



Doctoral Thesis

Structural and functional characterization of the Rtt101p and Cullin-3 complexes in *S.cerevisiae*

Author(s):

Zaidi, Iram Waris

Publication Date:

2007

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005358747> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH No. 16919

**Structural and Functional characterization of the
Rtt101p and Cullin-3 complexes in *S.cerevisiae***

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by
Iram Waris Zaidi
M.Sc. Biochemistry, A.M.U, Aligarh - India
Born on June 16, 1975
Citizen of India

Accepted on the recommendation of

Prof. Matthias Peter, Examiner
Prof. Wilhelm Krek, Co-examiner

2007

Zusammenfassung

Akkurate und vollständige DNS-Replikation ist grundlegend, um die Vollständigkeit des Genoms zu gewährleisten. Die Beeinträchtigung dieses Prozesses kann zu Fehlern führen, die wiederum zu genetischer Instabilität und Erkrankungen wie Krebs führen können. Die DNS wird fortlaufend durch sowohl innere Effektoren, wie z.B. oxidative Zwischenprodukte, oder Replikationsfehlern, als auch durch äussere Effekte, wie z. B. chemische Mutagene oder Strahlung, beschädigt. Als Antwort auf die Belastung die aus Replikation und Beschädigung der Zelle resultiert muss diese mit unfehlbaren Methoden zur Fehlererkennung reagieren, um eine absolut identische Duplikation des Erbgutes zu gewährleisten.

Wir wählten den Model-Organismus *S. cerevisiae* um die Rolle des „Cullin-Komplexes-Rtt101p“ zum Zeitpunkt der Replikationsgabelbildung im Replikationsprozess zu studieren. Wir fanden heraus, dass Cullin Rtt101p der Hefezelle während der S-Phase benötigt wird, um das weitere Voranschreiten der Replikationsgabel bei auftretenden Problemen, wie DNA-Läsionen oder stark gebundener Protein-DNA-Komplexe, mit Hilfe eines Ubitiquin gebundenen Mechanismus zu gewährleisten.

Unsere genetischen und biochemischen Ergebnisse zeigen die Interaktion und Reaktion von Rtt101p mit E2 Cdc34p. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass Rtt101p in der Anwesenheit von E2 Cdc34p und dem Ring-Finger-Protein Hrt1p in der Lage ist, *in vitro* Ubitiquin-Ketten zu bilden. Dies führt zu der Annahme, dass es sich bei Rtt101p um eine „Cullin“ basierte E3 Ligase handelt.

Mittels eines genetischen Screens waren wir in der Lage zusätzliche funktionelle Bestandteile des Rtt101p Signalwegs zu identifizieren. Unsere genetischen und biochemischen Daten haben gezeigt, dass Rtt101p mit vielen verschiedenen Proteinen, wie z.B. Mms1p, Mms22p und Rtt107p, in Wechselwirkung treten kann. Interessant ist, dass Zellen die kein MMS1, MMS22 oder Rtt107 haben, sowie die Mutante *rtt101Δ*, dennoch in der Lage sind den Replikations-Checkpoint zu aktivieren und Doppelstrang-Brüche zu reparieren. Allerdings sind sie nicht vollständig in der Lage, sich von Chemikalien wie Methylmethansulfat (MMS), die einen Zusammenbruch der Replikationsgabel bewirken, zu erholen. Sie schaffen dies jedoch vollständig bei Chemikalien, welche die Replikationsgabel arretieren, wie z.B. Hydroxyurea (HU). Bioinformatische Analysen ergaben interessanter Weise, dass Mms1p signifikante

Homologien zum menschlichen Ddb1 aufweist, einem Adapter-Protein der cullin4-Ligasen-Familie. Letztlich ergaben genetische Untersuchungen Hinweise darauf, dass der Rtt101p-Komplex die Funktion der „Trans-Läsions-Polymerasen“ (TLS) kontrolliert.

Wir nehmen daher an, dass die Rtt101p Ligase auf eine Komponente der blockierten Replikationsgabel abzielt, welches die Bindung oder Aktivierung der TLS Polymerasen unterstützt, und somit die Weiterführung der Replikationsgabel über beschädigte DNS oder besondere chromosomale Regionen ermöglicht.

Summary

Accurate and complete DNA replication is fundamental to maintaining genome integrity. If the replication machinery is compromised, errors can occur which may lead to genetic instability and diseases like cancer. DNA is exposed to constant damage from endogenous sources like oxidative metabolites and DNA replication errors as well as exogenous sources like ionizing radiation and chemical mutagens. A cell has to develop fool proof methods to deal with such replicative and damage induced stress in order to ensure error free genome duplication.

We used *S. cerevisiae* as a model organism to address the role of the cullin complex Rtt101p in fork progression. We found that the yeast cullin Rtt101p is required during S-phase and promotes fork progression through obstacles such as DNA-lesions or tightly bound protein-DNA complexes via a mechanism involving ubiquitin-conjugation.

Our genetic and biochemical data shows that Rtt101p interacts and functions with the E2 Cdc34p. Furthermore, it has been shown that Rtt101p is capable of *in vitro* ubiquitin chain formation in the presence of E2 Cdc34p and the ring finger protein Hrt1p, suggesting that Rtt101p is a cullin based E3 ubiquitin ligase.

Using a genetic screen we have identified additional components functioning in the Rtt101p pathway. Our genetic and biochemical data shows that Rtt101p interacts with multiple proteins including Mms1p, Mms22p and Rtt107p. Interestingly, like *rtt101Δ*, cells deleted for MMS1, MMS22 or RTT107 are fully proficient to activate the replication checkpoint and to repair double-strand breaks (DSBs). They are, however, unable to recover from an exposure to drugs inducing fork collapse such as methylmethane sulfonate (MMS), but recover efficiently from drugs inducing fork arrest like hydroxyurea (HU). Interestingly, bioinformatic analysis revealed that Mms1p has significant homology to human Ddb1, the adaptor of the cullin4-ligase family suggesting that Mms1p might be the substrate specific adaptor for the Rtt101p ligase. Finally, genetic analysis suggests that the Rtt101p complex controls the function of the translesion (TLS) polymerases.

We propose that the Rtt101p ligase targets a fork component at the stalled replication forks, which helps recruit or activate the TLS polymerases thereby promoting progression of the replication fork through damaged DNA or special chromosomal regions.