

DISS ETH NO. 15874

**The cullin, Rtt101p, provides a novel link between  
ubiquitination and DNA replication restart**

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

Presented by

**Brian Luke**

Bsc. Honours, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada

Born May 28, 1976

Citizen of Canada and Belgium

Accepted on the recommendation of

Prof. Matthias Peter- examiner  
Prof. Wilhelm Krek- co-examiner  
Dr. Philippe Pasero- co-examiner

## Zusammenfassung

Zuverlässige Replikation der DNS ist von essentieller Bedeutung für den Zellzyklus und somit für das Überleben eines Organismus. Ist die Replikation der DNS beeinträchtigt, so können Fehler entstehen. Solche Mutationen führen zu genetischer Instabilität und dadurch zu Krankheiten wie Krebs. DNS ist anfällig für Schäden, die von chemischen, mutagenen Substanzen,  $\gamma$ -Strahlung, aber auch durch zelleigene oxidative Metaboliten oder fehlerhafte Replikation entstehen können. Eine Zelle muss deshalb in der Lage sein, solche Schäden reparieren zu können, um eine fehlerfreie Verdoppelung der DNS sicherzustellen.

Mittels der Sprosshefe *S.cerevisiae* als Modellorganismus, konnten wir feststellen, dass das Hefeprotein der 'Cullin'-Familie, Rtt101p, dazu dient, Probleme in der S-Phase zu lösen. Genaugenommen, konnten wir zeigen, dass Rtt101p benötigt wird, um in sich zusammengefallene Replikationsgabeln zu reparieren, damit die Replikation der DNS fortgesetzt werden kann. Werden solche defekte Replikationsgabeln nicht wiederhergestellt, führt dies oft zu doppelsträngigen Brüchen in der DNS. Hefen die keine Rtt101p-Aktivität aufweisen, können Doppelstrangbrüche reparieren; dies weist darauf hin, dass dieses Cullin keine direkte Rolle in generellen DNS-Reparaturmechanismen spielt. Weiter haben wir bewiesen, dass Replikationsgabeln, die zwar angehalten, aber von sog. 'checkpoints' oder Kontrollpunkten stabilisiert werden, auch ohne die Wirkung von Rtt101p das Replizieren von DNS wieder aufnehmen können.

Rtt101p ist höchstwahrscheinlich eine E3-Ligase für Ubiquitin bei in sich zusammengefallenen Replikationsgabeln. Diese Hypothese wird von genetischen und biochemischen Interaktionen mit den E2-Ubiquitin Enzymen Ubc4p und Ubc5p gestützt. Zudem kann Rtt101p die Bildung von Ubiquitin-Ketten *in vitro* beschleunigen (*Michel et al., 2003a*).

Rtt101p ist in chromatinhaltigen Fraktionen von Zellextrakten anzutreffen. Dies weist, zusammen mit den obenerwähnten Daten, darauf hin, dass eine E3-Ligase der Cullin-Familie das Fortsetzen der DNS-Replikation nachdem eine Replikationsgabel angehalten wurde, gewährleistet. Höchstwahrscheinlich existiert ein Protein, dass an Doppelstrangbrüchen ubiquitiniert wird und damit die Wiederaufnahme der DNS-Synthese zur Folge hat.

## Summary

Accurate DNA replication is essential for cell cycle progression and organismal survival. If the replication machinery is compromised, errors can occur which may lead to genetic instability and diseases like cancer. DNA is vulnerable to attack from exogenous agents including  $\gamma$ -irradiation and chemical mutagens, however the accumulation of endogenous oxidative metabolites, and naturally occurring DNA replication errors can also result in DNA damage. A cell must be equipped to deal with such replicative and damage induced stress in order to ensure error free genomic duplication.

Using the budding yeast, *S. cerevisiae*, as a model organism, we have found that the yeast cullin protein, Rtt101p, is required to efficiently cope with S phase problems. Specifically, we have shown that Rtt101p is involved in the re-start of collapsed replication forks, which frequently result in a double stranded break. Cells deleted for Rtt101p, are competent to repair a double stranded break indicating that repair machinery is fully intact and the cullin does directly function during repair. Furthermore, we have demonstrated that a stalled, but checkpoint stabilized replication fork is able to restart in the absence of Rtt101p. As well, Rtt101p, is localized to the chromatin fraction of cell extracts.

Rtt101p is most likely acting as an ubiquitin conjugating E3 ligase at collapsed forks, as it shows genetic and biochemical interactions with the E2 ubiquitin conjugating enzymes, Ubc4p and Ubc5p. It has been shown previously that Rtt101p can enhance the formation of ubiquitin chains *in vitro* (Michel *et al.* 2003).

Taken together these data provide the first evidence that a cullin based E3 ligase is required for replication fork re-start, and suggests that a target protein exists, most likely at a double stranded break site, that becomes ubiquitinated to allow the resumption of DNA synthesis.