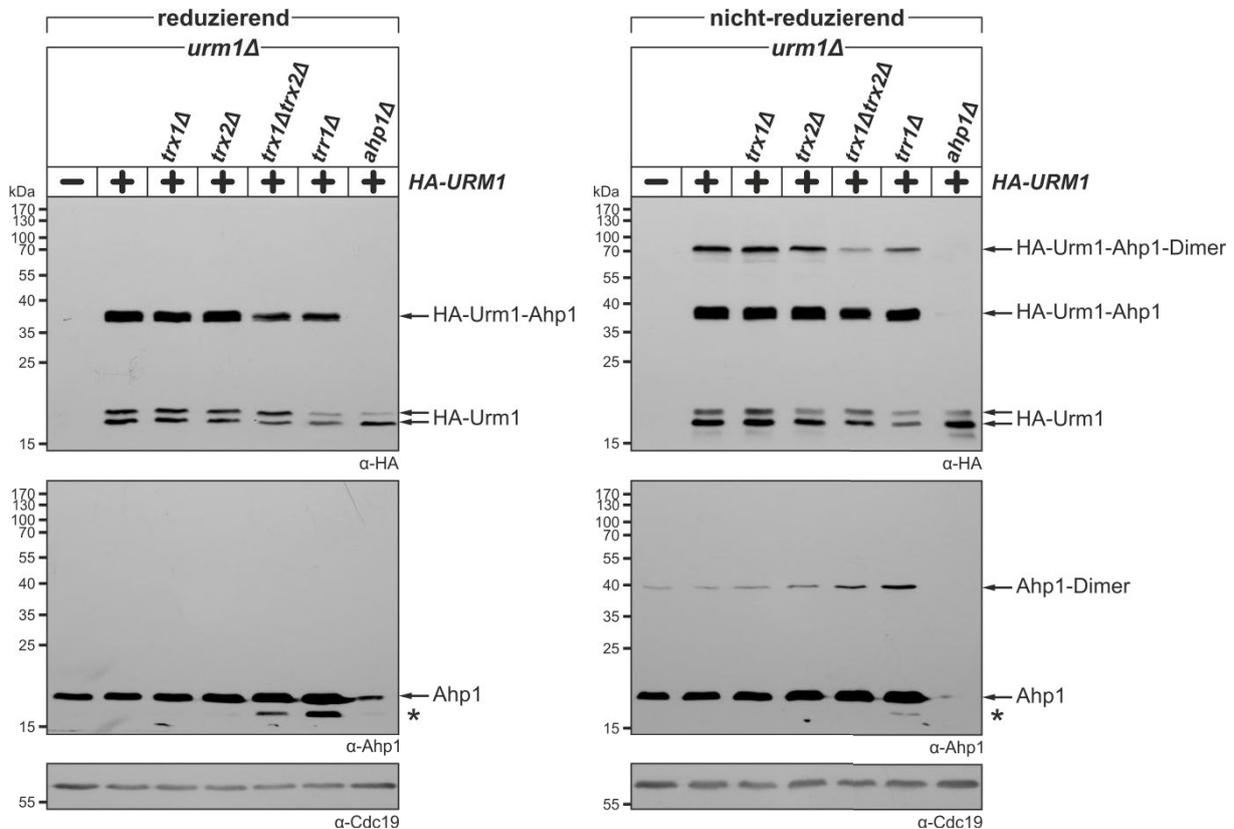
Ein *urm1Δahp1Δ*-Stamm, transformiert mit *HA-URM1* und *ahp1-C31S*, wurde für 5 min mit unterschiedlichen t-BOOH-Konzentrationen behandelt. Die NEM-unabhängige Urmylierung des *ahp1-C31S* wurde unter reduzierenden Bedingungen überprüft. Die Detektion der *Western Blots* erfolgte mit  $\alpha$ -HA-,  $\alpha$ -Ahp1- und  $\alpha$ -Cdc19-Antikörpern. Mit einem Sternchen (\*) ist ein weiteres HA-Urm1-Konjugat hervorgehoben, dessen Bildung durch t-BOOH induziert wurde.

### 2.2.7 Der Verlust des Thioredoxinsystems beeinflusst die Ahp1-Urmylierung

Die bisherigen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Ahp1-Urmylierung mit dem peroxidatischen Zyklus des Peroxiredoxins verknüpft sein könnte. Die Auflösung des Ahp1-Homodimers während dieses Zyklus erfolgt über das cytosolische Thioredoxinsystem (Iwai *et al.*, 2010; Lian *et al.*, 2012). Dieses System, welches die zwei Thioredoxine Trx1 und Trx2, sowie die Thioredoxin-Reduktase Trr1 umfasst, könnte demnach auch einen Einfluss auf die Ahp1-Modifikation haben. Daher wurde untersucht, wie sich die Mutation einzelner Komponenten des Thioredoxinsystems auf die Ahp1-Urmylierung auswirkt.

Es zeigte sich, dass die NEM-stabilisierte Modifikation des Ahp1-Monomers und -Dimers durch eine zusätzliche *trx1Δ*- oder *trx2Δ*-Mutation unbeeinflusst war (Abb. 18). Ebenso blieb auch die Dimerisierung des Peroxiredoxins in diesen Mutanten im Vergleich zum WT-Hintergrund unverändert. Im Gegensatz dazu war die Ahp1-Dimerisierung in einem *trx1Δtrx2Δ*- oder *trr1Δ*-Hintergrund verstärkt. Darüber hinaus war in beiden Mutanten nicht

nur generell mehr Ahp1 vorhanden, es konnte auch ein schneller migrierendes Ahp1-Signal nachgewiesen werden. Dies könnte entweder auf einen Abbau oder auf eine verstärkte negative Ladung des Peroxiredoxins hindeuten. Darüber hinaus konnte in beiden Mutantenhintergründen eine Abnahme in der Urmyleierung des Ahp1-Monomers und -Dimers festgestellt werden. Somit scheint ein Verlust des cytosolischen Thioredoxinsystems die Ahp1-Modifikation zu hemmen.



**Abbildung 18: Das Thioredoxinsystem wird für eine effiziente Ahp1-Modifikation benötigt.**

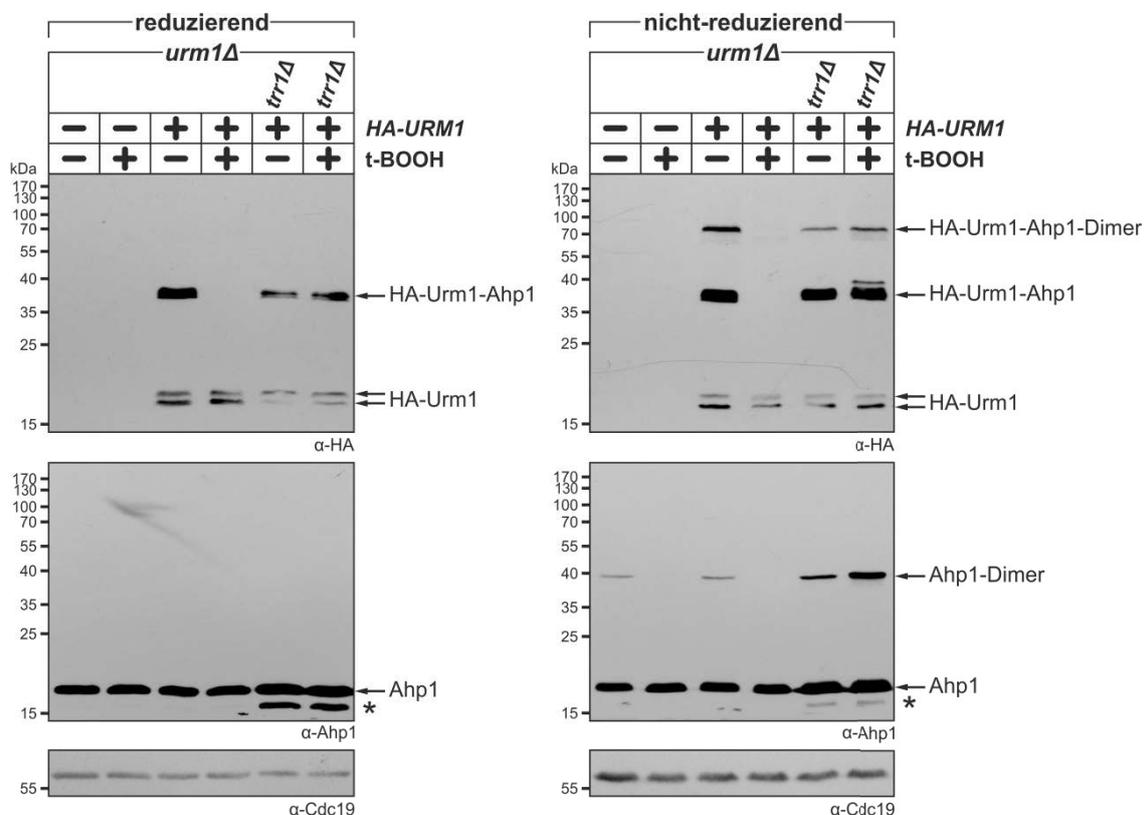
Die NEM-stabilisierte Konjugation von HA-Urm1 an Ahp1 wurde in einem *trx1* $\Delta$ -, *trx2* $\Delta$ -, *trx1* $\Delta$ *trx2* $\Delta$ - und *trr1* $\Delta$ -Hintergrund untersucht. Die Analyse der Ahp1-Urmyleierung in den verschiedenen Mutanten erfolgte unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen. Die Immunoblots wurden mit spezifischen  $\alpha$ -HA-,  $\alpha$ -Ahp1- und  $\alpha$ -Cdc19-Antikörpern entwickelt. Ein schneller migrierendes Ahp1-Signal ist durch ein Sternchen (\*) hervorgehoben.

### 2.2.8 Das Thioredoxinsystem vermittelt die t-BOOH-abhängige Hemmung der Ahp1-Urmyleierung

Zuvor wurde gezeigt, dass t-BOOH die NEM-stabilisierte Ahp1-Urmyleierung unterdrückt und dabei entgegen den Erwartungen auch eine Auflösung des Ahp1-Dimers bewirkt (Abb. 16). Da das cytosolische Thioredoxinsystem für die Reduktion des Homodimers benötigt wird,

könnte es an der t-BOOH-abhängigen Hemmung der Ahp1-Modifikation beteiligt sein. Daher wurde ein möglicher Einfluss des Thioredoxinsystems überprüft.

Während eine Ahp1-Urmylierung nach t-BOOH-Behandlung im WT-Hintergrund nicht mehr vorhanden war, blieb diese in einer *trr1Δ*-Mutante mit ausgeschaltetem Thioredoxinsystem weitestgehend unverändert (Abb. 19). Wie sich zeigte, war sogar eine leichte Zunahme für das urmylierte Dimer nachweisbar. Diese ging jedoch auch mit einer verstärkten Dimerisierung des Peroxiredoxins einher. Interessanterweise ließ sich nach t-BOOH-Behandlung ein weiteres Urm1-Konjugat nachweisen (ca. 40 kDa), das nur unter nicht-reduzierenden Bedingungen vorhanden war. Es bleibt jedoch unklar, ob dieses Konjugat eine modifizierte Form des urmylierten Ahp1 darstellt oder ob es sich um ein anderes Protein handelt, das nach t-BOOH-Behandlung nur im *trr1Δ*-Hintergrund durch Urm1 modifiziert wird. Dennoch zeigt sich, dass das cytosolische Thioredoxinsystem für die t-BOOH-abhängige Hemmung der Ahp1-Urmylierung benötigt wird.



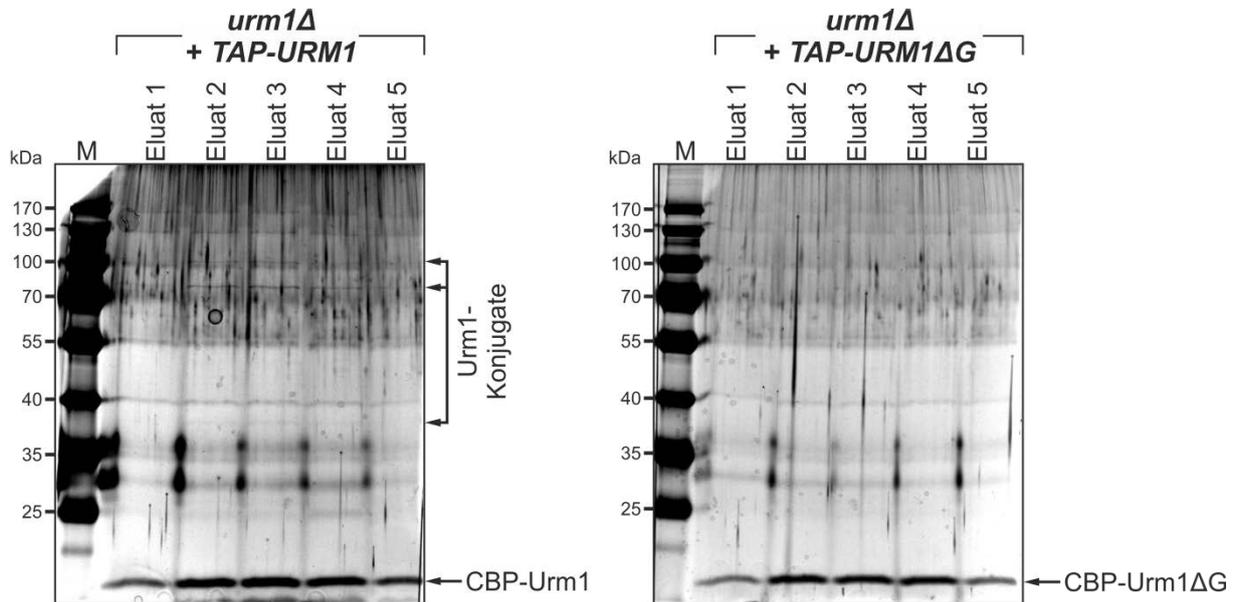
**Abbildung 19: In einer *trr1Δ*-Mutante zeigt sich keine Hemmung der Ahp1-Urmylierung durch t-BOOH.** Der Einfluss von t-BOOH auf die Urmylierung und Dimerisierung von Ahp1 wurde vergleichend im WT- und im *trr1Δ*-Hintergrund untersucht. Hierfür wurden die entsprechenden Stämme für 5 min mit 5 mM t-BOOH behandelt. Die Aufbereitung der Proteinextrakte erfolgte unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen. Für die Detektion der *Western Blots* wurden  $\alpha$ -HA-,  $\alpha$ -Ahp1- und  $\alpha$ -Cdc19-Antikörper verwendet. Ein schneller migrierendes Ahp1-Signal ist durch ein Sternchen (\*) gekennzeichnet.

### 2.3 Identifikation von Urm1-Zielproteinen in Hefe

Bereits die ersten Arbeiten zu Urm1 haben gezeigt, dass verschiedene Proteine in Hefe urmyliert werden können (Furukawa *et al.*, 2000). Trotzdem ist Ahp1 das einzige bekannte Urm1-Substrat in Hefe (Goehring *et al.*, 2003a). Da die Funktion der Urmylierung bisher ungeklärt ist, könnte der Nachweis weiterer Urm1-Substrate neue Einblicke in die Bedeutung dieses Modifikationsweges liefern. So wurden beispielsweise in menschlichen Zellen verschiedene Proteine identifiziert, für die eine Modifikation durch das humane Urm1-Homolog in Abhängigkeit von oxidativem Stress stattfindet (Van der Veen *et al.*, 2011). Diese urmylierten Proteine waren z.B. am Urm1-Weg selbst, an der tRNA-Modifikation, am Kerntransport oder an der Antwort auf oxidativen Stress beteiligt. Daher könnte die Urmylierung in all diese Prozesse involviert sein.

#### 2.3.1 Tandem-Affinitäts-Aufreinigung von Urm1-Konjugaten

Um neue Urmylierungssubstrate in Hefe nachzuweisen, wurde ein *urm1Δ*-Stamm verwendet, der *TAP-URM1* exprimiert. Aus diesem erfolgte die Isolation NEM-stabilisierter Urm1-Konjugate mittels Tandem-Affinitäts-Aufreinigung (engl. *tandem affinity purification*) (Rigaut *et al.*, 1999). Als zusätzliche Kontrolle fand parallel dazu eine Proteinaufreinigung aus einem *urm1Δ*-Stamm statt, der *TAP-URM1ΔG* trug. Wie zuvor gezeigt, ist aufgrund des fehlenden C-terminalen Glycins keine Urmylierung mit TAP-Urm1ΔG möglich (Abb. 10). Aus diesem Stamm lassen sich daher nur solche Proteine anreichern, die eine nicht-kovalente Interaktion mit Urm1 eingehen. Die nach Aufreinigung aus beiden Stämmen eluierten Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Silberfärbung des SDS-Gels sichtbar gemacht. In den Eluaten der *TAP-URM1*-Transformante ließen sich drei Proteinbanden unterschiedlicher Größe (ca. 37 kDa; ca. 80 kDa und ca. 100 kDa) nachweisen, die jedoch nicht in den Eluaten des *TAP-URM1ΔG*-Kontrollstammes sichtbar waren (Abb. 20). Da dies auf eine spezifische Aufreinigung von Urm1-Konjugaten hindeutete, erfolgte anschließend eine massenspektrometrische Analyse der Proben.



**Abbildung 20: Nachweis der spezifischen Aufreinigung von Urm1-Konjugaten.**

Mit einem *urm1Δ*-Stamm, der entweder *TAP-URM1* oder *TAP-URM1ΔG* enthielt, wurde eine Tandem-Affinitäts-Aufreinigung durchgeführt. Die erhaltenen Eluate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zum Nachweis der spezifischen Aufreinigung von Urm1-Konjugaten erfolgte eine Silberfärbung der SDS-Gele. Mutmaßliche Urm1-Konjugate sind hervorgehoben. CBP-Urm1 und CBP-Urm1ΔG (CBP = *calmodulin binding peptide*) entsprechen N-terminal verkürzten Varianten des TAP-Urm1 bzw. TAP-Urm1ΔG, die durch proteolytische Spaltung des TAP-Epitops während der Tandem-Affinitäts-Aufreinigung erzeugt wurden.

Durch den Nachweis von Proteinen, die nur mit TAP-Urm1 und nicht mit TAP-Urm1ΔG aufgereinigt wurden, konnte eine Reihe von potentiellen Urm1-Substraten identifiziert werden. Da die meisten von diesen jedoch nur mit einem Peptid vertreten waren, wurden diese als spezifische Substrate ausgeschlossen. Trotzdem wurde beispielsweise auch das bekannte Urm1-Zielprotein Ahp1 mit nur einem Peptid massenspektrometrisch identifiziert (Tab. 2). Der Nachweis von Ahp1 ist eine Kontrolle, die dafür spricht, dass die verwendete Aufreinigungsmethode eine Anreicherung von spezifischen Urm1-Substraten erlaubt. Insgesamt ließen sich jedoch nur zwei potentielle Zielproteine mit mehr als einem Peptid nachweisen. Dazu gehörten die Glycerol-1-Phosphatase Gpp1, welche an der Glycerolbiosynthese beteiligt ist (Norbeck *et al.*, 1996), und das Urm1-Aktivatorprotein Uba4. Eine mögliche Modifikation von Uba4 durch Urm1 ist insofern interessant, weil dies auf eine regulatorische Rolle der Urm1-Modifikation im Urm1-Weg hindeuten könnte.

**Tabelle 2: Auswahl an Proteinen, die nach der Aufreinigung massenspektrometrisch bestimmt wurden.**

Uba4 und Gpp1 sind die einzigen Proteine, welche mit mehr als einem Peptid nachgewiesen wurden. Die Identifikation von Ahp1 und Urm1 deutet auf die Validität der verwendeten Aufreinigungsmethode hin.

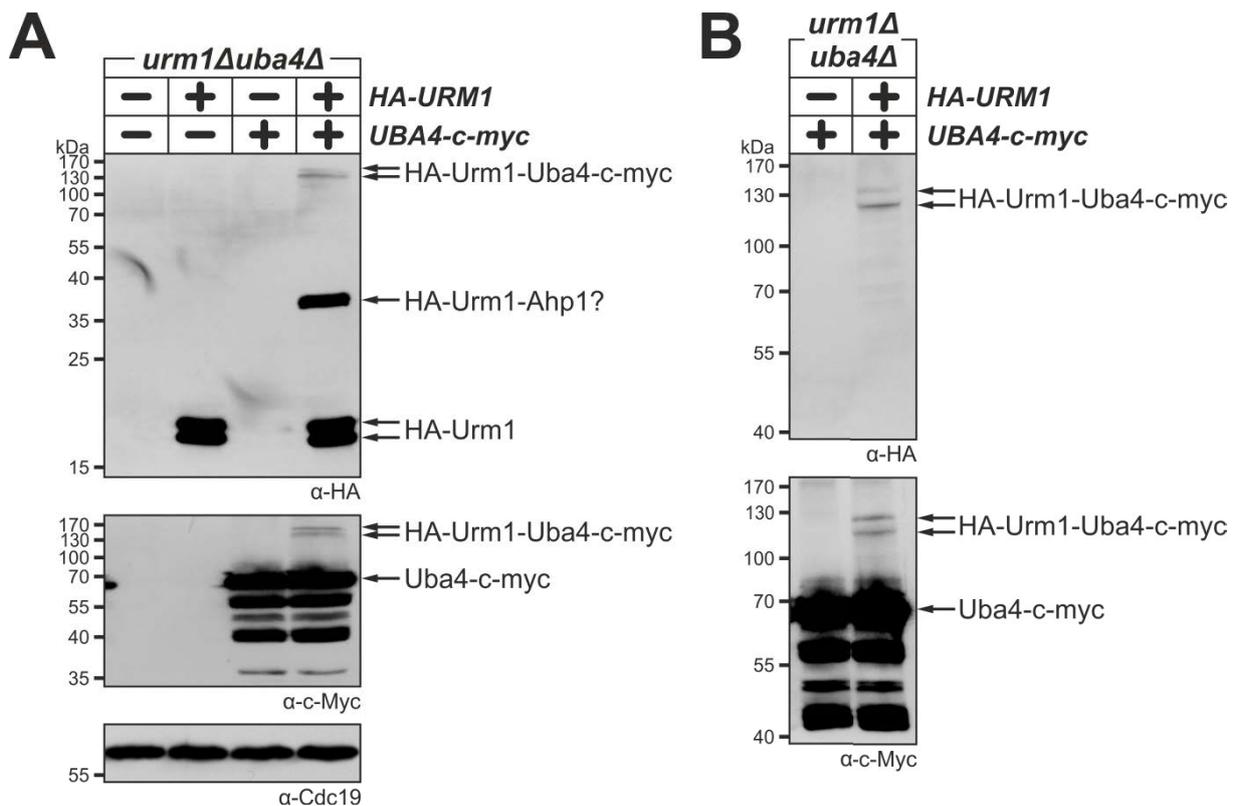
Protein	Beschreibung	Anzahl Peptide	Intensität
Uba4	E1-ähnliches Enzym; aktiviert Urm1	4	782800
Gpp1	Glycerol-1-Phosphatase; vermittelt Glycerolbiosynthese	3	296550
Ahp1	Peroxiredoxin; reduziert Hydroperoxide	1	248830
Urm1	Ubiquitin-ähnliches Protein; vermittelt tRNA-Thiolierung und posttranslationale Proteinmodifikation	3	46612000

### 2.3.2 Urm1 modifiziert Uba4 in Hefe

In menschlichen Zellen konnte eine Urm1-Modifikation des humanen Uba4-Homologs bereits gezeigt werden (Van der Veen *et al.*, 2011). Das vorherige Ergebnis der Tandem-Affinitäts-Aufreinigung sprach dafür, dass auch in *S. cerevisiae* eine Modifikation des Urm1-Aktivatorproteins stattfindet. Demnach würde dies darauf hindeuten, dass Uba4 als Zielprotein der Urm1-Modifikation konserviert ist.

Um die Uba4-Urm1-Modifikation in Hefe zu bestätigen, wurde eine c-Myc-Epitop-markierte Variante des Aktivatorproteins generiert. Erste Experimente mit einer genomisch kodierten Version des entsprechenden *UBA4-c-myc*-Gens erlaubten jedoch keinen Nachweis der Uba4-Urm1-Modifikation (Ergebnisse nicht gezeigt). Daher wurde *UBA4-c-myc* in einen *multicopy*-Vektor kloniert, der eine Überexpression des Gens in Hefe ermöglichte. Das Plasmid-kodierte *UBA4-c-myc* wurde zusammen mit *HA-URM1* in einen *urm1Δuba4Δ*-Stamm eingebracht. Anschließend wurde der Proteinextrakt dieser Transformante mittels  $\alpha$ -HA- und  $\alpha$ -c-Myc-*Western Blot* analysiert. Im  $\alpha$ -HA-Immunoblot konnten neben freiem HA-Urm1 weitere Urm1-Konjugate nachgewiesen werden, die auf einer Höhe von ca. 37 kDa und 130 kDa zu finden waren (Abb. 21A). Wie in den vorherigen Urm1-Modifikationsassays gezeigt (Abb. 12), entsprach das 37 kDa Urm1-Modifikationssignal in seiner Größe einem möglichen Konjugat aus HA-Urm1 und Ahp1. Daher handelte es sich bei dieser Bande vermutlich um urmyliertes Ahp1. Interessanterweise war bei 130 kDa eine Doppelbande zu erkennen, die sich auf derselben Höhe ebenfalls im  $\alpha$ -c-Myc-*Western Blot* nachweisen ließ. Der Nachweis der Doppelbande im  $\alpha$ -HA- und  $\alpha$ -c-Myc-*Immunoblot* war ein Hinweis dafür, dass es sich hierbei um urmylierte Formen des Uba4-c-myc handeln könnte. Dies wurde dadurch bestätigt, dass die entsprechenden c-Myc-Signale nur in einer Transformante detektiert werden konnten, die neben *UBA4-c-myc* auch *HA-URM1* enthielt. Fehlte das Gen des Modifikators waren nur

unmodifiziertes Uba4-c-myc und spezifische Abbaubanden nachweisbar. Nach einer genaueren Auftrennung derselben Proben auf einem niedrigprozentigen SDS-Polyacrylamidgel konnte die Bildung von zwei unterschiedlich großen HA-Urm1-Uba4-c-myc-Konjugaten bestätigt werden (Abb. 21B). Dies ist ein Indiz dafür, dass es vermutlich verschiedene Möglichkeiten der Uba4-Modifikation durch Urm1 gibt. Obwohl nicht näher bestimmt werden konnten, wie Urm1 sein eigenes Aktivatorprotein modifiziert, zeigen diese Ergebnisse, dass Uba4 in Hefe urmyliert wird. Somit konnte neben Ahp1 ein weiteres Urm1-Zielprotein in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden.



**Abbildung 21: Nachweis der Uba4-Urmylierung in Hefe.**

**A)** Uba4 wird urmyliert. **B)** Es kommt zur Bildung unterschiedlich modifizierter Formen des Uba4. Die NEM-stabilisierte Konjugation von HA-Urm1 an Uba4-c-myc wurde mittels EMSA untersucht. Hierfür wurden die Proben auf unterschiedlich konzentrierten SDS-Polyacrylamidgelen (15% für **A**) bzw. 9% für **B**) aufgetrennt. Es erfolgte eine Detektion der Immunoblots mit  $\alpha$ -HA,  $\alpha$ -c-Myc und  $\alpha$ -Cdc19-Antikörpern. Konjugate zwischen Urm1 und Uba4 sind ebenso hervorgehoben wie eine mutmaßlich urmylierte Form des Ahp1.

## 2.4 Untersuchung der mechanistischen Verknüpfung von Urmylierung und tRNA-Thiolierung

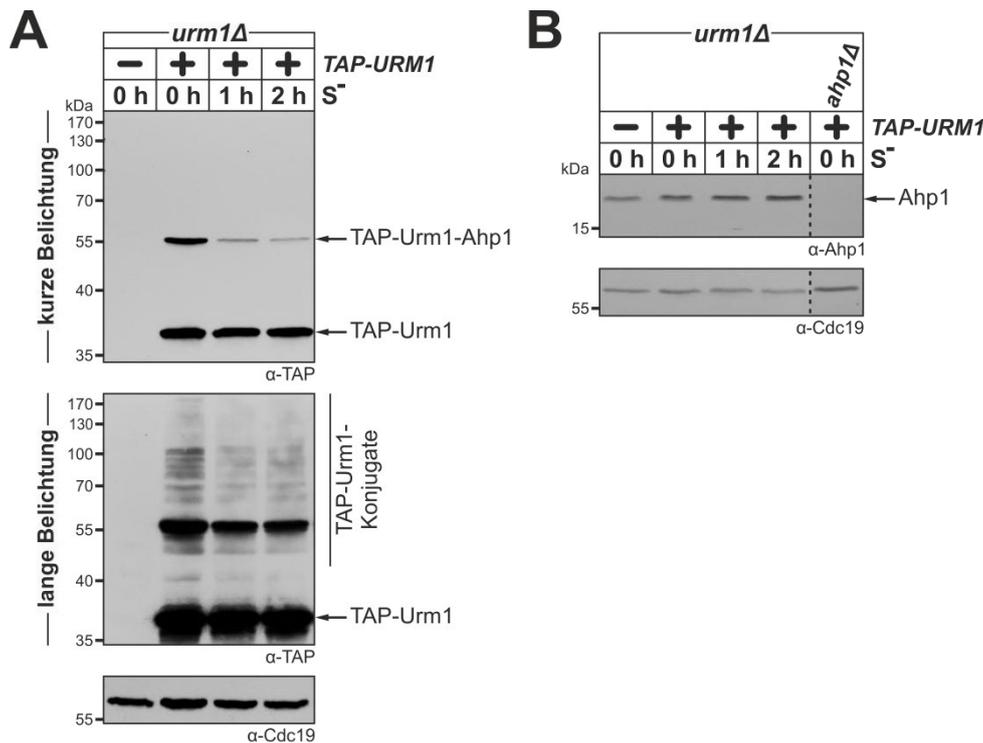
Es wurde gezeigt, dass die Bildung eines Urm1-Thiocarboxylats sowohl für die tRNA-Thiolierung als auch für die Urmylierung notwendig ist (Schmitz *et al.*, 2008; Leidel *et al.*, 2009; Noma *et al.*, 2009; Van der Veen *et al.*, 2011). Dieser Befund deutet auf eine mechanistische Verknüpfung beider Urm1-vermittelter Funktionen hin. So wird davon ausgegangen, dass derselbe Schwefeltransferweg, der an der Thiomodifikation bestimmter tRNAs beteiligt ist, auch zur Konjugation von Urm1 an andere Proteine beiträgt. Trotz dieser Annahme wurden bisher keine weiterführenden Untersuchungen durchgeführt, die eine mögliche mechanistische Verknüpfung der Urmylierung und tRNA-Thiolierung bestätigen.

### 2.4.1 Schwefelmangel führt zu einer verminderten Urmylierung

Laxman *et al.* (2013) konnten demonstrieren, dass die durch Urm1 vermittelte tRNA-Thiolierung in Hefe abhängig von der Schwefelverfügbarkeit im Wachstumsmedium ist. Wenn Hefezellen in einem Medium angezogen wurden, dem die Schwefel-enthaltenden Aminosäuren Cystein oder Methionin als Schwefelquellen fehlten, war die Bildung der  $s^2$ -Seitengruppe am *wobble*-Uridin reduziert. Da angenommen wird, dass die Urmylierung durch denselben Schwefeltransferweg vermittelt wird, der zur tRNA-Thiolierung beiträgt, kann davon ausgegangen werden, dass auch für die Proteinmodifikation durch Urm1 eine Schwefelabhängigkeit besteht. Dementsprechend wurde untersucht, wie sich Schwefelmangel auf die Urmylierung auswirkt.

Ein mit *TAP-URM1* komplementierter, Methionin-auxotropher *urm1Δ*-Stamm wurde hierfür in Methionin-haltigem Medium angezogen und anschließend erfolgte ein *shift* der Zellen in Medium, dem die Aminosäure als Schwefelquelle fehlte. Ein TAP-spezifischer *Western Blot* zeigte, dass die Bildung des NEM-stabilisierten TAP-Urm1-Ahp1-Konjugats bereits nach 1 h Wachstum in Methionin-freiem Medium vermindert war (Abb. 22A). Die Abnahme in der Ahp1-Urmylierung setzte sich nach 2 h nur leicht weiter fort. Zusätzlich zeigte eine längere Exposition, dass nicht nur die Urm1-Konjugation an Ahp1, sondern auch die Modifikation anderer Proteine vermindert war, wenn Methionin nicht mehr als Schwefelquelle vorlag. Daher scheint Schwefelmangel, der durch das Fehlen von Methionin ausgelöst wurde, einen generellen Effekt auf die Urmylierung zu besitzen. Interessanterweise hatte das Wachstum in Methionin-freiem Medium keinen Einfluss auf die Menge an freiem TAP-Urm1. Somit geht die verminderte Urm1-Konjugation bei Schwefelmangel wahrscheinlich nicht darauf zurück,

dass weniger Urm1 für die Proteinmodifikation vorhanden ist. Um auszuschließen, dass die beobachtete Verminderung der Urmylierung möglicherweise auf eine reduzierte Expression von Urm1-Zielproteinen zurückgeht, wurde beispielhaft untersucht, wie sich die Schwefelverfügbarkeit im Medium auf die *AHP1*-Expression auswirkt. Mittels  $\alpha$ -Ahp1-*Western Blot* konnte demonstriert werden, dass Schwefelmangel im untersuchten Zeitfenster nicht zu einer Reduktion der Ahp1-Proteinmenge führt (Abb. 22B). In Methionin-haltigem und -freiem Medium blieb die Menge an Ahp1 konstant. Demnach ist die durch Schwefelmangel hervorgerufene Abnahme in der Urmylierung wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass weniger Schwefel für die Urm1-Aktivierung bereitsteht. Insgesamt deuten die Ergebnisse daher auf eine Schwefelabhängigkeit der Urmylierung hin.



**Abbildung 22: Die Schwefelverfügbarkeit beeinflusst die Urmylierung.**

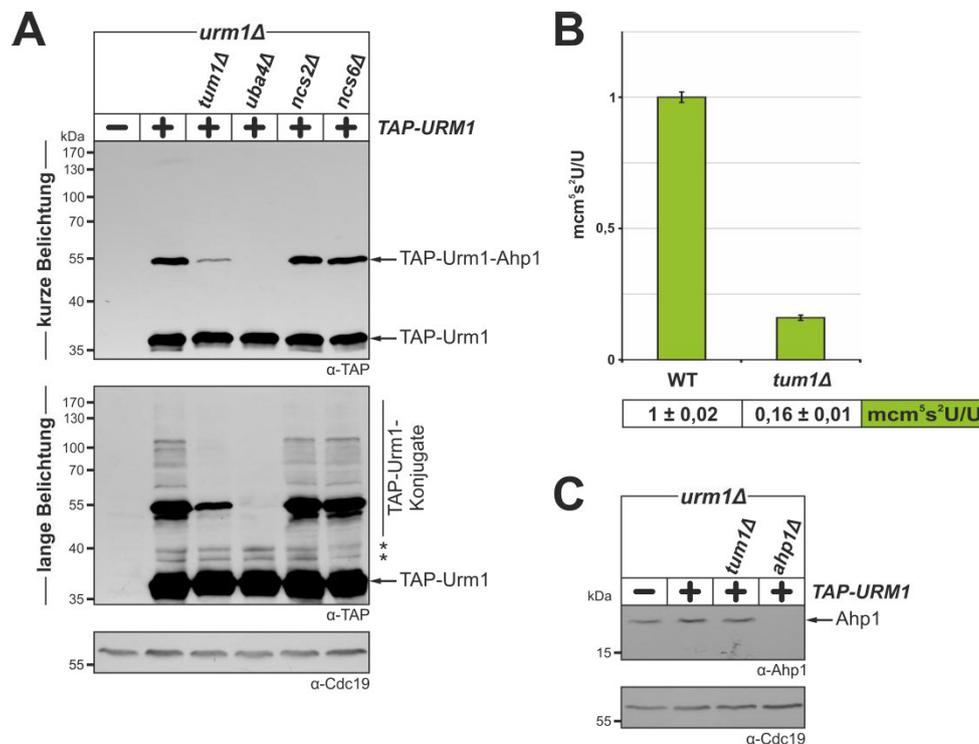
**A)** Schwefelmangel führt zu einer Abnahme in der Urm1-Konjugation. **B)** Die Ahp1-Proteinmenge bleibt bei Schwefelmangel unverändert. Ein *urm1Δ*-Stamm, der das *TAP-URM1*-Gen trug, wurde in Methionin-haltigem Medium angezogen und dann in Methionin-freies Medium überführt. Die Proteinextraktion erfolgte in An- (**A**) oder in Abwesenheit (**B**) von NEM. Für die Detektion des *Western Blots* wurden  $\alpha$ -TAP,  $\alpha$ -Ahp1 und  $\alpha$ -Cdc19-Antikörper verwendet. Für die Darstellung in **B)** wurden Teile der Immunoblots ausgespart (gestrichelte Linie).

### 2.4.2 Urmylieung und tRNA-Thiolierung werden vermutlich durch den gleichen Schwefeltransferweg vermittelt

Der Nachweis einer Schwefelabhängigkeit der Urmylieung unterstützte die Annahme, dass beide Urm1-vermittelten Funktionen mechanistisch miteinander verknüpft sind. Daher sollte bestätigt werden, dass die tRNA-Thiolierung und Urmylieung durch denselben Schwefeltransferweg vermittelt werden. Hierfür wurde untersucht, wie sich das Fehlen einzelner Komponenten dieses Schwefeltransferwegs auf die Urm1-Konjugation auswirkt.

Mittels  $\alpha$ -TAP-*Western Blot* wurde die vorherige Beobachtung bestätigt (Abb. 10), dass ein Verlust des Urm1-Aktivators Uba4 zu einem Ausbleiben der Urmylieung führt (Abb. 23A). Im Gegensatz dazu hatte die Deletion der Thiolasegene *NCS2* und *NCS6* keinen Einfluss auf die TAP-Urm1-Konjugation an Ahp1 oder an andere Zielproteine. Die Intensität der Urmylieungssignale blieb in beiden Mutanten im Vergleich zum WT-Hintergrund unverändert. Interessanterweise kam es jedoch im *tum1* $\Delta$ -Hintergrund zu einer drastischen Abnahme in der Ahp1-Urmylieung und in der Modifikation weiterer Proteine. Tum1 ist eine Schwefeltransferase, die den indirekten Schwefeltransport von Nfs1 auf Uba4 vermittelt und zur Bildung des Urm1-Thiocarboxylats beiträgt (Noma *et al.*, 2009). Dieser Beitrag zum Schwefeltransfer konnte in früheren Arbeiten dadurch gezeigt werden, dass die tRNA-Thiolierung in einer *tum1* $\Delta$ -Mutante drastisch reduziert ist (Huang *et al.*, 2008).

Um zu verifizieren, dass der Verlust von Tum1 eine verminderte Thiomodifikation zur Folge hat, wurde die relative Menge an thioliertem ( $mcm^5s^2U$ ) Uridin massenspektrometrisch in einem *tum1* $\Delta$ -Stamm bestimmt und mit der im WT verglichen. Tatsächlich war die Menge an thioliertem Uridin nach Deletion von *TUM1* stark reduziert (Abb. 23B). Verglichen mit der  $mcm^5s^2U$ -Menge im WT lag diese bei 16%. Dies bestätigt eine Hemmung der Thiomodifikation und daher auch des Schwefeltransfers, sobald Tum1 fehlt. Demnach scheint die zuvor im *tum1* $\Delta$ -Hintergrund beobachtete Verminderung der Urmylieung auf einen reduzierten Schwefeltransfer auf Urm1 zurückzugehen.



**Abbildung 23: Die Schwefeltransferase Tum1 wird für eine effiziente Urmylieung benötigt.**

**A)** In einer *tum1Δ*-Mutante ist die Urm1-Konjugation vermindert. Die NEM-stabilisierte Urmylieung mit TAP-Urm1 wurde in einem *tum1Δ*-, *uba4Δ*-, *ncs2Δ*- und *ncs6Δ*-Hintergrund untersucht. Die *Western Blots* wurden mit  $\alpha$ -TAP- und  $\alpha$ -Cdc19-Antikörpern detektiert. Durch Sternchen (\*) sind modifizierte Formen des TAP-Urm1 hervorgehoben, deren Bildung Uba4-unabhängig war. **B)** In einer *tum1Δ*-Mutante ist die tRNA-Thiolierung vermindert. Die relative Menge an  $mcm^5s^2U$  im WT und in einem *tum1Δ*-Stamm wurde massenspektrometrisch bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die relative Menge an  $mcm^5s^2U$  im WT mit 1 festgelegt. **C)** Die *AHP1*-Expression bleibt in einer *tum1Δ*-Mutante unverändert. Der Einfluss einer *TUM1*-Deletion auf die Ahp1-Proteinmenge wurde untersucht. Die Proteinextraktion aus den dargestellten Stämmen erfolgte in Abwesenheit von NEM. Die *Western Blots* wurden mit  $\alpha$ -Ahp1- und  $\alpha$ -Cdc19-Antikörpern entwickelt.

Es wird vermutet, dass der Verlust der  $s^2$ -Modifikation am *wobble*-Uridin der tRNAs  $tQ^{UUG}$ ,  $tE^{UUC}$  und  $tK^{UUU}$  zu einer verschlechterten Translation von mRNAs führt, die reich an Codons sind, welche durch diese tRNAs erkannt werden (Rezgui *et al.*, 2013). Dementsprechend war es nicht auszuschließen, dass die verminderte tRNA-Thiolierung nach Verlust von Tum1 zu einer reduzierten Translation von Urm1-Zielproteinen und somit zu einer verschlechterten Urmylieung führen könnte. Daher wurde beispielhaft untersucht, ob die durch Deletion von *TUM1* hervorgerufene Abnahme der Ahp1-Urmylieung auf eine verminderte Translationsrate des Peroxiredoxins zurückgeht. Mittels  $\alpha$ -Ahp1-*Western Blot* konnte gezeigt werden, dass die Ahp1-Translation in der *tum1Δ*-Mutante im Vergleich zum WT-Hintergrund unverändert war (Abb. 23C). Somit ist die zuvor beobachtete, verminderte Ahp1-

Modifikation nicht auf eine verschlechterte Expression des Peroxiredoxins zurückzuführen. Die Abnahme in der Urmyleierung nach Verlust von Tum1 geht daher womöglich darauf zurück, dass der Schwefeltransfer und somit die Bildung des Urm1-Thiocarboxylats eingeschränkt sind.

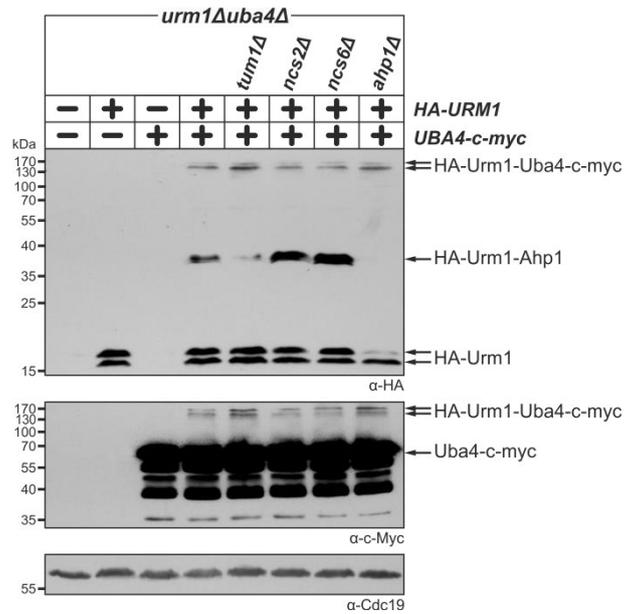
Dementsprechend lassen diese Ergebnisse vermuten, dass sowohl die tRNA-Thiolierung als auch die Urmyleierung durch den gleichen Schwefeltransferweg vermittelt werden.

### 2.4.3 Die Urmyleierung von Uba4 ist Tum1-unabhängig

Generell war die Urmyleierungseffizienz vermindert, wenn der Schwefeltransfer auf Urm1 durch Verlust von Tum1 eingeschränkt war (Abb. 23A). Um zu bestätigen, dass neben Ahp1 noch weitere Proteine Tum1-abhängig durch Urm1 modifiziert werden, wurde untersucht, wie sich eine *TUM1*-Deletion auf die Urmyleierung von Uba4 auswirkt.

Uba4 konnte in dieser Arbeit als neues Urm1-Zielprotein in Hefe identifiziert werden. Wie zuvor gezeigt (Abb. 21), kam es in einem *urm1Δuba4Δ*-Stamm, der das *HA-URM1* und *UBA4-c-myc* enthielt, zur Bildung von urmyliertem Uba4 (Abb. 24). Im  $\alpha$ -HA- und  $\alpha$ -c-Myc-*Western Blot* war das modifizierte Uba4 als Doppelbande im Bereich zwischen 130 und 170 kDa detektierbar. Zusätzlich konnte im  $\alpha$ -HA-Immunoblot eine weitere Urmyleierungsbande bei ca. 40 kDa nachgewiesen werden. Diese war in einem *ahp1Δ*-Hintergrund nicht mehr zu detektieren, was darauf hindeutet, dass es sich bei dieser Bande um urmyliertes Ahp1 handelt. Allgemein hatte der Verlust von Ahp1 keinen Einfluss auf die Uba4-Urmyleierung. Ebenso zeigte sich kein Effekt auf die Uba4-Modifikation in Mutanten, denen die Thiolasekomponenten Ncs2 und Ncs6 fehlten. In Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen bewirkte eine *TUM1*-Deletion eine Verringerung in der Ahp1-Urmyleierung, wohingegen keine Abnahme in der Uba4-Urmyleierung nachzuweisen war.

Demnach ist die Urmyleierung von Uba4 im Gegensatz zur Modifikation anderer Proteine durch Urm1 vermutlich nicht Tum1-abhängig.



**Abbildung 24: Der Verlust von Tum1 hat keinen Einfluss auf die Uba4-Urmylierung.**

Die Urmylierung von Uba4-c-myc wurde in einem *tum1Δ*-, *ncs2Δ*-, *ncs6Δ*- und *ahp1Δ*-Hintergrund untersucht. Die Proteinextraktion aus den entsprechenden Stämmen erfolgte mit NEM, um mögliche HA-Urm1-Konjugate zu stabilisieren. Für die Detektion der *Western Blots* wurden  $\alpha$ -HA,  $\alpha$ -c-Myc und  $\alpha$ -Cdc19-Antikörper verwendet. Urmylierte Formen von Uba4 oder Ahp1 sind hervorgehoben.

## 2.5 Analyse der Urm1-Aktivierung durch das E1-ähnliche Enzym Uba4

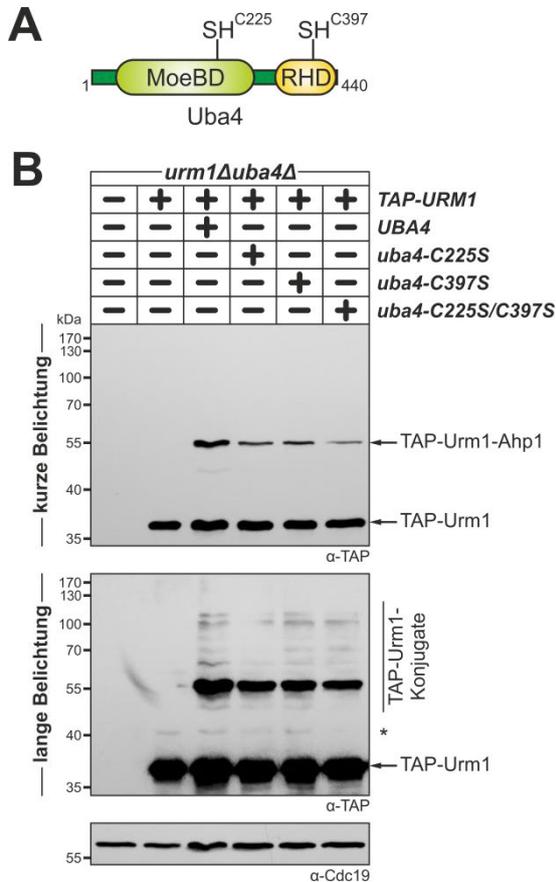
Das 440 Aminosäuren umfassende Protein Uba4 ist ein E1-ähnliches Enzym, welches essentiell für die Aktivierung von Urm1 ist und aus zwei Domänen besteht (Abb. 25A) (Furukawa *et al.*, 2000; Nakai *et al.*, 2008; Schmitz *et al.*, 2008; Leidel *et al.*, 2009; Noma *et al.*, 2009). Neben einer N-terminalen MoeBD besitzt Uba4 am C-Terminus eine RHD. Es wird angenommen, dass die MoeBD für die Urm1-Adenylierung benötigt wird, während die RHD den Schwefeltransfer auf Urm1 und somit die Thiocarboxylierung des Modifikators vermittelt. In beiden Uba4-Domänen konnte jeweils ein katalytischer Cysteinrest nachgewiesen werden (Furukawa *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2008). In der MoeBD ist es das Cystein an Position 225 (C225) und in der RHD das Cystein an Position 397 (C397). Es wurde gezeigt, dass eine Punktmutation der beiden Cysteine *in vivo* zu einem Ausbleiben der tRNA-Thiolierung und Urm1-Adenylierung führt (Furukawa *et al.*, 2000; Leidel *et al.*, 2009; Noma *et al.*, 2009; Van der Veen *et al.*, 2011;). Demzufolge scheinen sowohl das C225 als auch das C397 essentiell für die Urm1-Aktivierung zu sein. Trotz dessen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass eine Mutation des C225 weiterhin eine verminderte Urm1-Adenylierung erlaubt (Schmitz *et al.*, 2008). Daher ist die Urm1-Aktivierung durch Uba4 womöglich komplexer, als bisher angenommen.

### 2.5.1 Die Cysteine C225 und C397 sind nicht essentiell für die Uba4-Funktion

Um zu untersuchen, welche Rolle die beschriebenen, katalytischen Cysteinreste in Uba4 bei der Urm1-Aktivierung spielen, wurden *uba4*-Punktmutanten erzeugt. Hierbei wurden beide Cysteine einzeln (*uba4-C225S* und *uba4-C397S*) oder in Kombination (*uba4-C225S/C397S*) gegen die Aminosäure Serin ausgetauscht.

Die Gene der *uba4*-Cysteinmutanten wurden in einen *urm1Δuba4Δ*-Stamm eingebracht, der bereits *TAP-URM1* enthielt. Daraufhin erfolgte eine Analyse der Urm1-Adenylierung in diesen Transformanten. Interessanterweise zeigte ein  $\alpha$ -TAP-Western Blot, dass eine Urm1-Konjugation nicht nur möglich war, wenn WT-*UBA4* vorlag, sondern auch wenn *uba4-C225S*, *uba4-C397S* oder *uba4-C225S/C397S* vorhanden waren (Abb. 25B). Trotzdem konnte zumindest hinsichtlich der Modifikation von Ahp1 eine Abnahme in der Urm1-Adenylierungseffizienz festgestellt werden. Im Vergleich zur Urm1-Adenylierung mit *UBA4* war die Ahp1-Modifikation, die durch *uba4-C225S* und *uba4-C397S* vermittelt wurde, herabgesetzt. Die durch die Doppelmutante (*uba4-C225S/C397S*) bedingte Ahp1-Adenylierung war im Vergleich zu beiden Einzelmutanten sogar noch stärker reduziert. Zusammengefasst

demonstriert dieses Ergebnis, dass die beiden Uba4-Cysteinreste C225 und C397 im Gegensatz zu früheren Beobachtungen nicht essentiell für die Vermittlung der Urmyleierung sind.



**Abbildung 25: Das C225 wird ebenso wie das C397 nicht für die Urmyleierung benötigt.**

A) Schematische Darstellung von Uba4. Das 440 Aminosäuren lange Urm1-Aktivatorprotein besitzt mit der MoeBD (MoeB-like domain) und RHD (rhodanese homology domain) zwei Domänen, die jeweils über ein katalytisches Cystein verfügen (C225 und C397). B) Die Urm1-Konjugation ist nach Mutation der beiden katalytischen Cysteinreste von Uba4 zwar vermindert aber immer noch vorhanden. Die Gene für die verschiedenen *uba4*-Cysteinmutanten wurden zusammen mit *TAP-URM1* in einen *urm1Δuba4Δ*-Stamm eingebracht. Die NEM-stabilisierte TAP-Urm1-Konjugation wurde mittels EMSA untersucht. Die Detektion der Immunoblots erfolgte unter Verwendung von  $\alpha$ -TAP- und  $\alpha$ -Cdc19-Antikörpern. Mit einem Sternchen (\*) ist eine modifizierte Form des TAP-Urm1 hervorgehoben, deren Bildung Uba4-unabhängig erfolgte.

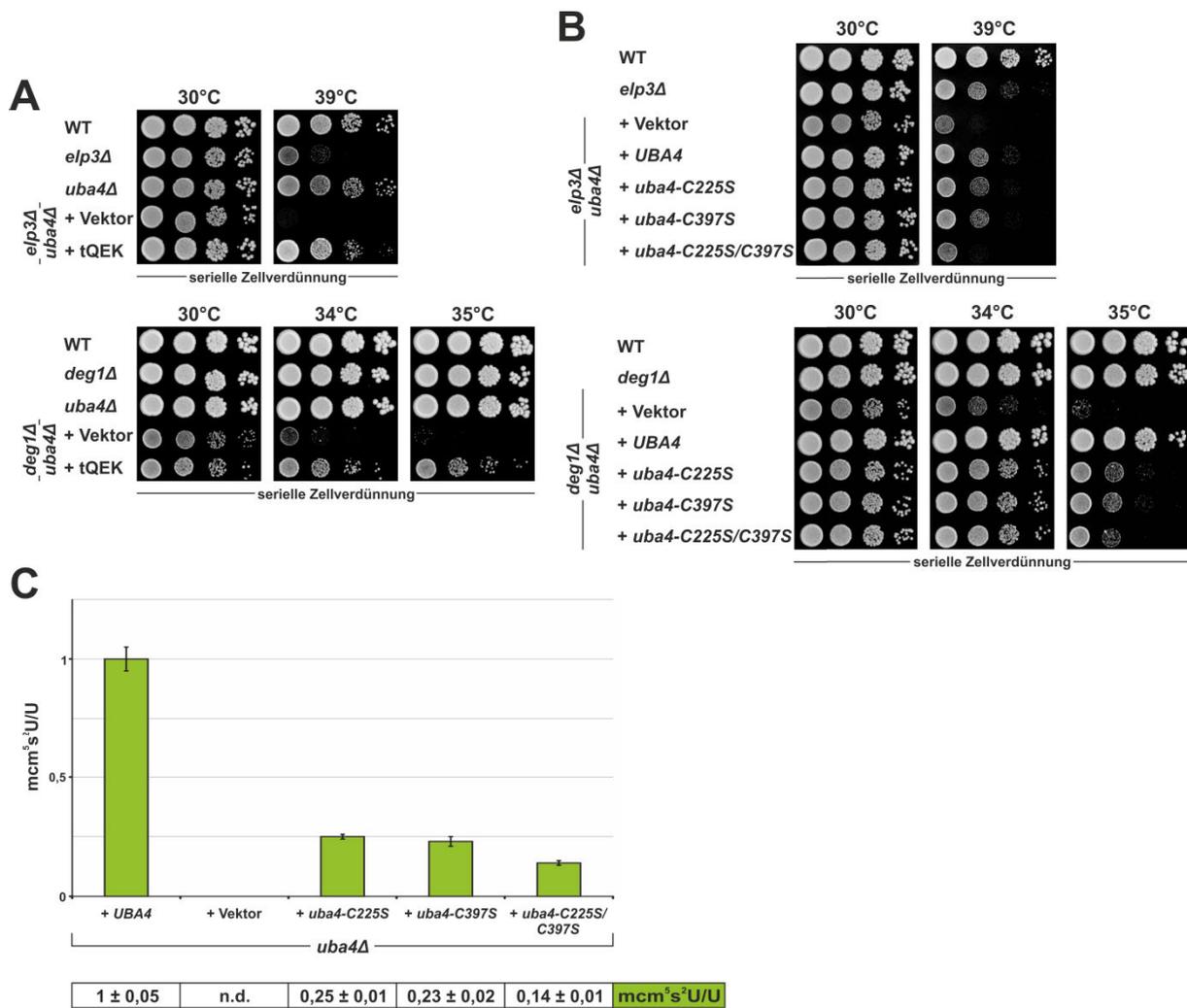
In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass wahrscheinlich beide Urm1-vermittelten Funktionen mechanistisch miteinander verknüpft sind. So kann davon ausgegangen werden, dass ebenfalls eine tRNA-Thiolierung stattfindet, wenn Urmyleierung vorhanden ist. Daher erfolgte eine Analyse, ob die *uba4*-Cysteinmutanten in der Lage sind, tRNA-Thiolierung zu vermitteln. Hierfür wurde untersucht, ob sich die erhöhte Thermosensitivität einer *elp3Δuba4Δ*- oder *deg1Δuba4Δ*-Doppelmutante durch Einbringen der *uba4*-Mutanten supprimieren lässt. Beiden Doppelmutanten fehlt neben *UBA4* ein weiteres Gen, dessen Genprodukt an der tRNA-Modifikation beteiligt ist. Elp3 ist Teil des Elongatorkomplexes, welcher unter anderem zur Bildung der  $mcm^{5,2}$ -Modifikation am *wobble*-Uridin der tRNAs  $tQ^{UUG}$ ,  $tE^{UUC}$  und  $tK^{UUU}$  beiträgt (Huang *et al.*, 2005). Deg1 ist eine Pseudouridinsynthase, die an Position 38 und 39 verschiedener tRNAs die Bildung eines Pseudouridins vermittelt (Lecoite *et al.*, 1998). Es ist bekannt, dass beide Doppelmutanten eine erhöhte Thermosensitivität besitzen, die durch Überexpression der hypomodifizierten tRNAs  $tQ^{UUG}$ ,

tE<sup>UUC</sup> und tK<sup>UUU</sup> supprimiert werden kann (Abb. 26A) (Han *et al.*, 2015; Klassen *et al.*, 2015). Dies demonstriert, dass die Thermosensitivität dieser Mutanten auf eine fehlerhafte tRNA-Modifikation zurückzuführen ist. Demnach würde eine Suppression der Thermosensitivität durch Einbringen der *uba4*-Cysteinmutanten auf eine Wiederherstellung der tRNA-Thiolierung in den Doppelmutanten hindeuten.

Im Vergleich zu den Leervektortransformanten erlaubten *uba4-C225S* und *uba4-C397S* ein besseres Wachstum im *elp3Δuba4Δ*- und *deg1Δuba4Δ*-Hintergrund (Abb. 26B). Jedoch war die Suppression der Thermosensitivität nicht so gut wie mit *UBA4*. Für *uba4-C225S/C397S* konnte eine schwache Suppression nur in der *deg1Δuba4Δ*-Doppelmutante nachgewiesen werden. Diese phänotypischen Tests deuten darauf hin, dass der Verlust der angenommenen, katalytisch aktiven Uba4-Cysteinreste immer noch eine abgeschwächte tRNA-Thiolierung erlaubt.

Zur Bestätigung dieser phänotypischen Ergebnisse wurde massenspektrometrisch die relative Menge an thioliertem Uridin in *uba4Δ*-Transformanten bestimmt, die entweder *uba4-C225S*, *uba4-C397S* oder *uba4-C225S/C397S* trugen. Im Gegensatz zur Leervektorkontrolle konnte in allen drei Transformanten eine Wiederherstellung der tRNA-Thiolierung nachgewiesen werden (Abb. 26C). Doch verglichen zur Thiomodifikation, die durch *UBA4* vermittelt wurde, war die tRNA-Thiolierung, die mit den *uba4*-Cysteinmutanten erzielt wurde, eingeschränkt. Im Vergleich zur tRNA-Thiolierung in Gegenwart von *UBA4*, lag die Menge an gebildetem mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U mit *uba4-C225S* oder *uba4-C397S* bei jeweils ca. 25% und 23%. Mit *uba4-C225S/C397S* war die Thiomodifikation sogar noch weiter herabgesetzt (ca. 14%). Diese Ergebnisse bestätigen die phänotypischen Tests. Daher kann davon ausgegangen werden, dass eine reduzierte tRNA-Thiolierung auch mit den *uba4*-Cysteinmutanten möglich ist.

Zusammengefasst demonstrieren diese Resultate, dass sowohl das C225 als auch das C397 nicht essentiell für die Uba4-Funktion sind. Eine Mutation dieser Cysteinreste führt jedoch zu einer Hemmung der Urmlylierung und tRNA-Thiolierung. Beide Cysteine werden demnach für eine effiziente Urm1-Aktivierung benötigt.



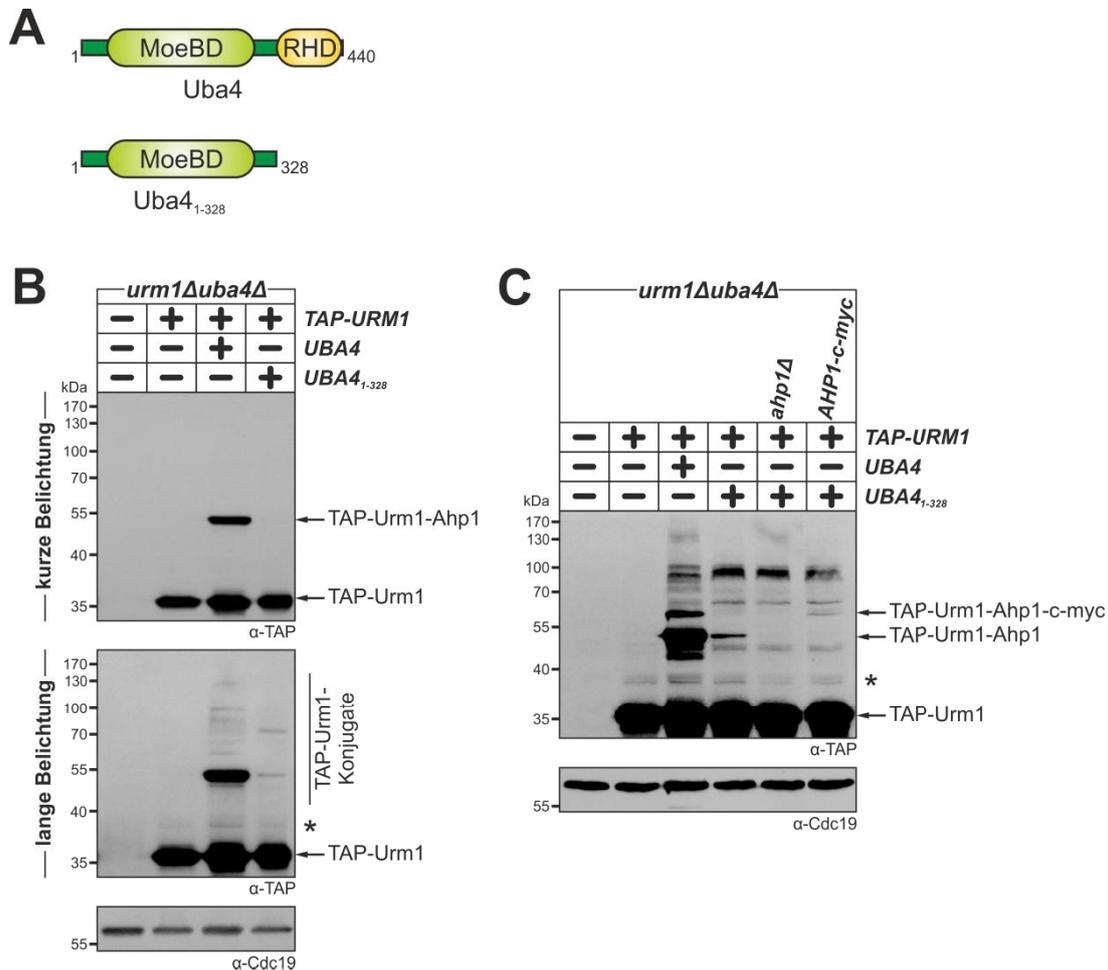
**Abbildung 26: Das C225 und das C397 sind nicht essentiell für die tRNA-Thiolierung.**

**A)** Die erhöhte Thermosensitivität einer *elp3Δuba4Δ*- oder *deg1Δuba4Δ*-Doppelmutante lässt sich durch Überexpression der hypomodifizierten tRNAs tQ<sup>UUG</sup>, tE<sup>UUC</sup> und tK<sup>UUU</sup> (tQEK) supprimieren. **B)** Die verschiedenen *uba4*-Cysteinmutanten vermitteln ein besseres Wachstum der *elp3Δuba4Δ*- und *deg1Δuba4Δ*-Doppelmutanten bei erhöhten Temperaturen. Von den dargestellten Stämmen in **A)** und **B)** wurden serielle Verdünnungen erstellt, die auf Vollmedium aufgetropft wurden. Die Inkubation erfolgte für 3 Tage bei 30°C (Kontrolle), 34°C, 35°C oder 39°C. **C)** Nach Mutation des C225 oder C397 findet weiterhin eine verminderte tRNA-Thiolierung statt. Die verschiedenen *uba4*-Cysteinmutanten wurden in einen *uba4Δ*-Stamm eingebracht. Die relative Menge an mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U in den entsprechenden Transformanten wurde massenspektrometrisch ermittelt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die relative Menge an mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U in der *UBA4*-Transformante mit 1 festgelegt. In einer Leervektortransformante (*uba4Δ* + Vektor) war thioliertes Uridin nicht detektierbar (n.d.).

### 2.5.2 Der Verlust der Uba4-RHD erlaubt weiterhin eine reduzierte Urm1-Aktivierung

Uba4 besitzt, wie bereits erwähnt, an seinem C-Terminus eine RHD. Diese Domäne ist insofern besonders, da sie in anderen E1-Enzymen nicht zu finden ist und eine evolutionäre Anpassung darstellt, die an der Vermittlung des Schwefeltransfers auf Urm1 beteiligt ist

(Schmitz *et al.*, 2008). Da zuvor gezeigt werden konnte, dass das beschriebene katalytische Cystein (C397) in dieser Domäne nicht essentiell für die Urm1-Aktivierung ist, wurde weiterführend untersucht, welche Bedeutung die RHD für die Uba4-Funktionalität besitzt. Dementsprechend wurde ein C-terminal verkürztes Uba4 erzeugt, das zwar noch über die N-terminale MoeBD verfügte, dem jedoch die RHD vollständig fehlte (Abb. 27A). Diese mutierte Variante wurde als Uba4<sub>1-328</sub> bezeichnet.



**Abbildung 27: Nach Verlust der Uba4-RHD ist weiterhin eine verminderte Urm1-Konjugation möglich.**

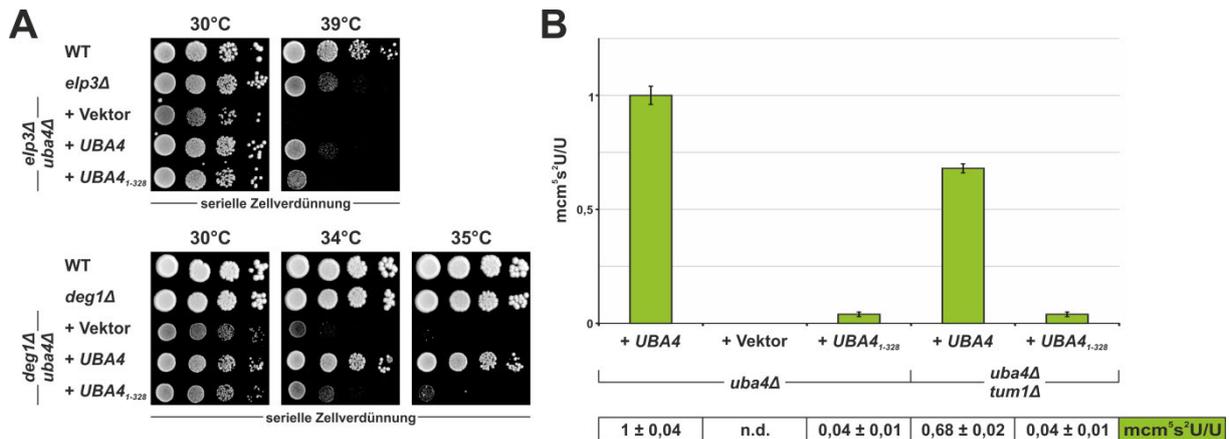
**A)** Schematische Darstellung von Uba4<sub>1-328</sub>, das im Vergleich zum Vollängen-Uba4 nicht über die C-terminale RHD verfügt. **B)** Uba4<sub>1-328</sub> erlaubt eine verminderte Urm1-Konjugation. **C)** Die Modifikation von Ahp1 wird nicht nur durch Uba4, sondern auch durch Uba4<sub>1-328</sub> vermittelt. In **B)** und **C)** wurde der Einfluss von Uba4<sub>1-328</sub> auf die NEM-stabilisierte TAP-Urm1-Konjugation in den angegebenen Stammhintergründen untersucht. Für die Detektion der *Western Blots* wurden α-TAP- und α-Cdc19-Antikörper benutzt. Ein Sternchen (\*) markiert eine modifizierte Form des TAP-Urm1, deren Bildung Uba4-unabhängig erfolgte.

Anfänglich wurde untersucht, ob Uba4<sub>1-328</sub> in Hefe die Modifikation von Proteinen durch TAP-Urm1 erlaubt. Ein α-TAP-*Western Blot* zeigte, dass eine Urm1-Konjugation nach Einbringen

von *UBA4*<sub>1-328</sub> möglich war (Abb. 27B). Die Effizienz der Urm1-Konjugation war jedoch im Vergleich zur der, die mit Vollängen-Uba4 nachweisbar war, drastisch herabgesetzt. Nur nach längerer Exposition des  $\alpha$ -TAP-Immunoblots konnten Urm1-Konjugate detektiert werden. Eines der Konjugate, das in Anwesenheit von Uba4<sub>1-328</sub> gebildet wurde, entsprach in seiner Größe (ca. 50 kDa) einem möglichen Konjugat aus TAP-Urm1 (ca. 32,8 kDa) und Ahp1 (ca. 19,1 kDa). Tatsächlich handelte es sich bei diesem modifizierten Protein um urmyliertes Ahp1. In einem *ahp1* $\Delta$ -Hintergrund war das entsprechende Urmylierungssignal nicht mehr detektierbar, während es in einem *AHP1-c-myc*-Hintergrund elektrophoretisch nach oben verschoben war (Abb. 27C). Dennoch scheint der Verlust der RHD auch Einfluss auf die Spezifität der Urm1-Konjugation zu haben, da sich die Urmylierungsmuster in Gegenwart von Uba4<sub>1-328</sub> oder Uba4 unterschieden. Trotz dessen deutet die immer noch vorhandene, aber herabgesetzte Urmylierung darauf hin, dass eine eingeschränkte Urm1-Aktivierung auch in Abwesenheit der Uba4-RHD möglich ist.

Um dies zu bestätigen, wurde ebenfalls bestimmt, ob eine tRNA-Thiolierung in Gegenwart von Uba4<sub>1-328</sub> stattfindet. Dementsprechend wurden phänotypische Tests mit der *elp3* $\Delta$ *uba4* $\Delta$ - und *deg1* $\Delta$ *uba4* $\Delta$ -Doppelmutante durchgeführt, die entweder das *UBA4*<sub>1-328</sub>- oder *UBA4*-Gen trugen. Wie zuvor die *uba4*-Cysteinmutanten vermittelte auch *UBA4*<sub>1-328</sub> eine Suppression der Thermosensitivität in beiden Mutantenhintergründen (Abb. 28A). Diese war jedoch schwächer als mit *UBA4*. Demnach scheint auch nach Verlust der Uba4-RHD eine eingeschränkte tRNA-Thiolierung möglich zu sein. Mittels Massenspektrometrie konnte eine durch Uba4<sub>1-328</sub>-vermittelte tRNA-Thiolierung ebenfalls gezeigt werden (Abb. 28B). Wurde *UBA4*<sub>1-328</sub> in eine *uba4* $\Delta$ -Mutante eingebracht, bestätigte sich eine stark eingeschränkte Bildung von thioliertem Uridin, da die relative Menge an gebildetem mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U im Vergleich zu einer Transformante mit *UBA4* nur bei 4% lag.

Alles in allem demonstrieren die drastisch reduzierte Urmylierung und tRNA-Thiolierung, dass womöglich trotz des Verlusts der Uba4-RHD eine verminderte Urm1-Aktivierung stattfinden kann. Demnach scheint diese Domäne nicht essentiell für die Uba4-Funktion zu sein.



**Abbildung 28: Die Uba4-RHD wird für eine effiziente tRNA-Thiolierung benötigt.**

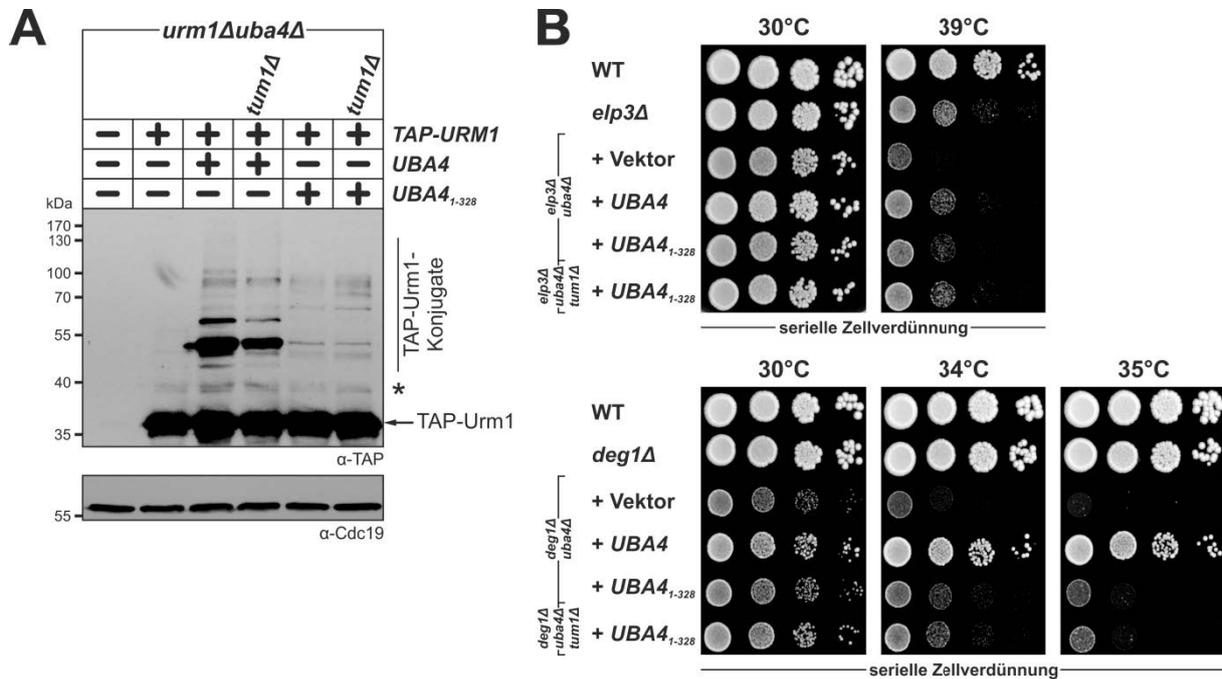
**A)** *UBA4*<sub>1-328</sub> vermittelt ein verbessertes Wachstum der *elp3Δuba4Δ*- oder *deg1Δuba4Δ*-Doppelmutante bei erhöhten Temperaturen. Die dargestellten Stämme wurden seriell verdünnt. Die Verdünnungen wurden auf Vollmedium getropft und anschließend erfolgte eine Inkubation für 3Tage bei 30°C (Kontrolle), 34°C, 35°C oder 39°C. **B)** *Uba4*<sub>1-328</sub> erlaubt eine stark verminderte tRNA-Thiolierung in Hefe. *UBA4*<sub>1-328</sub> wurde ebenso wie *UBA4* in einen *uba4Δ*- oder *uba4Δtum1Δ*-Stamm eingebracht. Die relative Menge an mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U in den entsprechenden Transformanten wurde massenspektrometrisch bestimmt. Für den *uba4Δ*-Stamm mit *UBA4* wurde die relative Menge an mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U mit 1 festgelegt. In der Leervektortransformante (*uba4Δ* + Vektor) war thioliertes Uridin nicht detektierbar (n.d.).

### 2.5.3 Die durch *Uba4*<sub>1-328</sub>-vermittelte Urm1-Aktivierung ist Tum1-unabhängig

Die vorherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass der Schwefeltransfer auf Urm1 durch Verlust von Tum1 gehemmt wird und dass die daraus resultierende, verminderte Urm1-Aktivierung eine reduzierte Urm1-Mylierung sowie tRNA-Thiolierung zur Folge hat (Abb. 23). Es wird davon ausgegangen, dass Schwefel in Form eines Persulfids von Tum1 auf Uba4 übertragen wird (Noma *et al.*, 2009). Nach Transfer auf das C397 in der RHD von Uba4 kann der eingebaute Schwefel zur Bildung des Urm1-Thiocarboxylats genutzt werden (Schmitz *et al.*, 2009). Da auch bei Fehlen der RHD eine Urm1-Mylierung und tRNA-Thiolierung möglich war, kann davon ausgegangen werden, dass in Abwesenheit der Domäne noch ein Schwefeltransfer auf Urm1 stattfindet. Es stellte sich jedoch die Frage, ob dieser wie bei Vollängen-Uba4 über Tum1 vermittelt wird.

Ein Urm1-Mylierungsassay sollte darüber Aufschluss geben, welchen Einfluss Tum1 auf den in Gegenwart von *Uba4*<sub>1-328</sub> vorhandenen Schwefeltransfer hat. Dementsprechend wurde untersucht, wie sich die An- oder Abwesenheit von *TUM1* auf die *Uba4*<sub>1-328</sub>-vermittelte Urm1-Mylierung auswirkt. In Übereinstimmung mit einer Beteiligung von Tum1 am *Uba4*-vermittelten Schwefeltransport, war die *UBA4*-bedingte TAP-Urm1-Konjugation in *tum1Δ*-

Zellen reduziert, da die Intensität der Urmylierungsbanden im Vergleich zum WT-Hintergrund leicht vermindert war (Abb. 29A). Im Gegensatz dazu blieb die *UBA4*<sub>1-328</sub>-bedingte Urmylierung in einer *tum1Δ*-Mutante unverändert. Dies deutet darauf hin, dass Tum1 nicht zum Uba4<sub>1-328</sub>-abhängigen Schwefeltransfer beiträgt.



**Abbildung 29: Die Urm1-Aktivierung durch Uba4<sub>1-328</sub> erfolgt unabhängig von Tum1.**

**A)** Tum1 trägt nicht zur Uba4<sub>1-328</sub>-vermittelten Urmylierung bei. Die NEM-stabilisierte Konjugation von TAP-Urm1 wurde in den dargestellten Stämmen mittels EMSA untersucht. Die Immunoblots wurden mit α-TAP- und α-Cdc19-Antikörpern detektiert. Eine modifizierte Form des TAP-Urm1, die Uba4-unabhängig gebildet wurde, ist durch ein Sternchen (\*) hervorgehoben. **B)** Auch wenn Tum1 fehlt, ist Uba4<sub>1-328</sub> womöglich weiterhin in der Lage, tRNA-Thiolierung zu vermitteln. *elp3Δuba4Δ*- oder *deg1Δuba4Δ*-Doppelmutanten, die das *UBA4*<sub>1-328</sub> trugen, wurden hinsichtlich ihrer Thermosensitivität mit *elp3Δuba4Δtum1Δ*- oder *elp3Δuba4Δtum1Δ*-Dreifachmutanten verglichen, die ebenfalls *UBA4*<sub>1-328</sub> enthielten. Von den dargestellten Stämmen wurden serielle Verdünnungen erstellt, die auf Vollmedium aufgetropft wurden. Die Inkubation fand für 3Tage bei 30°C (Kontrolle), 34°C, 35°C oder 39°C statt.

Um diesen Befund zu unterstützen, wurde untersucht, wie sich eine *TUM1*-Deletion in den Doppelmutanten *elp3Δuba4Δ* und *deg1Δuba4Δ* auf die Suppression der Thermosensitivität auswirkt, die zuvor für diese Stämme nach Einbringen von *UBA4*<sub>1-328</sub> beobachtet wurde (Abb. 28A). Sollte Tum1 zu dem durch Uba4<sub>1-328</sub>-vermittelten Schwefeltransfer beitragen, müsste eine Abnahme oder ein Ausbleiben der Suppression beobachtet werden. Es zeigte sich jedoch, dass eine zusätzliche *TUM1*-Deletion keinen Effekt auf das durch Uba4<sub>1-328</sub> vermittelte Wachstum hat (Abb. 29B). *tum1Δ*-Zellen, welche das *UBA4*<sub>1-328</sub>-Gen trugen,

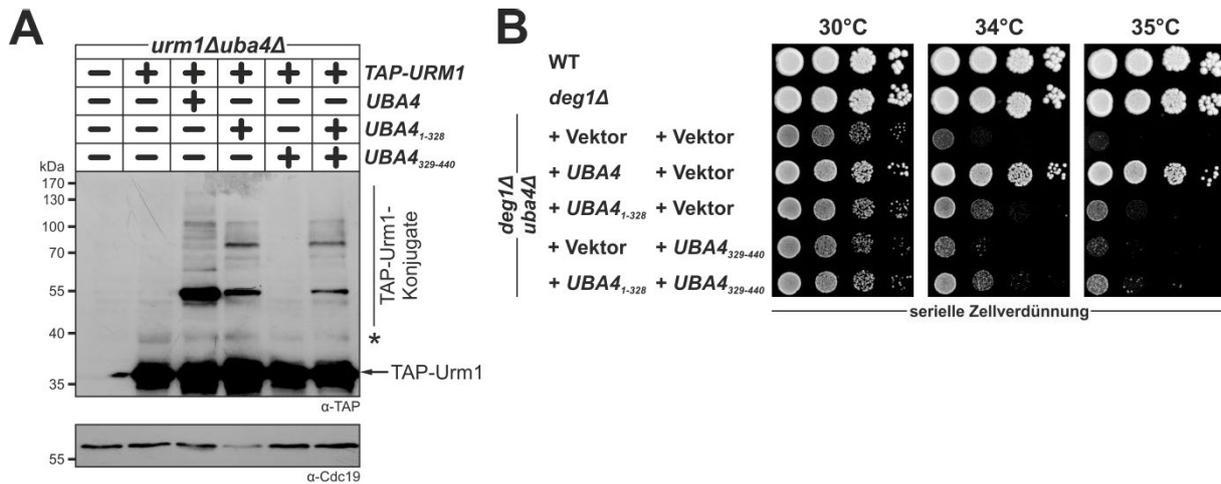
wuchsen bei höheren Temperaturen ebenso gut wie *UBA4*<sub>1-328</sub>-Transformanten ohne *TUM1*-Deletion. Mittels Massenspektrometrie konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass *UBA4*<sub>1-328</sub> in einer *uba4Δtum1Δ*-Mutante die Bildung von s<sup>2</sup>-modifizierter tRNA ermöglichte (Abb. 28B). Dabei blieb die relative Menge an gebildetem mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U (ca. 4%) im Vergleich zur *uba4Δ*-Mutante, die ebenfalls mit *UBA4*<sub>1-328</sub> transformiert war, unverändert.

Zusammengefasst scheint das Fehlen von Tum1 keinen Einfluss auf die Urmylieung und tRNA-Thiolierung zu haben, welche in Anwesenheit von Uba4<sub>1-328</sub> zu beobachten ist. Demnach ist die Urm1-Aktivierung, die durch das C-terminal verkürzte Uba4 vermittelt wird, vermutlich Tum1-unabhängig.

#### **2.5.4 Durch das zusätzliche Einbringen der Uba4-RHD wird die Uba4<sub>1-328</sub>-vermittelte Urm1-Aktivierung nicht verbessert**

Im Archaeon *H. volcanii* konnten mit SAMP1, SAMP2 und SAMP3 Urm1-ähnliche Proteine nachgewiesen werden, die ebenfalls als Schwefelträger und Proteinmodifikatoren fungieren (Humbard *et al.*, 2010; Miranda *et al.*, 2014). Interessanterweise besitzen die drei SAMPs mit UbaA ein E1-ähnliches Aktivatorprotein, das zwar zur N-terminalen Uba4-MoeBD homolog ist, dem aber eine C-terminale RHD fehlt. Daher wird davon ausgegangen, dass der Schwefeltransfer auf die SAMPs über ein weiteres, bisher unbekanntes Protein gewährleistet wird, welches über eine oder mehrere RHDs verfügt (Miranda *et al.*, 2011). Daran angelehnt könnte für Uba4 die Möglichkeit bestehen, dass dessen C-terminale RHD nicht notwendigerweise mit der N-terminalen MoeBD fusioniert sein muss, um in Hefe einen effektiven Schwefeltransfer auf Urm1 zu vermitteln. Um dies herauszufinden, wurde untersucht, ob das kombinierte Einbringen der Uba4-MoeBD (Uba4<sub>1-328</sub>) und -RHD (Uba4<sub>329-440</sub>) zu einer vergleichbaren Urmylieung oder tRNA-Thiolierung führt, wie sie mit Vollängen-Uba4 zu sehen ist.

In einem *urm1Δuba4Δ*-Stamm, der zusätzlich zum *TAP-URM1* das *UBA4*<sub>1-328</sub>-Gen trug, konnte wie auch zuvor eine Urm1-Konjugation nachgewiesen werden, die verglichen zur Urmylieung mit *UBA4* abgeschwächt war (Abb. 30A). Im Gegensatz dazu zeigte sich nach alleinigem Einbringen von *UBA4*<sub>329-440</sub> keine Urm1-Konjugation. Wurde *UBA4*<sub>329-440</sub> zusammen mit *UBA4*<sub>1-328</sub> exprimiert, blieb die Urmylieung im Vergleich zu der Transformante, die nur *UBA4*<sub>1-328</sub> trug, unverändert. Demnach scheint das zusätzliche Einbringen der Uba4-RHD die gehemmte, durch Uba4<sub>1-328</sub>-vermittelte Urmylieung nicht zu verbessern.



**Abbildung 30: Eine Koexpression von *UBA4*<sub>1-328</sub> und *UBA4*<sub>329-440</sub> verbessert die Urm1-Aktivierung nicht.**

**A)** Die Uba4<sub>1-328</sub>-vermittelte Urm1-Modifikation lässt sich durch zusätzliches Einbringen von Uba4<sub>329-440</sub> nicht verstärken. *UBA4*<sub>1-328</sub> und *UBA4*<sub>329-440</sub> wurden entweder einzeln oder zusammen in einen *urm1Δuba4Δ*-Stamm eingebracht, der zusätzlich das *TAP-URM1*-Gen trug. Die NEM-stabilisierte TAP-Urm1-Konjugation wurde mittels EMSA untersucht. Es erfolgte eine Detektion mit α-TAP- und α-Cdc19-Antikörpern. Ein Sternchen (\*) markiert eine modifizierte Form des TAP-Urm1, deren Bildung in Abwesenheit von Uba4 stattfand. **B)** Die Uba4<sub>1-328</sub>-abhängige tRNA-Thiolierung kann durch Einbringen von Uba4<sub>329-440</sub> nicht verbessert werden. Der Einfluss einer Koexpression von *UBA4*<sub>1-328</sub> und *UBA4*<sub>329-440</sub> auf die Thermosensitivität einer *deg1Δuba4Δ*-Mutante wurde überprüft. Die dargestellten Stämme wurden seriell verdünnt und auf Vollmedium aufgetropft. Die Inkubation erfolgte für 3 Tage bei 30°C (Kontrolle), 34°C und 35°C.

Auch phänotypisch konnte nachgewiesen werden, dass die zusätzliche Expression von *UBA4*<sub>329-440</sub> keinen Effekt auf die in Gegenwart von Uba4<sub>1-328</sub> vorhandene tRNA-Thiolierung hat. Wurden *UBA4*<sub>1-328</sub> und *UBA4*<sub>329-440</sub> zusammen in eine *deg1Δuba4Δ*-Doppelmutante eingebracht, zeigte sich zwar eine schwache Suppression der Thermosensitivität (Abb. 30B). Das Wachstum war jedoch mit einer Transformante vergleichbar, die allein das *UBA4*<sub>1-328</sub> enthielt.

Insgesamt lassen sich die verminderte Urm1-Modifikation und tRNA-Thiolierung, die durch Uba4<sub>1-328</sub> ermöglicht werden, nicht durch zusätzliches Einbringen von Uba4<sub>329-440</sub> verbessern. Demzufolge ist wahrscheinlich eine enge räumliche Nähe der Uba4-MoeBD und -RHD notwendig, um Schwefeltransfer und Urm1-Aktivierung effizient zu vermitteln.

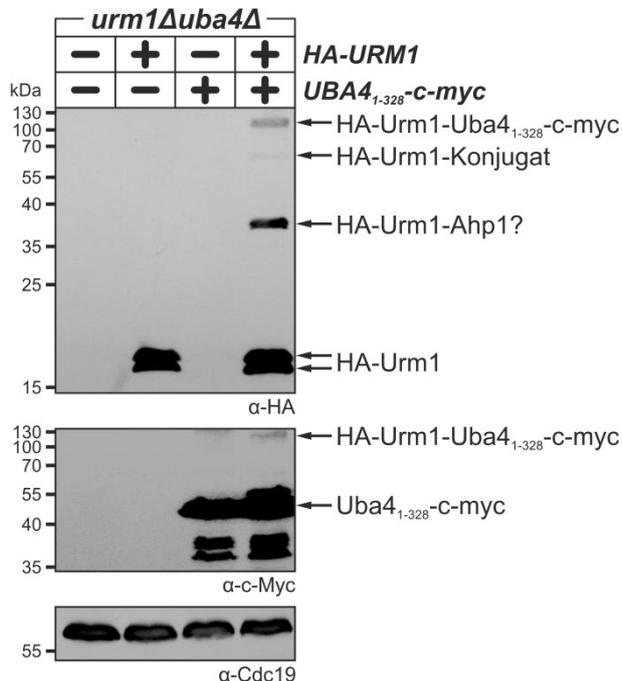
### 2.5.5 Uba4<sub>1-328</sub> wird vermutlich durch Urm1 modifiziert

Auch nach Verlust der RHD war Uba4<sub>1-328</sub> in der Lage die Urm1-Modifikation verschiedener Proteine zu ermöglichen (Abb. 27B). Da Uba4 zuvor selbst als Urm1-Zielprotein in Hefe

identifiziert werden konnte (Abb. 21), wurde untersucht, ob an Uba4<sub>1-328</sub> eine Urm1-Modifikation stattfindet.

Zur Untersuchung der Uba4<sub>1-328</sub>-Modifikation wurde eine c-Myc-Epitop-markierte Variante des verkürzten Proteins erzeugt. Das entsprechende *UBA4*<sub>1-328</sub>-*c-myc*-Gen wurde zusammen mit *HA-URM1* in einen *urm1Δuba4Δ*-Stamm transformiert und anschließend erfolgte eine Analyse des Proteinextrakts dieser Transformante mittels  $\alpha$ -HA- und  $\alpha$ -c-Myc-Western Blot. Im  $\alpha$ -HA-Immunoblot konnten neben freiem HA-Urm1 drei weitere Urm1-Konjugate detektiert werden (Abb. 31). Ein Konjugat lag bei ca. 37 kDa und entsprach in seiner Größe urmyliertem Ahp1. Während bei ca. 70 kDa ein nur schwach detektierbares, zweites Urm1-Modifikationssignal nachweisbar war, zeigte sich zwischen 100 und 130 kDa ein drittes Konjugat. Interessanterweise war im  $\alpha$ -c-Myc-Western Blot zusätzlich zum Uba4<sub>329-440</sub>-*c-myc* eine höhermolekulare Bande vorhanden, die ebenfalls zwischen 100 und 130 kDa zu finden war. Dieses nach oben verschobene c-Myc-Signal konnte nicht in einer Leervektortransformante detektiert werden, die kein *HA-URM1* enthielt. Da die Bildung dieses c-Myc-Signals *HA-URM1*-abhängig war und im  $\alpha$ -HA-Western Blot ein Konjugat mit demselben Laufverhalten detektiert werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um Uba4<sub>1-328</sub>-*c-myc* handelt, welches durch Urm1 modifiziert wurde.

Demzufolge scheint eine Urm1-Konjugation an Uba4 auch bei Fehlen der RHD möglich zu sein. Der Nachweis von modifiziertem Uba4<sub>1-328</sub> könnte ebenfalls darauf hindeuten, dass die Urm1-Modifikation von Vollängen-Uba4 an der N-terminalen MoeBD stattfindet.



**Abbildung 31: Urm1 modifiziert Uba4<sub>1-328</sub>.**

Es erfolgte eine Analyse der NEM-stabilisierten Modifikation von Uba4<sub>1-328</sub>-*c-myc* durch HA-Urm1. Für die Detektion von modifizierten Formen des C-terminal verkürzten Uba4 wurden die *Western Blots* mit  $\alpha$ -HA,  $\alpha$ -c-Myc-Antikörpern entwickelt. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung wurde ebenfalls eine  $\alpha$ -Cdc19-Detektion durchgeführt. Urm1-Modifiziertes Uba4<sub>1-328</sub> ist hervorgehoben. Ebenso sind mutmaßlich modifiziertes Ahp1 und ein weiteres Urm1-Konjugat angezeigt.

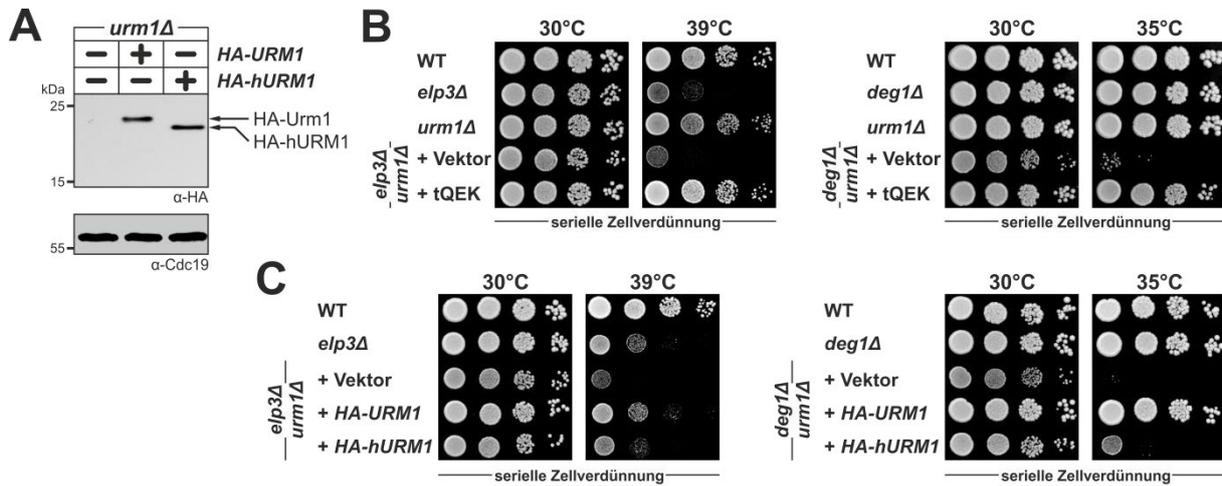
## 2.6 Konservierung von Urm1 und tRNA-Thiolierung zwischen Mensch und Hefe

Proteine, die zum Urm1 aus Hefe homolog sind, konnten auch in höheren Eukaryoten nachgewiesen werden. So wurde z.B. in *Arabidopsis thaliana* das AtUrm11 als Schwefelträger beschrieben, der an der tRNA-Thiolierung beteiligt ist (Nakai *et al.*, 2012). Auch in menschlichen Zellen konnte mit dem hURM1 ein humanes Urm1-Homolog identifiziert werden, welches die Thiomodifikation von tRNAs vermittelt und kovalent andere Proteine modifiziert (Schlieker *et al.*, 2008; Van der Veen *et al.*, 2011). Der Nachweis, dass Urm1-homologe Proteine in höheren Eukaryoten ebenfalls als Schwefelträger in der tRNA-Thiolierung und als Proteinmodifikatoren fungieren, deutet auf eine funktionale Konservierung des Urm1-Wegs hin. Bisher wurden jedoch keine Untersuchungen durchgeführt, die eine allgemeine Konservierung des Urm1-Wegs in Eukaryoten bestätigen. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob dieser Weg generell in allen eukaryotischen Systemen gleich funktioniert.

### 2.6.1 hURM1, das humane Urm1-Homolog, erlaubt tRNA-Thiolierung in Hefe

Zur Analyse einer möglichen Konservierung des Urm1-Wegs wurde untersucht, ob Urm1 in Hefezellen durch sein humanes Homolog funktional ersetzt werden kann. Hierfür wurde das *hURM1*-Gen mit dem kodierenden Bereich eines HA-Epitops fusioniert und unter Kontrolle des *ADHI*-Promotors gestellt, der eine konstitutive Genexpression in Hefe erlaubt (Mumberg *et al.*, 1995). Als Kontrolle erfolgte eine Modifikation des *URM1*-Gens aus Hefe auf die gleiche Weise.

Die resultierenden *HA-URM1*- und *HA-hURM1*-Konstrukte wurden in eine *urm1Δ*-Mutante eingebracht und die Expression beider Gene wurde mittels  $\alpha$ -HA-*Western Blot* verglichen. Im  $\alpha$ -HA-Immunoblot konnten beide Proteine nachgewiesen werden (Abb. 32A). Da HA-Urm1 und HA-hURM1 ungefähr im Bereich zwischen 20 kDa und 24 kDa detektierbar waren, wichen beide Proteine leicht von ihrer erwarteten Größe ab (HA-Urm1 ca. 16,5 kDa; HA-hURM1 ca. 16,8 kDa). Jedoch deutete eine vergleichbare Bandenintensität für HA-Urm1 und HA-hURM1 darauf hin, dass beide Proteine in ähnlicher Menge gebildet werden und demnach kein Expressionsunterschied für die entsprechenden Genkonstrukte besteht.



**Abbildung 32: hURM1 ist in Hefe funktional.**

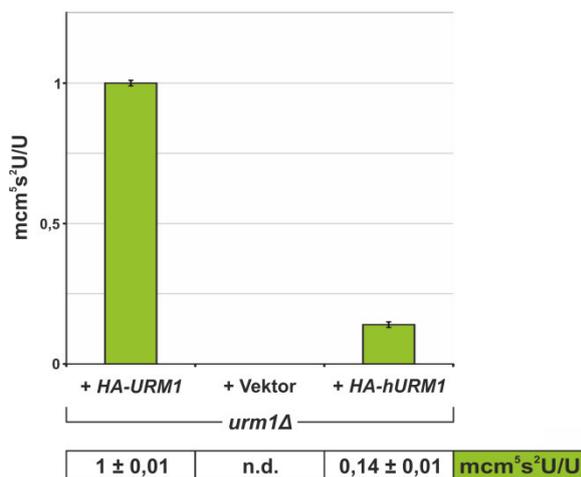
**A)** *hURM1* wird in Hefe ebenso gut exprimiert wie *URM1*. Aus einem *urm1Δ*-Stamm, der entweder das *HA-URM1*- oder *HA-hURM1*-Gen trug, wurden Proteine isoliert. Die Extraktion fand hierbei ohne Zusatz von NEM statt. Die erhaltenen Extrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Detektion der *Western Blots* erfolgte mit  $\alpha$ -HA- bzw.  $\alpha$ -Cdc19-Antikörpern. **B)** Durch Überexpression der hypomodifizierten tRNAs  $tQ^{UUG}$ ,  $tE^{UUC}$  und  $tK^{UUU}$  (*tQEK*) lässt sich die Thermosensitivität einer *elp3Δurm1Δ*- oder *deg1Δurm1Δ*-Doppelmutante supprimieren. **C)** *hURM1* erlaubt ein besseres Wachstum des *elp3Δurm1Δ*- und *deg1Δurm1Δ*-Stammes bei erhöhten Temperaturen. Die Stämme, welche in **B)** und **C)** dargestellt sind, wurden seriell verdünnt und auf Vollmedium aufgetropft. Die Inkubation erfolgte für 3 Tage bei 30°C (Kontrolle), 35°C oder 39°C.

Davon ausgehend erfolgte weiterführend eine Untersuchung der *hURM1*-Funktionalität, Hierzu wurde ermittelt, ob *hURM1* in Hefe tRNA-Thiolierung erlaubt. Dementsprechend wurden *HA-URM1* und *HA-hURM1* in eine *elp3Δurm1Δ*- oder *deg1Δurm1Δ*-Doppelmutante transformiert. Wie zuvor für *elp3Δuba4Δ*- und *deg1Δuba4Δ*-Doppelmutanten gezeigt (Abb. 26A), besitzen diese Stämme im Vergleich zu den entsprechenden Einzelmutanten eine erhöhte Thermosensitivität, die durch Überexpression der tRNAs  $tQ^{UUG}$ ,  $tE^{UUC}$  und  $tK^{UUU}$  supprimiert werden kann (Abb. 32B). Daher ist die erhöhte Thermosensitivität dieser Mutanten vermutlich auf eine fehlende tRNA-Modifikation zurückzuführen. Eine Suppression dieses Phänotyps nach Einbringen von *HA-URM1* oder *HA-hURM1* würde somit auf eine Wiederherstellung der tRNA-Thiolierung hindeuten. Tatsächlich zeigten die *elp3Δurm1Δ*- und *deg1Δurm1Δ*-Doppelmutante, die das *HA-hURM1* trugen, ein besseres Wachstum bei höheren Temperaturen als die jeweilige Leervektortransformante (Abb. 32C). Jedoch war die Suppression der Thermosensitivität nicht so gut wie in Anwesenheit von *HA-URM1*, was darauf hindeutet, dass *hURM1* in Hefe nur eine verminderte tRNA-Thiolierung erlaubt.

Zur Bestätigung dieser phänotypischen Tests erfolgte eine massenspektrometrische Bestimmung der relativen Menge an thiolierem Uridin in *urm1Δ*-Zellen, die entweder das *HA-URM1* oder *HA-hURM1* enthielten. Während in der Leervektortransformante kein

$mcm^5s^2U$  nachweisbar war, konnte mit *HA-hURM1* thioliertes Uridin nachgewiesen werden (Abb. 33). Eine eingeschränkte tRNA-Thiolierung in Anwesenheit von hURM1 ließ sich jedoch auch hier nachweisen, da die relative Menge an gebildetem  $mcm^5s^2U$  im Vergleich zur *HA-URM1*-Transformante nur bei ca. 14% lag.

Demzufolge lassen diese Ergebnisse vermuten, dass hURM1 in Hefe funktional ist. Trotzdem scheint jedoch dessen Funktionalität eingeschränkt zu sein, da es nur eine verminderte tRNA-Thiolierung erlaubte.



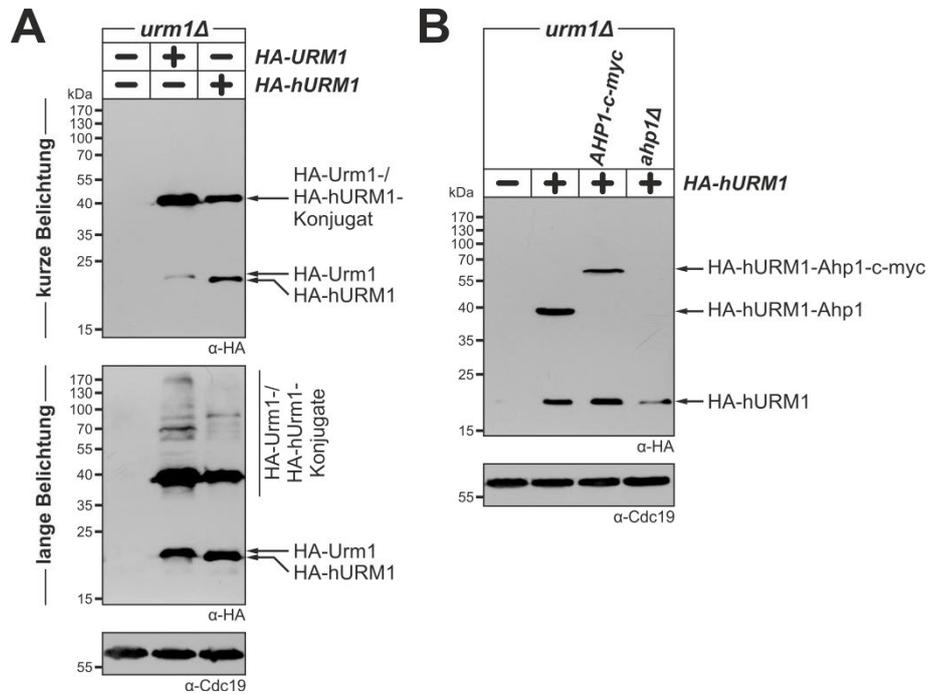
**Abbildung 33: hURM1 ermöglicht eine reduzierte tRNA-Thiolierung in Hefe.**

Nach einer tRNA-Extraktion aus einem *urm1Δ*-Stamm, der entweder das *HA-URM1*- oder *HA-hURM1*-Gen trug, wurde die relative Menge an  $mcm^5s^2U$  massenspektrometrisch bestimmt. Die  $mcm^5s^2U$ -Menge der *HA-URM1*-Transformante wurde mit 1 festgelegt. In einer Leervektortransformante (*urm1Δ* + Vektor) konnte thioliertes Uridin nicht detektiert werden (n.d.).

### 2.6.2 Ahp1 wird in Hefe durch hURM1 modifiziert

Da das humane Urm1-Homolog eine reduzierte tRNA-Thiolierung ermöglichte, wurde weiterführend untersucht, ob es in Hefe ebenfalls Urm1-Modifikation vermitteln kann. Hierfür erfolgte eine Analyse der Urm1-Modifikation in *urm1Δ*-Zellen, die entweder *HA-URM1* oder *HA-hURM1* trugen. Für die Stabilisierung möglicher Urm1- und hURM1-Konjugate erfolgte die Proteinextraktion aus den entsprechenden Transformanten in Gegenwart von NEM, das zuvor als Stabilisator der Urm1-Modifikation nachgewiesen wurde (Abb. 8).

Tatsächlich konnte mittels  $\alpha$ -HA-Western Blot nicht nur eine Urm1-Modifikation mit HA-Urm1, sondern auch mit HA-hURM1 gezeigt werden. Zusätzlich zu freiem HA-hURM1 war bereits nach kurzer Belichtung ein Konjugat nachweisbar, das ca. 40 kDa groß war (Abb. 34A). Darüber hinaus erlaubte eine längere Exposition des Films die Detektion weiterer hURM1-Konjugate, was ein Indiz dafür ist, dass das humane Urm1-Homolog in Hefe verschiedene Proteine modifizieren kann. Da jedoch in Gegenwart von HA-Urm1 mehr Konjugate nachweisbar waren als mit HA-hURM1, könnte dies ein Hinweis auf eine verminderte Effizienz der hURM1-Konjugation in Hefe sein.



**Abbildung 34: Das humane Urm1-Homolog vermittelt Urmylierung in Hefe.**

**A)** hURM1 bildet Proteinkonjugate in Hefe. **B)** hURM1 modifiziert Ahp1. In den in **A)** und **B)** dargestellten Stammhintergründen wurde die Bildung von NEM-stabilisierten HA-Urm1- oder HA-hURM1-Konjugaten mittels EMSA untersucht. Die *Western Blots* wurden mit  $\alpha$ -HA- oder  $\alpha$ -Cdc19-Antikörpern detektiert.

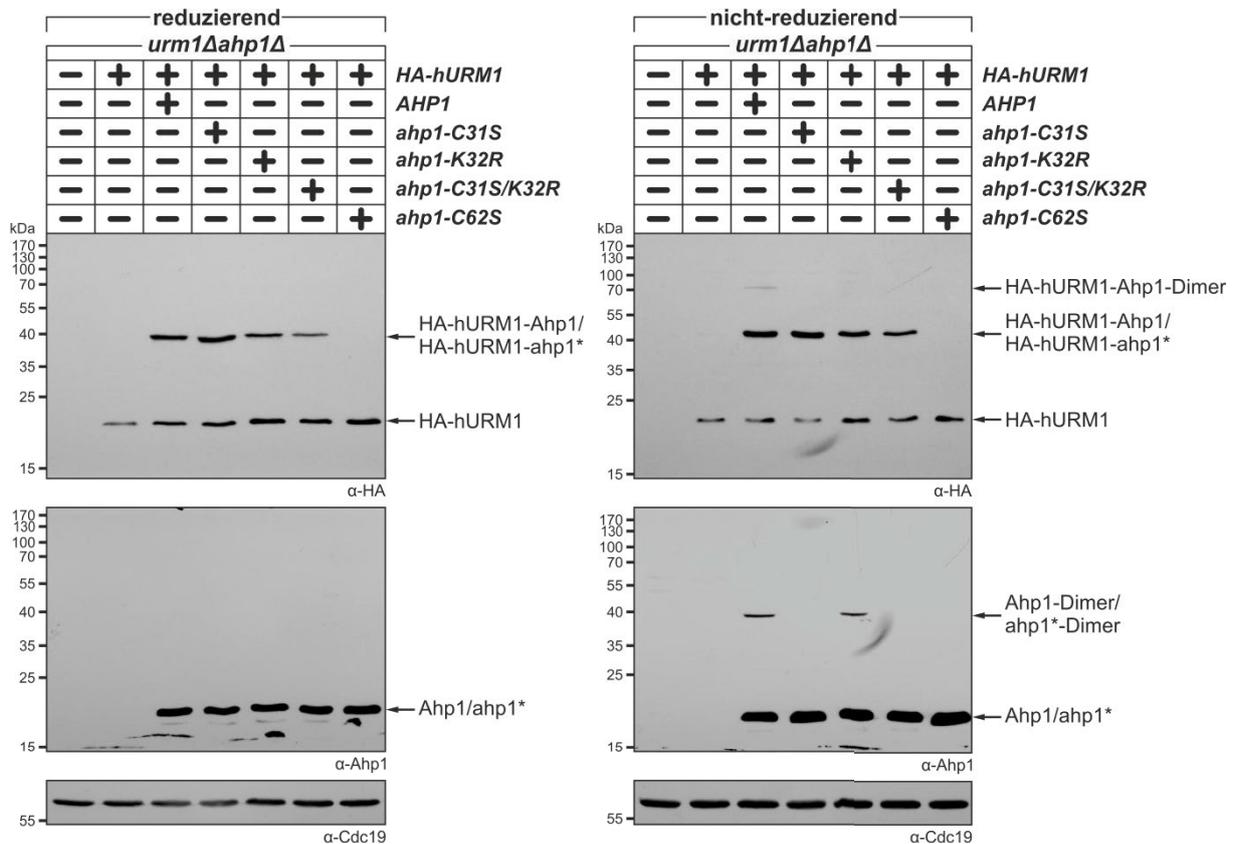
Interessanterweise fand sowohl mit HA-Urm1 als auch mit HA-hURM1 die Bildung eines ca. 40 kDa großen Konjugats statt. Der Nachweis eines gleichgroßen Konjugats deutete darauf hin, dass Urm1 und hURM1 in Hefe dasselbe Protein modifizieren. Ein wahrscheinlicher Kandidat für ein gemeinsames Zielprotein war Ahp1 (ca. 19,1 kDa), da nach dessen Modifikation durch HA-Urm1 (ca. 16,5 kDa) oder HA-hURM1 (ca. 16,8 kDa) ein Konjugat mit einer ungefähren Größe von jeweils ca. 36 kDa nachweisbar sein sollte. Die Konjugation von Urm1 an das Peroxiredoxin konnte zuvor bereits mehrfach gezeigt werden. Um zu bestätigen, dass auch hURM1 Ahp1 modifizieren kann, wurde die Urmylierung mit HA-hURM1 zusätzlich in einem *ahp1Δ*- und *AHP1-c-myc*-Hintergrund untersucht. Im Gegensatz zum WT-Hintergrund konnte das 40 kDa-Konjugat in *ahp1Δ*-Zellen mittels  $\alpha$ -HA-Immunoblot nicht detektiert werden (Abb. 34B). Ebenso zeigte sich in *AHP1-c-myc*-Zellen, dass das Urmylierungssignal nach oben verschoben war. Demzufolge kann davon ausgegangen werden, dass in Hefe eine Ahp1-Modifikation durch hURM1 stattfindet.

### 2.6.3 Für die hURM1-Konjugation an Ahp1 wird ebenfalls das Cystein C62 benötigt

Durch die Untersuchung der NEM-stabilisierten Urmyleerung verschiedener ahp1-Punktmutanten konnte unter anderem gezeigt werden, dass das C62 für die Modifikation des Peroxiredoxins benötigt wird und dass es womöglich einen alternativen Lysinrest gibt, der durch Urm1 modifiziert werden kann, wenn das K32 fehlt (Abb. 14). Da auch das humane Urm1-Homolog in der Lage war, das Peroxiredoxin zu modifizieren, wurde weiterführend untersucht, ob die verschiedenen Punktmutationen einen vergleichbaren Einfluss auf die Ahp1-Modifikation durch hURM1 haben.

Während hURM1 das nichtmutierte Ahp1 in seiner monomeren und dimeren Form modifizierte, war eine Urmyleerung des mutierten ahp1-62S nicht mehr nachweisbar (Abb. 35). Im Vergleich hierzu fand jedoch immer noch eine Modifikation der ahp1-C31S-Mutante statt. Daher scheint das C62 im Gegensatz zum C31 auch für die hURM1-Konjugation an Ahp1 benötigt zu werden. Darüber hinaus war nach Mutation des K32 weiterhin eine verminderte Modifikation des ahp1-K32R oder ahp1-C31S/K32R zu sehen. Dies deutet zum einen darauf hin, dass Ahp1 womöglich am K32 durch hURM1 modifiziert wird. Zum anderen zeigt dies aber auch, dass das hURM1 nach Verlust des Lysins an einen alternativen Rest angehängt werden kann.

Zusammengefasst demonstrieren diese Ergebnisse, dass die verschiedenen Punktmutationen die Ahp1-Modifikation durch Urm1 oder hURM1 auf die gleiche Art und Weise beeinflussen. Demnach scheint die Urmyleerung des Peroxiredoxins durch beide Modifikatoren mechanistisch gleich zu verlaufen.



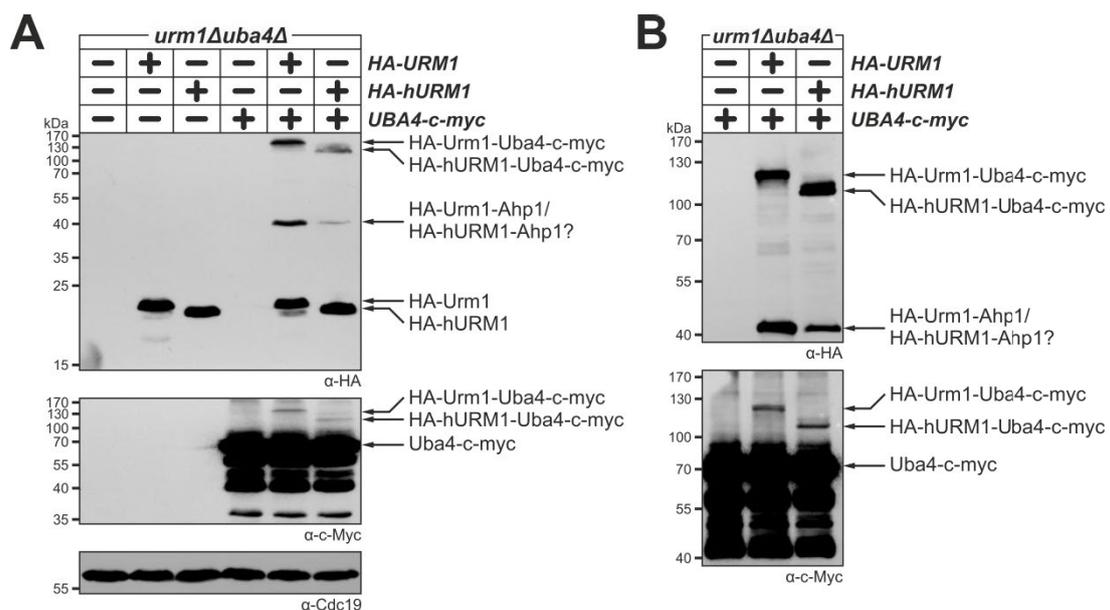
**Abbildung 35: Das C62 wird benötigt, damit Ahp1 durch hURM1 modifiziert werden kann.**

Die NEM-stabilisierte Konjugation von HA-hURM1 an verschiedene *ahp1*-Punktmutanten wurde unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen untersucht. Die Detektion der *Western Blots* erfolgte unter Verwendung von  $\alpha$ -HA-,  $\alpha$ -Ahp1- und  $\alpha$ -Cdc19-Antikörpern. Für eine übersichtlichere Darstellung der modifizierten und unmodifizierten Formen der unterschiedlichen *ahp1*-Punktmutanten, sind die Mutanten als *ahp1\** zusammengefasst.

#### 2.6.4 hURM1 modifiziert Uba4

Es konnte demonstriert werden, dass in Hefe eine kovalente Modifikation von Ahp1 durch hURM1 erfolgt. Da jedoch neben dem modifizierten Ahp1 noch andere hURM1-Konjugate nachgewiesen wurden, war davon auszugehen, dass weitere Proteine durch das humane Urm1-Homolog in Hefe modifiziert werden. Ein möglicher Kandidat für ein weiteres Zielprotein stellte hierbei das zuvor als Urm1-Substrat identifizierte Uba4 dar (Abb. 21). Demzufolge fand eine Untersuchung der potentiellen Uba4-Modifikation durch hURM1 statt. Zur vergleichenden Analyse der Uba4-Urmylierung wurden *HA-URM1* bzw. *HA-hURM1* in Kombination mit dem *UBA4-c-myc*-Gen in *urm1 $\Delta$ uba4 $\Delta$* -Zellen eingebracht. Proteinextrakte aus diesen Transformanten wurden mittels  $\alpha$ -HA- und  $\alpha$ -c-Myc-Immunoblot analysiert. Im  $\alpha$ -HA-*Western Blot* konnten verschiedene HA-Urm1- und HA-hURM1-Konjugate nachgewiesen werden, die nicht in Stämmen detektierbar waren, denen *UBA4-c-myc* fehlte

(Abb. 36A). Daher scheint auch die Proteinmodifikation durch hURM1 in Hefe Uba4-abhängig zu sein. Mit beiden Modifikatoren ließ sich ein Konjugat mit einer Größe von ca. 40 kDa nachweisen. Wie zuvor gezeigt, entsprach dieses in seiner Größe Ahp1, das durch HA-Urm1 bzw. HA-hURM1 modifiziert wurde. Demnach handelt es sich hierbei vermutlich jeweils um urmyliertes Ahp1. In Anwesenheit von HA-hURM1 konnte jedoch noch ein weiteres höhermolekulares Konjugat detektiert werden, das ca. 130 kDa groß war. Da ein gleichgroßes Signal ebenfalls im  $\alpha$ -c-Myc-Western Blot nachweisbar war, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem Konjugat um Uba4 handelt, welches durch hURM1 modifiziert wurde.



**Abbildung 36: Uba4 wird in Hefe durch hURM1 urmyliert.**

**A)** hURM1 bildet ein Konjugat mit Uba4. **B)** Urmyliertes Uba4, welches entweder durch Urm1 oder hUrm1 modifiziert wurde, unterscheidet sich im Laufverhalten. Die NEM-stabilisierte Konjugation von HA-Urm1 bzw. HA-hURM1 an Uba4-c-myc wurde mittels EMSA untersucht. Die Auftrennung der Proben erfolgte hierbei auf unterschiedlich konzentrierten SDS-Polyacrylamidgelen (15% für **A**) bzw. 9% für **B**). Die Immunoblots wurden mit  $\alpha$ -HA,  $\alpha$ -c-Myc und  $\alpha$ -Cdc19-Antikörpern entwickelt. Urmyliertes Uba4 ist ebenso hervorgehoben wie mutmaßlich modifiziertes Ahp1.

Auch für Urm1 konnte die Modifikation von Uba4 bestätigt werden. Dabei schien aber das durch Urm1 modifizierte Uba4 größer zu sein als das durch hURM1 modifizierte. Durch Auftrennung der gleichen Proben auf einem niedrigprozentigen SDS-Polyacrylamidgel konnte dieser Größenunterschied bestätigt werden (Abb. 36B). Im  $\alpha$ -HA- und  $\alpha$ -c-Myc-Western Blot lief das HA-Urm1-Uba4-c-myc-Konjugat bei ca. 120 kDa, während das HA-hURM1-Uba4-c-myc-Konjugat ungefähr 110 kDa groß war.

Trotz dieses Unterschieds im Laufverhalten, der ein Hinweis auf eine abweichende Urmyleierungsspezifität sein könnte, demonstriert dieses Ergebnis, dass das humane Urm1-Homolog in Hefe neben Ahp1 auch Uba4 modifizieren kann.

### 3. Diskussion

Aufgrund seiner dualen Funktionsweise unterscheidet sich Urm1 von anderen eukaryotischen UBLs. Zum einen fungiert es als Schwefelträger, welcher im Zusammenspiel mit weiteren Proteinen die Thiolierung des *wobble*-Uridins bestimmter cytoplasmatischer tRNAs vermittelt (Nakai *et al.*, 2008; Leidel *et al.*, 2009; Noma *et al.*, 2009). Zum anderen wirkt es aber auch als posttranslatonaler Modifikator, der kovalent mit anderen Proteinen verknüpft werden kann (Furukawa *et al.*, 2000; Van der Veen *et al.*, 2011). In Anlehnung an die Ubiquitinierung wird dieser Prozess der Urm1-vermittelten Proteinmodifikation als Urm1-Mylierung bezeichnet. Es wurde gezeigt, dass oxidativer Stress die Urm1-Konjugation sowohl in Hefe als auch im Menschen induziert (Van der Veen *et al.*, 2011). Daher wurde die Urm1-Mylierung mit der oxidativen Stressantwort in Verbindung gebracht. Doch ob die Urm1-vermittelte Proteinmodifikation hierbei tatsächlich eine Rolle spielt, ist jedoch unklar.

#### 3.1 Die Urm1-Mylierung von Ahp1 ist vermutlich mit dessen peroxidatischen Zyklus verknüpft

Der Nachweis von Ahp1 als Urm1-Substrat in Hefe deutet ebenfalls darauf hin, dass die Urm1-Mylierung womöglich an der oxidativen Stressantwort beteiligt ist (Goehring *et al.*, 2003a). So stellt Ahp1 ein Peroxiredoxin dar, welches in *S. cerevisiae* vorwiegend an der Detoxifikation von Alkylhydroperoxiden beteiligt ist (Jeong *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999a). Hierbei trägt es vermutlich auf zwei Wegen zu deren Entgiftung bei. Als Peroxiredoxin ist es in der Lage Alkylhydroperoxide über seinen peroxidatischen Zyklus direkt zu reduzieren (Jeong *et al.*, 1999; Lian *et al.*, 2012). Es wird jedoch vermutet, dass Ahp1 zusätzlich noch eine Signalfunktion besitzt, die vom Transkriptionsfaktor Yap2 abhängig ist (Iwai *et al.*, 2010). Bisher ist nicht bekannt, wie sich die Urm1-Mylierung auf die Funktionsweise von Ahp1 auswirkt. Dementsprechend wurde die Ahp1-Urm1-Mylierung im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht.

Durch Analyse der Ahp1-Modifikation unter nicht-reduzierenden Bedingungen konnte gezeigt werden, dass das Peroxiredoxin nicht nur als Monomer sondern auch als Dimer urmyliert vorliegt. Die Dimerisierung von Ahp1 erfolgt im Rahmen seines peroxidatischen Zyklus (Jeong *et al.*, 1999; Lian *et al.*, 2012). Hierbei kommt es nach Oxidation des peroxidatischen Cysteins (C62) eines Ahp1-Monomers zur Bildung einer intermolekularen Disulfidbrücke mit dem *resolving* Cystein (C31) eines anderen Monomers. Der Nachweis

eines urmylierten Ahp1-Dimers deutet demnach darauf hin, dass die Urmylierung mit dem peroxidatischen Zyklus des Peroxiredoxins verknüpft ist. Interessanterweise konnte stets nur eine modifizierte Form des Ahp1-Dimers nachgewiesen werden. Abgeleitet von dessen ungefähre Größe setzt sich das modifizierte Homodimer vermutlich aus zwei einfach urmylierten Ahp1-Monomeren zusammen. Eine weitere modifizierte Form des Ahp1-Dimers, bei der nur eines der Monomere urmyliert vorliegt, konnte nicht detektiert werden. Solch eine modifizierte Variante könnte jedoch entstehen, wenn die Urm1-Konjugation nach der Dimerisierung des Peroxiredoxins erfolgt. Demnach ist es naheliegend, dass die Ahp1-Urmylierung noch vor der Bildung des Homodimers stattfindet. Außerdem deutet das Fehlen dieser modifizierten Form darauf hin, dass sich immer nur zwei urmylierte Ahp1-Monomere zusammenfinden, um ein Dimer zu bilden.

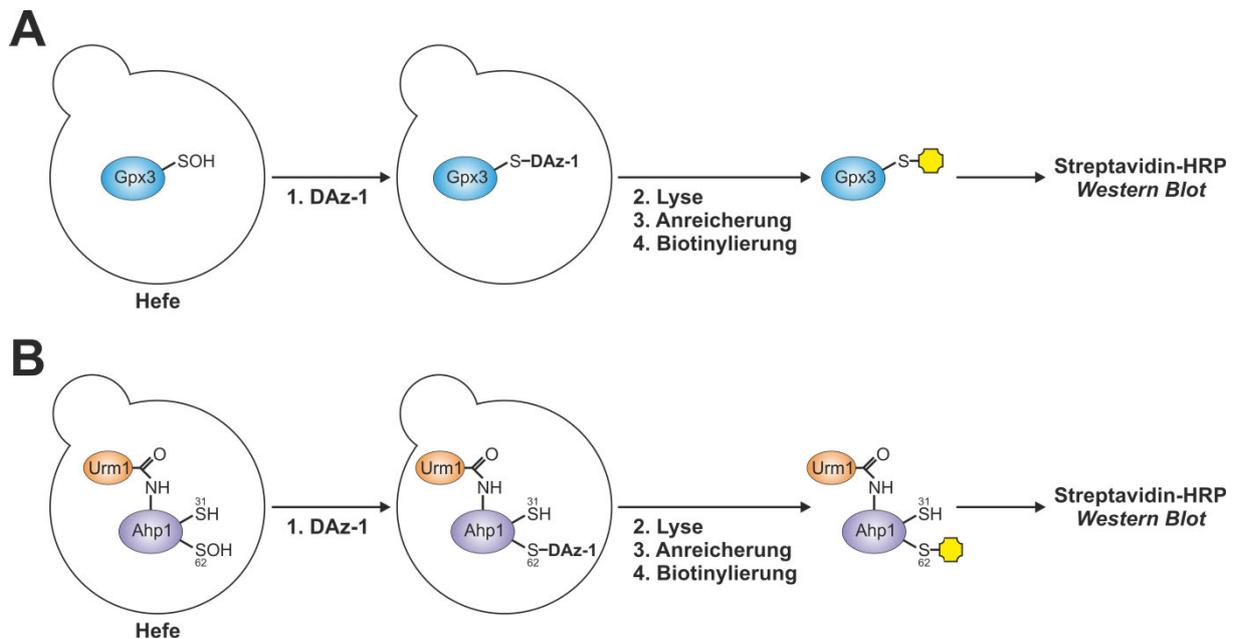
Auch die Ergebnisse, die für die Urmylierung der verschiedenen *ahp1*-Punktmutanten erhalten wurden, sind ein Indiz dafür, dass die Urm1-Konjugation vermutlich mit dem peroxidatischen Zyklus des Peroxiredoxins verknüpft ist. So bewirkte beispielsweise die Mutation des C31, dass auch in Abwesenheit von NEM eine Urmylierung von Ahp1 nachweisbar war. Es wird vermutet, dass das C31 als *resolving* Cystein für die Bildung des Ahp1-Homodimers benötigt wird. Das C31 wurde erst vor kurzem durch Lian *et al.* (2012) als das eigentliche *resolving* Cystein von Ahp1 beschrieben. In früheren Arbeiten wurde davon ausgegangen, dass das *resolving* Cystein des Peroxiredoxins an Position 120 (C120) liegt (Jeong *et al.*, 1999). Dementsprechend zeigten *in vitro*-Analysen, dass eine C120S-Mutante von Ahp1 im Gegensatz zu einer C31S-Mutante nicht mehr katalytisch aktiv war. Lian *et al.* (2012) erhielten durch *in vitro*-Analysen derselben Punktmutanten jedoch ein gegenteiliges Ergebnis. Durch die phänotypischen Tests, die in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, konnte die Bedeutung des C31 für die Ahp1-Funktion erstmals *in vivo* demonstriert werden. So war *ahp1-C31S* in Hefe nur noch eingeschränkt in der Lage, t-BOOH zu entgiften. Darüber hinaus führte die Mutation des Cysteins zum Ausbleiben der Homodimerisierung von Ahp1. Diese Ergebnisse bestätigen, dass es sich beim C31 tatsächlich um das *resolving* Cystein von Ahp1 handelt. Das Ausbleiben einer Homodimerisierung von *ahp1-C31S* und eine damit einhergehende erhöhte t-BOOH-Sensitivität stimmen mit der Erwartung überein, dass ein Verlust des *resolving* Cysteins den peroxidatischen Zyklus von Ahp1 blockiert. Womöglich trägt die Blockierung des peroxidatischen Zyklus dazu bei, dass eine NEM-unabhängige Urmylierung von *ahp1-C31S* beobachtet wurde. So ist es denkbar, dass Urm1 erst dann von Ahp1 dekonjugiert, wenn eine Dimerisierung des Peroxiredoxins erfolgt ist.

Eine Blockierung der Ahp1-Dimerisierung durch Mutation des C31 könnte demnach zu einer Hemmung der Urm1-Dekongjugation führen.

### 3.2 Der Oxidationsstatus von Ahp1 wirkt sich auf dessen Urm1ylierung aus

Während die Ahp1-Urm1ylierung durch Verlust des C31 stabilisiert wurde, bewirkte eine Mutation des C62, dass diese nicht mehr nachweisbar war. Als peroxidatisches Cystein ist das C62 essentiell für die Ahp1-Funktion. Dies konnte bereits durch verschiedene *in vitro*-Analysen demonstriert werden (Jeong *et al.*, 1999; Lian *et al.*, 2012). Durch die phänotypischen Tests, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte die Bedeutung des C62 für die Funktion des Peroxiredoxins erstmals auch in Hefe gezeigt werden. Dementsprechend waren C62S-Mutanten nicht mehr in der Lage, zur Detoxifikation von t-BOOH beizutragen. Dies bestätigt, dass das C62 eine essentielle Rolle bei der Reduktion von Alkylhydroperoxiden spielt. Es wird davon ausgegangen, dass die Reduktion von Alkylhydroperoxiden über die Thiolgruppe des C62 erfolgt (Jeong *et al.*, 1999; Lian *et al.*, 2012). Hierbei kommt es zur Oxidation des Thiols (-SH), sodass ein Sulfensäurerest (-SOH) entsteht. Daher sollte eine Oxidation von Ahp1 nach Verlust des C62 nicht mehr möglich sein. Dies könnte auch die Ursache dafür sein, warum eine Urm1ylierung des Peroxiredoxins nach Mutation des C62 nicht mehr nachweisbar war. So ist es durchaus denkbar, dass die Urm1ylierung von Ahp1 im Zuge der Oxidation des C62 erfolgt. Durch Bestimmung des Oxidationsstatus des urmylierten Ahp1-Monomers könnte geklärt werden, ob eine Oxidation des Peroxiredoxins tatsächlich erforderlich ist, damit eine Modifikation durch Urm1 stattfindet. In der Tat gibt es Möglichkeiten den Oxidationsstatus von Cysteinresten in Proteinen zu bestimmen. Häufig werden hierbei Chemikalien verwendet, die spezifisch mit Thiol- oder Sulfensäureresten reagieren (Pan und Carroll, 2014). Dimedon ist beispielsweise eine nukleophile Verbindung, die spezifisch und irreversibel mit Sulfensäureresten reagiert (Benitez und Allison, 1974). Das DAz-1 als Derivat des Dimedons wurde bereits verwendet, um in Hefe die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-abhängige Oxidation der Peroxidase Gpx3 nachzuweisen (Paulsen und Carroll, 2009). Hierbei wurde Gpx3 mittels Immunopräzipitation aus Hefezellen angereichert, die zuvor mit DAz-1 behandelt und mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestresst wurden (Abb. 37A). Nach einer anschließenden Biotinylierung des DAz-1-markierten Gpx3 konnte der modifizierte Sulfensäurerest daraufhin unter Verwendung von Streptavidin-HRP in einem *Western Blot* nachgewiesen werden. Durch Abwandlung dieser Methode könnte vermutlich auch der Oxidationsstatus des urmylierten Ahp1-Monomers bestimmt werden. Nach Anreicherung des modifizierten Ahp1-Monomers aus DAz-1-behandelten Hefezellen lässt sich das

Vorhandensein einer SOH-Gruppe am C62 vermutlich auf analoge Weise mittels *Western Blot* überprüfen (Abb. 37B).

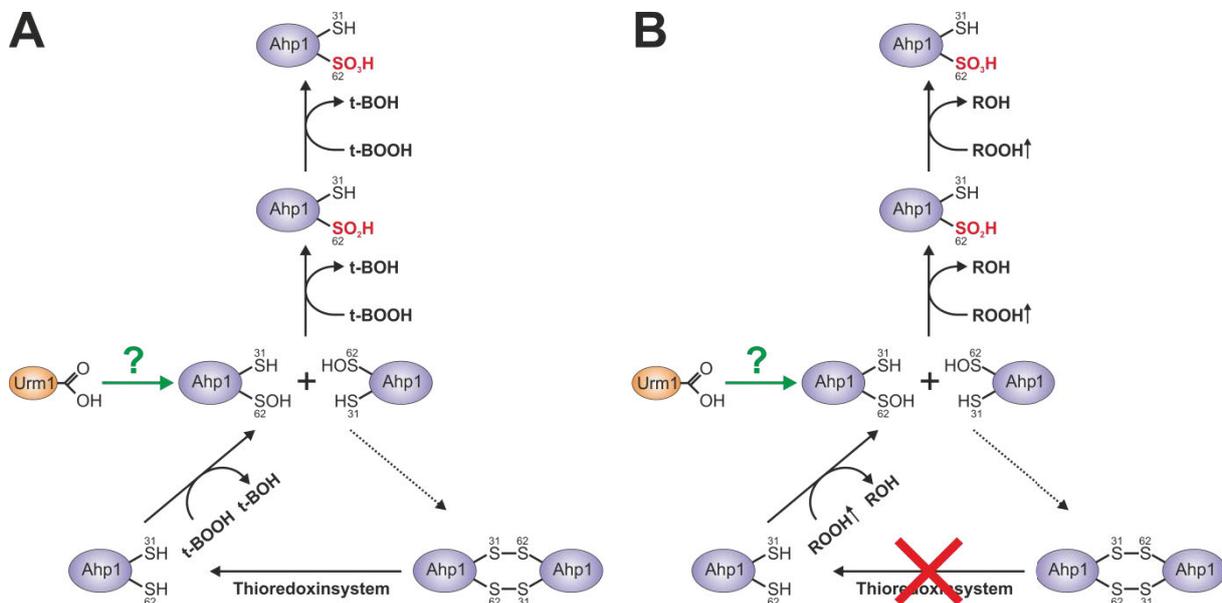


**Abbildung 37: DAz-1 eignet sich für den Nachweis von Sulfensäureresten in Proteinen.**

**A)** Methode zum Nachweis eines Sulfensäurerests (-SOH) in der Peroxidase Gpx3. Hefezellen werden mit DAz-1 behandelt, welches spezifisch an SOH-Gruppen bindet. Die Zellen werden daraufhin aufgeschlossen und das modifizierte Gpx3 wird mittels Immunopräzipitation angereichert. Über das angehängte DAz-1 kann Gpx3 anschließend biotinyliert werden. Unter Verwendung von Streptavidin-HRP erfolgt die Detektion des biotinylierten Gpx3 mittels *Western Blot*. **B)** Mögliche Methode zum Nachweis eines Sulfensäurerests im urmylierten Ahp1-Monomer. Um das Vorhandensein einer SOH-Gruppe zu überprüfen, könnte wie in **A)** verfahren werden. Abbildung verändert nach Paulsen und Carroll (2009).

Nicht nur eine Mutation des C62 hatte ein Ausbleiben der Ahp1-Urmylierung zur Folge. Auch in Hefezellen, die mit erhöhten t-BOOH-Konzentrationen behandelt wurden, konnte das modifizierte Peroxiredoxin nicht mehr nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Beobachtungen überein. So wurde durch Goehring *et al.* (2003a) bereits demonstriert, dass urmyliertes Ahp1 in t-BOOH-behandelten Hefezellen nicht mehr detektierbar ist. Die Ursache für das Ausbleiben der Ahp1-Modifikation konnte hierbei jedoch nicht bestimmt werden. Durch Iwai *et al.* (2010) wurde jedoch gezeigt, dass t-BOOH die Ahp1-Dimerisierung in Hefe induziert. Demnach wurde vermutet, dass die t-BOOH-abhängige Hemmung der Ahp1-Urmylierung auf einer verstärkten Dimerisierung des Peroxiredoxins beruht. So war es denkbar, dass eine t-BOOH-induzierte Ahp1-Dimerisierung mit einer Deurmylierung des Peroxiredoxins einhergeht. Doch ein solcher Zusammenhang ließ sich durch die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse nicht bestätigen. Denn entgegen den

Erwartungen korrelierte eine Abnahme in der Ahp1-Urmylierung nicht mit einer Zunahme in der Dimerisierung des Peroxiredoxins. Tatsächlich konnte Ahp1 unter nicht-reduzierenden Bedingungen bei höheren t-BOOH-Konzentrationen nur als Monomer nachgewiesen werden. Demnach scheint t-BOOH den Oxidationsstatus von Ahp1 so zu verändern, dass eine Dimerisierung des Peroxiredoxins nicht mehr möglich ist.



**Abbildung 38: Eine Überoxidation von Ahp1 wirkt sich wahrscheinlich auf dessen Urmylierung aus.**

**A)** Möglicher Einfluss von t-BOOH auf die Ahp1-Urmylierung. In Hefezellen, die mit t-BOOH gestresst werden, erfolgt eine verstärkte Oxidation von Ahp1. Durch weitere Oxidation eines Sulfensäurerests (-SOH) am C62, kommt es zur Bildung von Sulfin- (-SO<sub>2</sub>H) und Sulfonsäureresten (-SO<sub>3</sub>H). Solche überoxidierten Formen von Ahp1 können vermutlich nicht mehr durch Urm1 modifiziert werden. Außerdem sind diese nicht mehr in der Lage, Homodimere zu bilden. Gleichzeitig werden Ahp1-Dimere, die bereits vor der t-BOOH-Behandlung gebildet wurden, durch das Thioredoxinsystem reduziert. Hierbei geht die Reduktion vermutlich auch mit einer Deurmylierung von Ahp1 einher. **B)** Mögliches Modell, wie sich der Verlust des Thioredoxinsystems auf die Ahp1-Urmylierung auswirkt. Nach Verlust des Systems kommt es zu einer Anreicherung endogen gebildeter ROS. Hierzu zählen z.B. Alkylhydroperoxide (ROOH). Diese tragen zur Überoxidation von Ahp1 bei. Dies hemmt nicht nur die Dimerisierung, sondern auch die Urmylierung des Peroxiredoxins.

Es ist bekannt, dass bei oxidativem Stress eine Überoxidation von Cysteinresten erfolgen kann (Dalle-Donne *et al.*, 2009). Dementsprechend kann ein Sulfensäurerest weiter oxidiert werden, sodass es zur Bildung eines Sulfin- (-SO<sub>2</sub>H) oder Sulfonsäurerests (-SO<sub>3</sub>H) kommt. Diese überoxidierten Formen sind sehr stabil und können außerdem keine Disulfidbrücken mehr mit den Thiolgruppen anderer Cysteine aufbauen. Das Ausbleiben einer Ahp1-Dimerisierung bei höheren t-BOOH-Konzentrationen deutet demnach auf eine Überoxidation des Peroxiredoxins hin (Abb. 38A). Womöglich wirkt sich eine Überoxidation von Ahp1 auch

auf dessen Urmyleerung aus. So ist es denkbar, dass durch den Oxidationsstatus des peroxidatischen Cysteins bestimmt wird, ob eine Urmyleerung von Ahp1 erfolgt. Eine einfache Oxidation des C62 könnte ein Signal dafür sein, dass Urm1 an das Peroxiredoxin konjugiert. Im Gegensatz dazu könnte die Ahp1-Urmyleerung durch eine Überoxidation des C62 verhindert werden. Demnach ist es möglich, dass eine Überoxidation des Ahp1-Monomers in t-BOOH-gestressten Hefezellen nicht nur die Dimerisierung sondern auch die Urmyleerung des Peroxiredoxins hemmt.

Eine leichte Hemmung der Ahp1-Urmyleerung konnte auch in Mutanten des cytoplasmatischen Thioredoxinsystems festgestellt werden. Das cytoplasmatische Thioredoxinsystem wird benötigt, um das im peroxidatischen Zyklus gebildete Ahp1-Dimer zu reduzieren (Iwai *et al.*, 2010; Lian *et al.*, 2012). Nach Verlust des Systems sollte eine Reduktion des Dimers nicht mehr möglich sein. Demnach wäre eine verstärkte Ahp1-Dimerisierung zu erwarten. Tatsächlich war in einer *trx1Δtrx2Δ*- und *trr1Δ*-Mutante mehr Ahp1-Dimer vorhanden als im WT-Hintergrund. Gleichzeitig ließ sich jedoch auch zeigen, dass generell mehr Ahp1 in diesen Mutanten vorlag. Daher lässt sich die erhöhte Menge an Ahp1-Dimer im *trx1Δtrx2Δ*- und *trr1Δ*-Hintergrund vermutlich dadurch erklären, dass es in beiden Mutanten zu einer Induktion der *AHP1*-Expression kommt. Eine erhöhte Expression des Peroxiredoxins in einem *trx1Δtrx2Δ*- oder *trr1Δ*-Stamm ist bereits gezeigt wurden (Ragu *et al.*, 2014). Vermutlich wird die Induktion der *AHP1*-Expression hierbei durch den Transkriptionsfaktor Yap1 vermittelt. So ist bekannt, dass *AHP1* ein Zielgen von Yap1 darstellt (Lee *et al.*, 1999b). Außerdem wurde demonstriert, dass Yap1 in *trx1Δtrx2Δ*- und *trr1Δ*-Mutanten oxidiert vorliegt und vermehrt im Zellkern akkumuliert (Izawa *et al.*, 1999; Delaunay *et al.*, 2000; Ragu *et al.*, 2014). Allgemein sind diese Beobachtungen auch ein Hinweis dafür, dass Mutanten des cytoplasmatischen Thioredoxinsystems bereits ohne äußere Einwirkung oxidativem Stress ausgesetzt sind. In der Tat wird davon ausgegangen, dass es nach Verlust des Systems zu einer Anreicherung an endogen gebildeten Peroxiden kommt, die unter anderem zur Oxidation von Proteinen beitragen (Carmel-Harel *et al.*, 2001). Dementsprechend wurde durch Le Moan *et al.* (2006) gezeigt, dass bestimmte Proteine in einer *trx1Δtrx2Δtrr1Δ*-Mutante verstärkt oxidiert vorliegen. Zu diesen gehörte auch Ahp1. Hierbei wurde demonstriert, dass es im *trx1Δtrx2Δtrr1Δ*-Stamm zu einer Anreicherung der einfach oxidierten Form von Ahp1 kommt. Eine mögliche Überoxidation des Peroxiredoxins wurde durch Le Moan *et al.* (2006) jedoch nicht näher untersucht. Trotzdem lässt sich nicht ausschließen, dass eine Überoxidation von Ahp1 nach Verlust des Thioredoxinsystems stattfindet. Hierdurch könnte beispielsweise erklärt werden, warum die beobachtete Ahp1-

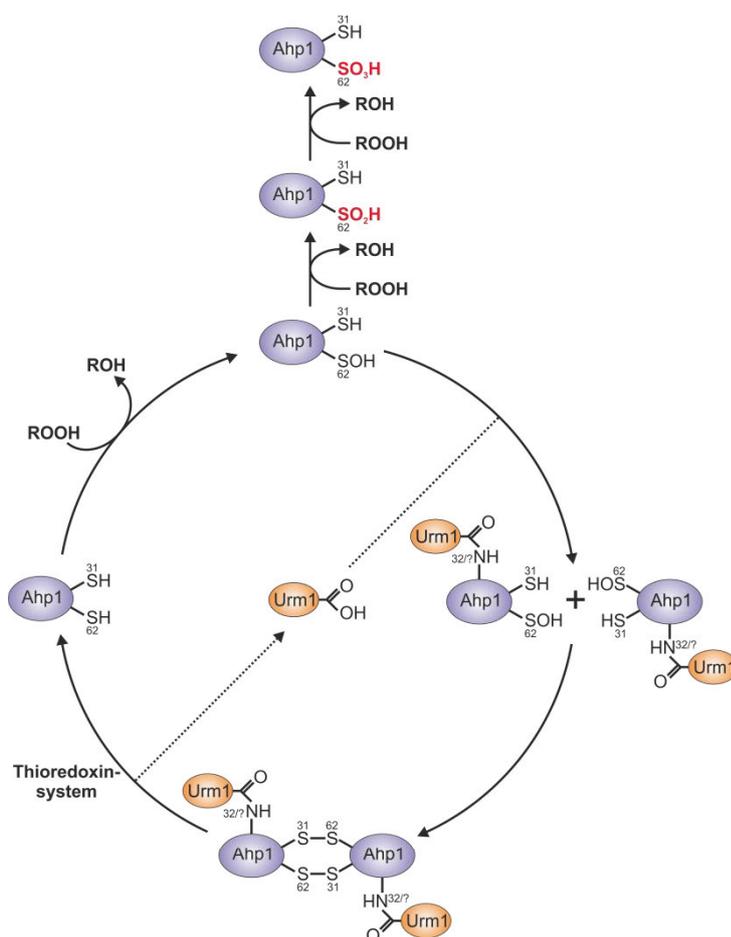
Dimerisierung im *trx1Δtrx2Δ*- und *trr1Δ*-Hintergrund nicht so stark ausfiel wie eigentlich erwartet. Vermutlich kommt es durch eine Anreicherung von endogen gebildeten Peroxiden in beiden Mutanten zu einer verstärkten Überoxidation von Ahp1-Monomeren (Abb. 38B). Dies hat womöglich zur Folge, dass diese nicht mehr in der Lage sind, Homodimere zu bilden. Gleichzeitig könnte durch eine Überoxidation auch erklärt werden, warum die Ahp1-Urmylierung im *trx1Δtrx2Δ*- und *trr1Δ*-Hintergrund gehemmt war. Denn wie bereits beschrieben, könnte nicht nur die Dimerisierung, sondern auch die Urmylierung des Peroxiredoxins durch eine Überoxidation verhindert werden.

Interessanterweise zeigte sich, dass das cytoplasmatische Thioredoxinsystem für die t-BOOH-abhängige Hemmung der Ahp1-Dimerisierung und -Urmylierung benötigt wird. In einem *trr1Δ*-Hintergrund konnte nach t-BOOH-Behandlung nicht nur eine verstärkte Dimerisierung von Ahp1 festgestellt werden. Es ließ sich ebenfalls beobachten, dass die Urmylierung des Peroxiredoxins nach Behandlung mit dem oxidativen Stressor weitestgehend unverändert blieb. Somit bestätigen diese Ergebnisse zum einen, dass das cytoplasmatische Thioredoxinsystem eine wichtige Rolle bei der Reduktion des Ahp1-Dimers spielt. Zum anderen sind diese Beobachtungen jedoch auch ein Hinweis dafür, dass das System womöglich zur Deurmylierung von Ahp1 beiträgt. So ist es denkbar, dass Ahp1 erst dann deurmyliert wird, wenn es als Dimer durch das cytoplasmatische Thioredoxinsystem reduziert wurde. Wenn das System wie im *trr1Δ*-Hintergrund nicht funktional ist, kann eine Reduktion des urmylierten Ahp1-Dimers nicht stattfinden, wodurch in Folge dessen eine Dekonjugation von Urm1 ausbleibt. Es ist aber auch möglich, dass sich ein Verlust des cytoplasmatischen Thioredoxinsystems negativ auf die Aktivität von Enzymen auswirkt, welche eine Deurmylierung von Ahp1 vermitteln. Deurmylierende Enzyme konnten bisher jedoch nicht nachgewiesen werden. Demnach ist es nicht klar, wie eine Urm1-Dekonjugation erfolgt. Doch insbesondere die Untersuchungen zur t-BOOH-abhängigen Hemmung der Ahp1-Urmylierung deuten darauf hin, dass es durchaus spezifische Enzyme gibt, die eine Deurmylierung vermitteln. Für die Dekonjugation von Ubiquitin sind sogenannte DUBs verantwortlich. Die meisten DUBs stellen Proteasen dar, die über ein katalytisches Cystein in ihrem aktiven Zentrum verfügen (Komander, 2010). Es ist bekannt, dass spezifische DUBs durch Oxidation ihres katalytischen Cysteins inaktiviert werden (Cotto-Rios *et al.*, 2012; Kulathu *et al.*, 2013). Die Inaktivierung eines putativen deurmylierenden Enzyms könnte auf ähnliche Weise erfolgen. Das cytoplasmatische Thioredoxinsystem könnte hierbei dazu beitragen, dass eine Oxidation solcher Enzyme verhindert oder rückgängig gemacht wird. Wenn Hefemutanten mit einem funktionslosen Thioredoxinsystem oxidativem Stress in Form von t-BOOH

ausgesetzt sind, könnte es daher zu einer verstärkten Oxidation und Inaktivierung deurmylierender Enzyme kommen. Dies wäre ebenfalls eine Erklärung dafür, warum keine t-BOOH-abhängige Hemmung der Ahp1-Urmylierung im *trr1*Δ-Hintergrund feststellbar war.

### 3.3 Der Einfluss der Urmylierung auf die Ahp1-Funktion bleibt ungeklärt

Anhand der erhaltenen Ergebnisse ist folgendes Modell für die Ahp1-Urmylierung vorstellbar: Zu Beginn wird Ahp1 in seiner monomeren Form durch Urm1 modifiziert (Abb. 39). Hierbei spielt der Oxidationsstatus des C62 vermutlich eine wichtige Rolle. Das Peroxiredoxin wird wahrscheinlich erst dann urmyliert, wenn die Thiolgruppe des C62 durch Oxidation zu einem Sulfensäurerest umgesetzt wurde. Durch Überoxidation des Cysteinrests könnte eine Modifikation von Ahp1 jedoch verhindert werden. Nach der Urmylierung kann eine Dimerisierung des Peroxiredoxins stattfinden, wobei anscheinend immer nur zwei urmylierte Ahp1-Monomere ein Homodimer bilden. Die Reduktion des urmylierten Dimers erfolgt daraufhin über das cytoplasmatische Thioredoxinsystem. Dies geht wahrscheinlich mit einer Deurmylierung von Ahp1 einher.



**Abbildung 39: Modell für die Urmylierung von Ahp1.**

Die Urmylierung ist womöglich mit dem peroxidatischen Zyklus von Ahp1 verknüpft. Zu Beginn des Zyklus wird Ahp1 am C62 oxidiert. Das oxidierte Peroxiredoxin kann daraufhin am K32 oder an einem alternativen Lysinrest durch Urm1 modifiziert werden. Zwei urmylierte Ahp1-Monomere bilden ein Homodimer. Dieses wird anschließend durch das Thioredoxinsystem reduziert. Hierbei kommt es vermutlich auch zur Dekonjugation von Urm1. Durch weitere Oxidation der SOH-Gruppe am C62 wird Ahp1 dem Zyklus entzogen. Hierdurch wird wahrscheinlich nicht nur die Dimerisierung, sondern auch die Urmylierung von Ahp1 verhindert.

Allgemein deutet dieses Modell darauf hin, dass die Urmyleierung in den peroxidatischen Zyklus von Ahp1 eingreifen könnte. Durch Van der Veen *et al.* (2011) wurde beschrieben, dass das Peroxiredoxin am K32 durch Urm1 kovalent modifiziert wird. So führte eine Mutation des Lysins zu einem Ausbleiben der Ahp1-Modifikation. Ein möglicher Einfluss der Mutation auf die Ahp1-Funktion wurde hierbei jedoch nicht näher untersucht. Deshalb wurden in der hier vorliegenden Arbeit phänotypische Tests durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich eine Mutation des K32 auf die Funktionalität des Peroxiredoxins auswirkt. In den phänotypischen Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass eine *K32R*-Mutante ebenso gut zur Detoxifikation von t-BOOH beitragen kann wie WT-Ahp1. Es konnte aber auch demonstriert werden, dass eine Urmyleierung des Peroxiredoxins trotz Mutation des K32 weiterhin möglich war. Hierbei war die Effizienz der Urm1-Konjugation zwar herabgesetzt, trotzdem ist dies ein Indiz dafür, dass Ahp1 womöglich noch an anderen Lysinresten urmyliert werden kann. Auch für Ubiquitin ist bekannt, dass es in der Lage ist, alternative Lysinreste in Zielproteinen zu modifizieren. In Hefe erfolgt beispielsweise eine Ubiquitinierung des Transkriptionsfaktors Rpn4 vorzugsweise am Lysin an Position 187 (K187) (Ju und Xie, 2006). Hierbei wird durch Modifikation des K187 der proteasomale Abbau von Rpn4 vermittelt. Wenn das Lysin fehlt, kann Ubiquitin aber auch an andere Lysinreste angehängt werden. Neben dem K187 wurden fünf weitere Lysine nachgewiesen, an denen eine Ubiquitinierung von Rpn4 stattfinden kann. Hierbei trägt eine Modifikation dieser Lysinreste ebenfalls zum proteasomalen Abbau von Rpn4 bei.

Da Ahp1 vermutlich an alternativen Lysinresten modifiziert werden kann, erlauben die phänotypischen Untersuchungen zur *K32R*-Mutante keine Aussage darüber, ob die Urmyleierung die Funktionalität des Peroxiredoxins beeinträchtigt. Es konnte aber demonstriert werden, dass ein Verlust von *URM1* generell keinen Einfluss auf die t-BOOH-Sensitivität hat. Auch Goehring *et al.* (2003a) kamen bereits zu einem vergleichbaren Ergebnis. So wurde gezeigt, dass die t-BOOH-Sensitivität einer *urm1Δ*-Mutante im Vergleich zu einem WT-Hefestamm unverändert ist. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Urmyleierung allgemein keine Rolle bei der Entgiftung von t-BOOH spielt. Demnach trägt diese auch nicht zu einer effizienten Reduktion von t-BOOH durch Ahp1 bei. Somit bleibt unklar, ob die Urmyleierung einen Einfluss auf die Funktionalität von Ahp1 hat.

Auch insgesamt ist weiterhin offen, welche mögliche Rolle die Urmyleierung bei der oxidativen Stressantwort spielt. In Hefe und in menschlichen Zellen kann die Urm1-Konjugation durch verschiedene oxidative Stressoren induziert werden (Van der Veen *et al.*, 2011). Dies führte zu der Annahme, dass Urm1 Proteine markiert, die durch ROS beschädigt

wurden. Demnach könnte der Urm1 eine Signalfunktion zukommen, durch die in der Zelle eine verstärkte Oxidation von Proteinen angezeigt wird. Auch die vermutete Ahp1-Überoxidation nach t-BOOH-Behandlung stellt eine ROS-vermittelte Beschädigung dar. Denn die Überoxidation von Ahp1 ist ein irreversibler Prozess, der eine Inaktivierung des Peroxiredoxins zur Folge hat. Trotzdem führte die t-BOOH-vermittelte Überoxidation nicht zu einer verstärkten, sondern zu einer gehemmten Urm1-Modifikation von Ahp1. Somit spricht dieses Ergebnis eher gegen die Vermutung, dass Urm1 Proteine markiert, die durch ROS beschädigt wurden. Alternativ wurde ebenfalls vorgeschlagen, dass die Urm1-Modifikation bei oxidativem Stress eine Schutzfunktion ausüben könnte (Van der Veen *et al.*, 2011). So ist es beispielsweise denkbar, dass diese eine ähnliche Funktion besitzt wie die S-Glutathionierung. Die S-Glutathionierung stellt eine Form der posttranslationalen Modifikation dar, bei der es durch den Aufbau von Disulfidbrücken zu einer Verknüpfung von GSH mit Cysteinresten in Proteinen kommt (Dalle-Donne *et al.*, 2009). Hierdurch werden die modifizierten Cysteine vor Überoxidation geschützt (Lillig *et al.*, 2003). Auf vergleichbare Weise könnte eine Urm1-Konjugation eine Oxidation von Lysinresten verhindern. Des Weiteren ist es aber ebenfalls möglich, dass die Urm1-Modifikation zu einer effizienteren Reduktion von oxidierten Proteinen beiträgt. Hierbei könnte eine Urm1-Konjugation dazu führen, dass oxidierte Proteine besser mit Enzymen interagieren, die deren Reduktion vermitteln. Somit würde der Urm1-Modifikation eine ähnliche Funktion zukommen wie beispielsweise der Ubiquitinierung oder SUMOylierung. Denn auch diese Modifikationen können Protein-Protein-Interaktion beeinflussen (Steinacher und Schär, 2005; Husnjak *et al.*, 2008). In der Tat deuten Strukturanalysen des Ahp1-Homodimers darauf hin, dass sich eine Urm1-Modifikation des Peroxiredoxins am K32 auf dessen Interaktion mit Thioredoxinen auswirkt (Lian *et al.*, 2012). Es wird jedoch vermutet, dass diese Interaktion eher gehemmt wird, wenn eine Modifikation am K32 erfolgt. Da aber gezeigt werden konnte, dass das Peroxiredoxin wahrscheinlich noch an alternativen Lysinresten urmyliert werden kann, bleibt fraglich, ob die Urm1-Modifikation tatsächlich einen Einfluss auf diese Interaktion hat.

### 3.4 Beide Urm1-Funktionen sind mechanistisch miteinander verknüpft

Der Aktivierungsmechanismus von Urm1 unterscheidet sich von dem anderer eukaryotischer UBLs. So umfasst die Aktivierung des Modifikators die Bildung eines Urm1-Thiocarboxylats (Schmitz *et al.*, 2008). Es wurde nachgewiesen, dass das thiocarboxylierte Urm1 nicht nur als Substrat für die tRNA-Thiolierung dient, sondern wahrscheinlich auch in die Urm1-Modifikation eingeht (Leidel *et al.*, 2009; Noma *et al.*, 2009; Van der Veen *et al.*, 2011). Dies führte zu der

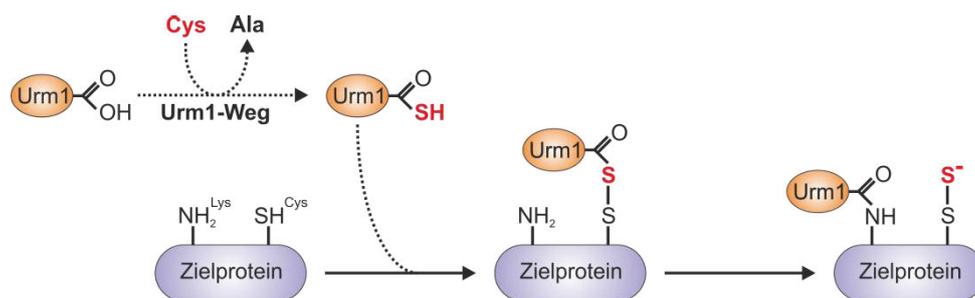
Annahme, dass die Urmlyierung durch denselben Schwefeltransferweg vermittelt wird, der ebenfalls zur tRNA-Thiolierung beiträgt. Doch eine solche mechanistische Verknüpfung beider Urm1-Funktionen konnte bisher nicht bestätigt werden.

Um dies zu überprüfen, wurde unter anderem untersucht, ob die Urmlyierung Schwefelabhängig ist. Für die Urm1-vermittelte tRNA-Thiomodifikation konnte bereits eine Schwefelabhängigkeit nachgewiesen werden (Laxman *et al.*, 2013). So ging die tRNA-Thiolierung zurück, wenn Hefezellen in Medium angezogen wurden, dem die Aminosäuren Cystein oder Methionin als Schwefelquellen fehlten. Tatsächlich konnte auch für die Urm1-Konjugation eine Schwefelabhängigkeit demonstriert werden. Dementsprechend war eine Abnahme in der Urmlyierung zu beobachten, wenn Hefezellen in Methionin-freiem Medium inkubiert wurden. Eine Schwefelabhängigkeit beider Urm1-Funktionen unterstützt die Annahme, dass diese mechanistisch miteinander verknüpft sind. Vermutlich kommt es bei Schwefelmangel zu einem Rückgang in der Thiocarboxylierung von Urm1, wodurch die tRNA-Thiolierung und wahrscheinlich auch die Urmlyierung gehemmt werden. Dieser Rückgang geht womöglich darauf zurück, dass weniger Schwefel für die Bildung des Urm1-Thiocarboxylats bereitsteht. Es konnte aber ebenfalls gezeigt werden, dass Schwefelmangel in Hefe zu einer Reduktion der Uba4-Menge führt (Laxman *et al.*, 2013). Da Uba4 für die Urm1-Aktivierung essentiell ist, sollte dessen Reduktion auch zu einer eingeschränkten Thiocarboxylierung des Modifikators führen. Demnach scheint die Bildung des Urm1-Thiocarboxylats, auf unterschiedliche Weise reguliert zu werden. Vermutlich ist es für Hefen von Vorteil, die Urm1-Thiocarboxylierung an die Schwefelverfügbarkeit anzupassen. So erlaubt dies beispielsweise eine Regulation der tRNA-Thiolierung. Eine Verminderung der tRNA-Thiomodifikation trägt wahrscheinlich dazu bei, dass Hefezellen Schwefelmangel besser überstehen können (Laxman *et al.*, 2013). Zum einen beeinflusst dies die Genexpression und das Zellwachstum. Zum anderen wird durch einen Rückgang der tRNA-Thiolierung der Schwefelverbrauch auch allgemein reduziert. Dies hat womöglich zur Folge, dass mehr Schwefel für andere physiologische Prozesse bereitgestellt wird. Es bleibt fraglich, welche Auswirkung eine verminderte Urmlyierung bei Schwefelmangel hat. Allgemein könnte dies ebenfalls dazu beitragen, dass der Schwefelverbrauch in der Zelle reduziert wird. Es ist aber auch möglich, dass sich ein Rückgang der Urmlyierung auf die Aktivität bestimmter Proteine auswirkt.

Nicht nur bei Schwefelmangel, sondern auch in einem *tum1* $\Delta$ -Hintergrund kam es zu einer Reduktion der Urmlyierung. Tum1 ist eine Schwefeltransferase, die einen indirekten Schwefeltransport von Nfs1 auf Uba4 vermittelt (Noma *et al.*, 2009). Dementsprechend spielt

es eine wichtige Rolle bei der Bildung des Urm1-Thiocarboxylats. Es ist bekannt, dass ein Verlust von Tum1 die Urm1-Thiocarboxylierung drastisch einschränkt. Dies konnte unter anderem dadurch gezeigt werden, dass in einer *tum1Δ*-Hefemutante nur noch eine stark reduzierte tRNA-Thiolierung möglich ist (Huang *et al.*, 2008). Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit reproduziert werden. Demnach ist es wahrscheinlich, dass auch die verminderte Urm1-Thiolierung im *tum1Δ*-Hintergrund auf eine eingeschränkte Urm1-Thiocarboxylierung zurückgeht. Diese Befunde deuten nicht nur auf eine mechanistische Verknüpfung beider Urm1-Funktionen hin. Gleichzeitig sind diese Ergebnisse auch der erste direkte Hinweis dafür, dass die Urm1-Thiolierung durch denselben Schwefeltransferweg vermittelt wird, der ebenfalls zur tRNA-Thiolierung beiträgt. Es wird vermutet, dass die eingeschränkte tRNA-Thiolierung, die im *tum1Δ*-Hintergrund vorhanden ist, auf einen direkten Schwefeltransfer zwischen Nfs1 und Uba4 zurückgeht. Solch eine direkte Schwefelübertragung zwischen beiden Proteinen konnte durch *in vitro*-Analysen bereits demonstriert werden (Noma *et al.*, 2009). Da die Urm1-Konjugation vermutlich über denselben Schwefeltransferweg vermittelt wird wie die tRNA-Thiolierung, geht wahrscheinlich auch die nachweislich drastisch reduzierte Urm1-Thiolierung im *tum1Δ*-Hintergrund auf diesen direkten Schwefeltransport zurück. Nfs1 steht als Cysteindesulfurase am Anfang des Urm1-Wegs (Nakai *et al.*, 2008; Noma *et al.*, 2009). Es entzieht der Aminosäure Cystein den Schwefel, der später für die Bildung des Urm1-Thiocarboxylats verwendet wird. Ohne Nfs1 sollte daher auch keine Thiocarboxylierung des Modifikators möglich sein. Da die Urm1-Thiolierung anscheinend ebenso von der Bildung des Urm1-Thiocarboxylats abhängig ist wie die tRNA-Thiolierung, sollte nach Verlust von Nfs1 keine Urm1-Konjugation mehr stattfinden. Nfs1 ist jedoch ein essentielles Protein. Es versorgt nicht nur den Urm1-Weg mit Schwefel, sondern ist auch an der Thiolierung mitochondrialer tRNAs und der Bildung von Eisen-Schwefel-*clustern* beteiligt (Li *et al.*, 1999; Nakai *et al.*, 2004). Dementsprechend ist eine *nfs1Δ*-Mutante nicht lebensfähig (Kolman und Söll, 1993). Bei bisherigen Untersuchungen zur Aufklärung der Nfs1-Funktion wurden häufig Hefestämme verwendet, bei denen das Gen der Cysteindesulfurase unter der Kontrolle eines *GALI*-Promotors stand (Kispal *et al.*, 1999; Nakai *et al.*, 2001). Dieser erlaubt eine Hemmung der *NFS1*-Expression bei Wachstum auf Glukose-haltigem Medium. Ein solcher Stamm könnte ebenfalls verwendet werden, um den Einfluss von Nfs1 auf die Urm1-Thiolierung näher zu untersuchen. Hierdurch ließe sich vermutlich klären, ob die Thiocarboxylierung von Urm1 wirklich erforderlich ist, damit der Modifikator an andere Proteine angehängt werden kann. Denn es ist durchaus möglich, dass die Urm1-Thiolierung bestimmter Proteine Schwefel-unabhängig erfolgt. So scheint zumindest die

Modifikation von Uba4 durch einen alternativen Weg vermittelt zu werden, bei dem die Bildung eines Urm1-Thiocarboxylats nicht erforderlich ist. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von Tum1 keinen Einfluss auf die Uba4-Urmylierung hat. Trotzdem scheint für die Modifikation der meisten Proteine die Bildung eines Urm1-Thiocarboxylats notwendig zu sein. Es bleibt jedoch offen, was mit dem im Thiocarboxylat eingebauten Schwefel passiert, wenn Urm1 an andere Proteine angehängt wird. Bei der tRNA-Thiolierung wird der Schwefel dafür verwendet, um am *wobble*-Uridin der tRNAs  $tQ^{UUG}$ ,  $tE^{UUC}$  und  $tK^{UUU}$  eine Thiogruppe aufzubauen (Nakai *et al.*, 2008; Leidel *et al.*, 2009; Noma *et al.*, 2009). Bei der Urmylierung kommt es vermutlich zur Entstehung einer Isopeptidbindung zwischen Urm1 und einem Lysinrest im entsprechenden Zielprotein (Van der Veen *et al.*, 2011). Eine solche Bindung enthält aber keinen Schwefel. Es ist denkbar, dass die Urmylierung im Zuge der tRNA-Thiolierung erfolgt. Dementsprechend könnte ein Urm1-Thiocarboxylat seinen Schwefel zuerst für die tRNA-Thiolierung bereitstellen, bevor es anschließend in die Urmylierung eingeht. Doch eine solche direkte Kopplung beider Urm1-Funktionen ließ sich nicht zeigen. Denn in einem *ncs2Δ*- oder *ncs6Δ*-Hintergrund, wo eine tRNA-Thiomodifikation nicht mehr möglich sein sollte, blieb die Urmylierung unverändert. Auch Goehring *et al.* (2003b) kamen bereits zu einem vergleichbaren Ergebnis.



**Abbildung 40: Möglicher Mechanismus für die Konjugation von Urm1 an Zielproteine.**

Für die Generierung des Urm1-Thiocarboxylats wird der Urm1-Weg benötigt. Dieser vermittelt einen Schwefeltransfer von Cystein auf Urm1. Das erzeugte Thiocarboxylat kann mit Zielproteinen verknüpft werden. Im ersten Schritt wird es über eine Acyldisulfidbindung mit einem Cysteinrest im Substrat verknüpft. Anschließend erfolgt eine Übertragung von Urm1 auf einen Lysinrest, wobei es zur Ausbildung einer Isopeptidbindung kommt. Der vom Thiocarboxylat eingebrachte Schwefel verbleibt als Persulfid am Cystein.

Demnach gibt es vermutlich einen alternativen Akzeptor, an den das Urm1-Thiocarboxylat seinen Schwefel abgibt. Dies könnte z.B. auch das Protein sein, mit dem Urm1 kovalent verknüpft wird. Hierbei wäre es beispielsweise möglich, dass der Schwefel auf einen Cysteinrest im Zielprotein übertragen wird. Dies hätte zur Folge, dass es an diesem Cystein zur Entstehung eines Persulfids kommt (Abb. 40). Ein solcher Schwefeltransfer sollte noch

vor dem Aufbau einer Isopeptidbindung zwischen Urm1 und einem Lysinrest im Zielprotein erfolgen. Hierbei wäre zu erwarten, dass es ähnlich wie bei der Aktivierung des Modifikators durch Uba4 kurzzeitig zur Entstehung einer Acyldisulfidbindung zwischen Urm1 und dem jeweiligen Cysteinrest im Zielprotein kommt. In der Tat konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass Urm1 in Hefe  $\beta$ ME-sensitive Konjugate bildet. Demnach besteht die Möglichkeit, dass der Modifikator auch mit Cysteinresten in Zielproteinen verknüpft wird. Es lässt sich aber nicht ausschließen, dass die nachgewiesenen  $\beta$ ME-sensitiven Konjugate darauf zurückgehen, dass urmylierte Proteine über Disulfidbrücken mit anderen Proteinen interagieren. So konnte beispielsweise das abundanteste  $\beta$ ME-sensitive Konjugat als das urmylierte Ahp1-Homodimer identifiziert werden. Trotzdem bleibt bei einer tatsächlich stattfindenden Cysteinmodifikation durch Urm1 fraglich, ob diese unter Ausbildung einer Acyldisulfid- oder Thioesterbindung erfolgt. Für das Ubiquitin wurde bereits gezeigt, dass es nicht nur an Lysin-, sondern auch an Cysteinreste angehängt werden kann (Cadwell und Coscoy, 2005; Williams *et al.*, 2007). Wahrscheinlich kommt es hierbei jedoch zum Aufbau einer Thioesterbindung. Demnach könnte auch Urm1 vorzugsweise über eine solche Bindung mit Cysteinresten verknüpft werden.

### 3.5 Der Mechanismus der Urm1-Aktivierung ist komplexer als bisher angenommen

Das E1-ähnliche Enzym Uba4 ist essentiell für die Aktivierung von Urm1 (Furukawa *et al.*, 2000; Nakai *et al.*, 2008; Leidel *et al.*, 2009; Noma *et al.*, 2009). Mit der N-terminalen MoeBD und der C-terminalen RHD umfasst es zwei Domänen (Schmitz *et al.*, 2008; Leidel *et al.*, 2009; Noma *et al.*, 2009). Während die MoeBD womöglich die Adenylierung von Urm1 vermittelt, ist die RHD an der Thiocarboxylierung des Modifikators beteiligt. In beiden Domänen konnte jeweils ein katalytischer Cysteinrest nachgewiesen werden, der für die Urm1-Aktivierung notwendig zu sein scheint (Furukawa *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2008). So wurde gezeigt, dass eine Mutation des C225 in der MoeBD oder des C397 in der RHD zu einem Ausbleiben der tRNA-Thiolierung und Urmylierung *in vivo* führt (Furukawa *et al.*, 2000; Leidel *et al.*, 2009; Noma *et al.*, 2009; Van der Veen *et al.*, 2011). Doch im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass diese Cysteine nicht essentiell für die Urm1-Aktivierung sind. Denn nach einzelner oder kombinierter Mutation beider Cysteine, war eine eingeschränkte Urmylierung und tRNA-Thiolierung weiterhin möglich. Demnach scheint die Urm1-Aktivierung komplexer zu sein als bisher angenommen.

Das C225 von Uba4 ist konserviert auch in den E1-Enzymen anderer eukaryotischer UBLs zu finden (Furukawa *et al.*, 2000). Dementsprechend wurde ursprünglich davon ausgegangen,

dass Uba4 ähnlich funktioniert wie diese E1-Enzyme. So wurde vermutet, dass es bei der Urm1-Aktivierung zum Aufbau einer Thioesterbindung zwischen dem C225 und dem C-Terminus des Modifikators kommt. In der Tat scheinen beide Proteine über eine DTT-sensitive Bindung miteinander verknüpft zu werden (Furukawa *et al.*, 2000). Vermutlich handelt es sich hierbei jedoch um eine Acyldisulfidbindung, die zwischen dem C397 der Uba4-RHD und dem C-Terminus von Urm1 aufgebaut wird. Diese Vermutung beruht unter anderem auf *in vitro*-Analysen. So wurde durch Schmitz *et al.* (2008) demonstriert, dass Uba4 eine Thiocarboxylierung von Urm1 vermitteln kann, wenn Natriumthiosulfat als alleinige Schwefelquelle vorliegt. Hierbei konnte aber ebenfalls nachgewiesen werden, dass das C225 im Unterschied zum C397 für die Bildung des Urm1-Thiocarboxylats nicht essentiell ist. Daher ist unklar, welche genaue Rolle das C225 bei der Urm1-Aktivierung spielt. Zumindest alle bisher *in vivo* durchgeführten Untersuchungen deuten darauf hin, dass dieser Cysteinrest durchaus für die Aktivierung des Modifikators von Bedeutung ist (Furukawa *et al.*, 2000; Leidel *et al.*, 2009; Noma *et al.*, 2009; Van der Veen *et al.*, 2011). Auch die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen bestätigen dies. Doch im Gegensatz zu früheren Untersuchungen ließ sich zeigen, dass das C225 nicht essentiell für die Uba4-Funktion ist. Es wird vermutet, dass das C225 zur Auflösung der Acyldisulfidbindung beiträgt, welche im Zuge des Schwefeltransfers zwischen dem C397 und Urm1 gebildet wird (Matthies *et al.*, 2004; Schmitz *et al.*, 2008). Hierbei könnte es eine reduktive Spaltung dieser Bindung vermitteln. Dies hätte zum einen zur Folge, dass das Urm1 in seiner thiocarboxylierten Form freigesetzt wird. Zum andern sollte es zur Entstehung einer intramolekularen Disulfidbrücke zwischen dem C225 und dem C397 kommen. Für die Wiederherstellung von aktivem Uba4 wäre aber im Anschluss daran eine Reduktion der Disulfidbrücke erforderlich. Es wird davon ausgegangen, dass eine solche Reduktion durch das cytoplasmatische Thioredoxinsystem vermittelt werden könnte. Der Nachweis, dass das C225 nicht essentiell für die Urm1-Aktivierung ist, deutet darauf hin, dass die reduktive Spaltung der Acyldisulfidbindung vermutlich noch auf einem anderen Weg erfolgt. Demnach könnten auch alternative Cysteinreste im Uba4 an dieser Reaktion beteiligt sein. Trotzdem ist es aber auch möglich, dass das C225 keine Rolle bei der Auflösung der Acyldisulfidbindung spielt. *in vitro*-Analysen mit einer C225A-Mutante von Uba4 haben gezeigt, dass diese eine eingeschränkte Urm1-Adenylierung vermittelt (Schmitz *et al.*, 2008). Daher könnte die reduzierte Urm1-Aktivierung nach Mutation des Cysteins ebenfalls auf eine gehemmte Adenylierung des Modifikators zurückgehen.

Alle bisher durchgeführten Untersuchungen deuten darauf hin, dass das C397 von Uba4 für die Urm1-Aktivierung essentiell ist (Schmitz *et al.*, 2008; Leidel *et al.*, 2009; Noma *et al.*, 2009; Van der Veen *et al.*, 2011). Dementsprechend wird davon ausgegangen, dass eine Thiocarboxylierung von Urm1 nicht mehr möglich ist, wenn dieser Cysteinrest fehlt. Es wird vermutet, dass es in Folge des Schwefeltransfers auf Uba4 zur Entstehung eines Persulfids am C397 kommt, welches die Ausbildung einer Acyldisulfidbindung mit Urm1 erlaubt (Schmitz *et al.*, 2008; Leidel *et al.*, 2009; Noma *et al.*, 2009). Erst durch Auflösung dieser Bindung wird thiocarboxyliertes Urm1 freigesetzt, welches entweder in die tRNA-Thiolierung oder Urmylierung eingehen kann (Leidel *et al.*, 2009; Noma *et al.*, 2009; Van der Veen *et al.*, 2011). Trotzdem ließ sich in dieser Arbeit nachweisen, dass nach Mutation des C397 weiterhin eine verminderte Urmylierung und tRNA-Thiolierung in Hefe stattfindet. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass das C397 für die Urm1-Aktivierung womöglich nicht essentiell ist. Somit existiert vermutlich noch ein weiterer Weg, der unabhängig von diesem Cystein zur Urm1-Thiocarboxylierung beiträgt. So ist es beispielsweise denkbar, dass es in der Uba4-RHD neben dem C397 einen weiteren Cysteinrest gibt, der am Schwefeltransfer auf Urm1 beteiligt ist. Doch, wie bereits erwähnt, konnte *in vitro* demonstriert werden, dass eine Mutation des C397 zu einem Ausbleiben der Urm1-Thiocarboxylierung führt (Schmitz *et al.*, 2008). Demnach ist der Schwefeltransfer, der über die RHD verläuft, vermutlich allein vom C397 abhängig. Somit lässt sich wahrscheinlich ausschließen, dass es in der RHD einen weiteren Cysteinrest gibt, welcher an der Urm1-Thiocarboxylierung beteiligt ist. Der Schwefeltransfer auf Urm1, der auch nach Mutation des C397 weiterhin *in vivo* vorhanden ist, scheint daher nicht über diese Domäne zu erfolgen.

Tatsächlich konnte demonstriert werden, dass Uba4<sub>1-328</sub>, dem die C-terminale RHD vollständig fehlt, weiterhin eine eingeschränkte Urmylierung und tRNA-Thiolierung in Hefe erlaubt. Demnach ist eine Thiocarboxylierung des Modifikators auch ohne die RHD möglich. Trotzdem bleibt unklar, wie in diesem Fall ein Schwefeltransfer auf Urm1 vermittelt wird. Bei den prokaryotischen Schwefelträgerproteinen MoeB und ThiS erfolgt die Aktivierung durch das jeweilige E1-ähnliche Enzym MoeB bzw. ThiF (Taylor *et al.*, 1998; Leimkühler *et al.*, 2001b). Diese unterscheiden sich von Uba4, weil sie über keine C-terminale RHD verfügen (Abb. 41) (Furukawa *et al.*, 2000; Noma *et al.*, 2009). Trotzdem sind sie ebenfalls an der Thiocarboxylierung des entsprechenden Schwefelträgerproteins beteiligt (Taylor *et al.*, 1998; Rudolph *et al.*, 2001). Doch während MoeB bei dieser Reaktion wahrscheinlich nur die Adenylierung von MoeB vermittelt, trägt ThiF zusätzlich noch direkt zum Schwefeltransfer auf ThiS bei. So wurde gezeigt, dass es zum Aufbau einer Acyldisulfidbindung zwischen

ThiS und einem zuvor am katalytischen Cystein von ThiF gebildeten Persulfid kommt (Xi *et al.*, 2001). Eine vergleichbare Form der Verknüpfung zwischen MoeB und MoeD konnte nicht nachgewiesen werden (Leimkühler *et al.*, 2001b). Doch vermutlich geht MoeD eine Acyldisulfidbindung mit einer separaten Schwefeltransferase ein, was schlussendlich ebenfalls zu dessen Thiocarboxylierung führt (Leimkühler *et al.*, 2001a; Dahl *et al.*, 2011).

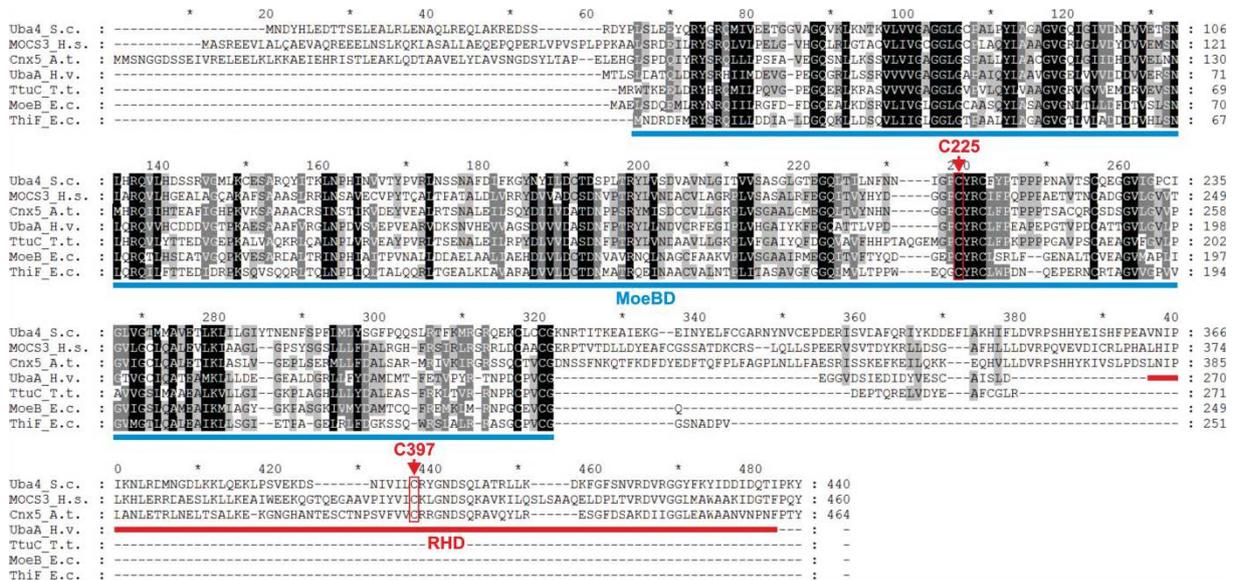
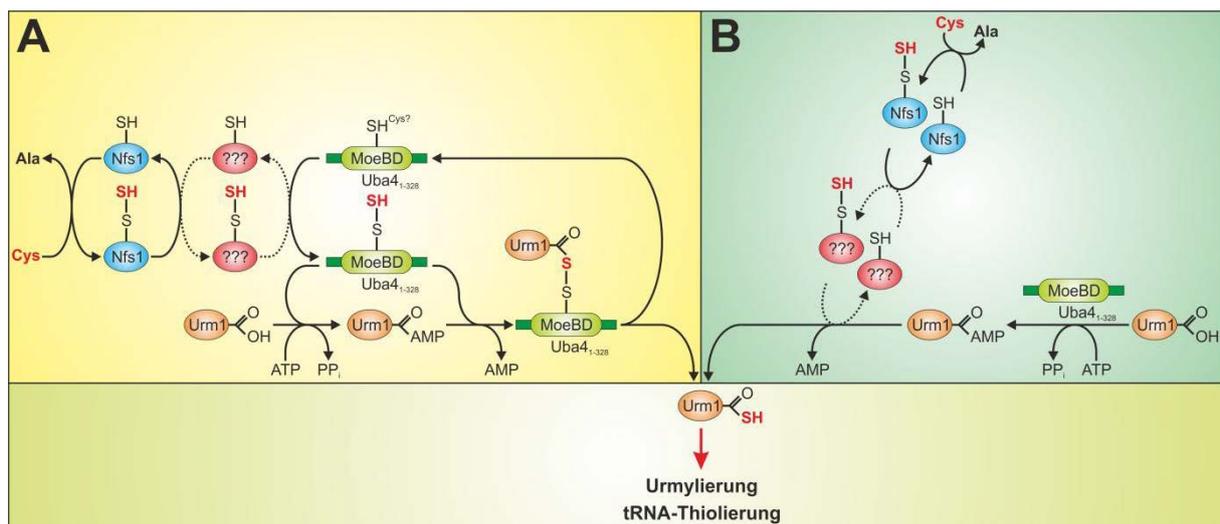


Abbildung 41: Sequenzvergleich von Uba4-homologen Proteinen aus Eu- und Prokaryoten.

Neben einem Sequenzabgleich von Uba4 mit homologen Proteinen aus Eu- und Prokaryoten (S.c. = *Saccharomyces cerevisiae*; H.s. = *Homo sapiens*; A.t. = *Arabidopsis thaliana*; H.v. = *Haloverax volcanii*; T.t. = *Thermus thermophilus*) erfolgte auch ein Abgleich mit MoeB und ThiF aus *Escherichia coli* (E.c.). Die MoeBD (blau) und die RHD (rot) sind farblich hervorgehoben. Außerdem sind die vermuteten katalytischen Cysteinreste beider Domänen gekennzeichnet. Für Uba4 sind dies das C225 (MoeBD) und das C397 (RHD). Weiße Buchstaben mit schwarzem Hintergrund sind Aminosäuren, die zu 100% homolog sind. Darüber hinaus sind auch solche Aminosäuren hervorgehoben, die eine Homologie von mehr als 80% (weiße Buchstaben mit dunkelgrauem Hintergrund) oder 60% (schwarze Buchstaben mit hellgrauem Hintergrund) vorweisen. Abbildung verändert nach Noma *et al.* (2009).

Ähnlich wie ThiF und MoeB fehlt auch dem C-terminal verkürzten Uba4<sub>1-328</sub> eine RHD. Demnach ist es vorstellbar, dass die Uba4<sub>1-328</sub>-vermittelte Thiocarboxylierung von Urm1 auf vergleichbare Weise erfolgt wie die von ThiS oder MoeD. So könnte Uba4<sub>1-328</sub> ähnlich dem ThiF weiterhin direkt am Schwefeltransfer auf Urm1 beteiligt sein (Abb. 42A). Dementsprechend wäre zu erwarten, dass es im Uba4<sub>1-328</sub> einen Cysteinrest gibt, der als Schwefelakzeptor fungiert und an dem es zur Ausbildung einer Acyldisulfidverknüpfung mit Urm1 kommt. Ebenso könnte das Uba4<sub>1-328</sub> ähnlich dem MoeB nur noch an der Adenylierung von Urm1 beteiligt sein (Abb. 42B). In diesem Fall würde der eigentliche Schwefeltransfer

auf Urm1 über ein anderes Protein erfolgen. Interessanterweise scheint es sich hierbei nicht um die Schwefeltransferase Tum1 zu handeln. So konnte gezeigt werden, dass eine *TUM1*-Deletion keinen Einfluss auf die Uba4<sub>1-328</sub>-vermittelte Urm1-Mylierung und tRNA-Thiolierung hat. Somit ist Tum1 vermutlich nicht an der Uba4<sub>1-328</sub>-vermittelten Urm1-Thiocarboxylierung beteiligt. Dies könnte womöglich darauf zurückgehen, dass Tum1 nicht mehr mit Uba4 interagieren kann, wenn die RHD des Urm1-Aktivatorproteins fehlt. So wurde durch *in vitro*-Analysen gezeigt, dass das humane TUM1 hauptsächlich über die RHD mit dem menschlichen Uba4-Homolog MOCS3 interagiert (Fräsdorf *et al.*, 2014). Demnach könnte auch die Interaktion von Tum1 und Uba4 vorwiegend über diese Domäne geschehen.



**Abbildung 42: Möglicher Beitrag von Uba4<sub>1-328</sub> zur Urm1-Thiocarboxylierung.**

**A)** Trotz des Verlusts der RHD ist Uba4<sub>1-328</sub> weiterhin am direkten Schwefeltransfer auf Urm1 beteiligt. Über die MoeBD des verkürzten Aktivatorproteins wird die Adenylierung von Urm1 vermittelt. Das adenylierte Urm1 geht eine Acyldisulfidbindung mit einem Persulfid ein, welches zuvor durch Schwefeltransfer an einem Cysteinrest in der MoeBD von Uba4<sub>1-328</sub> gebildet wurde. Am Schwefeltransfer auf Uba4<sub>1-328</sub> könnte neben Nfs1 noch eine weitere Schwefeltransferase beteiligt sein. **B)** Uba4<sub>1-328</sub> spielt keine Rolle bei der Schwefelübertragung auf Urm1. Nach der Adenylierung des Modifikators durch Uba4<sub>1-328</sub> wird der Schwefel entweder direkt über Nfs1 oder indirekt über eine dazwischengeschaltete Schwefeltransferase in Urm1 eingebaut.

Obwohl die Uba4<sub>1-328</sub>-vermittelte Urm1-Thiocarboxylierung Tum1-unabhängig zu sein scheint, kann davon ausgegangen werden, dass diese Nfs1-abhängig ist (Abb. 42). Denn ohne die Cysteindesulfurase würde der Schwefel fehlen, der zur Thiocarboxylierung des Modifikators führt. Es ist bekannt, dass Nfs1 Schwefel direkt auf Uba4 übertragen kann. Vermutlich wird dieser dabei auf das C397 in der RHD transferiert (Noma *et al.*, 2009). Demnach sollte ein direkter Schwefeltransfer zwischen Nfs1 und Uba4 nicht mehr möglich sein, wenn die RHD fehlt. Auch die Interaktion beider Proteine könnte durch den Verlust

dieser Domäne beeinflusst werden. So konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass das humane NFS1 ähnlich dem TUM1 vorwiegend über die RHD mit MOCS3 interagiert (Marelja *et al.*, 2008). Somit findet ein direkter Schwefeltransfer von Nfs1 auf das C-terminal verkürzte Uba4<sub>1-328</sub> wahrscheinlich nicht statt. Es könnte aber sein, dass Nfs1 seinen Schwefel direkt auf das zuvor durch Uba4<sub>1-328</sub> adenylierte Urm1 überträgt. Darüber hinaus ist es jedoch auch möglich, dass es neben Tum1 eine weitere Schwefeltransferase in Hefe gibt, die einen indirekten Schwefeltransport von Nfs1 auf Uba4<sub>1-328</sub> oder Urm1 vermitteln kann. In der Tat gibt es in *S. cerevisiae* neben Tum1 und Uba4 weitere Proteine, die über RHDs verfügen (Hofmann *et al.*, 1998). Doch es ist nicht bekannt, ob diese ebenfalls an der Bildung des Urm1-Thiocarboxylats beteiligt sind.

Urm1-ähnliche UBLs konnten mittlerweile auch in Prokaryoten nachgewiesen werden. Neben SAMP2 aus dem Archaeon *H. volcanii* gehört auch das im Bakterium *Thermus thermophilus* vorkommende TtuB dazu (Shigi *et al.*, 2006; Humbard *et al.*, 2010). Beide UBLs fungieren ebenso wie Urm1 als Proteinmodifikatoren und sind als Schwefelträger an der tRNA-Thiolierung beteiligt (Shigi *et al.*, 2006; Humbard *et al.*, 2010; Miranda *et al.*, 2011; Shigi *et al.*, 2012). Für die SAMP2- und TtuB-Aktivierung ist das entsprechende E1-ähnliche Enzym UbaA bzw. TtuC verantwortlich (Shigi *et al.*, 2008; Miranda *et al.*, 2011). Diese Enzyme sind zwar homolog zur MoeBD von Uba4, doch im Unterschied zum Urm1-Aktivator besitzen sie keine C-terminale RHD (Abb. 41) (Miranda *et al.*, 2011). Daher wird vermutet, dass der eigentliche Schwefeleinbau in SAMP2 und TtuB über eine separate Schwefeltransferase erfolgt, die über eine oder mehrere RHDs verfügt (Miranda *et al.*, 2011; Shigi *et al.*, 2014). Es könnte durchaus sein, dass sich in Hefe eine vergleichbare Form des Schwefeltransfers erhalten hat, bei der es unabhängig von der Uba4-RHD zum Schwefeleinbau in Urm1 kommt. Die Untersuchungen, die mit dem C-terminal verkürzten Uba4<sub>1-328</sub> durchgeführt wurden, unterstützen diese Annahme. Denn obwohl ein Schwefeltransfer über Uba4<sub>1-328</sub> wahrscheinlich nicht mehr stattfindet, ist eine Urm1-Thiocarboxylierung auch in Anwesenheit des verkürzten Aktivatorproteins vermutlich weiterhin möglich. Da diese aber gehemmt zu sein scheint, ist der Beitrag eines möglicherweise Uba4-unabhängigen Schwefeltransfers zur Urm1-Thiocarboxylierung gering. Somit spielt der Schwefeltransfer, der über die RHD von Uba4 vermittelt wird, in Hefe wahrscheinlich eine wichtigere Rolle. Interessanterweise ließ sich ebenfalls zeigen, dass das zusätzliche Einbringen der RHD in Form von Uba4<sub>329-440</sub> zu keiner sichtbaren Verbesserung der Uba4<sub>1-328</sub>-vermittelten Urm1-Thiocarboxylierung und tRNA-Thiolierung führt. Demnach scheint nicht nur das bloße Vorhandensein der RHD, sondern auch eine enge räumliche Nähe beider Uba4-

Domänen für eine effektive Urm1-Thiocarboxylierung wichtig zu sein. Auch die Uba4-homologen Aktivatorproteine anderer Eukaryoten verfügen über eine C-terminale RHD (Abb. 41) (Mendel und Schwarz, 2002; Nakai *et al.*, 2012). Vermutlich ist das Vorhandensein eines Aktivatorproteins mit zusätzlicher RHD eine exklusive Eigenschaft des eukaryotischen Urm1-Wegs. Anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass dies eine evolutionäre Anpassung darstellt, durch die in Eukaryoten ein effektiver Schwefeltransfer auf Urm1 gewährleistet wird.

### 3.6 Uba4 liegt in Hefe urymyliert vor

Obwohl Urm1 bereits im Jahr 2000 erstmals als Proteinmodifikator beschrieben wurde, konnte mit dem Peroxiredoxin Ahp1 bisher nur ein Substrat des Modifikators in Hefe nachgewiesen werden (Furukawa *et al.*, 2000; Goehring *et al.*, 2003a). In der hier vorliegenden Arbeit wurde jedoch Uba4 als weiteres Urm1-Zielprotein identifiziert. Der Nachweis einer Uba4-Modifikation in Hefe ist ein Hinweis dafür, dass die Urm1-Modifikation des Urm1-Aktivatorproteins in Eukaryoten konserviert sein könnte. So wurde durch Van der Veen *et al.* (2011) bereits demonstriert, dass eine Urm1-Modifikation des Uba4-Homologs MOCS3 auch in menschlichen Zellen erfolgt. Trotzdem scheint eine Modifikation des E1-ähnlichen Aktivatorproteins nicht nur in Eukaryoten konserviert zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass auch die in Prokaryoten vorkommenden, Urm1-ähnlichen UBLs ihr Aktivatorprotein modifizieren. Während SAMP2 beispielsweise in der Lage ist, an UbaA zu konjugieren, kann TtuB kovalent mit TtuC verknüpft werden (Humbard *et al.*, 2010; Shigi *et al.*, 2012). Diese Befunde sind ein Indiz dafür, dass die Modifikation des E1-ähnlichen Aktivatorproteins vermutlich allgemein konserviert ist. Es ist denkbar, dass eine solche Modifikation zur Regulation der Enzymaktivität beiträgt. Auch die Uba4-Aktivität könnte durch die Urm1-Modifikation beeinflusst werden. Eine Veränderung der Aktivität von Uba4 sollte womöglich nicht nur die Urm1-Modifikation selbst, sondern auch die tRNA-Thiolierung beeinträchtigen. Demnach könnte die Urm1-vermittelte Proteinmodifikation unter bestimmten Umweltbedingungen auch Einfluss auf die tRNA-Thiomodifikation haben. In menschlichen Zellen konnte eine Induktion der MOCS3-Urm1-Modifikation beobachtet werden, wenn diese zuvor mit Diamid oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt wurden (Van der Veen *et al.*, 2011). Somit wird die Modifikation von MOCS3 vermutlich durch oxidativen Stress induziert. In diesem Zusammenhang konnte jedoch kein Einfluss der verstärkten MOCS3-Urm1-Modifikation auf die tRNA-Thiolierung festgestellt werden. Dennoch könnten weitere Untersuchungen zur Uba4-

Urm1-Modifikation in Hefe, neue Hinweise dazu liefern, inwiefern die tRNA-Thiolierung durch die Urm1-vermittelte Proteinmodifikation beeinflusst wird.

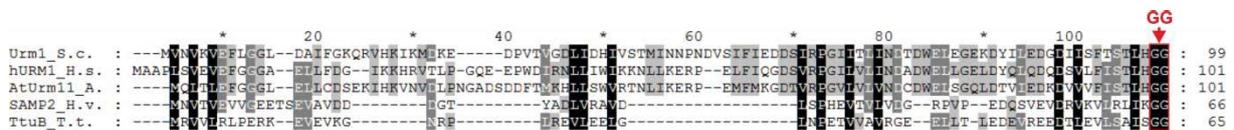
Die Modifikation des Urm1-Aktivatorproteins wurde stets unter reduzierenden Bedingungen untersucht. Demnach erfolgt die Verknüpfung von Urm1 und Uba4 vermutlich unter Ausbildung einer kovalenten Isopeptidbindung. Hierbei konjugiert Urm1 womöglich an einen Lysinrest, der in der N-terminalen MoeBD des Aktivatorproteins liegt. Denn es konnte gezeigt werden, dass auch das C-terminal verkürzte Uba4<sub>1-328</sub> urmyliert wird. Trotzdem bleibt offen, an welchem Lysin eine Urm1-Modifikation von Uba4 erfolgt. Allein in der MoeBD sind neun verschiedene Lysine vorhanden. Um zu bestimmen, ob an diesen tatsächlich eine Urm1-Modifikation stattfindet, könnte weiterführend untersucht werden, wie sich eine Mutation dieser Lysine auf die Uba4-Modifikation auswirkt. Alternativ könnten aber auch massenspektrometrische Analysen durchgeführt werden, um zu bestimmen, an welchem Lysin das Aktivatorprotein urmyliert wird. Auf diesem Wege konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Uba4-homologe UbaA durch SAMP2 am Lysin an Position 113 (K113) modifiziert wird (Humbard *et al.*, 2010). Im Uba4 ist an vergleichbarer Position kein Lysin zu finden. Dennoch ist der Nachweis einer UbaA-Modifikation am K113 ein weiterer Hinweis dafür, dass eine Urm1-Modifikation des Urm1-Aktivatorproteins ebenfalls an einem Lysinrest erfolgt.

Allgemein bleibt unklar, wie die Uba4-Modifikation vermittelt wird. Ein Verlust von Tum1 hatte zur Folge, dass die Urm1-Modifikation der meisten Proteine gehemmt war. Doch im Gegensatz hierzu blieb die Uba4-Modifikation in einem *tum1Δ*-Hintergrund unverändert. Demnach scheint die Bildung eines Urm1-Thiocarboxylats für die Uba4-Modifikation nicht notwendig zu sein. Dies deutet darauf hin, dass eine Verknüpfung von Urm1 und Uba4 noch vor der Thiocarboxylierung des Modifikators erfolgt. Neben Urm1 sind auch andere eukaryotische UBLs in der Lage, ihr E1-Enzym zu modifizieren. In menschlichen Zellen erfolgt beispielsweise eine SUMOylierung von SAE2 (Truong *et al.*, 2012). SAE2 bildet zusammen mit SAE1 ein Heterodimer, das als E1-Enzym wirkt und für die SUMO-Aktivierung benötigt wird (Johnson *et al.*, 1997). Es wurde gezeigt, dass eine SUMOylierung von SAE2 an unterschiedlichen Lysinresten möglich ist (Truong *et al.*, 2012). Hierbei wird die spezifische Modifikation der meisten Lysine durch das E2-Enzym Ubc9 katalysiert. Im Unterschied dazu scheint die SUMOylierung des Lysins an Position 236 (K236) Ubc9-unabhängig stattzufinden. Daher wird davon ausgegangen, dass SUMO direkt nach seiner Aktivierung mit dem K236 im SAE2 verknüpft wird. Es ist denkbar, dass ein ähnlicher Mechanismus zur

Urmyleerung von Uba4 führt. So könnte Urm1, direkt nachdem es durch Uba4 adenyliert wurde, mit seinem Aktivatorprotein verknüpft werden.

### 3.7 Der Urm1-Weg ist in Eukaryoten konserviert

Auch in höheren Eukaryoten konnten UBLs nachgewiesen werden, die zum Urm1 aus Hefe homolog sind (Abb. 43). So wurde beispielsweise mit AtUrm11 ein pflanzliches Urm1-Homolog identifiziert, das in *A. thaliana* als Schwefelträger an der tRNA-Thiomodifikation beteiligt ist (Nakai *et al.*, 2012). Darüber hinaus konnte mit hURM1 ein humanes Homolog nachgewiesen werden, welches in menschlichen Zellen eine Thiolierung von tRNAs und eine kovalente Modifikation von Proteinen vermittelt (Schlieker *et al.*, 2008; Van der Veen *et al.*, 2011).



**Abbildung 43: Sequenzvergleich von Urm1-homologen Proteinen.**

Die Sequenz von Urm1 wurde mit der homologer, eukaryotischer UBLs verglichen (S.c. = *Saccharomyces cerevisiae*; H.s. = *Homo sapiens*; A.t. = *Arabidopsis thaliana*). Zusätzlich erfolgte auch ein Sequenzabgleich mit Urm1-ähnlichen UBLs aus Prokaryoten (H.v. = *Haloverax volcanii*; T.t. = *Thermus thermophilus*). Das konservierte, C-terminale Di-Glycinmotiv (GG) ist in rot hervorgehoben. Weiße Buchstaben mit schwarzen Hintergrund stellen Aminosäuren dar, die zu 100% homolog sind. Des Weiteren sind auch solche Aminosäuren gekennzeichnet, die eine Homologie von mehr als 80% (weiße Buchstaben mit dunkelgrauem Hintergrund) oder 60% (schwarze Buchstaben mit hellgrauem Hintergrund) vorweisen.

Durch Nakai *et al.* (2012) wurde gezeigt, dass AtUrm11 nicht nur in *A. thaliana*, sondern auch in Hefe als Schwefelträger wirken kann. So kam es zu einer partiellen Wiederherstellung der tRNA-Thiomodifikation, wenn das Gen für AtUrm11 in eine *urm1Δ*-Hefemutante eingebracht wurde. Der Nachweis einer AtUrm11-vermittelten tRNA-Thiolierung deutet darauf hin, dass die Schwefelträgerfunktion von Urm1 in Eukaryoten konserviert ist. Ob jedoch auch eine Konservierung der Urmyleerungsfunktion vorliegt, konnte durch Nakai *et al.* (2012) nicht gezeigt werden. Daher wurde die Konservierung beider Urm1-Funktionen in der hier vorliegenden Arbeit näher untersucht. Hierfür wurde die Funktionalität des humanen Urm1-Homologs in Hefe analysiert. Es ließ sich zeigen, dass hURM1 in Hefe neben einer eingeschränkten tRNA-Thiolierung auch eine verminderte Urmyleerung erlaubt. Somit scheinen beide Urm1-Funktionen in Eukaryoten tatsächlich konserviert zu sein.

Trotzdem deuten eine gehemmte tRNA-Thiolierung und Urmyleierung auf eine verminderte Funktionalität von hURM1 in Hefe hin. Durch weitere Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass auch das Einbringen des humanen Uba4-Homologs in Hefe zu keiner Verbesserung der hURM1-vermittelten tRNA-Thiomodifikation und Urmyleierung führt (Jüdes *et al.*, 2015). Daher geht die verminderte Funktionalität von hURM1 wahrscheinlich nicht auf eine schlechtere Aktivierung des Modifikators in *S. cerevisiae* zurück. Vermutlich könnte diese aber darauf zurückgehen, dass hURM1 nach seiner Aktivierung kein geeignetes Substrat für nachfolgende Reaktionen darstellt. So ist es beispielsweise vorstellbar, dass hURM1 im Vergleich zum Urm1 weniger effizient mit der tRNA-Thiolase Ncs2/Ncs6 interagiert. Dies würde erklären, warum hURM1 in Hefe nur eine gehemmte tRNA-Thiolierung erlaubt. Die verminderte Urmyleierung mit hURM1 deutet darauf hin, dass auch die Erkennung von Zielproteinen durch den menschlichen Modifikator in Hefe weniger effizient verläuft. Es ist nicht bekannt, wie eine spezifische Urmyleierung von Proteinen vermittelt wird. An der Konjugation der meisten eukaryotischen UBLs sind E2- und teilweise auch E3-Enzyme beteiligt (Hochstrasser *et al.*, 2009). Ob solche Enzyme ebenfalls bei der spezifischen Urm1-Konjugation eine Rolle spielen, konnte bisher nicht geklärt werden. Dennoch könnte hURM1 in Hefe deshalb schlechter an Zielproteine konjugieren, weil es nur eingeschränkt mit einem putativen E2- oder E3-Enzym interagieren kann. Allgemein scheint jedoch mit hURM1 eine ähnliche Substratspezifität gegeben zu sein wie mit Urm1. So konnte gezeigt werden, dass auch mit hURM1 eine Ahp1- und Uba4-Modifikation in Hefe möglich ist. Hierbei ist insbesondere der Nachweis einer Uba4-Modifikation durch hURM1 interessant. Denn auch in menschlichen Zellen wird das Uba4-homologe MOCS3 durch hURM1 modifiziert (Van der Veen *et al.*, 2011).

Der Nachweis einer Modifikation von homologen Proteinen in Mensch und Hefe deutet darauf hin, dass bestimmte Urmyleierungssubstrate in Eukaryoten konserviert sind. Im Menschen konnten neben MOCS3 noch weitere Zielproteine von hURM1 nachgewiesen werden. So wurde unter anderem CTU1 als urmyliertes Protein identifiziert (Van der Veen *et al.*, 2011). CTU1 stellt das humane Homolog von Ncs6 dar. Proteine, die zum Ncs6 homolog sind, konnten nicht nur in Eukaryoten, sondern auch in Prokaryoten identifiziert werden. Ein prokaryotisches Ncs6-Homolog stellt das im Bakterium *T. thermophilus* vorkommende TtuA dar (Shigi *et al.*, 2006). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich ebenfalls um eine Thiolase, die eine essentielle Rolle bei der tRNA-Thiomodifikation spielt. Interessanterweise kann auch TtuA posttranslational modifiziert werden (Shigi *et al.*, 2012). So wurde gezeigt, dass das Urm1-ähnliche TtuB an TtuA konjugiert. Auch im Archaeon

*H. volcanii* konnte ein Ncs6-Homolog als Zielprotein des Urm1-ähnlichen SAMP2 identifiziert werden (Humbard *et al.*, 2010). Demnach scheint eine Modifikation von Ncs6-homologen Proteinen allgemein konserviert zu sein. Daher ist es wahrscheinlich, dass auch in Hefe eine Urm1-Modifikation von Ncs6 erfolgt. Dennoch sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um dessen Urm1-Modifikation zu bestätigen.

Da hURM1 in Hefe funktional ist, kann davon ausgegangen werden, dass der Urm1-Weg generell in allen Eukaryoten gleich funktioniert. Mit SAMP2 und TtuB wurden jedoch prokaryotische UBLs identifiziert, die wie Urm1 als Schwefelträger an der tRNA-Thiolierung beteiligt sind und als Proteinmodifikatoren fungieren (Shigi *et al.*, 2006; Humbard *et al.*, 2010; Miranda *et al.*, 2011; Shigi *et al.*, 2012). Demnach scheint der Urm1-Weg nicht erst in Eukaryoten entstanden zu sein. Wahrscheinlich hat sich dieser aus einem prokaryotischen Vorläufer entwickelt. Angelehnt an die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen könnte weiterführend auch die Funktionalität der prokaryotischen Urm1-ähnlichen UBLs analysiert werden. Sollten diese wie hURM1 in der Lage sein, eine tRNA-Thiolierung und Proteinmodifikation in Hefe zu vermitteln, wäre dies ein direkter Hinweis dafür, dass diese prokaryotischen Modifikationswege ähnlich funktionieren wie der eukaryotische Urm1-Weg.

## 4. Zusammenfassung

Das ursprünglich in *S. cerevisiae* identifizierte Urm1 stellt aufgrund seiner dualen Funktionsweise ein besonderes UBL dar. In einem Prozess, der als Urm1-Mylierung bezeichnet wird, kann es ähnlich dem Ubiquitin kovalent mit anderen Proteinen verknüpft werden. Zusätzlich fungiert es aber auch als Schwefelträger, der an der Thiolyierung des *wobble*-Uridins bestimmter cytoplasmatischer tRNAs beteiligt ist. Während neuere Untersuchungen zeigen, dass die Urm1-abhängige tRNA-Thiolyierung zu einer effizienten Translation in Eukaryoten beiträgt, ist die Bedeutung der Urm1-Mylierung immer noch unklar.

Um die Funktion der Urm1-vermittelten Proteinmodifikation weiter aufzuklären, wurde die Urm1-Mylierung des Peroxiredoxins Ahp1 im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Es konnte demonstriert werden, dass Ahp1 nicht nur als Monomer, sondern auch als Dimer urmyliert vorliegt. Dies deutet darauf hin, dass die Urm1-Mylierung mit dem peroxidatischen Zyklus von Ahp1 verknüpft ist. Diese Annahme konnte durch die Untersuchung der Modifikation verschiedener *ahp1*-Punktmutanten bestätigt werden. Hierbei ließ sich ebenfalls zeigen, dass das Peroxiredoxin wahrscheinlich auch an alternativen Lysinresten urmyliert werden kann. Trotzdem bleibt unklar, inwiefern die Funktionalität von Ahp1 durch die Urm1-Konjugation beeinträchtigt wird. So konnte ein Einfluss der Urm1-Mylierung auf die Ahp1-vermittelte Entgiftung des Alkylhydroperoxids t-BOOH nicht festgestellt werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung einer möglichen mechanistischen Verknüpfung beider Urm1-Funktionen. Es ließ sich zeigen, dass nicht nur Schwefelmangel, sondern auch ein Verlust der Schwefeltransferase Tum1 zu einer drastischen Reduktion der Urm1-Konjugation führt. Demnach wird die Urm1-Mylierung wahrscheinlich über denselben Schwefeltransferweg vermittelt, der ebenfalls zur tRNA-Thiolyierung beiträgt. Trotzdem ist der Schwefeltransfer, der zur Urm1-Aktivierung führt, womöglich komplexer als bisher angenommen. Wurden die vermuteten katalytischen Cysteine des Urm1-Aktivatorproteins Uba4 mutiert oder dessen C-terminale RHD entfernt, waren eine gehemmte Urm1-Mylierung und tRNA-Thiolyierung weiterhin nachweisbar. Somit scheint ein Schwefeltransfer auf Urm1 auch ohne direkte Beteiligung von Uba4 möglich zu sein.

In dieser Arbeit ließ sich außerdem zeigen, dass Urm1 in Hefe durch sein humanes Homolog funktional ersetzt werden kann. Dies ist ein Hinweis dafür, dass der Urm1-Weg in allen Eukaryoten gleich funktioniert und konserviert ist. Darüber hinaus scheint für die Urm1-Mylierung auch eine Konservierung der Substratspezifität gegeben zu sein. Der Nachweis einer Uba4-Urm1-Mylierung in Hefe könnte durchaus darauf hindeuten.

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Mikroorganismen

#### 5.1.1 *Escherichia coli*-Stämme

**Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Stämme**

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 <math>\lambda</math></i> <sup>-</sup>	ThermoFisher Scientific

#### 5.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

**Tabelle 4: Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme**

Stamm	Genotyp	Quelle
BY4741	<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	EUROSCARF
Y01400	BY4741, <i>urm1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y01939	BY4741, <i>uba4<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y02507	BY4741, <i>tum1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y02720	BY4741, <i>ahp1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y02742	BY4741, <i>elp3<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y07270	BY4741, <i>deg1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	EUROSCARF
FEY14	BY4741, <i>urm1<math>\Delta</math>::kanMX4 AHPI-(c-myc)<sub>9</sub>::ScHIS3</i>	diese Arbeit
FEY15	BY4741, <i>urm1<math>\Delta</math>::kanMX4 uba4<math>\Delta</math>::natNT2</i>	diese Arbeit
FEY16	BY4741, <i>ahp1<math>\Delta</math>::kanMX4 urm1<math>\Delta</math>::ScHIS3</i>	diese Arbeit
FEY18	BY4741, <i>yap1<math>\Delta</math>::kanMX4 ahp1<math>\Delta</math>::SpHIS5</i>	diese Arbeit
FEY19	BY4741, <i>ncs2<math>\Delta</math>::kanMX4 urm1<math>\Delta</math>::SpHIS5</i>	diese Arbeit
FEY20	BY4741, <i>ncs6<math>\Delta</math>::kanMX4 urm1<math>\Delta</math>::SpHIS5</i>	diese Arbeit
FEY21	BY4741, <i>tum1<math>\Delta</math>::kanMX4 urm1<math>\Delta</math>::SpHIS5</i>	diese Arbeit
FEY25	BY4741, <i>urm1<math>\Delta</math>::kanMX4 uba4<math>\Delta</math>::natNT2 ahp1<math>\Delta</math>::SpHIS5</i>	diese Arbeit
FEY26	BY4741, <i>urm1<math>\Delta</math>::kanMX4 uba4<math>\Delta</math>::natNT2 AHPI-(c-myc)<sub>3</sub>::ScHIS3</i>	diese Arbeit
FEY31	BY4741, <i>uba4<math>\Delta</math>::kanMX4 deg1<math>\Delta</math>::SpHIS5</i>	diese Arbeit
FEY32	BY4741, <i>urm1<math>\Delta</math>::kanMX4 uba4<math>\Delta</math>::natNT2 tum1<math>\Delta</math>::SpHIS5</i>	diese Arbeit
FEY34	BY4741, <i>urm1<math>\Delta</math>::kanMX4 uba4<math>\Delta</math>::natNT2 ncs2<math>\Delta</math>::SpHIS5</i>	diese Arbeit
FEY35	BY4741, <i>urm1<math>\Delta</math>::kanMX4 uba4<math>\Delta</math>::natNT2 ncs6<math>\Delta</math>::SpHIS5</i>	diese Arbeit
FEY36	BY4741, <i>uba4<math>\Delta</math>::kanMX4 tum1<math>\Delta</math>::SpHIS5</i>	diese Arbeit
FEY41	BY4741, <i>elp3<math>\Delta</math>::kanMX4 uba4<math>\Delta</math>::ScHIS3 tum1<math>\Delta</math>::KIURA3</i>	diese Arbeit
FEY42	BY4741, <i>urm1<math>\Delta</math>::kanMX4 trx1<math>\Delta</math>::SpHIS5</i>	diese Arbeit

FEY43	BY4741, <i>trx2Δ::kanMX4 urm1Δ::KIURA3</i>	diese Arbeit
FEY47	BY4741, <i>urm1Δ::kanMX4 trx1Δ::SpHIS5 trx2Δ::KILEU2</i>	diese Arbeit
FEY48	BY4741, <i>urm1Δ::kanMX4 AHP1-(c-myc)<sub>3</sub>::ScHIS3</i>	diese Arbeit
FEY49	BY4741, <i>uba4Δ::kanMX4 deg1Δ::SpHIS5 tum1Δ::KIURA3</i>	diese Arbeit
RK28	BY4741, <i>elp3Δ::kanMX4 uba4Δ::ScHIS3</i>	Klassen <i>et al.</i> , 2015
RK46	BY4741, <i>elp3Δ::kanMX4 urm1Δ::ScHIS3</i>	Klassen <i>et al.</i> , 2015
RK101	BY4741, <i>urm1Δ::kanMX4 trr1Δ::SpHIS5</i>	R. Klassen
RK197	BY4741, <i>urm1Δ::kanMX4 deg1Δ::SpHIS5</i>	R. Klassen

## 5.2 Plasmide

**Tabelle 5: Verwendete Plasmide**

Plasmide	Eigenschaften	Quelle
YDp-H	Amp <sup>R</sup> , pUC ori, <i>ScHIS3</i>	Berben <i>et al.</i> , 1991
pUG27	Amp <sup>R</sup> , ColE1 ori, <i>loxP-SpHIS5-loxP</i>	Gueldener <i>et al.</i> , 2002
pUG72	Amp <sup>R</sup> , ColE1 ori, <i>loxP-KIURA3-loxP</i>	Gueldener <i>et al.</i> , 2002
pUG73	Amp <sup>R</sup> , ColE1 ori, <i>loxP-KILEU2-loxP</i>	Gueldener <i>et al.</i> , 2002
pYM5	Amp <sup>R</sup> , ColE1 ori, <i>(c-myc)<sub>3</sub>::ScHIS3</i>	Knop <i>et al.</i> , 1999
pYM17	Amp <sup>R</sup> , ColE1 ori, <i>(HA)<sub>6</sub>::natNT2</i>	Janke <i>et al.</i> , 2004
pYM19	Amp <sup>R</sup> , ColE1 ori, <i>(c-myc)<sub>9</sub>::ScHIS3</i>	Janke <i>et al.</i> , 2004
pYM-N8	Amp <sup>R</sup> , pMB1 ori, <i>natNT2::P<sub>ADHI</sub>-(HA)<sub>3</sub></i>	Janke <i>et al.</i> , 2004
pRS423	Amp <sup>R</sup> , pUC ori, <i>ScHIS3</i> , 2μ ori	Christianson <i>et al.</i> , 1992
pRS425	Amp <sup>R</sup> , pUC ori, <i>ScLEU2</i> , 2μ ori	Christianson <i>et al.</i> , 1992
pSZ67	Gene für tQ <sup>UUG</sup> , tE <sup>UUC</sup> und tK <sup>UUU</sup> kloniert in pRS425	Leidel <i>et al.</i> , 2009
YCplac33	Amp <sup>R</sup> , pMB1 ori, <i>ScURA3, ARS1-CEN4</i>	Gietz und Sugino, 1988
YCplac111	Amp <sup>R</sup> , pMB1 ori, <i>ScLEU2, ARS1-CEN4</i>	Gietz und Sugino, 1988
YEplac195	Amp <sup>R</sup> , pMB1 ori, <i>ScURA3</i> , 2μ ori	Gietz und Sugino, 1988
pHA-URM1	<i>(HA)<sub>3</sub>-URM1</i> kloniert in pRS426 <sub>SmaI</sub>	Furukawa <i>et al.</i> , 2000
pCB45	<i>P<sub>GALI</sub>-TAP-URM1</i> kloniert in YCplac33 <sub>HindIII/SalI</sub>	C. Bär, 2012
pCBK3	<i>P<sub>GALI</sub>-TAP-URM1ΔG</i> kloniert in YCplac33 <sub>HindIII/SalI</sub>	C. Bär
pAJ16	<i>P<sub>ADHI</sub>-UBA4-T<sub>CYCI</sub></i> kloniert in YCplac111 <sub>BamHI/SacI</sub>	diese Arbeit
pAJ31	<i>AHP1</i> kloniert in YCplac111 <sub>HindIII/EcoRI</sub>	diese Arbeit
pAJ33	<i>ahp1-C31S</i> kloniert in YCplac111 <sub>HindIII/EcoRI</sub>	diese Arbeit
pAJ35	<i>ahp1-K32R</i> kloniert in YCplac111 <sub>HindIII/EcoRI</sub>	diese Arbeit
pAJ37	<i>ahp1-C31S/K32R</i> kloniert in YCplac111 <sub>HindIII/EcoRI</sub>	diese Arbeit
pAJ39	<i>ahp1-C62S</i> kloniert in YCplac111 <sub>HindIII/EcoRI</sub>	diese Arbeit
pAJ45	<i>P<sub>ADHI</sub>-(HA)<sub>3</sub>-URM1-T<sub>CYCI</sub></i> kloniert in YCplac33 <sub>HindIII/PstI</sub>	diese Arbeit
pAJ46	<i>P<sub>ADHI</sub>-(HA)<sub>3</sub>-hURM1-T<sub>CYCI</sub></i> kloniert in YCplac33 <sub>HindIII/PstI</sub>	diese Arbeit
pAJ52	<i>P<sub>ADHI</sub>-UBA4-(c-myc)<sub>9</sub>-T<sub>CYCI</sub></i> kloniert in YCplac111 <sub>EcoRI/SacI</sub>	diese Arbeit

pAJ64	$P_{ADHI-uba4-C225S-T_{CYC1}}$ kloniert in YCplac111 <sub>BamHI/SacI</sub>	diese Arbeit
pAJ65	$P_{ADHI-uba4-C397S-T_{CYC1}}$ kloniert in YCplac111 <sub>BamHI/SacI</sub>	diese Arbeit
pAJ67	$ahp1-C31S/C62S$ kloniert in YCplac111 <sub>HindIII/EcoRI</sub>	diese Arbeit
pAJ69	$P_{ADHI-uba4-C225S/C397S-T_{CYC1}}$ kloniert in YCplac111 <sub>BamHI/SacI</sub>	diese Arbeit
pAJ82	$UBA4_{1-328}$ kloniert in pAJ16 <sub>NotI/NdeI</sub>	diese Arbeit
pAJ90	$P_{ADHI-UBA4_{1-328}-(c-myc)_3-T_{CYC1}}$ kloniert in YCplac111 <sub>EcoRI/KpnI</sub>	diese Arbeit
pAJ113	$P_{ADHI-UBA4_{329-440}-T_{CYC1}}$ kloniert in pRS423 <sub>BamHI/SacI</sub>	diese Arbeit

### 5.3 Primer

Alle im Folgenden aufgelisteten Primer wurden von Invitrogen hergestellt. Die Sequenz der Primer ist jeweils vom 5' - zum 3' -Ende angegeben.

**Tabelle 6: Verwendete Primer**

Primer	Sequenz (5' → 3')
S1_UBA4_neu	gtcaataacaatgaatgactaccatctcgaggataccacgtctgaacttgcgccagatctgtttagcttg
S2_UBA4_neu	tcactctttagatagcgtgaaatgctccacactgattctctcatcaggcatcgatgaattcgagctcg
koURM1-FW	aaaacgagataggtaataagcaaaatcgggatggtaaacgtgaaagtggacgacggccagtgaattcccgg
koURM1-RV	ttaaccacatgtaattgtgaagtaaaagagatgatgcaccgtctccaagcttgctgcaggctgcagcg
KO_URM1_FW	caatactgattctgatactaaaacgagataggtaataagcaaaatcgggcagctgaagcttcgtacgc
KO_URM1_RV	ctttatataatagtagctgcttcttaaaatatttgcctgctatttgcataggccactagtgatctg
AHP1KOF	atctcaacaacagcaacaacacagactaccataaccacaacaaaccagctgaagcttcgtacgc
AHP1KOR	ttttgaattttttatataaacatggtttattgtctattacatagcatgcatagggcactagtgatctg
KO_TRX1_FW	ccctgaaactgcattagttaataagaactagacacctcgatacaatacagctgaagcttcgtacgc
KO_TRX1_RV	tatatacaaacacagtatagaacacaataatcggtcattgggtgagtgcatagggcactagtgatctg
KO_TRX2_FW	cacgcacacatacagagagtctacgatctttaaataacacatcaatacagctgaagcttcgtacgc
KO_TRX2_RV	ttaaactggtaaacatgatgactttacgtagcgttaataaccggcaagcatagggcactagtgatctg
KO_TUM1_FW	acaatgaggacaaaagcataaagttgtgaagaaaattgccatacattcacagctgaagcttcgtacgc
KO_TUM1_RV	ttaatatagtagtaataaatcgaactgtcaagaatatttctcttagcatagggcactagtgatctg
KO_NCS2_FW	tgctattgcatccctatcctagtttaaaaatataattctatcaagttcagctgaagcttcgtacgc
KO_NCS2_RV	taaataaataaacataaccattggaatagcgaagcctttgacattcagcatagggcactagtgatctg
KO_NCS6_FW	aaaatttggcgatgagacgatagtaagagtaaagcaaaaggaaccgtccagctgaagcttcgtacgc
KO_NCS6_RV	tatattatattatgtacgctgactcttactgcgagctatataatggcatagggcactagtgatctg
Deg1koF	ggtgccacatgcaatcttactgcctactataaacctccctgacagctgaagcttcgtacgc
Deg1koR	gaaatagcttcaaggttatattatacaggtttatattattgcatagggcactagtgatctg
S3_AHP1	caggtaccgatgtgaccttctcagctgaaagtgtcttgctcatttgcgtacgctgcaggtcgac
S2_AHP1	gggttacctgaagtatacagctgcctcttagcaaggataataaacatcgatgaattcgagctcg
URM1 ORF FW	cacataccggattatgttctctcc
URM1 ORF RV	actggaatgtagaggtctttggg

ScURM1_FW_HindIII	gggaagcttatggtaaactgaaagtgga
ScURM1_RV_XhoI	gggctcgagttaaccaccatgtaatgtg
UBA4-FW	cttctattcgaaggagcaagacgc
UBA4-RV	gcaggatgcagcctgaataaattgc
N_AHP1_FW	caacccttcgctaaccaag
N_AHP1_RV	tctgctgctccaactcactc
N_TRX1_FW	gtctgggtccgcttctttac
N_TRX1_RV	aagccaactgaaaggttgc
N_TRX2_FW	cgctccaagatcagcataac
N_TRX2_RV	caagccaaaggtgcagaaag
N_TUM1_FW	gtcgtggaagtctgttcc
N_TUM1_RV	tcctcgcgatagaaggtctc
N_NCS2_FW	accgatgagatgagtgagac
N_NCS2_R	ccgttcgaatggaactcag
NCS6_FW_KpnI	gggggtacctgctcaaggaatcgcgatgac
N_NCS6_R	acaccggagtcgcccagataag
Deg1FW	tgggctcagctcatcttg
pUG27 SpHIS reverse	gtccaaagcgatggcaacgc
AHP1_FW_HindIII	gggaagcttccttggcctcgatctattgc
AHP1_RV_EcoRI	ggggaattcctgctccaactcactctgtc
ScUBA4_FW_BamHI	gggggatccatgaatgactaccatctcga
ScUBA4_RV_EcoRI	ggggaattcctaataatftaggatggtttg
ADH1-ScUBA4_FW_BamHI	gggggatccccgggtgtacaatatggacttcc
ADH1-ScUBA4_FW	ccaagcatacaatcaactatctcatatcatatgaatgactaccatctcgaggatacc
ADH1-ScUBA4_RV	ggtatcctcgagatggtagtcattcatatgatagatagttgattgtatgcttgg
MOCS3/ScUBA4_RV_SacI	cccagctcaaagccttcgagcgtccc
ADH1-ScUBA4_FW_EcoRI	ggggaattccccgggtgtacaatatggacttcc
ScUBA4-c-myc_RV	cgactgcagcgtacgatatttaggaatggtttgatcaatatcgtc
ScUBA4-c-myc_FW	gacgatattgatcaaacattcctaaatcgtacgctgcaggtcg
c-myc_RV_SacI	ggggagctcagccctcctaccatggttg
ScUBA4_FW_NdeI	gggcatatgaatgactaccatctcgaggataccagctctg
ScUBA4_RV_NotI	ggggcgccgccagtgatggtatctgcagaattcctagtcacactgattctctc
ScUBA4(329-440)_FW_NdeI	catatggcatttcagcgtatctacaagg
ScUBA4(1-328)-c-myc_RV	cgactgcagcgtacggtccacactgattctctcatcag
ScUBA4(1-328)-c-myc_FW	ctgatgagagaatcagtggtggaccgtacgctgcaggtcg
ScUBA4-(c-myc) <sub>3</sub> _RV_KpnI	gggggtaccctcagtggtgcaaatcctaac
hURM1_FW_HindIII	gggaagcttatggctgcgcccttgc
hURM1_RV_XhoI	gggctcgagtcagcccgctgcagag
ScURM1_FW_HindIII	gggaagcttatggtaaactgaaagtgga
ScURM1_RV_XhoI	gggctcgagttaaccaccatgtaatgtg

ADH1-HA_FW_HindIII	gggaagctttcgccgggatcgagaaatg
hURM1-HA_RV	cactgacaagggcgagccatcgcgatgaattctctgtcggacc
hURM1-HA_FW	ggtccgacagagaattcatcgcgatggctgcgccttgcagtg
ScURM1-HA_RV	cctagaactccactttcacgtttaccatcgcgatgaattctctgtcggacc
ScURM1-HA_FW	ggtccgacagagaattcatcgcgatgtaaacgtgaaagtggagtcttagg
hURM1/ScURM1_RV_PstI	gggctgcagggcgcaaattaagccttc
AHP1_C31S_FW	cagtgaatctagtaagatgccacaaac
AHP1_C31S_RV	gtttgtggcatcttagactg
AHP1_K32R_FW	cagtgaatctgtaggatgccacaaac
AHP1_K32R_RV	gtttgtggcatcctacaagactg
AHP1_C31S,K32R_FW	cagtgaatctagtaggatgccacaaac
AHP1_C31S,K32R_RV	gtttgtggcatccttagactg
AHP1_C62S_FW	ctttctcccaaccagtactgtcagccatattc
AHP1_C62S_RV	gaatatggctgacagtactggttggggagaaag
ScUBA4_C225S_FW	ccaaatgccgtgacctcttccaagaaggcgggtgatag
ScUBA4_C225S_RV	ctatcacaccgccttctgggaagaggtcacggcatttgg
ScUBA4_C397S_FW	cagtaatatagtgattcttcccgtacggtaacgactctc
ScUBA4_C397S_RV	gagagtcgttaccgtacggggaagaatcactatattactg

## 5.4 Nährmedien und Anzuchtbedingungen

Alle Nährmedien wurden mit doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) angesetzt. Die Sterilisation der Nährmedien erfolgte in einem Autoklaven durch Erhitzen auf 121°C für 20 min. Für die Herstellung von Festmedien wurde 2% (w/v) Agar-Agar zugesetzt.

### 5.4.1 *E. coli*-Nährmedien

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in der Regel in *lysogeny broth* (LB)-Medium, welches sich aus 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) NaCl und 0,5% (w/v) Hefeextrakt zusammensetzte. Um Plasmid-tragende *E. coli*-Transformanten zu selektieren, wurde dem LB-Medium nach dem Autoklavieren Ampicillin (Carl Roth) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (siehe 2.5.1) wurde kein LB-, sondern *super optimal broth* (SOB)-Medium verwendet, das aus 2% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM MgSO<sub>4</sub> bestand.

### 5.4.2 *S. cerevisiae*-Nährmedien

Für die Kultivierung von *S. cerevisiae* wurde entweder Vollmedium oder Minimalmedium verwendet. Das Vollmedium wurde auf *yeast extract peptone* (YP)-Basis hergestellt und setzte sich dementsprechend aus 1% (w/v) Hefeextrakt und 2% (w/v) Pepton zusammen. Das Minimalmedium, welches zur Selektion von Hefen mit Prototrophien in der Aminosäure- oder Nukleinbasen-Biosynthese genutzt wurde, enthielt 0,67% (w/v) *yeast nitrogen base* (YNB) und je nach Bedarf 2 mg/ml Adeninsulfat, 2 mg/ml L-Histidin, 12 mg/ml L-Leucin, 2 mg/ml L-Methionin, 2 mg/ml L-Tryptophan oder 2 mg/ml Uracil. Zusätzlich wurde dem Voll- oder Minimalmedium für den jeweiligen Verwendungszweck 2% (w/v) Glukose oder 2% (w/v) Galaktose als Kohlenstoffquelle zugegeben. Antibiotika wie Nourseothricin (Werner BioAgents) und Phleomycin (Fisher Bioreagents), sowie die für phänotypische Analysen genutzten Chemikalien Rapamycin (Alfa Aesar) und t-BOOH (Sigma-Aldrich) wurden nach dem Autoklavieren zum Vollmedium gegeben. Während unterschiedliche Konzentrationen für Rapamycin (5 nM bis 10 nM) und t-BOOH (0,4 mM bis 2,5 mM) eingestellt wurden, enthielt das Vollmedium zur Selektion der entsprechenden Antibiotikum-Resistenz 100 µg/ml Nourseothricin oder 7,5 µg/ml Phleomycin. Um gegen Plasmide zu selektieren, die ein *URA3*-Markergen tragen, fand Minimalmedium Verwendung, welches nach dem Autoklavieren mit 1 mg/ml 5-Fluororotsäure (5-FOA) (Fluorochem Ltd.) versetzt wurde.

### 5.4.3 Anzuchtbedingungen für *E. coli* und *S. cerevisiae*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in der Regel bei 37°C. Als Ausnahme fand für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (5.6.1) eine Inkubation bei Raumtemperatur (RT) statt. *S. cerevisiae* wurde bei 30°C kultiviert. Für phänotypische Untersuchungen verschiedener *S. cerevisiae*-Mutanten wurde die Inkubationstemperatur jedoch auf 34°C, 35°C oder 39°C angehoben. Flüssigkulturen beider Mikroorganismen wurden stets schüttelnd bei 200 rpm inkubiert.

## 5.5 Phänotypische Analyse von Hefe mittels Tropfentest

Um *S. cerevisiae*-Stämme phänotypisch auf deren t-BOOH-, Rapamycin- oder Temperatur-Sensitivität zu untersuchen, wurden Tropfentests durchgeführt. Hierfür wurde für jeden zu untersuchenden Hefestamm eine serielle Zellverdünnungsreihe erstellt. Zur Herstellung der Verdünnungsreihe wurde zu Beginn etwas Zellmaterial in 1 ml sterilem ddH<sub>2</sub>O gelöst.

Anschließend erfolgte eine Bestimmung der OD<sub>600</sub> der Zellsuspension. Durch Verdünnung mit sterilem ddH<sub>2</sub>O wurde für die Suspension eine OD<sub>600</sub> von 0,4 eingestellt. Danach wurde diese 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt. Von jeder Verdünnung wurden je 4 µl auf das entsprechende Festmedium getropft. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation für 2 bis 4 Tage, bevor die Phänotypen dokumentiert werden konnten.

## **5.6 Methoden zur Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Mikroorganismen**

### **5.6.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen**

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte wie durch Inoue *et al.* (1990) beschrieben. Hierfür wurden zu Beginn 10 größere *E. coli*-Kolonien in 5 ml SOB gelöst. Mit dieser Zellsuspension wurde eine 250 ml SOB-Kultur angeimpft, welche anschließend bei RT solange schüttelnd inkubiert wurde, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht war. Nach Erreichen der OD<sub>600</sub> wurde die Hauptkultur für 10 min auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte eine Ernte der Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 4000 rpm und 4°C. Das Zellpellet wurde in 80 ml kaltem TB-Puffer (10 mM K-HEPES; 15 mM CaCl<sub>2</sub>; 250 mM KCl; 55 mM MnCl<sub>2</sub>; pH 6,7) resuspendiert und nach einer erneuten 10-minütigen Inkubation auf Eis, fand abermals eine Zentrifugation für 10 min bei 4000 rpm und 4°C statt. Die Zellen wurden anschließend in 20 ml kaltem TB-Puffer gelöst und mit 7% (v/v) DMSO versetzt. Abschließend wurde die Zellsuspension für weitere 10 min auf Eis gelagert, bevor 250 µl Aliquots der Suspension auf 1,5 ml Eppendorfgefäße verteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Die Lagerung der chemisch kompetenten Zellen erfolgte bei -80°C.

### **5.6.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen**

Auf die gefrorenen, chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurde DNA in entsprechender Menge gegeben. Das entsprach bei Plasmid-DNA etwa 200 ng, wohingegen bei einer Ligation (5.7.12 und 5.7.14) der gesamte Ansatz auf die Zellen gegeben wurde. Nach Zugabe der DNA wurden die Zellen für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 1 min bei 42°C. Auf die Zellen wurde 1 ml LB-Flüssigmedium gegeben und es schloss sich eine 30-minütige Inkubation bei 37°C an. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation bei 3000 rpm für 3 min. Das Zellpellet wurde in 100 µl LB-Flüssigmedium aufgenommen und der Ansatz auf Selektivmedium ausplattiert.

### 5.6.3 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Hefezellen

Um *S. cerevisiae*-Stämme mit spezifischen Gendisruptionen oder Epitopmarkierungen zu erzeugen (5.7.7 und 5.7.8), wurden zuvor aufkonzentrierte PCR-Produkte in entsprechende Ausgangsstämme transformiert. Die Transformation von Hefe erfolgte nach dem Protokoll von Gietz und Woods (2002). Zu Beginn wurde mit einer Einzelkolonie des zu transformierenden *S. cerevisiae*-Stammes eine 10 ml YPD-Vorkultur angeimpft. Diese wurde über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 ml frisches YPD-Flüssigmedium auf die Vorkultur gegeben, woraufhin diese für weitere 3 bis 4 h inkubiert. Es folgte eine Ernte der Hefezellen durch Zentrifugation für 2 min bei 4000 rpm. Das Zellpellet wurde mit sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in 2 ml LA-Puffer (0,1 M LiAc) gelöst. Nach Inkubation für 30 min bei 30°C wurden 100 µl der Zellsuspension in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Nachdem eine Ernte der Zellen durch Zentrifugation für 2 min bei 4000 rpm stattgefunden hatte, wurde das Zellpellet in einem Transformationsansatz gelöst, welcher sich aus 240 µl 50% (w/v) PEG, 36 µl 1 M LiAc und 50 µl denaturierter *salmon sperm* DNA (2 mg/ml) zusammensetzte. Auf den Transformationsansatz wurden 35 µl eines zuvor mittels Ethanolfällung (5.7.3) aufkonzentrierten PCR-Produkts gegeben. Daraufhin erfolgte eine Inkubation für 50 min bei 42°C. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation für 2 min bei 5000 rpm geerntet, in sterilem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und auf Selektivmedium ausplattiert. Für die Selektion von Antibiotika-Resistenzen wurden die Hefezellen nach deren Inkubation bei 42°C nicht direkt ausplattiert, sondern in 1 ml YPD-Flüssigmedium aufgenommen und für weitere 2 h bei 30°C inkubiert. Dies sollte Hefetransformanten mit genomisch integrierter Resistenzkassette die Möglichkeit geben, das entsprechende Genprodukt zur Ausbildung ihrer Resistenz zu bilden.

### 5.6.4 one-step Transformation von Hefe

Die Transformation von Hefezellen mit Plasmiden erfolgte, wie es durch Chen *et al.* (1992) beschrieben wurde. Hierfür wurde etwas Zellmaterial des zu transformierenden *S. cerevisiae*-Stammes von einer Vollmediums- oder Minimalmediumsplatte abgenommen, in 1 ml sterilem ddH<sub>2</sub>O gelöst und für 2 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl *one-step*-Puffer (40% (w/v) PEG; 0,2 M LiAc; 0,1 M DTT; 0,5 mg/ml *salmon sperm* DNA; pH 5,0) resuspendiert und etwa 200 ng Plasmid-DNA hinzugegeben. Nach einer Inkubation für 30 min bei 45°C wurde der gesamte Ansatz auf Selektivmedium ausplattiert.

## 5.7 DNA-Methoden

### 5.7.1 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Für die Isolation von Plasmiden aus *E. coli* wurde das *FastGene*<sup>®</sup> *Plasmid Mini Kit* des Herstellers NIPPON Genetics verwendet. Die Isolation der Plasmide erfolgte nach Herstellerangaben.

### 5.7.2 Schnell-Isolation chromosomaler DNA aus Hefezellen

5 ml einer YPD-Übernachtskultur wurden durch mehrfache Zentrifugation in einem 2 ml Eppendorfgefäß geerntet. Auf das Zellpellet kamen ca. 200 µl *glas beads*, 200 µl PCA und 200 µl *breaking buffer* (2% (v/v) Triton X-100; 1% (w/v) SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0). Durch starkes Vortexen für 4 min wurden die Zellen aufgeschlossen. Anschließend wurde das Lysat mit 400 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0) versetzt und nach Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm wurde die DNA- sowie RNA-enthaltene, obere wässrige Phase abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Um mögliche Verunreinigungen mit Chloroform zu entfernen, wurde eine Ethanol-fällung der DNA (5.7.3) durchgeführt. Nachdem das Pellet in 200 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen wurde, erfolgte die Zugabe von 1 µl RNase A (1 mg/ml), wodurch die ebenfalls in der Probe enthaltene RNA entfernt werden sollte. An eine Inkubation für 15 min bei 37°C schloss sich eine erneute Ethanol-fällung an. Das finale Pellet wurde in 30 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und ein Teil der isolierten chromosomalen DNA wurde zur Kontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese (5.7.4) untersucht.

### 5.7.3 Ethanol-fällung von DNA

Die Ethanol-fällung wurde vorzugsweise verwendet, um PCR-Produkte aufzukonzentrieren, welche später für die genetische Manipulation von Hefe (5.7.7 und 5.7.8) Verwendung fanden. Bei dieser Methode wurden zu der in Lösung befindlichen DNA 2 Volumen 96% (v/v) EtOH und 0,1 Volumen 3 M NaAc, pH 4,8 gegeben. Das Gemisch wurde für 20 min auf Eis inkubiert, bevor eine Fällung der DNA durch Zentrifugation für 20 min bei 13000 rpm und 4°C stattfand. Anschließend wurde die DNA mit 70% (v/v) EtOH gewaschen und der Überstand nach erneuter Zentrifugation gründlich entfernt. Das Pellet wurde an der

Luft bei RT getrocknet und in 40 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst, bevor abschließend die Effizienz der Fällung mittels Agarose-Gelelektrophorese (5.7.4) kontrolliert wurde.

#### 5.7.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA fand in Agarosegelen statt, welche je nach Größe des aufzutrennenden DNA-Fragments variierende Agarose-Konzentrationen (1% (w/v) oder 2% (w/v)) besaßen. Für die Herstellung der Gele wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl; 20 mM HAc; 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgeköcht, vollständig gelöst und die abgekühlte Lösung in eine Gelkammer gegossen. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 6-fach Probenpuffer (50% (v/v) Glycerol; 0,2 M Tris-HCl; 0,1 M HAc; 5 mM EDTA, pH 8,0; 0,25% (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA wurde je nach Größe der Gelkammer bei einer Spannung von 100 V bis 120 V durchgeführt, wobei TAE-Puffer als Laufpuffer diente. Nach der Elektrophorese wurde das Agarosegel für 10 min in ein Ethidiumbromid-Bad (0,0002% (w/v) EtBr) gelegt, wodurch die DNA in Folge dessen mittels UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und dokumentiert werden konnte. Die Bestimmung der Fragmentgröße oder ungefähren Menge an aufgetragener DNA erfolgte durch Abgleich mit dem *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (ThermoFisher Scientific).

#### 5.7.5 Gelelution von DNA-Fragmenten

Nach erfolgter Agarose-Gelelektrophorese (5.7.4) wurde das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend fand mit Hilfe des *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits* der Firma Macherey-Nagel eine Elution der DNA aus dem Gel statt. Die Elution erfolgte dabei nach Herstellerangaben.

#### 5.7.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion oder auf Englisch *polymerase chain reaction* (PCR) wurde ursprünglich von Mullis *et al.* (1986) als eine Methode eingeführt, die *in vitro* die Amplifikation von DNA erlaubt. In dieser Arbeit fand die PCR in verschiedenen Bereichen Anwendung. Für diese verschiedenen Anwendungen wurden unterschiedliche DNA-abhängige DNA-Polymerasen verwendet. Die *DreamTaq DNA Polymerase* (ThermoFisher Scientific) wurde genutzt, um analytische PCRs an Hefemutanten oder *E. coli*-Plasmidtransformanten durchzuführen und um DNA-Fragmente zu amplifizieren, mit denen

eine genetische Manipulation von *S. cerevisiae* erfolgte (5.7.7 und 5.7.8). Zusätzlich wurden Polymerasen mit *proof reading*-Funktion verwendet. So wurde beispielsweise eine *Phusion DNA Polymerase* (ThermoFisher Scientific) genutzt, um möglichst fehlerfreie DNA-Fragmente zu amplifizieren, mit denen später Klonierungen (5.7.10 und 5.7.12) durchgeführt wurden. Darüber hinaus wurde eine *Pfu DNA Polymerase* (ThermoFisher Scientific) zur Generierung ortspezifischer Mutationen (5.7.9) verwendet. Da sich die verwendeten DNA-Polymerasen in ihren Anforderungen unterscheiden, wurde für jede DNA-Polymerase ein nach Herstellerangaben angepasstes PCR-Programm verwendet. Zusätzlich wurden die PCR-Bedingungen an die Größe des zu erwartenden Produktes und an die Eigenschaften der verwendeten Primer angepasst. Alle Reaktionen wurden in einem *LabCycler* der Firma SensoQuest durchgeführt. Nach Durchlauf des Programms fand eine Kontrolle des PCR-Produkts mittels Agarose-Gelelektrophorese (5.7.4) statt. Zur Übersicht ist beispielhaft ein PCR-Programm dargestellt, wie es für die *DreamTaq DNA Polymerase* Anwendung fand:

<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	
96 °C	3min	
96 °C	30 sec	} 35 Zyklen
54 °C - 60 °C	30 sec	
72 °C	1 min/kb	
72 °C	10 min	
15 °C	Pause	

### 5.7.7 PCR-basierende Gendisruption in Hefe

Die Disruption bzw. der *knockout* von Hefegenen basierte auf einer Methode, wie sie von Budin *et al.* (1993) eingeführt wurde. Hierbei wurde zu Beginn mittels PCR eine Disruptionskassette erzeugt, welche für die spätere Selektion von *knockout*-Mutanten ein selektierbares Markergen enthielt. Für die Erstellung der Kassetten wurden *template*-Plasmide verwendet, die über unterschiedliche Markergene verfügten (Berben *et al.*, 1991; Gueldener *et al.*, 2002). Über die 5'-Enden der verwendeten PCR-Primer wurden zusätzlich an beide Enden der Disruptionskassette 50 bp große Überhänge eingeführt. Diese waren homolog zu stromaufwärts und -abwärts gelegenen, genomischen Bereichen des zu disruptierenden Gens. Nach Transformation des PCR-Produkts in Hefe (5.6.3) kam es über diese Überhänge zur homologen Rekombination, wodurch das Zielgen gegen die Disruptionskassette ausgetauscht wurde. Transformanten, die nach Anzucht auf entsprechendem Selektivmedium wuchsen,

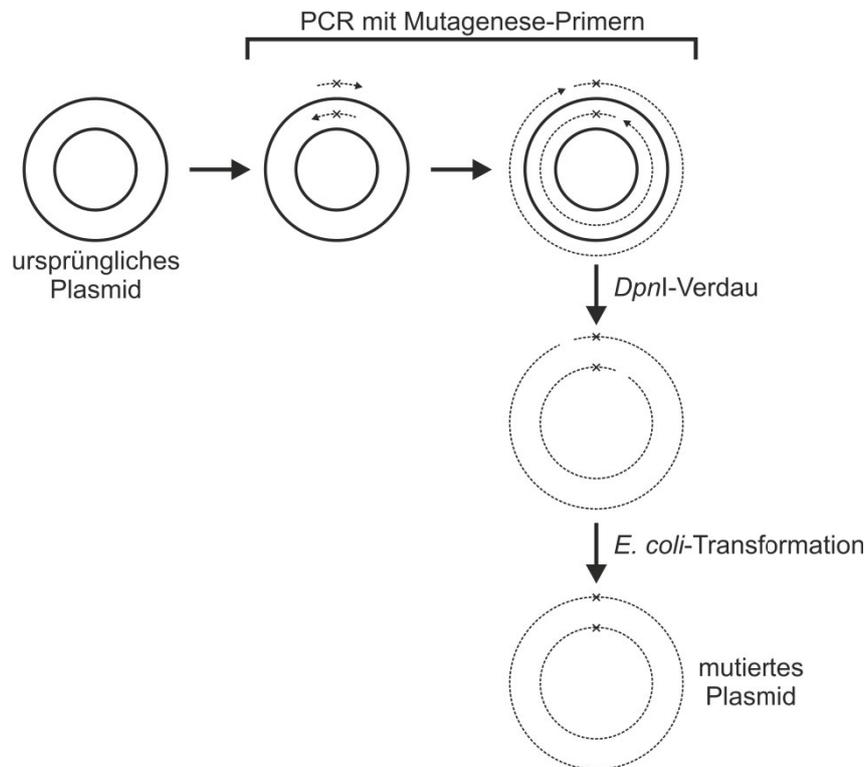
wurden mittels PCR auf die korrekte genomische Integration der Disruptionskassette untersucht.

### 5.7.8 PCR-basierende *in vivo* Epitopmarkierung in Hefe

Um Hefegene *in vivo* mit einem N- oder C-terminalen HA- bzw. c-Myc-Epitop zu versehen, wurde ein PCR-basierender Ansatz verwendet, wie er von Knop *et al.* (1999) beschrieben wurde. Mittels PCR wurde eine Kassette amplifiziert, die neben einem selektierbaren Markergen die kodierende Sequenz für das jeweilige Epitop enthielt. Nach Transformation in Hefe erlaubten homologe Bereiche, die über die verwendeten PCR-Primer an die Enden der Kassette eingeführt wurden, den Einbau des PCR-Produkts in das Genom. Erhaltene Transformanten wurden mittels PCR und *Western Blot* (5.9.4) auf eine erfolgreiche Epitopmarkierung des Zielgens überprüft.

### 5.7.9 Ortsspezifische Mutagenese

Um Punktmutationen in Plasmid-kodierte Hefegene einzufügen, wurde eine ortsspezifische Mutagenese durchgeführt. Die Mutagenese erfolgte nach einem Protokoll, wie es durch Wang und Malcolm (1999) beschrieben wurde. Dieses stellt eine Abwandlung des von Stratagene eingeführten *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis* Protokolls dar, bei dem unterschiedliche Punktmutationen, wie z.B. Basenaustausche, Insertionen oder Deletionen, mittels PCR in Plasmid-DNA eingeführt werden können (Abb. 44).

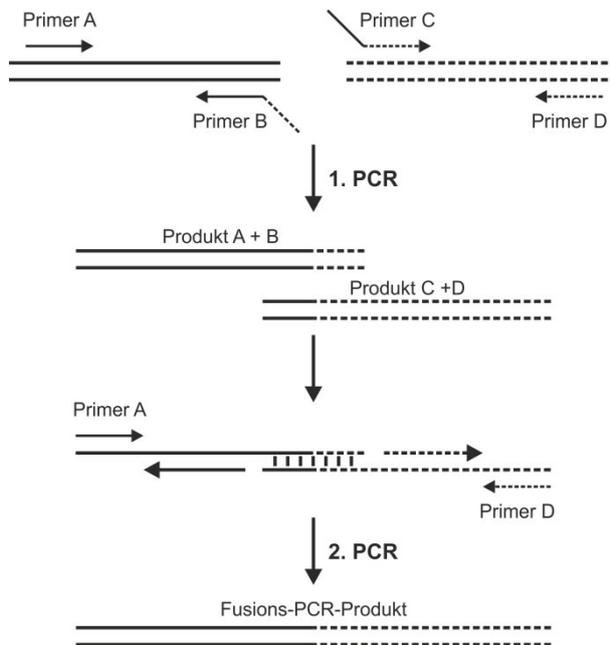


**Abbildung 44: Schematische Übersicht zum Ablauf einer ortsspezifischen Mutagenese mittels PCR.**

An dem Plasmid, in das eine Mutation eingeführt werden soll, wird eine PCR durchgeführt. Hierfür werden Mutagenese-Primer verwendet, die komplementär zueinander sind und die gewünschte Mutation tragen. Durch Verlängerung der Primer wird die Mutation in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Ein Verdau mit dem Restriktionsenzym *DpnI*, welches methylierte und hemimethylierte DNA schneidet, vermittelt den Abbau der ursprünglichen nichtmutierten Plasmid-DNA. Die mutierte DNA bleibt zurück. Diese wird in *E. coli* transformiert, wo ein Ringschluss und eine Vermehrung des mutierten Plasmids stattfindet. Darstellung verändert nach dem Handbuch zum *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene).

### 5.7.10 Fusions-PCR

Die Fusions-PCR ist eine Methode, welche die Einführung ortsspezifischer Mutationen oder die Konstruktion chimärer DNA-Fragmente erlaubt (Ho *et al.*, 1989; Horton *et al.*, 1989). In dieser Arbeit wurde die Fusions-PCR dafür angewandt, um einzelne Abschnitte eines Gens zu deletieren oder Gen- und Epitopsequenzen miteinander zu verknüpfen. Der Ablauf der Methode ist schematisch in Abbildung 45 gezeigt. Erzeugte Fusions-PCR-Produkte wurden aus einem Agraosegel eluiert (5.7.5) und anschließend in einen *E. coli*-Vektor kloniert (5.7.12).



**Abbildung 45: Schematischer Ablauf einer Fusions-PCR.**

Die Fusions-PCR umfasst zwei PCR-Schritte. Beim ersten Schritt werden mit Hilfe der Primerpaare A + B und C + D zwei DNA-Fragmente generiert. Diesen Fragmenten werden über die internen Primer B und C Sequenzen angehängen, die mit dem Ende des jeweils anderen DNA-Fragments überlappen. Nach Denaturierung der Fragmente in einem zweiten PCR-Schritt können deren Einzelstränge an ihren überlappenden 3'-Enden hybridisieren und anschließend verlängert werden. Durch die äußeren Primer A und D findet daraufhin eine Amplifikation des entstandenen Fusions-PCR-Produkts statt. Abbildung verändert nach Heckman und Pease, 2007.

### 5.7.11 Aufreinigung von PCR-Produkten

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten fand das *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* des Herstellers Macherey-Nagel Verwendung. Die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 5.7.12 Klonierung von PCR-Produkten

Zur Klonierung von zuvor aufgereinigten PCR-Produkten (5.7.5 und 5.7.11) wurde das *CloneJET PCR Cloning Kit* von ThermoFisher Scientific verwendet. Die Klonierung fand nach Angaben des Herstellers statt.

### 5.7.13 Restriktion

Der enzymatische Verdau von Plasmiden zur analytischen Kontrolle oder zur Umklonierung von DNA-Fragmenten in andere Vektoren (5.7.14) wurde mit TypII-Restriktionsendonukleasen des Herstellers ThermoFisher Scientific durchgeführt. Die Restriktion erfolgte nach Angaben des Herstellers.

#### 5.7.14 Ligation

Die Klonierung eines DNA-Fragments in einen Zielvektor erfolgte in einem 20  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz. In diesem Ansatz wurden das zu klonierende DNA-Fragment und der Zielvektor in einem molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Zusätzlich enthielt die Reaktion 1  $\mu\text{l}$  T4 DNA Ligase (5 U/ $\mu\text{l}$ , ThermoFisher Scientific) und 2  $\mu\text{l}$  10-fach Ligationspuffer. Nach Inkubation für 30 min bei RT und darauf folgender Hitzeinaktivierung der Ligase (5 min, 70°C), wurde der gesamte Ansatz für eine *E. coli*-Transformation (5.6.2) eingesetzt.

#### 5.7.15 Sequenzierung

Zur Kontrolle von Klonierungen (5.7.12 und 5.7.14) oder zum Nachweis von Punktmutationen, welche mittels ortsspezifischer Mutagenese (5.7.9) in Plasmid-kodierte Hefegene eingeführt wurden, fand eine Sequenzierung nach der Didesoxymethode statt (Sanger *et al.*, 1977). Für jede Sequenzierung wurden 10  $\mu\text{l}$  Ansätze vorbereitet. Jeder Ansatz umfasste dabei 5  $\mu\text{l}$  *template*-Plasmid (ca. 100 ng/ $\mu\text{l}$ ) und 5  $\mu\text{l}$  eines Sequenzier-Primers (5  $\mu\text{M}$ ). Die Sequenzierung der Proben erfolgte durch die Firma GATC Biotech.

### 5.8 RNA-Methoden

#### 5.8.1 tRNA-Extraktion aus Hefe

Für die tRNA-Extraktion wurden 50 OD<sub>600</sub>-Einheiten einer logarithmisch wachsenden Hefekultur (OD<sub>600</sub> ca. 1,0) durch Zentrifugation geerntet (4000 rpm; 2 min). Bis zur weiteren Behandlung fand eine Lagerung des Zellpellets bei -80°C statt.

Zu Beginn der Extraktion wurden 0,5 ml Lyse-Puffer (1% (w/v) SDS; 0,1 M NaAc; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0), 1,5 ml *TRIzol® Reagent* (ThermoFisher Scientific) und ca. 0,5 ml *glas beads* auf das Pellet gegeben. Indem der Ansatz für 3 min gevortext und anschließend für 5 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert wurde, fand ein Aufschluss der Zellen statt. Das Vortexen und die Hitzeinkubation wurden dreimal wiederholt. Das Lysat wurde mit 600  $\mu\text{l}$  Chloroform versetzt, erneut für 1 min gevortext und für 15 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation des Ansatzes (6000 rpm; 30 min; 4°C) wurde die obere wässrige Phase, welche die RNA enthielt, in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Der Ansatz wurde mit ca. 0,33 Volumen 8 M LiCl versetzt. Durch eine anschließende Inkubation für 3 h bei -20°C und eine darauf folgende Zentrifugation (13000 rpm; 15 min; 4°C), fand eine

Fällung größerer RNA-Moleküle statt. Nach Überführung des tRNA-enthaltenden Überstandes in ein neues Eppendorfgesäß erfolgte die Zugabe von 2 Volumen 96% (v/v) EtOH und 0,1 Volumen 5 M NH<sub>4</sub>Ac. Das Gemisch wurde über Nacht bei -20°C inkubiert, bevor eine Fällung der tRNA durch Zentrifugation (13000 rpm; 15 min; 4°C) stattfand. Anschließend wurde das Pellet mit 75% (v/v) EtOH gewaschen und der Überstand nach erneuter Zentrifugation gründlich entfernt. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 50 µl RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 5.8.2 Nachweis von mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>-modifiziertem Uridin in tRNA-Extrakten

Um die Bildung von mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U in Hefe nachzuweisen, wurden die erzeugten tRNA-Extrakte mittels LC-MS/MS (Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie) analysiert. Die LC-MS/MS-Analyse der Proben erfolgte hierbei durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mark Helm (Johannes Gutenberg-Universität Mainz). Die Messungen wurden so durchgeführt, wie es in Klassen *et al.* (2015) beschrieben ist. Für jede Probe erfolgte eine Dreifachbestimmung. Nach der Messung wurde das spezifische Signal des mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>-modifizierten Uridins gegen das des Gesamturidins normalisiert. Die auf diesem Wege ermittelte relative Menge an mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U erlaubte eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Proben untereinander.

## 5.9 Protein-Methoden

### 5.9.1 Proteinextraktion aus Hefe

Für die Analyse der Urmyleierung wurde eine Proteinextraktion aus Hefe durchgeführt. Noch vor der Extraktion erfolgte die Ernte des zu untersuchenden Hefestammes. Hierfür wurden 50 OD<sub>600</sub>-Einheiten einer exponentiell wachsenden Hefekultur (OD<sub>600</sub> ca. 1,0) abzentrifugiert (4000 rpm; 2 min). Das Pellet wurde mit 1 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen und in ein Schraubdeckel-Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Bearbeitung fand eine Lagerung des Pellets bei -80°C statt.

Um einen Proteinabbau zu verhindern, wurden alle im Folgenden beschriebenen Schritte der Proteinextraktion auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Auf das Pellet kamen 200 µl *glas beads* und 400 µl Puffer A (10 mM K-HEPES, pH 7,0; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM PMSF; 2 mM Benzamidin). Der Puffer A war zusätzlich mit einem *cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail* (Roche) versetzt und enthielt je nach Versuch außerdem noch 10 mM

NEM. Durch starkes Vortexen für 1 min auf einem *bead beater* (*Mini-Beadbeater-16*, Biospec Products) fand ein mechanischer Aufschluss der Hefezellen statt. Das Vortexen auf dem *bead beater* wurde viermal wiederholt. Zwischen den einzelnen Aufschlussschritten erfolgte jeweils eine 5-minütige Inkubation der Proben auf Eis. Anschließend fand eine Zentrifugation (13000 rpm; 20 min; 4°C) statt, um größere Zellreste zu entfernen. Nach Transfer des Überstands in ein neues Eppendorfgefäß wurden weiterhin vorhandene Zelltrümmer durch erneute Zentrifugation (13000 rpm; 5 min; 4°C) entfernt. Der von Zellresten befreite Gesamtproteinextrakt wurde abermals in ein neues Eppendorfgefäß überführt und es erfolgte eine Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (5.9.2). Für eine Weiterbearbeitung der Extrakte mittels SDS-PAGE (5.9.3) wurden diese mit 5-fach Laemmli-Puffer (50% (v/v) Glycerol; 25% (v/v)  $\beta$ ME; 0,25 M Tris-HCl, pH 6,8; 10% (w/v) SDS; 0,2% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Um die Urmyleierung unter nicht-reduzierenden Bedingungen zu untersuchen wurde 5-fach Laemmli-Puffer verwendet, dem  $\beta$ ME als Zusatz fehlte.

### 5.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration eines Gesamtproteinextrakts erfolgte nach der Methode, welche von Bradford (1976) eingeführt wurde. Hierfür wurde das *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad) verwendet. Die Konzentrationsbestimmung fand nach Angaben des Herstellers statt. Dabei wurden 990  $\mu$ l des 1:4 verdünnten Farbstoff-Konzentrats mit 10  $\mu$ l des 1:20 verdünnten Proteinextrakts vermischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation im Dunkeln erfolgte die Messung der OD<sub>595</sub>. Durch Abgleich der gemessenen OD<sub>595</sub> gegen eine Eichgerade, die zuvor mit BSA erstellt wurde, konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden.

### 5.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt (Laemmli, 1970). Hierfür wurden diskontinuierliche Gele verwendet, die sich aus einem Sammelgel (5% (w/v) Acrylamid; 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,2% (w/v) SDS) und einem Trenngel (9%-15% (w/v) Acrylamid; 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,2% (w/v) SDS) zusammensetzten. Neben den aufzutrennenden Proben wurden die Gele ebenfalls mit dem *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (ThermoFisher Scientific) als Größenstandard beladen. Die Auftrennung erfolgte in einer mit

Laufpuffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris; 0,1% (w/v) SDS) befüllten Elektrophorese-Apparatur (*Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell*, Bio-Rad), durch Anlegen einer konstanten Spannung von 200 V. Hierbei wurde die Elektrophorese so lange durchgeführt, bis die gewünschte Auftrennung der Proben erreicht war. Die anschließende Detektion der Proteine erfolgte entweder mittels *Western Blot*-Analyse (5.9.4) oder Silberfärbung des Gels (5.9.5).

#### 5.9.4 *Western Blot*

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese mit Hilfe einer Tankblot-Apparatur (*Mini Trans-Blot® Cell*, Bio-Rad) auf eine PVDF-Membran (*Immobilon®-P Transfer Membrane*, Porengröße 0,45 µm, Merck Millipore) transferiert. Die Übertragung erfolgte in Transferpuffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris; 20% (v/v) Methanol) bei einer konstanten Spannung von 100 V für 80 bis 90 min bei 4°C. Anschließend wurde die PVDF-Membran für 1 h bei RT mit TBSTM (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,2% (v/v) Tween 20; 5% (w/v) Milchpulver) blockiert. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert, der in TBSTM gelöst war. Nach der Antikörperinkubation wurde dreimal für 10 min mit TBST (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,2% (v/v) Tween) gewaschen. Es folgte eine Behandlung der Membran mit einem ebenfalls in TBSTM gelösten sekundären Antikörper für 1h bei RT. Danach wurde erneut dreimal mit TBST gewaschen und über die an den sekundären Antikörper gekoppelte *horseradish peroxidase* fand eine Proteindetektion mit Hilfe einer Chemilumineszenz-Reaktion statt. Hierfür wurde die Membran mit dem *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate* (ThermoFisher Scientific) nach Herstellerangaben behandelt. Abschließend wurden die Signale durch Auflegen und Entwickeln eines Röntgenfilms (*LucentBlue X-ray film*, Advansta) sichtbar gemacht.

**Tabelle 7: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.**

Primäre Antikörper	Verdünnung	Quelle
$\alpha$ -HA (Maus)	1:5000	Santa Cruz Biotechnology
$\alpha$ -c-Myc (Maus)	1:5000	Santa Cruz Biotechnology
$\alpha$ -c-Myc (Kaninchen)	1:5000	Santa Cruz Biotechnology
$\alpha$ -Ahp1 (Kaninchen)	1:4000	S. Kuge
$\alpha$ -Cdc19 (Kaninchen)	1:320000	J. Thorner
Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Quelle
$\alpha$ -Maus IgG HRP (Kaninchen)	1:5000	Dianova
$\alpha$ -Kaninchen IgG HRP (Maus)	1:5000	Dianova
$\alpha$ -Kaninchen IgG HRP (Ziege)	1:5000	Dianova

### 5.9.5 Silberfärbung

Um Proteine direkt im SDS-Gel sichtbar zu machen, wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Hierfür wurde das Gel nach der SDS-PAGE für 30 min in Fixierlösung (40% (v/v) EtOH; 10% (v/v) HAc) geschwenkt und anschließend zweimal für je 20 min mit 30% (v/v) EtOH behandelt. Nachdem das Gel zweimal für je 15 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen wurde, folgte eine 1-minütige Inkubation in *sensitizer*-Lösung (0,02% (w/v) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Die Lösung wurde durch erneutes Waschen mit ddH<sub>2</sub>O (zweimal für je 30 sec) gründlich entfernt. Das Gel wurde für 20 min mit Silberlösung (0,1 M AgNO<sub>3</sub>; 0,02% (v/v) Formaldehyd) behandelt und im Anschluss daran abermals mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen (dreimal für je 15 sec). Durch die Zugabe einer Entwicklerlösung (2% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,04% (v/v) Formaldehyd) fand eine Visualisierung der Proteinbanden statt. Die Entwicklung erfolgte so lange, bis die gewünschte Intensität der Proteinbanden erreicht war. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das Gel kurz mit ddH<sub>2</sub>O gespült und danach für 5 min in 5% (v/v) HAc geschwenkt.

### 5.9.6 Tandem-Affinitäts-Aufreinigung

Um Urm1-Konjugate aus Hefe zu isolieren, wurde eine Tandem-Affinitäts-Aufreinigung nach Rigaut *et al.* (1999) durchgeführt. Für die Aufreinigung wurde eine Urm1-Variante genutzt, die an ihrem N-Terminus über ein zusätzliches TAP-Epitop verfügte. Das TAP-Epitop besteht aus einer Protein A- und einer Calmodulin Bindepeptid-Domäne, wobei diese durch eine TEV-Protease-Schnittstelle voneinander getrennt sind. Beide Domänen ermöglichen eine zweistufige Aufreinigung. Demnach ist das TAP-Epitop besonders gut geeignet, um gering konzentrierte Proteinkomplexe in hoher Reinheit aufzureinigen.

Für die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung von Urm1-Konjugaten wurde eine 6 l Hefekultur geerntet, die eine OD<sub>600</sub> von 1,0 erreicht hatte. Das erhaltene Zellpellet, das ein Volumen von ca. 10 ml besaß, wurde in der gleichen Menge Puffer A (10 mM K-HEPES, pH 7,0; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 2 mM Benzamidin; 2,5 mM NEM; *cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail* (Roche)) resuspendiert. Anschließend erfolgte ein Aufschluss der Zellen mittels *glas bead*-Lyse durch fünfmaliges Vortexen in einem *bead beater* (*Mini-Beadbeater-16*, Biospec Products) bei 4°C. Im so erzeugten Proteinextrakt wurde eine KCl-Konzentration von 0,2 M eingestellt. Durch zweimaliges Zentrifugieren (50000 g; 30 min; 4°C und 130000 g; 85 min; 4°C) wurde das Lysat von Zelltrümmern befreit. Es folgte eine Dialyse des gereinigten Extrakts für 3 h bei 4°C gegen Puffer D (20% (v/v) Glycerol; 20 mM K-HEPES, pH 7,9; 50 mM KCl; 0,2 mM EDTA, pH 8,0; 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 2 mM Benzamidin). Durch die Zugabe entsprechender Mengen an 2 M Tris-HCl, 5 M NaCl und 10% (v/v) NP-40 wurde die Pufferzusammensetzung des dialysierten Extrakts anschließend so eingestellt, dass sie der Zusammensetzung des IPP100-Puffers (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl; 0,1% (v/v) NP-40) entsprach. Das äquilibrierte Extrakt wurde mit 200 µl IgG Sepharose *beads* (*IgG Sepharose 6 Fast Flow*, GE Healthcare) vermischt und auf eine Säule (*Poly-Prep® Chromatography Columns*, Bio-Rad) geladen, welche danach für 2 h bei 4°C auf einem Rotator (*Intelli-Mixer RM-2S*, ELMI) schwenkte. Nach Entfernen des ungebundenen Materials wurden die *beads* dreimal mit 10 ml IPP100-Puffer und einmal mit 10 ml TEV *cleavage*-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl; 0,1% (v/v) NP-40; 0,5 mM EDTA, pH 8,0; 1 mM DTT) gewaschen. Zum Ablösen der an die IgG Sepharose *beads* gebundenen Proteine, folgte eine Behandlung mit 100 U *AcTEV™ Protease* (ThermoFisher Scientific) für 4 h bei 4°C. Der Durchfluss wurde aufgefangen und mit 3 Volumen *calmodulin binding*-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl; 0,1% (v/v) NP-40; 10 mM βME; 1 mM MgAc; 1 mM Imidazol; 2 mM CaCl<sub>2</sub>) vermischt. Außerdem wurde die CaCl<sub>2</sub>-Konzentration im Eluat auf 1 mM eingestellt. Das so äquilibrierte Eluat wurde zusammen mit 200 µl Calmodulin Sepharose *beads* (*Calmodulin Sepharose 4B*, GE Healthcare) auf eine Säule geladen, die im Anschluss für 2 h bei 4°C auf einem Rotator schwenkte. Nach Entfernen des ungebundenen Materials fand ein dreimaliges Waschen mit 10 ml *calmodulin binding*-Puffer statt. Zum Schluss erfolgte eine Elution der aufgereinigten Proteine durch fünffaches Waschen der Calmodulin Sepharose *beads* mit je 200 µl *calmodulin elution*-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl; 0,1% (v/v) NP-40; 10 mM βME; 1 mM MgAc; 1 mM Imidazol; 2 mM EGTA). Von jedem Eluat wurden 20 µl mit 5 µl 5-fach Laemmli-Puffer vermischt und aufgekocht (95°C; 5min). Nach

Auftragen des gesamten Ansatzes auf ein SDS-Gel und anschließender elektrophoretischer Auftrennung (5.9.3) fand eine Silberfärbung (5.9.5) statt. Die weitere massenspektrometrische Analyse der Proben wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Angus I. Lamond (*University of Dundee*, Schottland) durchgeführt.

## 6. Literaturverzeichnis

- Arnason T. und Ellison M.J. (1994)** Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain. *Mol Cell Biol.* 14: 7876-7883.
- Bär C. (2012)** Genetic analysis of protein and tRNA modifications required for growth inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* by a fungal ribotoxin. Doktorarbeit. University of Leicester.
- Baudin A., Ozier-Kalogeropoulos O., Denouel A., Lacroute F. und Cullin C. (1993)** A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 21: 3329-3330.
- Begley T.P., Downs D.M., Ealick S.E., McLafferty F.W., Van Loon A.P., et al. (1999)** Thiamin biosynthesis in prokaryotes. *Arch Microbiol.* 171: 293-300.
- Berben G., Dumont J., Gilliquet V., Bolle P.A. und Hilger F. (1991)** The YDp plasmids: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 7: 475-477.
- Benitez L.V. und Allison W.S. (1974)** The inactivation of the acyl phosphatase activity catalyzed by the sulfenic acid form of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by dimedone and olefins. *J Biol Chem.* 249: 6234-6243.
- Bilsland E., Molin C., Swaminathan S., Ramne A. und Sunnerhagen P. (2004)** Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Mol Microbiol.* 53: 1743-1756.
- Björk G.R., Huang B., Persson O.P. und Byström A.S. (2007)** A conserved modified wobble nucleoside (mcm5s2U) in lysyl-tRNA is required for viability in yeast. *RNA.* 13: 1245-1255.
- Bordo D. und Bork P. (2002)** The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO Rep.* 3: 741-746.
- Bossier P., Fernandes L., Rocha D. und Rodrigues-Pousada C. (1993)** Overexpression of YAP2, coding for a new yAP protein, and YAP1 in *Saccharomyces cerevisiae* alleviates growth inhibition caused by 1,10-phenanthroline. *J Biol Chem.* 268: 23640-23645.
- Bradford M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.

- Cadwell K. und Coscoy L. (2005)** Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. *Science*. 309: 127-130.
- Camier S., Ma E., Leroy C., Pruvost A., Toledano M., et al. (2007)** Visualization of ribonucleotide reductase catalytic oxidation establishes thioredoxins as its major reductants in yeast. *Free Radic Biol Med*. 42: 1008-1016.
- Carmel-Harel O., Stearman R., Gasch A.P., Botstein D., Brown P.O., et al. (2001)** Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 39: 595-605.
- Cha M.K., Choi Y.S., Hong S.K., Kim W.C., No K.T., et al. (2003)** Nuclear thiol peroxidase as a functional alkyl-hydroperoxide reductase necessary for stationary phase growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 278: 24636-24643.
- Chae H.Z., Chung S.J. und Rhee S.G. (1994)** Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem*. 269: 27670-27678.
- Chau V., Tobias J.W., Bachmair A., Marriott D., Ecker D.J., et al. (1989)** A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science*. 243: 1576-1583.
- Chen D.C., Yang B.C. und Kuo T.T. (1992)** One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr Genet*. 21: 83-84.
- Chen Z.J. und Sun L.J. (2009)** Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell*. 33: 275-286.
- Christianson T.W., Sikorski R.S., Dante M., Shero J.H. und Hieter P. (1992)** Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*. 110: 119-122.
- Ciechanover A., Heller H., Katz-Etzion R. und Hershko A. (1981)** Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78: 761-765.
- Ciechanover A., Elias S., Heller H. und Hershko A. (1982)** "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem*. 257: 2537-2542.
- Cotto-Rios X.M., Békés M., Chapman J., Ueberheide B. und Huang T.T. (2012)** Deubiquitinases as a signaling target of oxidative stress. *Cell Rep*. 2: 1475-1484.
- Dahl J.U., Urban A., Bolte A., Sriyabhaya P., Donahue J.L., et al. (2011)** The identification of a novel protein involved in molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 286: 35801-35812.
- Damon J.R., Pincus D. und Ploegh H.L. (2015)** tRNA thiolation links translation to stress responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 26: 270-282.

- Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo G., Giustarini D. und Milzani A. (2009)** Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci.* 34: 85-96.
- Davanloo P., Sprinzl M., Watanabe K., Albani M. und Kersten H. (1979)** Role of ribothymidine in the thermal stability of transfer RNA as monitored by proton magnetic resonance. *Nucleic Acids Res.* 6: 1571-1581.
- Delaunay A., Isnard A.D. und Toledano M.B. (2000)** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J.* 19: 5157-5166.
- Delaunay A., Pflieger D., Barrault M.B., Vinh J. und Toledano M.B. (2002)** A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell.* 111: 471-481.
- Deshaies R.J. und Joazeiro C.A. (2009)** RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem.* 78: 399-434.
- Dewez M., Bauer F., Dieu M., Raes M., Vandehaute J., et al. (2008)** The conserved Wobble uridine tRNA thiolase Ctu1-Ctu2 is required to maintain genome integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 5459-5464.
- Esberg A., Huang B., Johansson M.J. und Byström A.S. (2006)** Elevated levels of two tRNA species bypass the requirement for elongator complex in transcription and exocytosis. *Mol Cell.* 24: 139-148.
- Fichtner L., Jablonowski D., Schierhorn A., Kitamoto H.K., Stark M.J., et al. (2003)** Elongator's toxin-target (TOT) function is nuclear localization sequence dependent and suppressed by post-translational modification. *Mol Microbiol.* 49: 1297-1307.
- Fräsdorf B., Radon C. und Leimkühler S. (2014)** Characterization and interaction studies of two isoforms of the dual localized 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase TUM1 from humans. *J Biol Chem.* 289: 34543-34556.
- Furukawa K., Mizushima N., Noda T. und Ohsumi Y. (2000)** A protein conjugation system in yeast with homology to biosynthetic enzyme reaction of prokaryotes. *J Biol Chem.* 275: 7462-7465.
- Gan Z.R. (1991)** Yeast thioredoxin genes. *J Biol Chem.* 266: 1692-1696.
- Garrido E.O. und Grant C.M. (2002)** Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. *Mol Microbiol.* 43: 993-1003.
- 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.

- Gietz R.D. und Woods R.A. (2002)** Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* 350: 87-96.
- Goehring A.S., Rivers D.M. und Sprague G.F. Jr. (2003a)** Attachment of the ubiquitin-related protein Urm1p to the antioxidant protein Ahp1p. *Eukaryot Cell.* 2: 930-936.
- Goehring A.S., Rivers D.M. und Sprague G.F. Jr. (2003b)** Urm1ylation: a ubiquitin-like pathway that functions during invasive growth and budding in yeast. *Mol Biol Cell.* 14: 4329-4341.
- Goldknopf I.L. und Busch H. (1977)** Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74: 864-868.
- Gonzalez Porqué P., Baldesten A. und Reichard P. (1970)** Purification of a thioredoxin system from yeast. *J Biol Chem.* 245: 2363-2370.
- Groettrup M., Pelzer C., Schmidtke G. und Hofmann K. (2008)** Activating the ubiquitin family: UBA6 challenges the field. *Trends Biochem Sci.* 33: 230-237.
- Guldener U., Heinisch J., Koehler G.J., Voss D. und Hegemann J.H. (2002)** A second set of *loxP* marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 30: e23.
- Han L., Kon Y. und Phizicky E.M. (2015)** Functional importance of  $\Psi$ 38 and  $\Psi$ 39 in distinct tRNAs, amplified for tRNAGln(UUG) by unexpected temperature sensitivity of the s2U modification in yeast. *RNA.* 21: 188-201.
- Harshman K.D., Moye-Rowley W.S. und Parker C.S. (1988)** Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from GCN4. *Cell.* 53: 321-330.
- Heckman K.L. und Pease L.R. (2007)** Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc.* 2: 924-932.
- Helm M., Giegé R. und Florentz C. (1999)** A Watson-Crick base-pair-disrupting methyl group (m1A9) is sufficient for cloverleaf folding of human mitochondrial tRNA<sup>Lys</sup>. *Biochemistry.* 38: 13338-13346.
- Herrero E., Ros J., Bellí G. und Cabisco E. (2008)** Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta.* 1780: 1217-1235.
- Hershko A., Ciechanover A. und Rose I.A. (1981)** Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown. *J Biol Chem.* 256: 1525-1528.

- Hershko A., Heller H., Elias S. und Ciechanover A. (1983)** Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem.* 258: 8206-8214.
- Hiltunen J.K., Mursula A.M., Rottensteiner H., Wierenga R.K., Kastaniotis A.J., et al. (2003)** The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* 27: 35-64.
- Hirata D., Yano K. und Miyakawa T. (1994)** Stress-induced transcriptional activation mediated by *YAP1* and *YAP2* genes that encode the Jun family of transcriptional activators in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 242: 250-256.
- Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K. und Pease L.R. (1989)** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene.* 1989 77: 51-59.
- Hochstrasser M. (2009)** Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature.* 458: 422-429.
- Hoegge C., Pfander B., Moldovan G.L., Pyrowolakis G. und Jentsch S. (2002)** RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature.* 419: 135-141.
- Hofmann K., Bucher P. und Kajava A.V. (1998)** A model of Cdc25 phosphatase catalytic domain and Cdk-interaction surface based on the presence of a rhodanese homology domain. *J Mol Biol.* 282: 195-208.
- Holmgren A. (1989)** Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem.* 264: 13963-13966.
- Leidel S., Pedrioli P.G., Bucher T., Brost R., Costanzo M., et al. (2009)** Ubiquitin-related modifier Urm1 acts as a sulphur carrier in thiolation of eukaryotic transfer RNA. *Nature.* 458: 228-232.
- Horton R.M., Hunt H.D., Ho S.N., Pullen J.K. und Pease L.R. (1989)** Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene.* 77: 61-68.
- Huang B., Johansson M.J. und Byström A.S. (2005)** An early step in wobble uridine tRNA modification requires the Elongator complex. *RNA.* 11: 424-436.
- Huang B., Lu J. und Byström A.S. (2008)** A genome-wide screen identifies genes required for formation of the wobble nucleoside 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA.* 14: 2183-2194.
- Humbard M.A., Miranda H.V., Lim J.M., Krause D.J., Pritz J.R., et al. (2010)** Ubiquitin-like small archaeal modifier proteins (SAMPs) in *Haloferax volcanii*. *Nature.* 463: 54-60.

- Husnjak K., Elsasser S., Zhang N., Chen X., Randles L., et al. (2008)** Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature*. 453: 481-488.
- Ichimura Y., Kirisako T., Takao T., Satomi Y., Shimonishi Y., et al. (2000)** A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*. 408: 488-492.
- Inoue H., Nojima H. und Okayama H. (1990)** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96: 23-28.
- Iwai K., Naganuma A. und Kuge S. (2010)** Peroxiredoxin Ahp1 acts as a receptor for alkylhydroperoxides to induce disulfide bond formation in the Cad1 transcription factor. *J Biol Chem*. 285: 10597-10604.
- Izawa S., Maeda K., Sugiyama K., Mano J., Inoue Y., et al. (1999)** Thioredoxin deficiency causes the constitutive activation of Yap1, an AP-1-like transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 274: 28459-28465.
- Janke C., Magiera M.M., Rathfelder N., Taxis C., Reber S., et al. (2004)** A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*. 21: 947-962.
- Jeong J.S., Kwon S.J., Kang S.W., Rhee S.G. und Kim K. (1999)** Purification and characterization of a second type thioredoxin peroxidase (type II TPx) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*. 38: 776-783.
- Johansson M.J., Esberg A., Huang B., Björk G.R. und Byström A.S. (2008)** Eukaryotic wobble uridine modifications promote a functionally redundant decoding system. *Mol Cell Biol*. 28: 3301-3312.
- 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.
- Ju D. und Xie Y. (2006)** Identification of the preferential ubiquitination site and ubiquitin-dependent degradation signal of Rpn4. *J Biol Chem*. 281: 10657-10662.
- Jüdes A., Ebert F., Bär C., Thüring K.L., Harrer A., et al. (2015)** Urmylation and tRNA thiolation functions of ubiquitin-like Uba4·Urm1 systems are conserved from yeast to man. *FEBS Lett*. 589: 904-909.

- Kawai G., Yamamoto Y., Kamimura T., Masegi T., Sekine M., et al. (1992)** Conformational rigidity of specific pyrimidine residues in tRNA arises from posttranscriptional modifications that enhance steric interaction between the base and the 2'-hydroxyl group. *Biochemistry*. 31: 1040-1046.
- Kerscher O., Felberbaum R. und Hochstrasser M. (2006)** Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 22: 159-180.
- Kispal G., Csere P., Prohl C. und Lill R. (1999)** The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J*. 18: 3981-3989.
- Klassen R., Grunewald P., Thüring K.L., Eichler C., Helm M., et al. (2015)** Loss of anticodon wobble uridine modifications affects tRNA(Lys) function and protein levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*. 10: e0119261.
- Knop M., Siegers K., Pereira G., Zachariae W., Winsor B., et al. (1999)** Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast*. 15: 963-972.
- Koc A., Mathews C.K., Wheeler L.J., Gross M.K. und Merrill G.F. (2006)** Thioredoxin is required for deoxyribonucleotide pool maintenance during S phase. *J Biol Chem*. 281: 15058-15063.
- Kolman C. und Söll D. (1993)** SPL1-1, a *Saccharomyces cerevisiae* mutation affecting tRNA splicing. *J Bacteriol*. 175: 1433-1442.
- Komander D., Clague M.J. und Urbé S. (2009)** Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10: 550-563.
- Komander D. (2009)** The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans*. 37: 937-953.
- Komander D. (2010)** Mechanism, specificity and structure of the deubiquitinases. *Subcell Biochem*. 54: 69-87.
- Krogan N.J. und Greenblatt J.F. (2001)** Characterization of a six-subunit holo-elongator complex required for the regulated expression of a group of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 21: 8203-8212.
- Kuge S. und Jones N. (1994)** YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J*. 13: 655-664.
- Kulathu Y1, Garcia FJ, Mevissen TE, Busch M, Arnaudo N, et al. (2013)** Regulation of A20 and other OTU deubiquitinases by reversible oxidation. *Nat Commun*. 4: 1569.

- Kumar S., Yoshida Y. und Noda M. (1993)** Cloning of a cDNA which encodes a novel ubiquitin-like protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 195: 393-399.
- Laemmli U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lammer D., Mathias N., Laplaza J.M., Jiang W., Liu Y., et al. (1998)** Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin-related protein rub1p affects function of the SCFCdc4 complex. *Genes Dev.* 12: 914-926.
- Lauhon C.T. und Kambampati R. (2000)** The *iscS* gene in *Escherichia coli* is required for the biosynthesis of 4-thiouridine, thiamin, and NAD. *J Biol Chem.* 275: 20096-20103.
- Laxman S., Sutter B.M., Wu X., Kumar S., Guo X., et al. (2013)** Sulfur amino acids regulate translational capacity and metabolic homeostasis through modulation of tRNA thiolation. *Cell.* 154: 416-429.
- Le Moan N., Clement G., Le Maout S., Tacnet F. und Toledano M.B. (2006)** The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols: contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways. *J Biol Chem.* 281: 10420-10430.
- Lecoite F., Simos G., Sauer A., Hurt E.C., Motorin Y., et al. (1998)** Characterization of yeast protein Deg1 as pseudouridine synthase (Pus3) catalyzing the formation of psi 38 and psi 39 in tRNA anticodon loop. *J Biol Chem.* 273: 1316-1323.
- Lee J., Spector D., Godon C., Labarre J. und Toledano M.B. (1999a)** A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast. *J Biol Chem.* 274: 4537-4544.
- Lee J., Godon C., Lagniel G., Spector D., Garin J., et al. (1999b)** Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem.* 274: 16040-16046.
- Leidel S., Pedrioli P.G., Bucher T., Brost R., Costanzo M., et al. (2009)** Ubiquitin-related modifier Urm1 acts as a sulphur carrier in thiolation of eukaryotic transfer RNA. *Nature.* 458: 228-32.
- Leimkühler S. und Rajagopalan K.V. (2001a)** A sulfurtransferase is required in the transfer of cysteine sulfur in the *in vitro* synthesis of molybdopterin from precursor Z in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 276: 22024-22031.
- Leimkühler S., Wuebbens M.M. und Rajagopalan K.V. (2001b)** Characterization of *Escherichia coli* MoeB and its involvement in the activation of molybdopterin synthase for the biosynthesis of the molybdenum cofactor. *J Biol Chem.* 276: 34695-34701.
- Li J., Kogan M., Knight S.A., Pain D. und Dancis A. (1999)** Yeast mitochondrial protein, Nfs1p, coordinately regulates iron-sulfur cluster proteins, cellular iron uptake, and iron distribution. *J Biol Chem.* 274: 33025-33034.

- Lian F.M., Yu J., Ma X.X., Yu X.J., Chen Y., et al. (2012)** Structural snapshots of yeast alkyl hydroperoxide reductase Ahp1 peroxiredoxin reveal a novel two-cysteine mechanism of electron transfer to eliminate reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 287: 17077-17087.
- Lillig C.H., Potamitou A., Schwenn J.D., Vlamis-Gardikas A. und Holmgren A. (2003)** Redox regulation of 3'-phosphoadenylylsulfate reductase from *Escherichia coli* by glutathione and glutaredoxins. *J Biol Chem.* 278: 22325-22330.
- 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.
- Marelja Z., Stöcklein W., Nimitz M. und Leimkühler S. (2008)** A novel role for human Nfs1 in the cytoplasm: Nfs1 acts as a sulfur donor for MOCS3, a protein involved in molybdenum cofactor biosynthesis. *J Biol Chem.* 283: 25178-25185.
- Markson G., Kiel C., Hyde R., Brown S., Charalabous P., et al. (2009)** Analysis of the human E2 ubiquitin conjugating enzyme protein interaction network. *Genome Res.* 19: 1905-1911.
- Matthies A., Rajagopalan K.V., Mendel R.R. und Leimkühler S. (2004)** Evidence for the physiological role of a rhodanese-like protein for the biosynthesis of the molybdenum cofactor in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 5946-5951.
- 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.
- Mendel R.R. und Schwarz G. (2002)** Biosynthesis and molecular biology of the molybdenum cofactor (Moco). *Met Ions Biol Syst.* 39: 317-368.
- Michelle C., Vourc'h P., Mignon L. und Andres C.R. (2009)** What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote common ancestor? *J Mol Evol.* 68: 616-628.
- Miranda H.V., Nembhard N., Su D., Hepowit N., Krause D.J., et al. (2011)** E1- and ubiquitin-like proteins provide a direct link between protein conjugation and sulfur transfer in archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 4417-4422.
- Miranda H.V., Antelmann H., Hepowit N., Chavarria N.E., Krause D.J., et al. (2014)** Archaeal ubiquitin-like SAMP3 is isopeptide-linked to proteins via a UbaA-dependent mechanism. *Mol Cell Proteomics.* 13: 220-239.
- Mizushima N., Noda T., Yoshimori T., Tanaka Y., Ishii T., et al. (1998)** A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature.* 395: 395-398.

- Morano K.A., Grant C.M. und Moye-Rowley W.S. (2012)** The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 190: 1157-1195.
- Mueller E.G. (2006)** Trafficking in persulfides: delivering sulfur in biosynthetic pathways. *Nat Chem Biol*. 2: 185-194.
- Muller E.G. (1991)** Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J Biol Chem*. 266: 9194-9202.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., et al. (1986)** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 51: 263-273.
- Mumberg D., Müller R. und Funk M. (1995)** Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*. 156: 119-122.
- Muramatsu T., Nishikawa K., Nemoto F., Kuchino Y., Nishimura S., et al. (1988)** Codon and amino-acid specificities of a transfer RNA are both converted by a single post-transcriptional modification. *Nature*. 336: 179-181.
- Murphy M.P. (2009)** How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 417: 1-13.
- Nakai Y., Nakai M., Hayashi H. und Kagamiyama H. (2001)** Nuclear localization of yeast Nfs1p is required for cell survival. *J Biol Chem*. 276: 8314-8320.
- Nakai Y., Umeda N., Suzuki T., Nakai M., Hayashi H., et al. (2004)** Yeast Nfs1p is involved in thio-modification of both mitochondrial and cytoplasmic tRNAs. *J Biol Chem*. 279: 12363-12368.
- Nakai Y., Nakai M. und Hayashi H. (2008)** Thio-modification of yeast cytosolic tRNA requires a ubiquitin-related system that resembles bacterial sulfur transfer systems. *J Biol Chem*. 283: 27469-27476.
- Nakai Y., Harada A., Hashiguchi Y., Nakai M. und Hayashi H. (2012)** *Arabidopsis* molybdopterin biosynthesis protein Cnx5 collaborates with the ubiquitin-like protein Urm11 in the thio-modification of tRNA. *J Biol Chem*. 287: 30874-30884.
- Nedialkova D.D. und Leidel S.A. (2015)** Optimization of Codon Translation Rates via tRNA Modifications Maintains Proteome Integrity. *Cell*. 161: 1606-1618.
- Noma A., Sakaguchi Y. und Suzuki T. (2009)** Mechanistic characterization of the sulfur-relay system for eukaryotic 2-thiouridine biogenesis at tRNA wobble positions. *Nucleic Acids Res*. 37: 1335-1352.

- Norbeck J., Pählman A.K., Akhtar N., Blomberg A. und Adler L. (1996)** Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the corresponding *GPP1* and *GPP2* genes and evidence for osmotic regulation of Gpp2p expression by the osmosensing mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 271: 13875-13881.
- Osaka F., Kawasaki H., Aida N., Saeki M., Chiba T., et al. (1998)** A new NEDD8-ligating system for cullin-4A. *Genes Dev.* 12: 2263-2268.
- Otero G., Fellows J., Li Y., de Bizemont T., Dirac A.M., et al. (1999)** Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Mol Cell.* 3: 109-118.
- Özkaynak E., Finley D. und Varshavsky A. (1984)** The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature.* 312: 663-666.
- Pan J. und Carroll K.S. (2014)** Chemical biology approaches to study protein cysteine sulfenylation. *Biopolymers.* 101: 165-172.
- Park S.G., Cha M.K., Jeong W. und Kim I.H. (2000)** Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 275: 5723-5732.
- Patton E.E., Willems A.R., Sa D., Kuras L., Thomas D., et al. (1998)** Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast. *Genes Dev.* 12: 692-705.
- Paulsen C.E. und Carroll K.S. (2009)** Chemical dissection of an essential redox switch in yeast. *Chem Biol.* 16: 217-225.
- Pedrajas J.R., Kosmidou E., Miranda-Vizuete A., Gustafsson J.A., Wright A.P., et al. (1999)** Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 274: 6366-6373.
- Pedrajas J.R., Miranda-Vizuete A., Javanmardy N., Gustafsson J.A. und Spyrou G. (2000)** Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J Biol Chem.* 275: 16296-16301.
- Pedrioli P.G., Leidel S. und Hofmann K. (2008)** Urm1 at the crossroad of modifications. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. *EMBO Rep.* 9: 1196-1202.
- Pham A.D. und Sauer F. (2000)** Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science.* 289: 2357-2360.
- Phizicky E.M. und Hopper A.K. (2010)** tRNA biology charges to the front. *Genes Dev.* 24: 1832-1860.

- Rabut G. und Peter M. (2008)** Function and regulation of protein neddylation. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. EMBO Rep. 9: 969-976.
- Ragu S., Dardalhon M., Sharma S., Iraqui I., Buhagiar-Labarchède G., et al. (2014)** Loss of the thioredoxin reductase Trr1 suppresses the genomic instability of peroxiredoxin tsal mutants. PLoS One. 9: e108123.
- Rahl P.B., Chen C.Z. und Collins R.N. (2005)** Elp1p, the yeast homolog of the FD disease syndrome protein, negatively regulates exocytosis independently of transcriptional elongation. Mol Cell. 17: 841-853.
- Rajagopalan K.V. (1997)** Biosynthesis and processing of the molybdenum cofactors. Biochem Soc Trans. 25: 757-761.
- Reyes-Turcu F.E., Ventii K.H. und Wilkinson K.D. (2009)** Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. Annu Rev Biochem. 78: 363-397.
- Rezgui V.A., Tyagi K., Ranjan N., Konevega A.L., Mittelstaet J., et al. (2013)** tRNA tKUUU, tQUUG, and tEUUC wobble position modifications fine-tune protein translation by promoting ribosome A-site binding. Proc Natl Acad Sci U S A. 110: 12289-12294.
- Rigaut G., Shevchenko A., Rutz B., Wilm M., Mann M., et al. (1999)** A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. Nat Biotechnol. 17: 1030-1032.
- Robzyk K., Recht J. und Osley M.A. (2000)** Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. Science. 287: 501-504.
- Rodriguez M.S., Dargemont C. und Hay R.T. (2001)** SUMO-1 conjugation *in vivo* requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. J Biol Chem. 276: 12654-12659.
- Rudolph M.J., Wuebbens M.M., Rajagopalan K.V. und Schindelin H. (2001)** Crystal structure of molybdopterin synthase and its evolutionary relationship to ubiquitin activation. Nat Struct Biol. 8: 42-46.
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A.R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 74: 5463-5467.
- Schlesinger D.H. und Goldstein G. (1975)** Molecular conservation of 74 amino acid sequence of ubiquitin between cattle and man. Nature. 255: 423-424.
- Schlieker C.D., Van der Veen A.G., Damon J.R., Spooner E. und Ploegh H.L. (2008)** A functional proteomics approach links the ubiquitin-related modifier Urm1 to a tRNA modification pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 105: 18255-18260.

- Schmitz J., Wuebbens M.M., Rajagopalan K.V. und Leimkühler S. (2007)** Role of the C-terminal Gly-Gly motif of *Escherichia coli* MoaD, a molybdenum cofactor biosynthesis protein with a ubiquitin fold. *Biochemistry*. 46: 909-916.
- Schmitz J., Chowdhury M.M., Hänzelmann P., Nimitz M., Lee E.Y., et al. (2008)** The sulfurtransferase activity of Uba4 presents a link between ubiquitin-like protein conjugation and activation of sulfur carrier proteins. *Biochemistry*. 47: 6479-6489.
- Seeler J.S. und Dejean A. (2003)** Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4: 690-699.
- Seo M.S., Kang S.W., Kim K., Baines I.C., Lee T.H., et al. (2000)** Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem*. 275: 20346-20354.
- Seol J.H., Feldman R.M., Zachariae W., Shevchenko A., Correll C.C., et al. (1999)** Cdc53/cullin and the essential Hrt1 RING-H2 subunit of SCF define a ubiquitin ligase module that activates the E2 enzyme Cdc34. *Genes Dev*. 13: 1614-1626.
- Shigi N., Sakaguchi Y., Suzuki T. und Watanabe K. (2006)** Identification of two tRNA thiolation genes required for cell growth at extremely high temperatures. *J Biol Chem*. 281: 14296-14306.
- Shigi N., Sakaguchi Y., Asai S., Suzuki T. und Watanabe K. (2008)** Common thiolation mechanism in the biosynthesis of tRNA thiouridine and sulphur-containing cofactors. *EMBO J*. 27: 3267-3278.
- Shigi N. (2012)** Posttranslational modification of cellular proteins by a ubiquitin-like protein in bacteria. *J Biol Chem*. 287: 17568-17577.
- Shigi N. (2014)** Biosynthesis and functions of sulfur modifications in tRNA. *Front Genet*. 5: 67.
- Shintani T., Mizushima N., Ogawa Y., Matsuura A., Noda T., et al. (1999)** Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *EMBO J*. 18: 5234-5241.
- Spence J., Sadis S., Haas A.L. und Finley D. (1995)** A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol*. 15: 1265-1273.
- Steinacher R. und Schär P. (2005)** Functionality of human thymine DNA glycosylase requires SUMO-regulated changes in protein conformation. *Curr Biol*. 15: 616-623.
- Stephen D.W., Rivers S.L. und Jamieson D.J. (1995)** The role of the *YAP1* and *YAP2* genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 16: 415-423.

- Taylor S.V., Kelleher N.L., Kinsland C., Chiu H.J., Costello C.A., et al. (1998)** Thiamin biosynthesis in *Escherichia coli*. Identification of ThiS thiocarboxylate as the immediate sulfur donor in the thiazole formation. *J Biol Chem.* 273: 16555-16560.
- Terrell J., Shih S., Dunn R. und Hicke L. (1998)** A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol Cell.* 1: 193-202.
- Truong K., Lee T.D. und Chen Y. (2012)** Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of E1 Cys domain inhibits E1 Cys domain enzymatic activity. *J Biol Chem.* 287: 15154-15163.
- Van der Veen A.G., Schorpp K., Schlieker C., Buti L., Damon J.R., et al. (2011)** Role of the ubiquitin-like protein Urm1 as a noncanonical lysine-directed protein modifier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 1763-1770.
- Verdoucq L., Vignols F., Jacquot J.P., Chartier Y. und Meyer Y. (1999)** *In vivo* characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family. *J Biol Chem.* 274: 19714-19722.
- Wang W. und Malcolm B.A. (1999)** Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis. *Biotechniques.* 26: 680-682.
- Wang C., Xi J., Begley T.P. und Nicholson L.K. (2001)** Solution structure of ThiS and implications for the evolutionary roots of ubiquitin. *Nat Struct Biol.* 8: 47-51.
- Wang F., Liu M., Qiu R. und Ji C. (2011)** The dual role of ubiquitin-like protein Urm1 as a protein modifier and sulfur carrier. *Protein Cell.* 2: 612-619.
- Wilkinson K.A. und Henley J.M. (2010)** Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J.* 428: 133-145.
- Williams C., van den Berg M., Sprenger R.R. und Distel B. (2007)** A conserved cysteine is essential for Pex4p-dependent ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p. *J Biol Chem.* 282: 22534-22543.
- Wittschieben B.O., Otero G., de Bizemont T., Fellows J., Erdjument-Bromage H., et al. (1999)** A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell.* 4: 123-128.
- Wu A.L. und Moye-Rowley W.S. (1994)** *GSH1*, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol Cell Biol.* 14: 5832-5839.
- Wu A., Wemmie J.A., Edgington N.P., Goebel M., Guevara J.L., et al. (1993)** Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. *J Biol Chem.* 268: 18850-18858.

- Xi J., Ge Y., Kinsland C., McLafferty F.W. und Begley T.P. (2001)** Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin in *Escherichia coli*: identification of an acyldisulfide-linked protein--protein conjugate that is functionally analogous to the ubiquitin/E1 complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 98: 8513-8518.
- Xu J., Zhang J., Wang L., Zhou J., Huang H., et al. (2006)** Solution structure of Urm1 and its implications for the origin of protein modifiers. Proc Natl Acad Sci U S A. 103: 11625-11630.
- Zheng L., White R.H., Cash V.L., Jack R.F. und Dean D.R. (1993)** Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 90: 2754-2758.
- Zheng L., White R.H., Cash V.L. und Dean D.R. (1994)** Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the *nifS* gene product. Biochemistry. 33: 4714-4720.

## Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Raffael Schaffrath für die Möglichkeit an diesem interessanten Thema zu arbeiten und für die ständige Diskussionsbereitschaft.

Ich danke ebenfalls Herrn Prof. Dr. Wolfgang Nellen für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gebührt auch Herrn Dr. Roland Klassen, der durch seine Ideen wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Für die umfangreichen Vorarbeiten und für die anfängliche Einarbeitung ins Thema möchte ich Herrn Dr. Christian Bär ebenfalls danken.

Prof. Dr. Mark Helm und Kathrin Thüring danke ich für die fruchtbare Kooperation und die Durchführung der LC-MS/MS-Analysen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Mikrobiologie für die tolle Zeit und die angenehme Zusammenarbeit bedanken. Hierbei sei vor allem „meinen“ Studenten Folke, Alex, Andi, Aileen und Mathilde für ihre Mitarbeit gedankt.

Zu guter Letzt danke ich meiner Freundin Katja Schulze, die mich während meiner Promotionszeit durch alle Höhen und Tiefen mitbegleitet hat. Danke für all die Aufmunterungen und die schöne Zeit!

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe Dritter angefertigt und andere als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Dritte waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der Dissertation nicht beteiligt; insbesondere habe ich hierfür nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Kassel, den 21.03.2016