
Zur Funktion des *MPH1*-Gens
von *Saccharomyces cerevisiae*
bei der rekombinativen Umgehung
von replikationsarretierenden DNA-Schäden

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von Anke Schürer
aus Zwickau

Göttingen 2003

D7

Referent: PD Dr. Wilfried Kramer

Korreferent: Prof. Dr. Gerhard Braus

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2004

»The process of genetic recombination
is in danger of becoming popular.«

Stephen C. West

EINLEITUNG.....	7
Mutagene <i>bypass</i> -Mechanismen	8
Nicht-mutagene <i>bypass</i> -Mechanismen	9
Rolle von RecQ-Helikasen.....	12
Verbindung zwischen Replikation und <i>checkpoint</i>	12
Das <i>MPH1</i> -Gen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
MATERIAL UND METHODEN.....	16
Medien.....	16
Stämme.....	17
Oligodesoxyribonukleotide.....	22
Plasmide.....	26
Klonierung, Deletion und Komplementation von <i>spmph1</i> ⁺	28
Mutationsratenbestimmung	29
<i>Drop dilution assay</i> zur Bestimmung der Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien	31
Mitotische Rekombination.....	32
Wachstumskurven.....	32
Proteinpräparation	33
Immunpräzipitation.....	33
Western Blot.....	33
α-Faktor-Arrest.....	34
Fluoreszenzmikroskopie.....	34
ERGEBNISSE.....	35
Genetische Interaktionsstudien	35
Basen- und Nukleotidexcisionsreparatur.....	37
Transkriptionsgekoppelte Reparatur	41
Doppelstrangbruchreparatur.....	42
<i>MPH1</i> zeigt keine Interaktion mit der NHEJ	46
<i>mph1</i> ist hypostatisch zu <i>rad51</i> , <i>rad52</i> und <i>rad55</i>	47
<i>MPH1</i> ist nicht defekt in der mitotischen Rekombination	49
<i>MPH1</i> und <i>MRE11</i>	51
RAD6-Epistasisgruppe	52
Der <i>mph1</i> -Mutatorphänotyp ist vom <i>error-prone</i> Zweig abhängig und wird durch <i>rad5</i> reduziert	54
Proteine mit einer Funktion an arretierten Replikationsgabeln	59
<i>Sgs1</i> und <i>Top3</i>	59
<i>sgs1</i> und <i>top3</i> reduzieren den <i>mph1</i> -Mutatorphänotyp	61
<i>sgs1</i> reduziert den <i>rad52</i> Mutatorphänotyp.....	63
BLM kann partiell den Phänotyp von <i>sgs1 mph1</i> komplementieren	64
Die <i>SGS1</i> -Überproduktion ist toxisch in <i>mph1</i> -Zellen.....	66
<i>SRS2</i>	69
<i>RAD27</i> & <i>MMS4</i>	72
Interaktionen mit dem DNA damage checkpoint	75
<i>mph1</i> zeigt eine synergistische Interaktion mit <i>rad9</i> und <i>mec1</i>	79
Ist <i>Mph1</i> ein Substrat der Kinasen des <i>DNA damage checkpoints</i> ?	83

Lokalisation von Mph1	86
Das putative Homologe von <i>MPH1</i> in <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	89
Phänotypische Charakterisierung von <i>spmph1</i>-Mutanten	90
Komplementation	91
DISKUSSION	94
Mph1 agiert in einem Weg zur fehlerfreien Umgehung von DNA-Läsionen	94
Mph1 ist nicht in die postreplikative Reparatur involviert.....	95
Die fehlerfreie Umgehung von DNA-Schäden durch Mph1 erfordert Proteine der homologen Rekombination	96
Modelle zur <i>chicken foot</i> -Bildung durch homologe Rekombination	97
Mph1 hat vermutlich eine Funktion bei der <i>D-loop</i> -Stabilisierung	99
Destabilisiert Sgs1 den <i>D-loop</i> ?	102
Die Funktion von Mph1 ist mit dem Informationstransfer vom Schwesterchromatid gekoppelt	104
Mph1 und der <i>DNA damage checkpoint</i>	105
Evolutionäre Konservierung von <i>MPH1</i>	106
ZUSAMMENFASSUNG.....	107
LITERATURVERZEICHNIS	109
ANHANG.....	125

EINLEITUNG

Replikation, Rekombination und Reparatur der DNA wurden lange Zeit als separate Mechanismen studiert und betrachtet. Replikation ist der Prozess der DNA-Verdopplung vor jeder Zellteilung, Rekombination der Austausch von genetischem Material zwischen verschiedenen DNA-Molekülen, und Reparatur die Wiederherstellung einer chemisch veränderten DNA in ihre Ausgangsform. Durch neuere Untersuchungen in *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und höheren Eukaryoten wird es immer offensichtlicher, dass diese drei Prozesse eng miteinander verknüpft sind. Da DNA ständig durch endogene und exogene Quellen geschädigt wird, kann das Genom ohne die Mitwirkung von Rekombination und Reparatur nur selten vollständig und fehlerfrei repliziert werden (Friedberg 2003). Dies hat auch zur Änderung der Lehrmeinung über die Funktion der Rekombination geführt. Früher wurde die Bedeutung hauptsächlich in der Erzeugung genetischer Variabilität gesehen, während sie heutzutage vielmehr als wichtiger Bestandteil des Replikationsapparates einer Zelle betrachtet wird (Cox 2001).

Chemisch modifizierte Basen können zum einen fehlerkodierend sein, was in der nächsten Replikationsrunde zu Mutationen führen kann. Sie können aber auch zum Arrest der replikativen DNA-Polymerasen führen. Die Replikation ist ein Prozess mit hoher Genauigkeit. Für diese Genauigkeit sorgen zum einen die replikativen DNA-Polymerasen selbst. Die hohe Genauigkeit dieser Enzyme wird vermutlich dadurch erreicht, dass die Geometrie des neu zu bildenden Basenpaares sehr genau abgefragt wird (Kunkel und Bebenek 2000). Chemische Modifikationen der Matrize führen daher in der Regel zu einem Arrest der Polymerase und damit der Replikation (Abbildung 1 B). Im schlimmsten Falle kann das in Organismen, die nur einen *origin of replication* pro Genom haben, zum Zelltod führen, aber auch in multizellulären Organismen mit dem Auftreten von Krankheiten, wie z. B. Krebs verbunden sein. Eine weitere DNA-Läsion, die den Kollaps einer Replikationsgabel herbeiführen kann, ist ein Einzelstrangbruch (Abbildung 1 C). Läuft die Replikation über diesen hinweg, entsteht ein Doppelstrangbruch (DSB) mit potentiell katastrophalen Folgen für die Zelle, wie z. B. den Verlust von Chromosomenfragmenten. In allen bisher studierten Organismen konnte daher eine Vielzahl von Reparaturmechanismen, wie u. a. die Basen- und Nukleotidexcisionsreparatur (BER, NER), identifiziert werden, die auftretende DNA-Läsionen beseitigen. Hierbei kann z. B. die geschädigte Base oder gar mehrere Nukleotide entfernt und die Lücke durch Neusynthese und Ligation wieder aufgefüllt werden, womit der Fehler korrigiert ist. Gelingt es jedoch nicht, die DNA-Läsion rechtzeitig vor der nächsten Replikation zu reparieren, kann es zu dem oben erwähnten Arrest der Replikationsgabel kommen. Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass neben den klassischen Reparaturmechanismen auch hierfür Mechanismen entdeckt wurden, die DNA-Läsionen umgehen, bzw. die Wiederaufnahme der Replikation gewährleisten können. Solche *bypass*-Mechanismen können strikt gesprochen nicht als Reparatur bezeichnet werden, da die DNA-Läsion zunächst in der

DNA verbleibt. Treffender hierfür ist der Begriff Schadenstoleranzmechanismus. Die DNA-Läsion kann später durch potentielle Reparaturenzyme entfernt werden. Die Umgehung der DNA-Läsion kann zum einen mutagen erfolgen. Dieser Prozess, der im nächsten Abschnitt eingehender vorgestellt wird, wird als Transläsionssynthese (TLS) bezeichnet und von spezialisierten Polymerasen ausgeführt (Friedberg *et al.* 2002). Daneben gibt es aber auch fehlerfreie Mechanismen, bei denen über rekombinative Prozesse die Information des Schwesterchromatids für die Umgehung der DNA-Läsion ausgenutzt wird (Cox *et al.* 2000). Wenn es zum Stop der Replikationsgabel gekommen ist, müssen die Zellen nicht nur direkt auf dieses Ereignis reagieren, sondern auch - weil die DNA-Replikation noch nicht beendet ist - Prozesse, wie z. B. die Mitose, zurückhalten, wobei die Proteine des *DNA damage checkpoint* eine wichtige Rolle spielen.

Mutagene bypass-Mechanismen

Mutationen können nicht nur durch fehlerkodierende Läsionen oder Fehler der replikativen Polymerasen entstehen, sondern auch durch den Einsatz der Transläsionssynthese als Toleranzmechanismus. Dieser Prozess involviert spezialisierte Polymerasen mit geringerer Genauigkeit, die - im Gegensatz zu den replikativen Polymerasen (s. o.) - gegenüber einer DNA-Läsion Nukleotide einbauen können. Da viele Läsionen aber nichtkodierend sind, kann dies zu Mutationen führen. In *E. coli* und in Hefe wurden verschiedene Transläsionspolymerasen gefunden, aber die Familie dieser Polymerasen ist in höheren Eukaryoten weitaus größer (Goodman und Tiffin 2000). In Hefe wurden Rad30 (Pol η) und Rev1 als Transläsionspolymerasen identifiziert. Rev1 baut gegenüber von apurinischen/apyrimidinischen Stellen (*AP sites*) bevorzugt Cytosin ein, vermutlich da die meisten *AP sites* durch spontane Depurinisierung von Guanin zustande kommen, kann aber auch Pyrimidin 6-4-Photoaddukte überlesen (Nelson *et al.* 1996b, Nelson *et al.* 2000). Pol η , deren Ausfall im Menschen mit der vererbaren Krankheit *Xeroderma pigmentosum variant* (XPV) einhergeht, kann relativ fehlerfrei über Thymindimere hinweglesen, indem zwei Adenine eingebaut werden (Johnson *et al.* 1999, Washington *et al.* 2000). Sie ist aber ebenfalls an der mutagenen Prozessierung von Pyrimidin 6-4-Photoaddukten beteiligt. Ein anderes Enzym, das in die mutagene Transläsionssynthese involviert ist, ist Pol ζ , die von *REV3* und *REV7* kodiert wird (Nelson *et al.* 1996a). Pol ζ hat die Eigenschaft, fehlgepaarte 3'-Primer mit hoher Effizienz zu verlängern, was die meisten Polymerasen - auch Transläsionspolymerasen - nicht können (Johnson *et al.* 2000). Auf ungeschädigten Matrizen zeigt Pol ζ eine relativ hohe Genauigkeit, über DNA-Läsionen hingegen kann sie ineffizient hinweglesen. Dies impliziert, dass Pol ζ , zusammen mit einer weiteren Polymerase agiert, die die eigentliche DNA-Läsion mutagen umgehen kann, während sie selbst das fehlgepaarte Primerende verlängert (Haracska *et al.* 2001, Haracska *et al.* 2003).

DNA-Läsionen können auch, wie oben bereits angedeutet, durch rekombinative Prozesse fehlerfrei umgangen werden. Da die TLS *per se* mutagen ist, verwundert es nicht, dass die Entscheidung, ob fehlerfreie oder fehlerbehaftete Mechanismen

verwendet werden, reguliert wird. Allerdings ist nach wie vor unklar, welches die Entscheidungsparameter sind. Untersuchungen in Hefe haben gezeigt, dass die Gene der *RAD6*-Epistasisgruppe hierbei eine wichtige Rolle spielen. Rad6, ein ubiquitin-konjugierendes Enzym (Jentsch *et al.* 1987), welches durch die Interaktion mit Rad18 an einzelsträngige DNA-Bereiche dirigiert wird, katalysiert die Monoubiquitinierung von *proliferation cell nuclear antigen* (PCNA, Hoege *et al.* 2002), was die Voraussetzung für Transläsionssynthese ist (Stelter und Ulrich 2003). Rad5, welches ebenfalls mit Rad18 interagiert, leitet im Komplex mit dem ubiquitinkonjugierenden Heterodimer aus Ubc13/Mms2 (Hofmann und Pickart 1999) die Polyubiquitinierung von PCNA ein, wobei die Verknüpfung an Lysin 63 erfolgt, und nicht - wie beim Signal für Proteolyse - an Lysin 48. Hierdurch erfolgt vermutlich die Umschaltung auf fehlerfreie Mechanismen (Hoege *et al.* 2002).

Bei der Regulation zwischen mutagener und fehlerfreier Umgehung spielt auch *SRS2*, das für eine DNA-Helikase kodiert und ebenfalls in die *RAD6*-Epistasisgruppe eingeordnet wird, eine Rolle (Schiestl *et al.* 1990, Rong und Klein 1993). Indem es die Bildung des Rad51-Filamentes, einem Intermediat der Rekombination, verhindert bzw. wieder auflösen kann (Krejci *et al.* 2003, Veaute *et al.* 2003), verhindert es wahrscheinlich homologe Rekombination zugunsten replikativer *bypass*-Mechanismen.

Nicht-mutagene bypass-Mechanismen

Mittlerweile wird in der Literatur weitgehend akzeptiert, dass rekombinative Prozesse an der Reinitiation von arretierten und kollabierten Replikationsgabeln beteiligt sind (u. a. Oakley und Hickson 2002, Cox 2002). Die Information, die nötig ist, um eine DNA-Läsion fehlerfrei zu umgehen, wird durch Interaktion mit dem Schwesterchromatid erhalten.

Wenn die DNA-Läsion die *lagging strand*-Synthese blockiert (Abbildung 1 A), kann das entsprechende Okazaki-Fragment unbeendet zurückgelassen und die DNA-Synthese mit dem nächsten Okazaki-Fragment weitergeführt werden, da für jedes Okazaki-Fragment sowieso ein neuer Primer synthetisiert werden muss. Hierbei bleibt aber eine Einzelstranglücke (*single strand gap*) zurück, die - wie in Abbildung 1 b schematisch gezeigt - später rekombinativ aufgefüllt werden kann. Das freie 3'-Ende des unbeendeten Okazaki-Fragmentes kann das neusynthetisierte Schwesterchromatid unter Ausbildung eines *displacement loops* (*D-loop*, Abbildung 1 e, d) invadieren. Der Strang kann dann mit dem *leading strand* als Matrize verlängert werden (Abbildung 1 e). Wird der verlängerte Strang zurückgeklappt (Abbildung 1 f), ist die Läsion fehlerfrei umgangen. Eventuell noch verbleibende Lücken können durch DNA-Polymerasen - jetzt wieder mit dem *lagging strand* als *template* - aufgefüllt und der *nick* durch Ligation geschlossen werden. Wird das 3'-Ende des terminierten Okazaki-Fragmentes über den Anfang des vorherigen Okazaki-Fragmentes hinaus verlängert (Abbildung 1 f), entsteht nach dem Zurückklappen ein 3'-*flap*. Für die Entfernung dieses 3'-*flaps* ist möglicherweise Rad27 und Sgs1 oder alternativ Mms4/Mus81 (Fabre *et al.* 2002) verantwortlich.

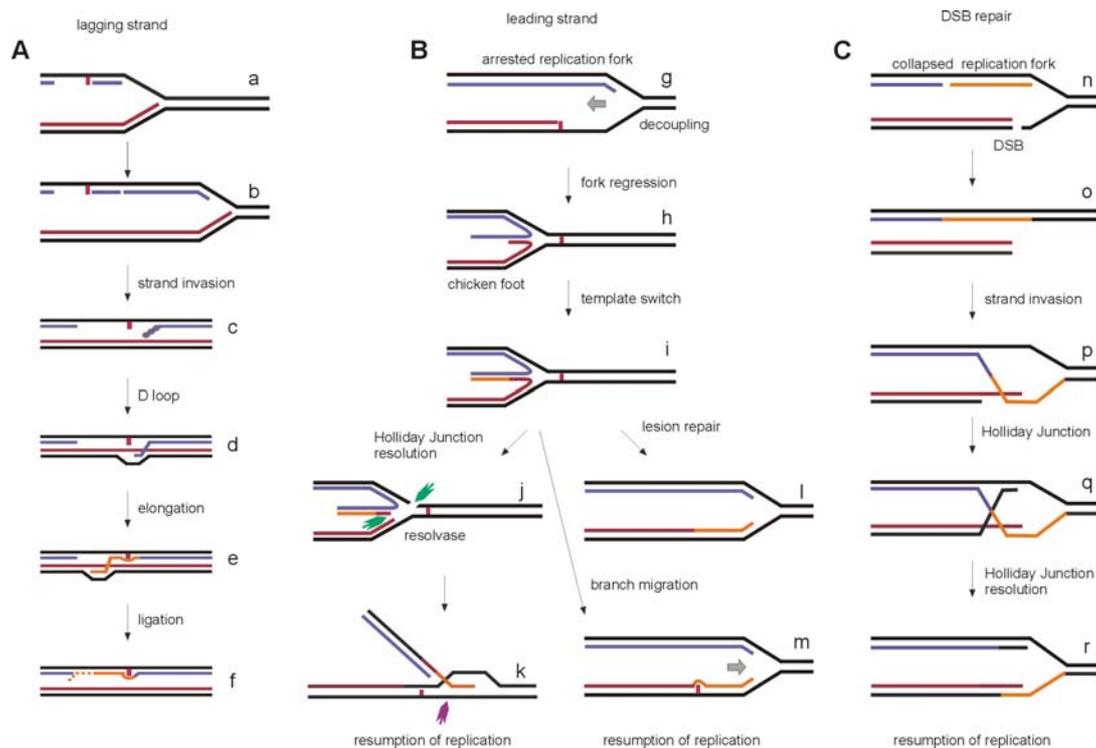


Abbildung 1: Einige Modelle für die fehlerfreie Umgehung von DNA-Schäden bei der Replikation und für die Reinitiation von kollabierten Replikationsgabeln. Die hier vorgestellten Modelle repräsentieren nur einen Teil der denkbaren Variationsmöglichkeiten, demonstrieren aber die grundlegenden Konzepte. **A:** DNA-Läsionen am *lagging strand* nach dem *gap-repair*-Modell. **B:** DNA-Läsionen am *leading strand*, die zum Arrest der Replikationsgabel führen und rekombinativ über Schneiden der *Holliday Junction* durch Resolvasen oder nicht-rekombinativ durch *branch migration* aufgelöst werden können. **C:** Strangbrüche, die zum Kollaps der Replikationsgabel führen, werden mit homologer Rekombination aufgelöst, hier als Beispiel das Doppelstrangbruchreparaturmodell. Die Details sind im Text erklärt. Die parentalen Stränge sind schwarz, der neusynthetisierte *lagging strand* in blau, der neusynthetisierte *leading strand* in weinrot dargestellt. DNA-Neusynthese, um die DNA-Läsion zu umgehen, ist in orange dargestellt. Das rote Kästchen bei A und B stellt eine DNA-Läsion dar. Die Pfeile (grün, violett) stellen Enzyme mit endonukleolytischer Aktivität dar.

Alternativ zu dem in Abbildung 1 A gezeigten Modell ist denkbar, dass der *D-loop* nicht mit der Verlängerung des 3'-Endes verschoben wird. Dann kann der Einzelstrang des *D-loop* mit der Matrize des *lagging strand* hybridisieren und sich eine Struktur mit einer doppelten *Holliday Junction* (HJ) ausbilden, die je nach Auflösung der HJ, zu einem *sister chromatid exchange* (SCE) führen kann.

Bei einer arretierenden Läsion auf dem *leading strand* ist die Situation besonders kritisch, da die Replikation nicht durch die Synthese eines neuen Primers stromabwärts des Schadens fortgesetzt werden kann, da die Synthese des *leading strand* Primers strikt reguliert ist und nur genau einmal pro Zellzyklus erfolgt. Es wurde aber gezeigt, dass nach Arrest der *leading strand* Polymerase die Synthese des *lagging strand* noch für mindestens 1-2 kb fortgesetzt wird (Abbildung 1 g; Cordeiro-Stone *et al.* 1999). Hierdurch wird eine Verlängerung des abgebrochenen *leading strand* mit dem *lagging*

strand als Matrize möglich. Mechanistische Modelle, deren Grundlage bereits 1976 durch Higgins *et al.* und, unabhängig davon, von Fujiwara und Tatsumi vorgeschlagen wurden, postulieren die Bildung einer X-Struktur, die wegen ihres Aussehens auch als *chicken foot* bezeichnet wird (Lee *et al.* 1970, Postow *et al.* 2001). Diese Struktur - im Prinzip eine *Holliday Junction* - wie in Abbildung 1 h und i gezeigt, kann durch Zurückschieben (*branch migration*) der arretierten Replikationsgabel (*fork regression*) entstehen, wobei sowohl die beiden neusynthetisierten, als auch die beiden Parentalstränge paaren. Die Bildung des *chicken foot* kann durch Torsionsstress spontan erfolgen. Jedoch bedarf die *fork regression in vivo* wahrscheinlich enzymatischer Aktivitäten. In *E. coli* konnte dies für RecA und/oder RecG postuliert werden (Seigneur *et al.* 2000, McGlynn und Lloyd 2000, McGlynn und Lloyd 2002a). Nach einem Matrizenwechsel der DNA-Polymerase (*template switch*), kann jetzt das 3'-Ende des *leading strand* elongiert werden (Abbildung 1 i). So entstandene *Holliday Junctions* können auf zweierlei Arten aufgelöst werden: Zum einen kann durch Resolvasen geschnitten werden, wobei ein Doppelstrangende entsteht (Abbildung 1 j). Zum anderen kann die *Holliday Junction* durch reverse *branch migration* in Replikationsrichtung verschoben werden, wodurch auf dem *leading strand* hinter der Läsion ein elongiertes 3'-Ende zur Verfügung gestellt wird und die Replikation fortgeführt werden kann (Abbildung 1 m). Die DNA-Läsion ist nach wie vor im *leading strand template* und kann später durch Reparaturmechanismen beseitigt werden.

Bei der oben erwähnten Auflösung der *Holliday Junction* über Resolvasen muss die Replikationsgabel durch Einsatz der homologen Rekombination wieder hergestellt werden. Nach Schließen der Strangbrücke und Prozessieren des Doppelstrangendes durch Nukleasen zur Erzeugung eines 3'-Überhanges, kann dieses in das vollständige Chromatid eingefädelt werden, wodurch die Replikationsgabel (ähnlich wie in Abbildung 1 C dargestellt) wieder hergestellt werden kann (Abbildung 1 j, m). Da für die Stranginvasion das elongierte 3'-Ende des *leading strand* benutzt wird, liegt die Läsion auf jedem Fall hinter diesem Ende. Allerdings muss erwähnt werden, dass in Eukaryoten zwar für Enzyme, wie dem Mus81/Mms4-Komplex (siehe S. 73), biochemisch gezeigt werden konnte, dass *X-Junctions* bzw. Replikationsgabel-ähnliche Strukturen mit schlechter Effizienz geschnitten werden, jedoch wurde bisher, im Gegensatz zu *E. coli* (RusA und RuvC), keine nukleäre *Holliday Junction*-Resolvase in Hefe und höheren Eukaryoten identifiziert.

Nach dem *chicken foot* Modell kann eine DNA-Läsion, die nicht rechtzeitig vor dem Eintreffen der Replikationsgabel repariert werden konnte, weil die beiden *template* Stränge bereits separiert wurden, auch noch durch die „normalen“ Reparaturmechanismen (BER, NER) beseitigt werden, da die Information des gegenüberliegenden Stranges wieder zur Verfügung steht (Abbildung 1 l). Nach *branch migration* kann die Replikation normal fortgesetzt werden.

Ein weiterer Schaden, der nicht zum Arrest sondern zum Kollaps der Replikationsgabel führt, ist ein Einzelstrangbruch in einem der parentalen Stränge. Bei der in Abbildung 1 n gezeigten Situation eines Einzelstrangbruches in der Matrize des *leading strand*, entsteht wahrscheinlich durch Replikations-*run-off* ein Doppelstrangbruchende (Strumberg *et al.* 2000). Ähnlich, wie nach dem Schnitt des *chicken foot* durch Resolvasen, kann man sich hier eine Reinitiation der Replikationsgabel durch homologe Rekombination vorstellen (Abbildung 1 o, p, q, r).

Die meisten Evidenzen für die hier vorgestellten Mechanismen stammen von genetischen Daten in *E. coli* (zusammengefasst u. a. in McGlynn und Lloyd 2002b), aber ähnliche Mechanismen werden in Eukaryoten angenommen. Eine Bewertung über die Relevanz der Mechanismen ist schwierig, aber es wurde abgeschätzt, dass es in einer menschlichen Zelle pro Zellzyklus zu ca. 10 Arresten der Replikationsgabel kommt (Haber 1999).

Rolle von RecQ-Helikasen

Für die Wiederaufnahme der Replikation spielen auch die Helikasen der RecQ-Familie eine wichtige Rolle. Die RecQ Helikase wurde in *E. coli* als Komponente des rekombinativen RecF Weges entdeckt (Nakayama *et al.* 1984). Es konnten bisher zehn Mitglieder der RecQ-Helikasefamilie in verschiedenen Eukaryoten identifiziert werden, wozu Sgs1 aus *Saccharomyces cerevisiae* und rqh+ *Schizosaccharomyces pombe* zählen, aber auch im Menschen BLM, WRN und RECQL4, bei deren Ausfall Erbkrankheiten auftreten, die mit dem verstärkten Auftreten von Krebs und erhöhter genomischer Instabilität verbunden sind (siehe S. 59). Es wird postuliert, dass sie eine Rolle bei verschiedenen rekombinativen Prozessen spielen, wobei die genaue molekulare Rolle nach wie vor nicht bekannt ist. *E. coli* recQ-Mutanten zeigen eine erhöhte Rekombinationsrate und können nach UV-Bestrahlung die DNA-Synthese nicht mehr aufnehmen (Hanada *et al.* 1997). RecQ kann synthetische *Holliday Junctions* entwinden und wurde deshalb als Anti-Rekombinase bezeichnet (Harmon und Kowalczykowski 1998). Es kann aber auch Einzelstrang-Substrate für RecA (dem Homologen von Rad51) generieren und mag deshalb auch während der Initiation der Rekombination agieren. Auch für das BLM-Protein konnte ähnliches gezeigt werden: Es kann *Holliday Junctions* verschieben (Karow *et al.* 2000) und, so wurde postuliert, fördert möglicherweise die Bildung des *chicken foot*. Desweiteren konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine physikalische Interaktion von BLM mit RAD51, sowie eine Kollokalisierung in nukleären Foci gezeigt werden (Wu *et al.* 2001a). In Verbindung mit der evolutionären Konserviertheit der Interaktion von RecQ mit Topoisomerase III konnte gezeigt werden, dass dieser Komplex Plasmidkatenane auflösen kann. Daher wurde eine Rolle bei den letzten Schritten der Replikation postuliert (Harmon und Kowalczykowski 1999).

Verbindung zwischen Replikation und checkpoint

Wenn ein DNA-Schaden in Eukaryoten auftritt, wird der Zellzyklus angehalten oder verlangsamt, um Zeit für die Prozessierung des Schadens bereitzustellen. Dies wird über den sogenannten *DNA damage checkpoint* (DDC) vermittelt. In *Saccharomyces cerevisiae* werden diesem *checkpoint* u. a. die Gene *MEC1*, *DDC2*, *RAD17*, *DDC1*, *MEC3*, *RAD24*, *TEL1*, *RAD53* und *CHK1* zugewiesen. Hierbei werden für unterschiedliche Zellzyklusphasen verschiedene *checkpoint* unterschieden. Der G1- und der G2/M-*checkpoint* arretieren den Zellzyklus, um entweder den Beginn der S-Phase oder den

Eintritt in die Mitose zu verhindern. Während also die Aktivierung dieser beiden *checkpoint* aufgrund des Zellzyklusarrestes zu einem klar definierbaren Phänotyp führt, ist dies beim *S-Phase-checkpoint* nicht der Fall. Fehlfunktionen des *S-Phase-checkpoint* gehen mit genomischer Instabilität einher. Das heißt, dass Mutanten von Genen, die in diesen *checkpoint* eingeordnet werden, eine verstärkte Rate von genomischen Rearrangements zeigen (Myung *et al.* 2001a). Dies führte zu der Hypothese, dass der *S-Phase-checkpoint* eine Verbindung zwischen Rekombination und Replikation herstellt, indem rekombinative Prozesse bei der Replikation, die zu genomischer Instabilität führen können, durch die Funktionen dieses *checkpoint* unterdrückt werden (Kolodner *et al.* 2002). Der *S-Phase-checkpoint* wird nach neueren Literaturdaten nochmals in den *intra-S-Phase-checkpoint* und den *replication checkpoint* unterteilt. Dem ersteren wird u. a. die Kontrolle der Replikationsinitiation an den späten *origin of replication* zugeschrieben (Santocanale *et al.* 1999). Es gibt mindestens zwei redundante Zweige dieses Weges: Der eine bedingt *RAD17/24* und der andere benötigt *SGS1*, eine Helikase der RecQ-Familie (Frei und Gasser 2001). Prozesse, die aktiv die Replikation verlangsamen, werden als *replication checkpoint* bezeichnet (Lowndes und Murguia 2000). Der *S-Phase-checkpoint*, so scheint es, wird aktiviert, wenn an der Replikationsgabel eine DNA-Läsion wahrgenommen wird (Marchetti *et al.* 2000, Tercero und Diffley 2001). So wurde für *mec1*-Zellen beschrieben, dass selbst in Abwesenheit von DNA schädigenden Agenzien es zum Arrest von Replikationsgabeln kommt, bzw. sich vermehrt Doppelstrangbrüche in G2 anhäufen (Cha und Kleckner 2002). Für Rad53 wurde postuliert, dass es bei der Stabilisierung von Replikationsgabeln von Bedeutung ist, da es in *rad53*-Mutanten verstärkt zur Anhäufung von ungewöhnlichen DNA-Strukturen kommt, wenn die Zellen mit Hydroxyharnstoff behandelt werden (HU; führt durch Inhibition der Ribonukleotidreduktase zu einer Depletion des dNTP-Pools und damit zum Replikationsstop; Lopes *et al.* 2001). Zu diesen ungewöhnlichen Strukturen gehören interessanterweise auch Einzelstranglücken (*single strand gaps*) und *chicken foot*-Strukturen (Sogo *et al.* 2002).

Genomische Instabilität, wie sie durch den Arrest oder Kollaps von Replikationsgabeln in Folge von DNA-Läsionen (Basenschäden, sperrige DNA-Addukte, Strangbrüche) und deren Sekundärschäden (Doppelstrangbrüche) hervorgerufen werden kann, ist ein charakteristisches Merkmal bei einer Vielzahl von humanen Erbkrankheiten und Krebs (Lengauer *et al.* 1998). Die Phänotypen von Mutanten aus *Saccharomyces cerevisiae*, die in Prozesse bei der Wiederaufnahme der Replikation involviert sind, ähneln denen von Zellen aus Patienten mit solchen Krankheiten. Man mag also spekulieren, dass dies auf den gleichen mechanistischen Grundlagen beruht. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass *Saccharomyces cerevisiae* mindestens sieben Gene mit Homologien zu menschlichen Genen besitzt, deren Ausfall kausal mit Erbkrankheiten mit einer Prädisposition für Krebs und genomischer Instabilität in Verbindung gebracht werden (vgl. **Tabelle 21**, S. 76). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass Proteine wie BRCA1 und BRCA2, die beim vererbaren Brustkrebs mutiert sind, mit Proteinen wie RAD51, MRE11/RAD50/NBS1 oder BLM interagieren (Wang *et al.* 2000) oder durch Proteine (ATM, ATR) phosphoryliert werden (Cortez *et*

al. 1999, Tibbetts et al. 2000), für die eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität gezeigt ist.

Das MPH1-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae*

Im Jahre 1996 wurde die Sequenzierung des *Saccharomyces cerevisiae*-Genom abgeschlossen (Goffeau et al. 1996). Das Genom enthält 6882 offene Leserahmen (ORF). Von etwa 30 % der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen war die Funktion bereits bekannt. Weitere 30% wiesen Homologien zu Sequenzen bereits bekannter Proteine auf, was Rückschlüsse auf die Funktion zuließ. Eine dritte Kategorie der deduzierten Aminosäuresequenzen zeigte keine Homologien zu bekannten Proteinen, womit ihre Funktion völlig unbekannt war. Im Rahmen eines BMBF-Verbundprojektes wurden von 324 bisher nicht näher charakterisierten potentiellen offenen Leserahmen systematisch Deletionen erzeugt und anschließend eine phänotypische Charakterisierung der Deletionsmutanten vorgenommen. Die Arbeitsgruppe um Wilfried Kramer untersuchte die Phänotypen der Deletionsmutanten bzgl. spontan erhöhter Mutationsfrequenzen und UV-Sensitivität. Die Deletionsmutante des putativen Gens von *YIR002c* wies eine erhöhte *CAN1*-Vorwärtsmutations- (19-fach) und *trp1-289*-Reversionsrate (16-fach; CAG→TAG, Codon 130 des *TRP1*-Gens) auf. Bei einer Vielzahl weiterer Untersuchungen zu Störungen des Wachstums auf verschiedenen Kohlenstoffquellen, der Zellmorphologie und des Cytoskeletts, der Mitochondrienfunktion, der Paarung und der Stressantwort wurden keine auffälligen Phänotypen gefunden (Entian et al. 1999). Der offene Leserahmen *YIR002* wurde in *MPH1* (*mutator phenotype 1*) umbenannt (Entian et al. 1999). *MPH1* befindet sich auf dem rechten Arm des Chromosoms IX (Position: 357.415-360.393).

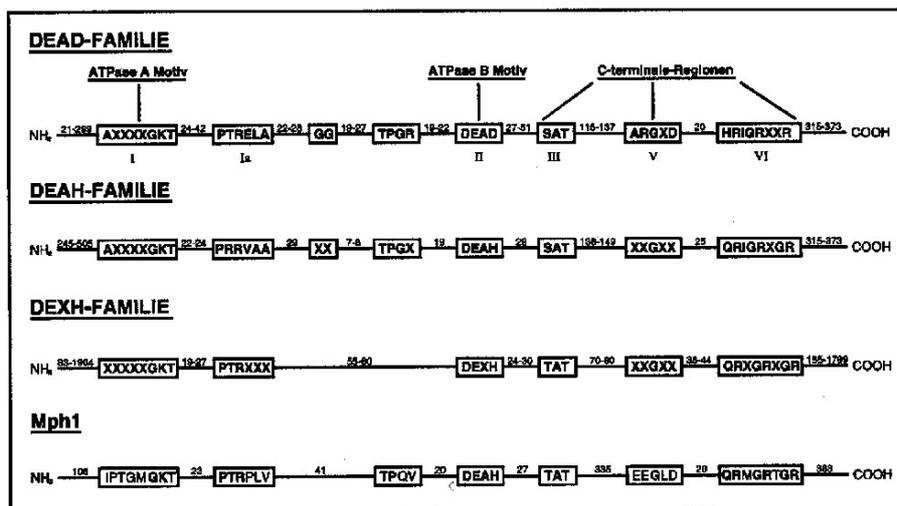


Abbildung 2: Schematischer Vergleich konservierter Aminosäuren der DEAD/DExH-Familie mit Mph1 als potentielles Mitglied dieser Familie. Konservierte Aminosäuren sind in den Kästchen fettgedruckt, die Zahlen geben den Abstand der Aminosäuren wieder (aus Scheller 1999).

Der offene Leserahmen von *MPH1* kodiert für ein Protein von 993 Aminosäuren mit einer berechneten relativen molaren Masse von 114.861. Die deduzierte Aminosäuresequenz von Mph1 weist, wie in Abbildung 2 gezeigt, die sieben charakteristischen Motive der DEAD/DExH-Box-Proteinfamilie auf (Scheller *et al.* 2000). Zur DEAD/DexH-Familie zählen eine Reihe von DNA- und RNA-Helikasen, die u. a. an Transkription, RNA-*Splicing*, mRNA-Export, Translation, DNA-Reparatur oder DNA-Rekombination beteiligt sind (Deschavenne und Harosh 1993, Paques und Haber 1999, Cruz *et al.* 1999). Man kann daher postulieren, dass *MPH1* für eine ATP-abhängige Helikase kodiert, obwohl es eine Reihe von Mitgliedern dieser Proteinfamilie gibt, für die bisher keine Helikaseaktivität nachgewiesen werden konnte. Für Mph1 konnten keine Hinweise gewonnen werden, dass es an Prozessen, wie dem *RNA-splicing* oder der Translation beteiligt ist (Scheller *et al.* 2000).

Neben der erhöhten Mutationsrate konnten für *mph1*-Mutanten auch eine Sensitivität gegenüber verschiedenen DNA-schädigenden Agenzien (MMS, EMS, 4-NQO, Camptothecin, Scheller *et al.* 2000) gezeigt werden. Diese Daten führten zu der Hypothese, dass Mph1 bei der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität eine Rolle spielt. Durch eine MPH1-GFP-Fusion konnte gezeigt werden, dass das Protein im Kern lokalisiert (Scheller *et al.* 2000). Epistasisanalysen erlaubten die weitere Eingrenzung der Funktion von *MPH1*. So konnte eine Beteiligung an der Basenexcisionsreparatur, der Nukleotidexcisionsreparatur und der *mismatch*-Reparatur mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden (Scheller *et al.* 2000). Auch konnte gezeigt werden, dass der Mutatorphänotyp von *mph1* *REV3*-abhängig ist. *REV3* kodiert für die katalytische Untereinheit der Transläsionspolymerase ζ (Nelson *et al.* 1996a). Daraus wurde geschlossen, dass die erhöhte Mutationsrate in *mph1* aus der mutagenen Umgehung von spontan auftretenden DNA-Läsion herrührt, für deren Prozessierung normalerweise Mph1 benötigt wird. Da das Mutationsspektrum von *mph1* keine Auffälligkeiten gegenüber dem Wildtyp zeigt, konnten hieraus keine Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion von Mph1 gezogen werden (Scheller *et al.* 2000). Putative Homologe von Mph1 finden sich in Archaea und in anderen Eukaryoten (*Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*, Maus und Mensch). Daher scheint Mph1 und der Weg, in dem es involviert ist, nicht nur auf *Saccharomyces cerevisiae* beschränkt zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von *MPH1* durch Epistasisanalysen von *mph1* mit Mutanten aus weiteren DNA-Reparatur-Wegen, der Doppelstrangbruchreparatur, der postreplikativen Reparatur, dem *DNA damage checkpoint* und mit Mutanten, für deren Genprodukte eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität postuliert wird, weiter eingegrenzt.

MATERIAL UND METHODEN

Medien

Alle Medien wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Für Festmedien wurde zusätzlich zu dem angegeben Rezept 1.6 % Agar zugegeben.

YPD: 2 % D-Glukose, 2 % Bacto-Pepton, 1 % *Yeast Extract*

YPD⁺: YPD mit je 75 mg/l Adenin, Histidin, Leucin, Lysin, Tryptophan, Tyrosin, Methionin und Uracil

SC: 2 % D-Glukose, 0.17 % *Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulfate*, 0.51 % Ammoniumsulfat, 680 mg/l *SC complete* Aminosäuremischung, (die Glukose wurde, gegebenenfalls mit dem Agar, getrennt von den übrigen Zutaten autoklaviert)

SC complete Aminosäuremischung

Adenin	40 mg/l	L-Phenylalanin	50 mg/l
L-Arginin	30 mg/l	L-Serin	100 mg/l
L-Histidin	20 mg/l	L-Threonin	150 mg/l
L-Isoleucin	20 mg/l	L-Tryptophan	30 mg/l
L-Leucin	30 mg/l	L-Tyrosin	30 mg/l
L-Lysin-HCl	30 mg/l	Uracil	20 mg/l
L-Methionin	20 mg/l	L-Valin	100 mg/l

Drop out: wie SC, jedoch (680 – x) mg/l *SC complete* Aminosäuremischung. X ist dabei die namensgebende Komponente, auf deren Prototrophie selektiert wird (z. B. SC-ura, wenn Uracil in der *SC complete* Aminosäuremischung fehlt).

5-FOA: wie SC, zusätzlich 50 mg/l Uracil und nach dem Autoklavieren als Feststoff 1 g/l *5-Fluoroorotic acid* [5-FOA, Toronto Research] zugesetzt

Sporulationsmedium: 0.05 % D-Glukose, 2 % Kaliumacetat, 0.23 % *Yeast Extract*, 1.6 % Agar

CAN: SC-arg, zusätzlich 40 mg/l Canavanin [Sigma] aus einer 2 % sterilfiltrierten Stammlösung nach dem Autoklavieren zugesetzt, wenn das Medium kälter als ca. 60 °C war

G418: YPD oder YE mit 200 µg/ml G418 [Calbiochem] als Pulver nach dem Autoklavieren zugesetzt, wenn das Medium kälter als ca. 60 °C war

YE: 3 % D-Glukose, 0.5 % *Yeast extract*, 0.2 % *Casaminoacids*

EMM: 2 % Glukose, 0.3 % Kaliumhydrogenphthalat, 0.22 % Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄), 0.5 % Ammoniumchlorid

Zusätze wie benötigt: 75 mg/l Adenin, 40 mg/l Leucin, 40 mg/l Uracil

Nach dem Autoklavieren wurde aus Stammlösungen zugesetzt: 2 % 50 × Salz-Stammlösung (20 ml pro 1 l), 0.1 % 1000 × Vitamin-Stammlösung (1 ml pro 1 l), 0.01 % 10.000 × Mineralien-Stammlösung (100 µl pro 1 l)

50 x Salz-Stammlösung		1000 x Vitamin-Stammlösung		10.000 x Mineralien-Stammlösung	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5.25 %	Pantothensäure	0.1 %	Borsäure	0.5 %
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.074 %	Nicotinsäure	1 %	MnSO ₄	0.4 %
KCl	5 %	Inositol	1 %	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0.4 %
Na ₂ SO ₄	0.2 %	Biotin	0.001 %	FeCl ₂ x 6 H ₂ O	0.2 %
autoklavieren		sterilfiltrieren		Molybdänsäure	0.04 %
				Kaliumiodid	0.1 %
				CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.04 %
				Zitronensäure	1 %
				sterilfiltrieren	

Stämme

E. coli: DH5 α (*F*⁻, *endA1*, *hsdR17*, (*r_k-m_k-*), *supE44*, *thi1*, *recA1*, *gyrA* (*NaI*'), *relA1*, Δ (*lacZYA-argF*)*U169*, ϕ 80*lacZ* Δ *M15*; Hanahan 1983)

Schizosaccharomyces pombe:

ATCC 969993: *h*⁻, *ade6 M210*, *leu1-32*, *ura4 D18*

ATCC 969994: *h*⁺, *ade6 M210*, *leu1-32*, *ura4 D18*

ATCC 969993 *spmph1*⁻: *h*⁻, *ade6 M210*, *leu1-32*, *ura4 D18*, *mph1::kanMX4*

ATCC 969994 *spmph1*⁺: *h*⁺, *ade6 M210*, *leu1-32*, *ura4 D18*, *mph1::kanMX4*

Saccharomyces cerevisiae: siehe Tabelle 1,

Stammhintergrund: CEN.PK2 (*MATa*/*MAT α* , *leu2-3,112*, *ura3-52*, *trp1-289*, *his 3 Δ 1*, *MAL2-8cc*, *SUC2* (Quelle: Peter Kötter; Entian *et al.* 1999). Wenn nicht anders angegeben, wurde CEN.PK2-1c (*MATa*) verwendet. Der *MAT α* -Stamm trägt die Bezeichnung CEN.PK2-1d.

Für die Untersuchung der Phosphorylierung von Mph1 wurde in CEN.PK2-1c unter Verwendung des Plasmids pYM3 (Knop *et al.* 1999) und der Primer 5' tag *mph1 stop* und 3' tag *mph1 stop* ein immunochemisch nachweisbares *MPH1*-Konstrukt hergestellt (*MPH1-6HA-kITRP*).

Stämme zur Bestimmung der mitotischen Rekombination siehe dort.

Tabelle 1: Alle konstruierten *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1c (*MATa*) Derivate.

Stamm	Konstrukt/Disruption	Disruptionskonstrukt	Referenz / Quelle
<i>apn1</i>	<i>apn1::HIS3</i>	pSCP19A [<i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i>]	Ramotar <i>et al.</i> 1991
<i>apn1 rev3</i>	<i>rev3::hisG</i> in <i>apn1</i>	pYPG [<i>KpnI</i>]	Morrison <i>et al.</i> 1989
<i>apn2</i>	<i>apn2::hisG</i>	pBLUE-ETH1 [<i>SacI</i> , <i>XhoI</i>]	Bennett 1999
<i>lig4</i>	<i>lig4::HIS3</i>	pGEMTS <i>clig4</i> [<i>PaeI</i> , <i>SalI</i>]	Teo und Jackson 1997
<i>mag1</i>	<i>mag1::hisG</i>	+ FOA-Selektion	Scheller <i>et al.</i> 2000
<i>mec1</i>	<i>mec1::TRP1</i> in <i>sml1</i>	PCR auf chromosomale DNA, Stamm U953	Zhao <i>et al.</i> 1998 Quelle: R. Rothstein
<i>mgs1</i>	<i>mgs1::HIS3MX6</i>	PCR-basiert	Wach <i>et al.</i> 1997
<i>mms2</i>	<i>mms2::kanMX4</i>		Scheller <i>et al.</i> 2000
<i>mms4</i>	<i>mms4::hisG</i>	+ FOA-Selektion	Scheller <i>et al.</i> 2000
<i>mph1</i> *	<i>mph1::hisG</i>		Scheller <i>et al.</i> 2000
<i>mre11</i>	<i>mre11::URA3</i>	pK <i>Fg Mre11</i> [<i>BamHI</i> , <i>HindIII</i>]	K. Ohta, RIKEN, Japan
<i>rad5</i> *	<i>rad5::kanMX4</i>	PCR-basiert	Wach <i>et al.</i> 1994
<i>rad5 rad51</i> *	<i>rad51::LEU2</i> in <i>rad5</i>	siehe <i>rad51</i>	
<i>rad5 rad52</i>	<i>rad52::URA3</i> in <i>rad5</i>	pSM22 [<i>BamHI</i>]	Torres-Ramos <i>et al.</i> 1996
<i>rad6</i>	<i>rad6::kanMX4</i>		Scheller <i>et al.</i> 2000
<i>rad9</i> *	<i>rad9::kanMX4</i>	PCR-basiert	Wach <i>et al.</i> 1994

<i>rad14</i>	<i>rad14::kanMX4</i>		Scheller <i>et al.</i> 2000
<i>rad17</i>	<i>rad17::URA3</i>	pUC Rad17::URA3 [<i>Bam</i> HI]	Siede <i>et al.</i> 1996
<i>rad18</i>	<i>rad18::HIS3MX6</i>	PCR-basiert	Wach <i>et al.</i> 1997
<i>rad24</i>	<i>rad24::kanMX4</i>	PCR-basiert	Wach <i>et al.</i> 1994
<i>rad26</i>	<i>rad26::kanMX4</i>	PCR-basiert	Wach <i>et al.</i> 1994
<i>rad27</i>	<i>rad27::hisG</i>	pRAD27::hisG-URA-hisG [<i>Eco</i> RI, <i>Sal</i> I]	
<i>rad28</i>	<i>rad28::kanMX4</i>	PCR-basiert	Wach <i>et al.</i> 1994
<i>rad51</i> *	<i>rad51::LEU2</i>	durch PCR auf chromosomaler DNA von entsprechender Mutante	Quelle: I. Hickson
<i>rad52</i> *	<i>rad52::kanMX4</i>		Scheller <i>et al.</i> 2000
<i>rad53</i>	<i>rad53::kanMX4</i> in <i>sml1</i>	PCR-basiert	Wach <i>et al.</i> 1994
<i>rad54</i>	<i>rad54::kanMX4</i>	PCR-basiert	Wach <i>et al.</i> 1994
<i>rad55</i>	<i>rad55::LEU2</i>	pSTL11 [<i>Hind</i> III]	Lovett und Mortimer, 1987
<i>rad57</i>	<i>rad57::LEU2</i>	pSM51 [<i>Sac</i> I], D. Schild	Quelle: L. Symington
<i>rev1</i>	<i>rev1::hisG-URA-hisG</i>	pSF3 [<i>Xho</i> I, <i>Sal</i> I]	Larimer <i>et al.</i> 1989
<i>rev3</i>	<i>rev3::kanMX4</i>		Scheller <i>et al.</i> 2000
<i>rev7</i>	<i>rev7::hisG</i>	pYPG102	Torpey <i>et al.</i> 1994
<i>sgs1</i>	<i>sgs1::kanMX4</i>	PCR-basiert	Wach <i>et al.</i> 1994
<i>sgs1</i> *	<i>sgs1::LEU2</i>	pPWΔSGS1 [<i>Bam</i> HI, <i>Kpn</i> I]	Watt <i>et al.</i> 1995
<i>sgs1 rad52</i> *	<i>sgs1::LEU2</i> <i>rad52::kanMX4</i>	durch Kreuzung erhalten	
<i>sml1</i>	<i>sml1::HIS</i>	durch PCR auf chromosomaler DNA von entsprechender Mutante (U953-61A)	Zhao <i>et al.</i> 1998
<i>srs2</i> *	<i>srs2::HISMX6</i>	PCR-basiert	Wach <i>et al.</i> 1997
<i>tel1</i>	<i>tel1::KanMX4</i>	PCR-basiert	Wach <i>et al.</i> 1994
<i>top3</i>	<i>top3::HISMX6</i>	PCR-basiert	Wach <i>et al.</i> 1997
<i>ubc13</i> *	<i>ubc13::HISMX6</i>	PCR-basiert	Wach <i>et al.</i> 1997
<i>yku70</i>	<i>yku70::LEU2</i>	pGEM4Z-S-H-leu [<i>Sac</i> I, <i>Hind</i> III]	Feldmann und Winnacker 1993
<i>yku80</i>	<i>yku80::kanMX4</i>	pHDF2 [<i>Bam</i> HI, <i>Sal</i> I]	Feldmann <i>et al.</i> 1996

Für die Konstruktion der Doppelmutanten mit *mph1* wurde, wenn nicht anders angegeben, CEN.PK2-1c *mph1::hisG* (Scheller *et al.* 2000) verwendet. Die chromosomalen Koordinaten der Gene sind abfragbar bei der *Saccharomyces genome database* (SGD) <http://yeastgenome.org> oder der *Comprehensive yeast genome database* (CYGD) <http://mips.gsf.de>.

Symbolerklärung: * Diese Stämme gibt es in den Varianten *Mat α* und *Mat \mathbf{a}* . Die in [] angegebenen Restriktionsenzyme sind zu verwenden, um die Disruptionskassette freizusetzen.

Sämtliche Hefestämme und Hefemutanten wurden mittels der *one step gene disruption* Methode (Rothstein 1991) erzeugt. Die Transformation erfolgte wie in Gietz *et al.* 1992 beschrieben. Die Disruptionskassetten wurden durch Spaltung von Plasmiden oder durch PCR gewonnen (siehe Tabelle 1). Für die PCR dienten als *template* entweder chromosomale DNA von Deletionsmutanten aus anderen Stammhintergründen, pFA6a (Wach *et al.* 1994) oder pFA-HIS3MX6 (Wach *et al.* 1997). Für die pFA-basierte PCR trugen die Primer jeweils am 5'-Ende 40 bp, die Homolog entweder zu den ersten 40 bp nach dem ATG oder zu den letzten 40 bp vor dem Stopcodon des zu deletierenden Genes waren. Die erhaltenen Transformanten wurden als Einzelkolonien ausgestrichen. Wenn die Disruptionskassette das *hisG::URA3::hisG*-Konstrukt enthielt (Alani *et al.* 1987), wurde auf *ura3*-Rekombinanten durch Einzelkoloniausstrich auf 5-FOA-Platten selektiert (Sikorski und Boeke 1991). Nach Isolierung der chromosomalen DNA wurden Einzelklone mittels PCR verifiziert. Dabei wurde, wie in Abbildung 3 schematisch dargestellt, mit außerhalb der deletierten

Region liegenden Primern (5' screen und 3' screen) die gesamte Genregion amplifiziert und dadurch überprüft, ob die Deletion an richtiger Lage im Genom erfolgte. Wobei dies nur möglich war, wenn das zu erwartenden PCR-Produkt nicht größer 4000 bp ist. Zusätzlich wurde die Anwesenheit des Markers an der richtigen Position kontrolliert (5' screen mit dem entsprechenden 3' Marker Primer und 3' screen mit 5' Marker). Weiterhin wurde überprüft, ob mit innerhalb der deletierten Region liegenden Primern (5' intern und 3' intern, oder wahlweise mit dem passenden screen-Primer) ein PCR-Produkt zu erhalten war. Hiermit wurde sichergestellt, dass das Wildtypgen nicht mehr vorhanden war. Es wurde bei jeder PCR-Kombination der Wildtyp mitgeführt (die zu erwartenden PCR-Fragmente sind in Tabelle 2 zusammengestellt).

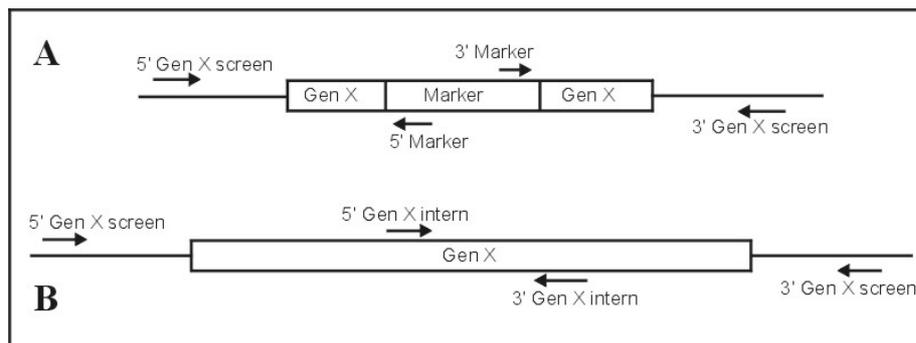


Abbildung 3: Schematische Darstellung des PCR-Nachweises einer Gendeletion.
A: Situation in der Mutante. **B:** Situation im Wildtyp.

Tabelle 2: Primerkombinationen und die zu erwartenden Fragmentgrößen (nur gerundet angegeben) von *Saccharomyces cerevisiae* Mutanten.

Gen	Primerkombination	PCR-Produkt im wt [bp]	PCR-Produkt in der Mutante [bp]
<i>apn1</i>	5' & 3' screen	3000	3700
	5' & 3' intern	600	-
	5' screen & 3' HIS3	-	1800
<i>apn2</i>	5' & 3' screen	2500	2800
	5' screen & 3' intern	760	-
	5' screen & hisG1	-	1100
	3' screen & hisG2	-	1100
<i>lig4</i>	5' & 3' screen	3200	4200
	5' & 3' intern	800	-
	5' screen & 3' HIS3	-	1900
	3' screen & 5' HIS3	-	1500
<i>mag1</i>	5' & 3' screen	2900	3300
	5' & 3' intern	500	-
	5' screen & hisG2	-	1500
	3' screen & hisG1	-	1600
<i>mec1</i>	5' & 3' disrupt	-	1100
	5' & 3' screen	7320	1240
	5' screen & 3' intern	430	-
	5' screen & 3' TRP1	-	650
	3' screen & 5' TRP1	-	900
<i>mgs1</i>	5' & 3' screen	2200	1800
	5' screen & 3' intern	500	-
	5' screen & 5' his out	-	900
	3' screen & 3' his out	-	700

MATERIAL UND METHODEN

<i>mms2</i>	5' & 3' screen	900	1800
	5' screen & 5' kan out	-	1000
	3' screen & 3' kan out	-	1200
<i>mms4</i>	5' & 3' screen	2200	2400
	5' & 3' intern	600	-
	5' screen & hisG2	-	1400
	3' screen & hisG1	-	1400
<i>mph1::hisG</i>	5' & 3' screen (oder screen_2)	3600	2500
	5' & 3' intern	1000	-
	5' screen & hisG2	-	1500
	3' screen & hisG1	-	1300
<i>mph1::kanMX4</i>	5' & 3' screen	3600	2500
	5' & 3' intern	1000	-
	5' screen & 5' kan out	-	1600
	3' screen & 3' kn out	-	1000
<i>mre11</i>	5' & 3' screen	4200	4000
	3' screen & 5' intern	1900	-
	5' screen & 3' URA3	-	1800
<i>rad5</i>	5' & 3' screen	4600	2700
	5' & 3' intern	1000	-
	5' screen & 5' kan out	-	1100
	3' screen & 3' kan out	-	1000
<i>rad6</i>	5' & 3' screen	1100	2000
	5' screen & 5' kan out	-	1000
	3' screen & 3' kan out	-	1200
<i>rad9</i>	5' & 3' screen	4600	2300
	5' & 3' intern	1000	-
	5' screen & 5' kan out	-	800
	3' screen & 3' kan out	-	850
<i>rad14</i>	5' & 3' screen	1700	2000
	5' & 3' intern	800	-
	5' screen & 5' kan out	-	800
	3' screen & 3' kan out	-	600
<i>rad17</i>	5' & 3' screen	1100	2600
	5' screen & 3' URA3	-	1500
<i>rad18</i>	5' & 3' screen	2200	2100
	5' screen & 3' intern	900	-
	5' screen & 5' his out	-	1100
	3' screen & 3' his out	-	700
<i>rad24</i>	5' & 3' screen	2800	2400
	5' & 3' intern	650	-
	5' screen & 5' kan out	-	1000
	3' screen & 3' kan out	-	900
<i>rad26</i>	5' & 3' screen	4100	2400
	5' & 3' intern	700	-
	5' screen & 5' kan out	-	1000
	3' screen & 3' kan out	-	900
<i>rad27</i>	5' & 3' screen	1600	2200
	5' & 3' intern	640	-
	5' screen & 5' hisG1	-	700
	3' screen & 3' hisG2	-	1150
<i>rad28</i>	5' & 3' screen	2800	2800
	5' screen & 5' kan out	-	1300
	3' screen & 3' kan out	-	1000
<i>rad51</i>	5' & 3' disrupt	-	2500
	5' & 3' screen	1700	2700
	5' intern & 3' screen	440	-
	3' screen & 3' LEU2	-	1100

MATERIAL UND METHODEN

<i>rad52::kanMX4</i>	5' & 3' out	1900	1800
	5' out & 3' intern	800	-
	5' out & 5' kan out	-	900
	3' out & 3' kan out	-	1000
<i>rad52::URA3</i>	5' screen & 3' out	2800	4500
	5' screen & 3' intern wt	1800	2500
	5' screen & 3' intern	1700	-
	5' URA3 & 3' out	-	2400
	3' URA3 & 5' screen	-	2000
<i>rad53</i>	5' & 3' screen	2800	1700
	5' screen & 3' intern	900	-
	5' screen & 5' kan out	-	1000
	3' screen & 3' kan out	-	1100
<i>rad54</i>	5' & 3' screen	2900	1900
	5' sc & 3' intern	720	-
	5' screen & 5' kan out	-	900
	3' screen & 3' kan out	-	450
<i>rad55</i>	5' & 3' screen	1900	4000
	5' & 3' intern	200	2500
	5' screen & 5' LEU2	-	1500
	3' screen & 3' LEU2	-	2400
<i>rad57</i>	5' & 3' screen	2400	2700
	5' & 3' intern	500	-
	5' screen & 3' LEU2	-	1000
	3' screen & 5' LEU2	-	1500
<i>rev1</i>	5' & 3' screen	5100	6600
	5' screen & 3' intern	1600	-
	5' screen & hisG2	-	1900
	3' screen & hisG1	-	1200
<i>rev3::kanMX4</i>	5' & 3' screen	5600	2800
	5' out & 5' kan out	-	900
	3' out & 3' kan out	-	1300
<i>rev3::hisG</i>	5' & 3' screen	5600	2600
	5' up & 3' intern	2400	-
	3' screen & hisG1	-	800
	5' screen & hisG2	-	1200
<i>rev7</i>	5' & 3' screen	3500	3700
	5' screen & 3' intern	900	-
	3' screen & hisG2	-	2700
	5' screen & hisG1	-	1200
<i>sml1</i>	5' & 3' screen	900	1900
	5' screen & 3' intern	400	-
	3' screen & 5' HIS3	-	1000
	5' screen & 3' HIS3	-	600
<i>sgs1::kanMX4</i>	5' & 3' screen	5300	1500
	5' wt screen & 3' wt screen	800	-
	3' screen & 3' kan out	-	1000
	5' screen & 5' kan out	-	1000
<i>sgs1::LEU2</i>	5' screen & 3' int out	3000	4700
	5' & 3' intern	500	-
	5' screen & 3' LEU2	-	2200
	5' LEU2 & 3' int out	-	1600
<i>srs2</i>	5' & 3' screen	4200	2000
	3' screen & 5' intern	900	-
	3' screen & 3' his out	-	950
	5' screen & 5' his out	-	900
<i>tel1</i>	5' & 3' screen	9000	250
	5' & 3' intern	800	-
	3' screen & 3' kan out	-	900
	5' screen & 5' kan out	-	1000

<i>top3</i>	5' & 3' screen	3300	2600
	5' & 3' intern	900	-
	3' screen & 3' his out	-	1200
	5' screen & 5' his out	-	1400
<i>ubc13</i>	5' & 3' screen	1050	1800
	5' & 3' intern	500	-
	3' screen & 3' his out	-	700
	5' screen & 5' his out	-	1000
<i>yku70 (hdf1)</i>	5' & 3' screen	1700	3400
	5' & 3' intern	300	-
	3' screen & 3' LEU2	-	1600
<i>yku80 (hdf2)</i>	5' & 3' screen	2700	3800
	5' screen & 5' kan out	-	1000
	3' screen & 3' kan out	-	2400

Oligodesoxyribonukleotide

Tabelle 3: Verwendete Primer. Die Nummer, angegeben nach dem Primernamen, gibt die laborinterne Nomenklatur des jeweiligen Primers wieder.

Name/Nummer	Sequenz
5' HIS3, 293	5'-AAA GGG TGG TCC CCT AGC GAT A
3' HIS3, 134	5'-CAG TGG TGT GAT GGT CGT CTA T
5' URA3, 224	5'-GTC GAA AGC TAC ATA TAA GG
3' URA3, 151	5'-CAC ACC GTG TGC ATT CGT AAT G
5' LEU2, 321	5'-GCC CCT AAG AAG ATC GTC GTT T
3' LEU2, 153	5'-TAC CTC CCA CTA ATT CTC TGA C
5' TRP1, 292	5'-TGA AAG TTT GCG GCT TGC AGA G
3' TRP1, 152	5'-GTC TTG GTA TTC TTG CCA CGA C
3' kl TRP, 208	5'-GGT GGA CTG CAG TTG AAA TAC C
5' kan out, 11	5'-CGT GAG TCT TTT CCT TAC CCA TGG
3' kan out, 12	5'-ATG TTG GAC GAG TCG GAA TCG CAG
5' his out, 282	5'-GTA AAG TCG TAA GCT CCA GCC T
3' his out, 283	5'-GAC GAA GCT CTT TCT AGA AGC G
his G1, 89	5'-CCT TTC TGG TCG AGG TAG CGT TTG
his G2, 88	5'-GCT ATC TGC GAT TTG GTC TCT ACC
5' APN1 screen, 162	5'-TAA TAA CGG GCG ATC CCA GTG ATC
3' APN1 screen, 163	5'-GCA AGT GAA GAT ATG GAC ACA CTC
5' APN1 intern, 160,	5'-CTG TTC CTT ACG CGA TTT AGC ACC
3' APN1 intern, 161	5'-TTG AAA GGA GAC CAT CAG TTG CAG
5' APN2 screen, 129	5'-GGG AAC TGT TTA CAG ATT CCT C
3' APN2 screen, 130	5'-GGC CAG TTG TGA TGG GGA AAA A
3' APN2 intern, 197	5'-ATC CAG CAG CCA ACG CCA GAA T
5' LIG4 screen, 135	5'-CGT TGT TTG TGC AGT ACT AGA G
3' LIG4 screen, 136	5'-CCT TAA GTT AAT TGA CTG GCC A
5' LIG4 intern, 137	5'-AGT AGA CGG GGC ATC GAC TAT A
3' LIG4 intern, 138	5'-CGG AGG TTC TTT TCC AAT GTC C
5' MAG1 screen, 164	5'-TTA ACG AGA ACC TCG AGT CGT TTG
3' MAG1 screen, 165	5'-GTT CTG TTT GAG TCT AGA AG TCC
5' MAG1 intern, 166	5'-AACCCG GTT ACA GTT CAG TTG GTC
3' MAG1 intern, 167	5'-ACA CCC TAT TGT TGT GTG TGA TGC
5' MEC1 disrupt, 307	5'-CAA CAA GAA CGA CAT ACA CCG C
3' MEC1 disrupt, 308	5'-AAG AGG AAG TTC GTC TGT TGC C
5' MEC1 screen, 304	5'-GGA ACG CAC GCT CCA AAA CTA G
3' MEC1 screen, 305	5'-TTA ACT CCG CCG GAG AAA AGC A
3' MEC1 intern, 306	5'-CTC AAA GTT CCC GTT GGA ATC C
5' MGS1 disrupt, 235	5'-CG CTA GCG GTA AGA TCT GAAACA GGA TCG CAC AGT CTC A CAG CTG AAG CTT CGT ACG CTG

3' MGS1 disrupt, 236	5'-ATT GTA GAC GCG GCATTG AGA GAA GTA TGG AAG ACC CTT GA GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G
5' MGS1 screen, 232	5'-A GTA AATAAG CCG GGT CAG GAT GC
3' MGS1 screen, 233	5'-AAA ACG TGC CAG CAA TGC AAT GCG
3' MGS1 intern, 234	5'-TTT GGG CCT GCC AAA AGA CTT GAC
5' MRE11 screen, 198	5'-G CGC GAT TCT ACG GAA TAT ACC
3' MRE11 screen, 199	5'-TGA ACT TTA TGG AGC GCT GAA T
5' MRE11 intern, 200	5'-CTG AGA ACA GAT GAT GCA GAG G
5' MMS2 disrupt, 173	5'-CTG TAT ATG CAA CGT AGA AGA AAG CAG CGT TTA CAC AAA ACA GCT GAA GCT TCG TAC GC
3' MMS2 disrupt, 172	5'-CTT GGA ATG CTG CAA ATA CTG TTT AGG AAA AAG TAG ATA AGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC
5' MMS2 screen, 174	5'-TGA ATG GTC CAC TCA ATG CAC TGA
3' MMS2 screen, 175	5'-GAT GAG GAC CGT TGC AAG GAT TGA
5' MMS4 screen, 169	5'-AACTTT CTG CGC CGT TCT TCC AAG
3' MMS4 screen, 168	5'-ATG AGA GCC ATT GCC TTA TTG ACC
5' MMS4 intern, 171	5'-CTG CCA GAG AGG TAT CAC AAC TAG
3' MMS4 intern, 170	5'-GTT CCT GAC AAT CGT TGT TCT ACC
5' tag mph1 stop, 226	5'-CGC AGA ATT AGA TGA CAT ACT GGG CTC AGA TTC TGA TTT T CGT ACG CTG CAG GTC GAC
3' tag mph1 stop, 227	5'-CAG CGT TAT TTT TGT ATA GAC GCA GAC GTA TAA GAG TCT CGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG
5' Sp_Mph1_XhoI, 263	5'-GCCT CTCGAG GTG AAT CAG TAA ATT TAA AAT ACG
3' Sp_Mph1_SacI, 262	5'-CGGT GAGCTC AGG GAA ATC CTT CAG CAG GCT ATC
5' Sp_Mph1 screen, 264	5'-GTG CTT AAA TTC TTT AAT TTA TAC
3' Sp_Mph1 screen, 265	5'-CGG AGC ATC GAT GTA TAA TGA GAA
5' Sp_Mph1 intern, 266	5'-AGA GGG TTT GGA CAT AGG TGA AGT
3' Sp_Mph1 intern, 267	5'-TAG CTA GAG AAT GCG GTA TCCGTC
5' MPH1 disrupt kan, 342	5'-ATG GCT AGT GCA GAT GAT TAC TTT AGT GAT TTC GAA GAT GCA GCT GAA GCT TCG TAC GC
3' MPH1 disrupt kan, 343	5'-AAA ATC AGA ATC TGA GCC CAG TAT GTC ATC TAA TTC TGC GGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG
5' MPH1 screen, 91	5'-ATC TCC TCT AAC TCC TTA CTG GTG
5' MPH1 screen_2, 378	5'-AGT AGT GGA GCG TCT AAC TGG CCT
3' MPH1screen, 90	5'-CGA CAA AGC TAG AAC GCG AGT CAG
3' MPH1 screen_2, 377	5'-TGC TTA GCT TTT GCG ACA CCT GTG
3' MPH1 intern, 92	5'-CGC TCT CTT AGT TCG TTC AGC TCC
5' MPH1 intern, 93	5'-TCT TGT CAT CGA TGA AGC TCA CAG
5' RAD5 screen, 109	5'-GAG GCG AGC TAG CTG CTA TTA A
3' RAD5 screen, 110	5'-ACC CAC CTT GTA TGG GTT CGT A
5' RAD5 intern, 107	5'-GCT CGA AAA GAC TGG CTC TAC T
3' RAD5 intern, 108	5'-GAC GTC CTCATC TGT CAT CCT T
5' RAD5 disrupt, 105	5'-ATG AGT CAT ATT GAA CAG GAA GAA AGG AAG AGG TTT TTT ACA GCT GAA GCT TCG TAC GCT G
3' RAD5 disrupt, 106	5'-CTA TTC AAA CAG CAT CTG GAT TTC TTC AAT TCT CCT TTT TGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG
5' RAD6 disrupt, 185	5'-GAT TAT TTT TAG GCA GAC AGA GAC TAA AAG ATA AAG CGT CCA GCT GAA GCT TCG TAC GCT G
3' RAD6 disrupt, 184	5'-ATC GGC TCG GCA TTC ATC ATT AAG ATT CTT TTG ATT TTT CGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC
5' RAD6 screen, 187	5'-TGG TGA CTA CAT TTC CCG GAT TAG
3' RAD6 screen, 186	5'-CGG GTA TCG GCA GTT ATA ACC GAT
5' RAD9 disrupt, 111	5'-ATG TCA GGC CAG TTA GTT CAA TGG AAA AGC TCT CCA GAT CCA GCT GAA GCT TCG TAC GCT G
3' RAD9 disrupt, 112	5'-TCA TCT AAC CTC AGA AAT AGT GTT GTA TAT ATC ATT GTC CGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG
5' RAD9 screen, 115	5'-CGG CCT TGT TAG CGT TAG ATA C
3' RAD9 screen, 116	5'-TCA TCT CAC CCA TTG GGG TGA A
5' RAD9 intern, 113	5'-TAA TAG TGC TGT GTC TGG CAC C
3' RAD9 intern, 114	5'-CTG AAG TTC TGA GCTCTG TCC T
5' RAD14 disrupt, 111	5'-GAG TTT GGA TCT TCG TAG TGA AGG TAT CGA ACG TAA CGC TCA GCT GAA GCT TCG TAC GC

3' RAD14 disrupt, 112	5'-TAT GAC TTT CTT GTT ATA TTC TTA TAT ACA TAA CCA ACA TGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC
5' RAD14 screen, 115	5'-GTT CGA TTC TGC CCT GGA GCG TAA
3' RAD14 screen, 116	5'-TAT GCA CCC AAG GAA TTG ATT GTA
5' RAD14 intern, 113	5'-GTG TTT GTA TTT TAA CCG TGG G
3' RAD14 intern, 114	5'-TGA GGG TTC GGC TTT TCT AGT C
5' RAD17 screen, 131	5'-TAT GGT GTG CCT GAA GAT GAA C
3' RAD17 screen, 132	5'-TAA GGC TGA ATG AAG GGC TTC G
5' RAD18 disrupt	5'-CAA GTG AGC ATC ACA GCT ACT AAG AAA AGG CCA TTT TTA CTA CTC CGT ACG CTG CAG GTC GAC
3' RAD18 disrupt	5'-AAA TGT GCA CAA GCT AAC AAA CAG GCC TGA TTA CAT ATA CAC ACC ATC GAT GAA TTC GAG CTC G
5' RAD18 screen, 313	5'-TGG TAA CAA TAC TAC GGA TAG C
3' RAD18 screen, 314	5'-AAC CGT AAA CTA CGC TGG CCT T
3' RAD18 intern, 315	5'-AGTAAG GAA GAT CGT AGG GAT G
5' RAD24-disrupt, 117	5'-ATG GAT AGT ACG AAT TTG AAC AAA CGG CCC TTA TTA CAA TCA GCT GAA GCT TCG TAC GCT G
3' RAD24-disrupt, 118	5'-TTA GAG TAT TTC CAG ATC TGA ATC TGA AAG GGA CTC ACT GGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG
5' RAD24-screen, 121	5'-GGC CTT ATC CTT CGT TTC ATG C
3' RAD24-screen, 122	5'-TCA ATG GGG AGT TCC AGG G
5' RAD24-intern, 119	5'-AGT TCG GAG CCT CTA TTA CCT C
3' RAD24-intern, 120	5'-AGG TTT TGC GCA CTT CTC GTA A
5' RAD26-disrupt, 61	5'-AGT GAA GAT AAA GAG CAG CAA GAC AAT GCG AAA CTT GAA ACA GCT GAA GCT TCG TAC GCT G
3' RAD26 disrupt, 62	5'-TCA TGA AGC ATT GTT ATT CCT AAA TTC TTC ATC AAG CAC CGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG
5' RAD26 screen, 63	5'-CGA CTG GCA AGT ACG ATC AAC AGT
3' RAD26 screen, 64	5'-TCC GTG ACA AAG TAT GTA GGT GGC
5' RAD26 intern, 65	5'-GCA GCG TTG CAT CAT TCA GGT CTA
3' RAD26 intern, 66	5'-CAA GTCACG CAA TGC AAC AGC ACA
5' RAD27 screen, 390	5'-GTA ACA TCG CGC AAA TGA AGG T
3' RAD27 screen, 391	5'-GCT AGG TGT CGA AGG CAT TAC G
5' RAD27 intern, 392	5'-AAG AGC ATA ATG AAG AAG CCC A
3' RAD27 intern, 393	5'-GAA CCC ATC TAA CCT ACC CTG A
5' RAD28 disrupt, 71	5'-ATG GAT CCA TTT TTA GAG TTC AGA GTA GGC AAT ATC TCA TCA GCT GAA GCT TCGTAC GC
3' RAD28 disrupt, 72	5'-TAT GAA CAT TCA AAG ATG GAT CCG CCG TCG CTA ACG GTG TGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG
5' RAD28 screen, 73	5'-AAA AGG ACT GCC CGT CAG GTA TAC
3' RAD28 screen, 74	5'-GCT TTC GTT TGA AAT CGC GTC TCC
5' RAD51 disrupt, 246	5'-G GAA TAG TGG GGA CTG GAG AAA
3' RAD51 disrupt, 247	5'-CTA AGA CAG TGG ATG GAA ATG A
5' RAD51 screen, 248	5'-TCT CACCATATCCCA CGA CTA G
3' RAD51 screen, 249	5'-GAG GAA GTA GTC ATC GGG AAG A
5' RAD51 intern, 250	5'-CAG ATC CAA AGA AGC CTA TCG G
5' RAD52 disrupt, 178	5'-CGA AAA ATA TAG CGG CGG GCG GGT TAC GCG ACC GGT ATC GAA TG GCT GAA GCT TCG TAC GCT G
3' RAD52 disrupt, 179	5'-TAA TAA ATAATG ATG CAA ATT TTT TAT TTG TTT CGG CCA GGA AGC GTT TCA ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG
5' RAD52 out, 177	5'-ATCGGGTCTGCACACGTCGCTAA
3' RAD52 out, 176	5'-TTAATACGACACATGGAGGAAAGAA
5' RAD52 screen, 201	5'-CCA CTA CTG CTT CTG AAC TTG G
3' RAD52intern, 202	5'-TCC TAG AGC ATT ACC AAA CCC T
3' RAD52 intern wt, 225	5'-GGG TAC CTC GAC TTA CTG TA
5' RAD53 disrupt kan, 311	5'-AGA ATA GTG AGA AAA GAT AGT GTT ACA CAA CAT CAA CTA AAA ATG GAA AA CAG CTG AAG CTT CGT ACG CTG C
3' RAD53 disrupt kan, 312	5'-GGT TAC GAA AAT TGC AAA TTC TCG GGG CCT TTT GAG GTT TGG TCC AAT TT GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G
5' RAD53 disrupt, 302	5'-GGA CGG TAG AGA TTA TTG GAA G
3' RAD53 disrupt, 303	5'-CTC GAG ACA ACC TAT TGT CTT C

[können als screen Primer verwendet werden]

5' RAD53 screen, 299	5'-GGT TGA GAA GAT AAA GGG TAC C
3' RAD53 screen, 300	5'-CGT ATC AAA ACG TCA CTC TAT A
3' RAD53 intern, 301	5'-AGT CAC CAC CAG AAA CGA ACT C
5' RAD54 disrupt kan, 408	5'-ATG GCA AGA CGC AGA TTA CCA GACAGA CCA CCA AAT GGA ATA CAG CTG AAG CTT CGT ACG CTG C
3' RAD54 disrupt kan, 409	5'-ATGTGA AAT ATA TTG AAA TGC AAA ACT GAT ATC ATT GTA ATG GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G
5' RAD54 screen, 357	5'-GCG AAG GCC AAA ACT CTT CTC A
3' RAD54 screen, 358	5'-CCC CGA CGA TCG AAT TCT ACT T
3' RAD54 intern, 359	5'-GAT GTG TCA TGG ACA ATC ATT T
5' RAD55 screen, 334	5'-GCT CCG CTA TCA AAG ATG TCA AGT
3' RAD55 screen, 335	5'-TGT ATG GAA GGT AGA CCT CGG GGC
5' RAD55 screen, 334	5'-GCT CCG CTA TCA AAG ATG TCA AGT
3' RAD55 screen, 335	5'-TGT ATG GAA GGT AGA CCT CGG GGC
5' RAD55 intern, 336	5'-ATT AGT CTG CGA TCA TCT GTG TAC
5' RAD55 intern, 337	5'-TCT TCC AAG GAT TCG AAT TCG TTT
5' RAD57 screen, 338	5'-AAC CAC TGG GAA TTC ACC ATT T
3' RAD57 screen, 339	5'-GTC TCG AAT TAC GAT TCT GGC T
5' RAD57 intern, 340	5'-GTT GCC TAT TTT ATT AGA GAG A
3' RAD57 intern, 341	5'-TTC GCT CAA CGG TTT TAT TCT C
5' REV1 screen, 147	5'-GGA TTC CAT TGT TGA TAA AGG C
3' REV1 screen, 148	5'-CCT ACT TCC ACT ACG GAA ACT G
3' REV1 intern, 149	5'-GAG TAT TCC AAA TCG CTG TCC A
5' REV3 disrupt kan, 9	5'-ATG TCG AGG GAG TCG AAC GAC ACA ATA CAG AGC GAT ACG GCA GCT GAA GCT TCG TAC GC
3' REV3 disrupt kan, 10	5'-AAT CAT TTA GAG ATA TTA ATG CTT CTT CCC TTT GAA CAG AGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG
5' REV3 screen, 7	5'-TGT CGC TCC TTT GTT CCA TTC CAC
3' REV3 screen, 8	5'-TGC CTC GCA ACA AAA CCA CGT AGA
5' REV3 up, 143	5'-CGA TGC CAT AAC CCA TTC GAA T
3' REV3 intern, 144	5'-CCG TAT CGC TCT GTA TTG TGT C
5' REV7 screen, 145	5'-CCG CTA AAA ACG AGC AAC TCG A
3' REV7 screen, 146	5'-TCA TCG CTA CAG ACATTG AAG G
3' REV7 intern, 150	5'-GTA TAC CCT CAG CCA CTT CTC T
5' SML1 disrupt, 296	5'-TCG CCA TTT TGG GAA GTC ATC C
3' SML1 disrupt, 297	5'-CAA AAA TAC GTA GAA GAG ACA T
5' SML1 screen, 294	5'-TTT TTG TTA CCT CGC GCT GAG C
3' SML1 screen, 295	5'-AGC ATT GAT CAA GAG AGG GGG A
3' SML1 intern, 298	5'-CAT AGG TGG CAA AGG CAC CCT T
5' SGS1 disrupt, 154	5'-ATG GTG ACG AAG CCG TCA CAT AAC TTA AGA AGG GAG CACACA GCT GAA GCT TCG
3' SGS1 disrupt, 155	5'-TCA CTT TCT TCC TCT GTA GTG ACC TCG GTA ATT TCT AAA AGC ATA GGC CAC TAG
5' SGS1 screen, 156	5'-CGG TCC AGA GAC TTC GTG ATC TGC
3' SGS1 screen, 157	5'-GAG AGG TTA TAC CCG TGA AGA AGC
5' SGS1 wt screen, 158	5'-AAG ACA AAT TCG CCA CCA ACA ACG
3' SGS1 wt screen, 159	5'-CCT TAG TGA CGG TAG TCG CAG TAG
5' SGS1 intern, 274	5'-GAG GCA GAA GAT GAT GCC CAT T
3' SGS1 intern, 275	5'-TCG CTATCT GAT AGG TAC TCG A
3' SGS1 intern out, 276	5'-CTT GCA GTT GCA GTT AAA GCA A
5'SRS2 disrupt-HIS, 309	5'-TTC CAA TTT GAT CTT TCT TCT ACC GGT ACT TAG GGA TAG CAA ATG TCG CAG CTG AAG CTT CGT ACG CTG C
3' SRS2 disrupt-HIS, 310	5'-ATA AAC CGC CTC CAA TAG TTG ACG TAG TCA GGC ATG AAA GTG CTA CTA GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G
5' SRS2 disrupt, 252	5'-GCT TCC TGT CCC TCT AGT TTC T [für srs2::TRP1 auf Stamm von I. Hickson]
3' SRS2 disrupt, 253	5'-TCA TTC ATA GCT GTC ATA TCG G [können als screen Primer verwendet werden]
5' SRS2 screen, 253	5'-GTA ACG AGA CGC GAA TGC GAA A
3' SRS2 screen, 254	5'-TTG ACT GGG TAC TGC TTG ACT G
5' SRS2 intern, 255	5'-CAG TCG CTT ACG TCG AGT GAA T

5' TEL1 disrupt, 212	5'-ATG GAG GAT CAT GGG ATT GTA GAA ACT TTA ACC TTT CTA T CAG CTG AAG CTT CGT ACG CTG
3' TEL1 disrupt, 213	5'-AAT AAA AAG GTG ACC ATC CCA TAT ATA TAA CAC TCA AAT T GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT
5' TEL1 screen, 214	5'-GGC CAA GAG TTG CAT CTA ACT C
3' TEL1 screen, 215	5'-TGC GTA GTG AGT CTT TAC GGC A
5' TEL1 intern, 216	5'-TCC CCT ACC GAC CAG TAA TTTTAC
3' TEL1 intern, 217	5'-GCG TAA ACT CTT TCA CAA CTC CGC
5' TOP3 disrupt-HIS, 344	5'-ATG AAA GTG CTA TGT GTC GCA GAG AAA AAT TCT ATA GCG A CA GCT GAA GCT TCG TAC GC
3' TOP3 disrupt-HIS, 345	5'-TAC ATG GAT GCC TTG ACA CGG TCA TAA ACT TGC AAG AGA G GC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG
5' TOP3 screen, 346	5'-GTC GCA TGA TAT CAT GGA ACC A
3' TOP3screen, 347	5'-AGC TTC CCG ATG ACT TCG AGA A
5' TOP3 intern, 348	5'-AGT CGT ATC GTA TGG TAC ATG C
3' TOP3 intern, 349	5'-GTG CCA ATG CCG TTT GTA TCC A
5' UBC13 disrupt	5'-CCA ATA TTA GCA AAT AAG GTC AGG TTC ATT GTA ACA TAG TTA GAA CGT ACG CTG CAG GTC GAC
3' UBC13 disrupt	5'-GAT ATA TAT TTA TAT ATT CAG TTG AGA AAA CTT ATA CAG AAA TGA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G
5' UBC13 screen, 316	5'-ATG CCG CAT CCG TAT TGT TAC C
3' UBC13 screen, 317	5'-AAT GCG CCT CTT TAG ATG ACC A
3' UBC13 intern, 318	5'-TGT AAT GCC AGG TAC TGG GTC A
5' HDF1 screen, 139	5'-ACA GGT CAC TTC TGC AAG GTT G
3' HDF1 screen, 140	5'-CGT CTAGGAATG GAA CCC TGT A
5'HDF1 intern, 230	5'-ACG GGC AAG ATT GAG AAG GCT T
3'HDF1 intern, 231	5'-TAG TGT AAC CCT TGA CTC CGA C
5' HDF2 screen, 141	5'-GTA CCG TCA ACC AAAGAT TAG C
3' HDF2 screen, 142	5'-AGT ATA ACG TCC CCT TTC ACG T
SQ_HX_mut, 285	5'-TTT GTA AAA GTT AAC GAT AAA gct CAA GTC GAC AAC AAC AGT GTC AAC CAT GAT TCA gct CAA TCT TTT ACC TTA TCG AAC
SQ_HX_rev_seq, 289	5'-AGA CGC CGA CGT ATA AGA
SQ_HX_seq, 272	5'-AAT GTT TGG CGA GAG GCA
5' pRS screen; 75 + 83	5'-ATT CAG GCT GCG CAA CTG TTGG
5' MPH1 end, 209	5'-CGA TGT GGA GCC CAA TTT TGT ACA
5' Mph1 prom XbaI, 210	5'-GTC ATC TAG ACT CAG GTA CTT TTG GCG T
3' Mph1 Fspl, 211	5'-TAC GTG CGC ATA TGG TGA TTG CCA CAA A

Plasmide

Die konstruierten Plasmide beruhen auf den folgenden Vektoren: pRS31x-Serie (beschrieben in Sikorski und Hieter 1989), Yplac-Serie (beschrieben in Gietz und Sugino 1988), auf pGEM7Zf(-) (Promega) oder auf pYES2 (Invitrogen).

pRS31x-Serie: *colE1-ori*, *f1-ori*, *amp^r*, *lacZ*-Gen, *CEN6*-Centromerbereich, *ARS6*-Replikationsursprung, (pBluesscript-Derivat). Die Vektoren unterscheiden sich im Selektivmarker für die Anwendung in *Saccharomyces cerevisiae*: pRS313-*HIS3*, pRS314-*TRP1*, pRS315-*LEU2*, pRS316-*URA3*.

YplacX-Serie: *pMB1-ori*, *amp^r*, (pUC19-Derivat), X steht für verschiedene Nummern, die sich je nach dem Selektionsmarker für die Anwendung in *Saccharomyces cerevisiae* unterscheidet. Bei der YIplacX-Serie (X: 211-*URA3*, 128-*LEU2*, 204-*TRP1*) handelt es sich um integrative Vektoren, bei der YEplacX-Serie (X: 195-*URA3*, 181-*LEU2*, 112-*TRP1*) um episomale (*2μ-ori*) und bei der YCplac-Serie (X: 33-*URA3*, 111-*LEU2*, 22-*TRP1*) um Centromervektoren.

pGEM7Zf(-): *colE1-ori*, *f1-ori*, *amp^R*, *lacZ*-Gen, T7-RNA-Promotor, SP6-RNA-Promotor

pYES2: *colE1-ori*, *f1-ori*, *amp^R*, *2μ-ori*, *URA3*, *GAL1*-Promotor

pRS313 e6e9: Dieses Plasmid enthält ein chromosomales *SspI/MscI* Fragment aus *Saccharomyces cerevisiae* mit dem *MPH1*-Gen einschließlich der Promotor- und Terminatorregion (Quelle: Pia Meyer).

pRS313 MPH1 GFP: Bei diesem Plasmid steht das MPH1-GFP-Konstrukt unter Kontrolle des eigenen Promotors (Scheller 1999).

pRS313 MPH1: Für die Konstruktion dieses Plasmids wurde *MPH1*, einschließlich Promotor- und Terminatorregion, ausgehend von einem PCR-Produkt (5' Mph1 prom *XbaI* und 3' Mph1 *FspI*, *template*: chromosomale DNA von *Saccharomyces cerevisiae*), gespalten mit *XbaI* und *FspI* in pRS313 (mit *XbaI* und *SmaI* gespaltenen) kloniert. Der Vektor komplementiert den *mph1* Mutatorphänotyp.

pRS316 MPH1: Für die Konstruktion dieses Plasmids wurde *MPH1*, einschließlich Promotor- und Terminatorregion, ausgehend von einem PCR-Produkt (5' Mph1 prom *XbaI* und 3' Mph1 *FspI*, *template*: chromosomale DNA von *Saccharomyces cerevisiae*), mit *XbaI* und *FspI* in pRS316 (gespalten mit *XbaI* und *SmaI*) kloniert. Der Vektor komplementiert den *mph1* Mutatorphänotyp.

YCplac33 MPH1: Für die Konstruktion dieses Plasmids wurde *MPH1*, einschließlich Promotor- und Terminatorregion, ausgehend von einem PCR-Produkt (5' Mph1 prom *XbaI* und 3' Mph1 *FspI*, *template*: chromosomale DNA von *Saccharomyces cerevisiae*), mit *XbaI* und *FspI* in den Vektor YCplac33 (gespalten mit *XbaI* und *SmaI*) kloniert. Der Vektor komplementiert den *mph1* Mutatorphänotyp.

pRS313 e6e9 MPH1 SQ_{3/4} mut: Im *MPH1*-Gen sind zwei der putativen Mec1-Phosphorylierungsstellen (SQ961, SQ982) gegen AQ ausgetauscht. Dazu wurde ein PCR-Fragment mit chromosomaler *Saccharomyces cerevisiae* DNA als *template* und den Primern 5' pRS screen und SQ-HX-mut erzeugt, welches mit *HpaI* und *XbaI* gespalten und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen gespaltenen Vektor pRS313 e9e6 kloniert wurde. Die Klonierung wurde durch Sequenzierung (SQ_HX_rev_seq und SQ_HX_seq) überprüft.

pYES2 MPH1 sen his: Das *MPH1*-Gen steht unter der Kontrolle des Galaktose-induzierbaren Promotors und ist 3' *in frame* mit dem immunochemisch nachweisbaren Sendai-Epitop (Einberger 1999) und einem HIS₆-tag fusioniert (Schürer 2000).

pYES2 MPH1_{NEAH} sen his: Es handelt sich um den Vektor pYES2 MPH1 sen his. Anstelle des Wildtyp- *MPH1*-Gens liegt eine veränderte Variante vor, bei der die DEAH-Sequenz gegen eine NEAH-Sequenz (D209N) ausgetauscht wurde (Quelle: Jürgen Scheller, Konstruktion von *mph1*_{NEAH} siehe Scheller, 1999)

YIplac128 MPH1: Für die Konstruktion dieses Plasmids wurde *MPH1*, einschließlich Promotor- und Terminatorregion mit *PstI* und *XbaI* aus dem Plasmid pRS316 MPH1 ausgeschnitten und in den mit den gleichen Enzymen gespaltenen Vektor YIplac128 kloniert. Für die Integration wurde der Vektor mit *AflI* gespalten. In *mph1* Zellen führte die Integration dieses Vektors zur Komplementation des Mutatorphänotypes.

YIplac128 pGAL-MPH1 sen his: Für die Konstruktion dieses Plasmids wurde *MPH1*, einschließlich dem *GAL1*-Promotor- und dem immunochemisch nachweisbaren

Sendai-Epitop (Einberger 1999) und dem HIS₆-tag mit *Pst*I und *Sma*I aus dem Plasmid pYES2 MPH1 sen his ausgeschnitten und in den mit *Pst*I und *Sma*I gespaltenen Vektor Ylplac128 kloniert. Für die Integration wurde der Vektor mit *Afl*II gespalten. In *mph1* Zellen führte die Integration dieses Vektors zur Komplementation des Mutatorphänotypes, wobei die Zellen in Galaktose-haltigen Medium angezogen wurden.

Ylplac128 pGAL-MPH1 NEAH sen his: *MPH1*, unter Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors, wurde mit *Pst*I und *Sma*I aus pYES2 MPH1_{NEAH} sen his ausgeschnitten und in den mit *Pst*I und *Sma*I gespaltenen Ylplac128 kloniert. Für die Integration wurde der Vektor mit *Afl*II gespalten.

pYES BLM: Die cDNA des humanen BLM-Gens liegt unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors im Vektor pYES2 zwischen der *Bam*HI und der *Not*I-Schnittstelle vor (Quelle: I. Hickson).

pYES SGS1: Das *SGS1*-Gen liegt unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors im Vektor pYES2 zwischen der *Bam*HI und der *Not*I-Schnittstelle vor (Quelle: I. Hickson).

pJH626 BLM: Die cDNA vom humanen BLM-Gen liegt unter der Kontrolle des Promotors des konstitutiven humanen *house keeping* Gens der Triosephosphatisomerase (TPI) im Vektor pRS316 zwischen der *Bam*HI und der *Not*I-Schnittstelle vor. Der TPI-Promotor befindet sich zwischen der *Hind*III und der *Eco*RI-Schnittstelle (Quelle: I. Hickson).

pJH626 SGS1: *SGS1* liegt unter der Kontrolle des Promotors des konstitutiven humanen *house keeping* Gens der Triosephosphatisomerase (TPI) im Vektor pRS316 zwischen der *Bam*HI und der *Not*I-Schnittstelle vor. Der TPI-Promotor befindet sich zwischen der *Hind*III und der *Eco*RI-Schnittstelle (Quelle: I. Hickson).

Die Vektoren **pGEM7Zf(-)spmph1⁺**, **pGEM7Zf(-)spmph1::kanMX4** und **pRS316 spmph1⁺** sind im folgenden Kapitel beschrieben.

Klonierung, Deletion und Komplementation von *spmph1⁺*

Für die Klonierung des *spmph1⁺* Homologen wurde ausgehend von chromosomaler *Schizosaccharomyces pombe* DNA das Gen SPAC9.05 (2605 bp) mit den Primern 5' Sp_Mph1_XhoI (730 bp vor dem ATG) und 3' Sp_Mph1_SacI (430 bp nach Stop-codon) amplifiziert, mit *Xho*I und *Sac*I gespalten und in den mit den gleichen Enzymen gespaltenen Vektor pGEM7Zf(-) (Promega) kloniert. Die fehlerfreie Nukleotidabfolge von *spmph1⁺* im resultierenden Plasmid pGEM7Zf(-) *spmph1⁺* wurde durch Sequenzierung nicht überprüft.

Für die Konstruktion der Deletionskassette von *spmph1⁺* wurde der Vektor pGEM7Zf(-) *spmph1⁺* mit *Bam*HI und *Swa*I gespalten, wodurch ein 722 bp Fragment aus dem *spmph1⁺*-Gen herausfällt. Das kanMX4-Modul wurde mit *Bgl*II und *Ecl*136II aus dem Vektor pFA6a (Wach *et al.* 1994) ausgeschnitten und anstelle des 722 bp Fragmentes in den mit *Bam*HI und *Swa*I linearisierten Vektor pGEM7Zf(-) *spmph1⁺* kloniert. Aus dem resultierenden Vektor pGEM7Zf(-) *spmph1::kanMX4* kann die Deletionskassette durch Spaltung mit *Xho*I und *Sac*I freigesetzt werden (4213 bp). Für die Konstruktion der Stämme ATCC 969993 *spmph1* und ATCC 969994 *spmph1* wurden die Stämme ATCC 969993 und ATCC 969994 mit der Deletionskassette

transformiert. Die Transformation wurde nach Bähler *et al.* 1998 durchgeführt. Ich möchte hiermit noch mal ausdrücklich hinweisen, dass die Mistviecher :-), egal was man machen möchte, nur in der log-Phase handhabbar sind (10^7 Zellen/ml, OD_{600} zwischen 0.5 und 1.0).

Der Nachweis der Deletion erfolgte mittels PCR (Tabelle 4). Die Primer wurden, analog wie in Abbildung 3 beschrieben, definiert.

Tabelle 4: Primerkombinationen und zu erhaltende Fragmentgrößen (nur gerundet angegeben) zur Verifizierung von *Schizosaccharomyces pombe* und *smpmh1*-Mutanten.

Primerkombination	PCR-Produkt im wt [bp]	PCR-Produkt in der Mutante [bp]
5' & 3' screen	3800	4500
5' & 3' intern	600	-
5' screen & 3' HIS3	-	2500
3' screen & 5' HIS3	-	1200

Um für die Komplementation in *Saccharomyces cerevisiae* den Vektor pRS316 *smpmh1*⁺ zu erhalten, wurde das *smpmh1*⁺ Gen aus pGEM7Zf(-)*smpmh1*⁺ mit *Xho*I und *Sac*I ausgeschnitten und in den ebenso gespaltenen Vektor pRS316 (Sikorski und Hieter 1989) ligiert. Die fehlerfreie Nukleotidabfolge von *smpmh1*⁺ wurde durch Sequenzierung nicht überprüft.

Mutationsratenbestimmung

Während des Wachstums einer Kultur treten Mutationen auf. Diese können im Laufe des Kulturwachstums zu verschiedenen Zeiten auftreten. Eignet sich ein Mutationsereignis früher, so ist die Zahl der mutierten Zellen in der Kultur größer, als wenn das Mutationsereignis später stattfindet. Dies führt zu verschiedenen Mutationszahlen in vergleichbaren Kulturen mit gleicher Zellzahl, was als Mutationsfrequenz ausgedrückt wird. Unter der Mutationsrate versteht man die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Mutation. Die Bestimmung der Mutationsrate ist nur mit statistischen Verfahren möglich und wurde nach der Medianmethode bestimmt (Lea und Coulson 1948).

Zur Bestimmung der Mutationsrate wurde das Canavaninvorwärtsmutationsystem verwendet. Das *CAN1*-Gen kodiert für die Argininpermease, durch welche sowohl Arginin als auch das Struktur analogon L-Canavanin (2-Amino-4-guanidinoxybuttersäure) in die Zelle aufgenommen werden kann. Der Einbau von L-Canavanin anstelle von Arginin kann zu aberanten Proteinen führen und ist damit toxisch. Durch eine Vorwärtsmutation im *CAN1*-Gen können die Zellen resistent werden, da kein L-Canavanin mehr aufgenommen wird. Nur argininprototrophe Zellen können verwendet werden.

Elf Parallelkulturen (7 ml) wurden mit 20 Zellen/ml einer Übernachtskultur des zu untersuchenden Stammes in YPD angeimpft und bis zum Erreichen der stationären Phase (für drei Tage oder bei langsam wachsenden Stämmen vier Tage) bei 30 °C unter Rollen inkubiert. Aliquots aller Kulturen wurden auf CAN-Platten zur Bestimmung der Anzahl der Mutanten plattiert. Zur Bestimmung des Lebendtiters wurden von zwei

willkürlich gewählten Kulturen entsprechende Verdünnungen auf SC-arg plattiert. Es wird vorausgesetzt, dass die Gesamtzellzahl in der stationären Wachstumsphase in allen 11 Parallelkulturen mit hinreichender Genauigkeit gleich ist. Bis zum Sichtbarwerden von Kolonien auf den Platten wurden die Kulturen bei 4 °C gelagert. Die Koloniezahl auf den Platten wurde ausgezählt. Der Wert der Medianplatte (hochgerechnet auf das Gesamtvolumen) geht in die Berechnung der Mutationsrate ein. Der Lebendtitel wurde aus dem Mittelwert der Koloniezahl der beiden willkürlich gewählten Kulturen berechnet. Wenn nicht anders angegeben wurde für die Kalkulation der Mutationsrate der Lebendtitel verwendet. Wurde die Gesamtzellzahl im Kulturröhrchen zur Berechnung der Mutationsrate herangezogen, wurde die Zellzahl der Mediankultur mittels Neubauer Zählkammer von den bei 4 °C gelagerten Kulturen bestimmt. Bei jedem Experiment wurde unter Verwendung der selbem Mediumcharge die Wildtyp und *mph1*-Mutationsrate mit bestimmt und die relativen Faktoren der jeweiligen Mutanten auf die Rate des Wildtypes in diesem Experiment bezogen.

Abschätzung der Mutationsraten

Die Anzahl der Mutationsereignisse m , die der Entstehung von r_0 Mutanten zugrunde lagen, ließen sich durch folgende Näherung abschätzen (Lea und Coulson 1948):

$$r_0 = 1,24 - m + m \cdot \ln m$$

Nach der Subtraktion von r_0 ließ sich m als einzige Nullstelle einer streng monoton steigenden Funktion betrachten, wobei r_0 als Konstante angesehen werden konnte. Deshalb ließ sich m durch Newtonsche Iteration bestimmen. Die Folge

$$m_{i+1} = m_i - \frac{m_i + m_i \cdot \ln m_i - r_0}{2,24 + \ln m_i}$$

konvergierte also gegen m . Als Standardwert m_i wurde r_0 verwendet. Der Algorithmus wurde bei $m_{i+1} - m_i \leq 10^{-8}$ abgebrochen.

Die Standardabweichung für die errechnete Anzahl der Mutationsereignisse errechnet sich nach folgender Formel (Lea und Coulson 1948):

$$\left(\frac{\sigma_m}{m} \right)^2 = \frac{1}{N} \cdot \frac{12,7}{(2,24 + \ln m)^2}$$

Dabei ist N der Stichprobenumfang, also die Anzahl der Parallelkulturen, die für die Bestimmung von r_0 eingesetzt wurde.

Die Berechnung von Mutationsrate und Standardabweichung erfolgte mit einem von S. Schmidt erstellten Programm, welches die Newtonsche Iteration approximiert (<http://www.ruser.uni-heidelberg.de/~sschmid6>).

Drop dilution assay zur Bestimmung der Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien

Folgende DNA-schädigende Agenzien kamen zum Einsatz:

MMS (Methylmethansulfonat),

4-NQO (4-Nitrochinolin-1-oxid),

CPT (Camptothecin).

MMS ist ein alkylierendes Agens, welches hauptsächlich N⁷ von Guanin und N³ von Adenin alkyliert, was zum Verlust der modifizierten Basen führen kann (*AP-sites*, Pegg *et al.* 1994). MMS gilt als replikationsarretierendes Agens. Wenn eine hohe Schadensdichte an Einzelstrangbrüchen auftritt, so können auch Doppelstrangbrüche auftreten (Milne *et al.* 1996).

Durch 4-NQO-Behandlung bilden sich sperrige Aminochinolin-1-oxid-Addukte, hauptsächlich an N²-, N⁶- und N⁷- von Guanin und Adenin (Turesky *et al.* 1994). Aber auch oxidative Schäden werden hervorgerufen (Ramotar *et al.* 1998).

Camptothecin stabilisiert die kovalente Bindung zwischen einem Tyrosylrest der Topoisomerase I und der DNA, wodurch die Religation der DNA nicht mehr erfolgen kann. Der so verbleibende Einzelstrangbruch kann an der Replikationsgabel zu einem Doppelstrangbruch führen. Am *leading strand* entsteht durch *run-off*-Replikation ein glatter Doppelstrangbruch, der den Kollaps der Replikationsgabel zur Folge hat und von den Enzymen der Doppelstrangbruchreparatur prozessiert werden kann. Am *lagging strand*, so vermutet man, führt der Topoisomerase-DNA-Komplex zum Arrest der Replikationsgabel, weil er möglicherweise eine Barriere für die replikativen Helikasen darstellt (Pommier *et al.* 1998, Strumberg *et al.* 2000, Wang 2002).

Zellen der jeweiligen Stämme wurden über Nacht in YPD bei 30 °C angezogen und am morgen 1:10 in frischen YPD verdünnt. Die verdünnten Kulturen wurden für vier Stunden im Roller bei 30 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Platten mit den Mutagenen vorbereitet. Das Medium wurde autoklaviert und nach Abkühlung unter ca. 60 °C die jeweilige Chemikalie in der angegebenen Konzentration zugegeben. Die Zelldichte der Kultur wurde mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt und die Kultur auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt und drei 1:10 Verdünnungen (bis zu 1×10^4 Zellen/ml) hergestellt. Je 10 µl dieser Verdünnungen (enthalten jeweils 10^5 , 10^4 , 10^3 und 10^2 Zellen) wurden dann auf die verschiedenen Platten mit den DNA schädigenden Agenzien sowie auf eine YPD-Platte als Kontrolle getropft. Die Platten wurden bei 30 °C inkubiert. Nach zwei Tagen, sofern nicht anders angegeben, wurde das Wachstum auf den Platten durch *Scannen* dokumentiert.

Mitotische Rekombination

Für die Bestimmung der mitotischen Rekombinationsrate wurden die Stämme NLBL1 (*Mat α* , *ade5*, *met13-c*, *cyh2R*, *trp5*, *LEU2*, *ade6*, *CLY8*, *his7-1*, *tyr1-2*, *lys2-2*, *ade2-1*, *ura3-1*, *CAN1*) und NLBL3 (*Mata*, *ADE5*, *met13-d*, *CYH2*, *TRP5*, *leu1*, *ADE6*, *CLY8*, *his7-2*, *tyr1-1*, *lys2-1*, *ade2-1*, *ura3-1*, *can1^R*) verwendet (Quelle: Robert Ramirez, Dora et al. 1999). Die Deletion von *mph1* und *sgs1* in den jeweiligen Haplonten erfolgte wie in Tabelle 5 angegeben. Die Diplonten wurden durch Kreuzung der jeweiligen Haplonten auf YPD-Platten und Selektion auf SC-leu-ura-Platten gewonnen und bei -70 °C in 7 % DMSO gelagert. Vor jedem Experiment wurden die Diplonten durch Replikaplattierung auf alle Marker hin überprüft.

Tabelle 5: Ausgangsstämme für die Konstruktion der Diplonten für die Bestimmung der mitotischen Rekombinationsrate.

NLBL1-Derivate	NLBL3-Derivate	Diplont
wt	wt	wt
<i>mph1::hisG</i>	<i>mph1::kanMX4</i>	<i>mph1::hisG</i> / <i>mph1::kanMX4</i>
<i>sgs1::kanMX4</i>	<i>sgs1::kanMX4</i>	<i>sgs1::kanMX4</i> / <i>sgs1::kanMX4</i>
<i>sgs1::kanMX4</i> in <i>mph1::hisG</i>	<i>mph1::hisG</i> in <i>sgs1::kanMX4</i>	<i>sgs1::kanMX4</i> / <i>mph1::hisG</i>

Für die Bestimmung der mitotischen Rekombinationsrate wurden die Stämme frisch von Gefrierkultur auf SC-leu-ura-Platten angezogen. Eine Einzelkolonie wurde in sterilem Wasser resuspendiert und die Zelldichte mit einer Zählkammer bestimmt. Elf Parallelkulturen (10 ml YPD*) wurden mit 4 Zellen/ml angeimpft und für drei Tage bis zum Erreichen der stationären Phase bei 30 °C unter Rollen inkubiert. Entsprechende Verdünnungen aller Kulturen wurden auf SC-lys-, SC-his- und SC-met-Platten zur Bestimmung von heteroallelischen Rekombinanten plattiert. Der Lebendtitel jeder Kultur wurde auf SC Medium bestimmt. Kolonien wurden nach 4-tägiger Inkubation bei 30 °C (oder 37 °C für SC-met) gezählt. Die Berechnung der Rekombinationsrate und der Standardabweichung erfolgte mit einem von Steffen Schmidt erstellten Programm, welches die Newtonsche Iteration, wie bei der Bestimmung der Mutationsrate angegeben, approximiert (<http://www.rzuser.uni-heidelberg.de/~sschmid6>).

Wachstumskurven

Die verschiedenen Mutanten wurden für 48 Stunden bis zum Erreichen der stationären Phase in einem Volumen von 350 μ l in YPD oder dem entsprechenden Selektivmedium in 100-Loch Mikrotiterplatten (pro Loch eine andere Mutante) unter Schütteln (500 rpm) bei 30 °C angezogen. Die Hauptkultur wurde in neuen 100-Loch Mikrotiterplatten (pro Loch eine andere Mutante) angesetzt, indem von diesen Vorkulturen eine 1:50-Verdünnung mit frischem Medium hergestellt wurde (Gesamt-volumen von 350 μ l pro Well). Die Zunahme der optische Dichte (OD_{600}) wurde mit

einer *Labsystem Bioscreen C Microbiology Workstation* verfolgt (folgende Parameter wurden gesetzt: *shaking intensity: high, shaking regime: per 1 min, shaking time: 60 s*). Für die Auswertung der Daten wurde zunächst der Mediumsleerwert abgezogen. Die Messung der optischen Dichte erfolgt bei einem OD-Wert größer 1.0 nicht mehr linear (Lambert-Beer-Gesetz). Da die Kulturen während der Messreihe nicht verdünnt werden können, wurde diese OD-Verzerrung durch folgende Formel korrigiert: $=((\text{gemessener OD-Wert}) + (0.8324057 \times \text{gemessener OD-Wert}^{13}))$; (angewendet mit Excel, Microsoft; Quelle: Elke Ericson, Universität Göteborg).

Proteinpräparation

CEN.PK2-1c MPH1-6HA Zellen wurden in der log-Phase geerntet und in Puffer A (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 0.2 % Triton X-100, *Complete*^R Proteaseinhibitor-mix, Roche) gewaschen. Sollte die Analyse der Proteine in einer bestimmten Zellzyklusphase erfolgen, wurden die Zellen zum Abstoppen aller zellulären Reaktionen vor dem Zentrifugieren für 2 min in einem Trockeneis/Ethanolbad inkubiert. Die Zellyse erfolgte mit Glaskügelchen in einem *FastPrep 120* Apparat (Parameter: 4.0 für 20 s). Der Gesamtzellextrakt wurde bei 4 °C für 10 min zentrifugiert und der zellfreie Überstand gelelektrophoretisch aufgetrennt (ca. 20 µg Gesamtprotein pro Spur). Mph1-6HA wurde durch Western Blot identifiziert.

Immunpräzipitation

Die Präparation des Gesamtzellextraktes erfolgte wie unter Proteinpräparation angegeben. Der zellfreie Proteinüberstand wurde dann mit Pansorbin (Formalinfixierte *S. aureus* Zellen; Calbiochem) für zwei Stunden bei 4 °C vorinkubiert, um unspezifische Bindung am Präzipitationsantikörper zu reduzieren. Für die Präzipitation von Mph1-6HA wurde der Überstand der Vorinkubation mit dem Antikörper (4 µg *mouse-monoclonal anti-HA 12CAS*) versetzt. Nach vier Stunden Inkubation bei 4 °C unter Überkoprotation wurde zur Präzipitation des Antikörpers Pansorbin hinzugegeben und über Nacht unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation gewonnen und zweimal mit Puffer A, der zusätzlich 0.25 % NP-40 enthielt, gewaschen und letztendlich durch SDS-PAGE aufgetrennt und Mph1-6HA durch Western Blot identifiziert.

Western Blot

Die Proteine wurden auf einem 10 %-igem SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt und im *semi-dry* Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Blot wurde für eine Stunde in 5 % Milchpulver in TBS/0.05 % Tween-20 (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 136 mM NaCl) geblockt. Der erste Antikörper (*mouse-monoclonal anti-HA 12CAS* oder *mouse monoclonal anti-phospho-Ser/Thr/Tyr; Clontech*) und der zweite Antikörper

(*HRP conjugated anti-mouse monoclonal IgG*; Amersham Pharmacia) wurden für jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur in TBS/0.05 % Tween-20 inkubiert. Entwickelt wurde der Blot mit dem *ECL Western Blotting Analysis System* (Amersham Pharmacia). Wurde derselbe Blot zweimal mit einem anderen Antikörper entwickelt, so wurden die Antikörper der ersten Entwicklung erst vor der erneuten Inkubation mit den Antikörpern für 30 min bei 50 °C unter Schütteln in *stripping*-Puffer (100 mM β -Mercaptoethanol, 2 % SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7) gewaschen. Der Blot wurde mehrmals mit TBS/0.05 % Tween-20 gewaschen, bevor er erneut geblockt wurde.

α -Faktor-Arrest

Die Zellen wurden aus einer Vorkultur in frisches YPD überführt und so eingestellt, dass zu Versuchsbeginn, nach einer Inkubation für mindestens 3 Stunden, eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml vorlag. Die Zellen wurden mit α -Faktor in G1 arretiert, indem 4 μ g/ml α -Faktor (aus einer 2 mg/ml-Stammlösung in Ethanol) zugesetzt wurde, für 60 min bei 30 °C inkubiert und erneut die gleiche Menge α -Faktor zugesetzt und für weitere 60 min bei 30 °C inkubiert wurde. Hierdurch wurde der Konzentrationsabnahme des α -Faktor entgegengewirkt, der von der Bar1-Protease abgebaut wird, um den Zellzyklusfortgang zu gewährleisten, wenn der Paarungspartner nicht greifbar ist. Der G1-Arrest wurde mikroskopisch kontrolliert (ca. 90 % der Zellen bilden keine Knospe). Zum Aufheben des Arrestes wurden die Zellen abzentrifugiert und zweimal mit sterilem Wasser gewaschen.

Fluoreszenzmikroskopie

Die Zellen, transformiert mit pRS313 MPH1-GFP oder pYES2 Mph1-sen-GFP-his6, wurden über Nacht in Selektivmedium (ggf. mit 2 % Galaktose anstelle von 2 % Glukose) angezogen und am morgen in frischem Medium 1:10 verdünnt und für 4 Stunden bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Wurden die Zellen in G1 untersucht, wurden sie mit α -Faktor arretiert. Für die Mikroskopie wurden die Zellen abzentrifugiert und 4 μ l des Zellpellets ohne Fixierung direkt auf einem Objektträger präpariert. Die Lokalisation von Mph1-GFP wurde mit einem Leica DM RXA Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung untersucht (Durchlicht oder GFP-Filter: 513853, Belichtungszeit: 2 s). Die Bilder wurden mit einer Hamamatsu ORCA gekühlten CCD Kamera aufgenommen und in Photoshop die Helligkeit und ggf. der Kontrast nachbearbeitet.

ERGEBNISSE

Genetische Interaktionsstudien

Die Rolle von *MPH1* bei der Aufrechterhaltung der Integrität der genetischen Information sollte zunächst durch genetische Interaktionsstudien weiter eingegrenzt werden. Dabei betrachtet man die Beziehung zweier Mutanten miteinander. Durch die Phänotypen der entsprechenden Einzel- und Doppelmutanten kann man möglicherweise Rückschlüsse auf die Art der Beziehung der betroffenen Gene erhalten. Man kann hierbei vier typische Fälle unterscheiden, sofern es sich um quantitative Phänotypen (z. B. der gleiche Phänotyp in unterschiedlicher Ausprägung) handelt: Epistasis/Hypostasis, Additivität, Synergismus, Suppression. Bei diskreten Phänotypen (z. B. verschiedene Blütenfarben) wird in der Doppelmutante nur der Phänotyp einer der beiden Einzelmutanten ausgeprägt. Da in dieser Arbeit nur quantitative Phänotypen untersucht werden, wird im Folgenden nur auf diese eingegangen. Bei *Epistasis/Hypostasis* entspricht der Phänotyp der Doppelmutante dem Phänotyp der stärksten Einzelmutante. Von Epistasis spricht man, wenn der Phänotyp von Mutation A den Phänotyp von Mutation B überdeckt (A ist epistatisch zu B). Dieselbe Beziehung, nur von Mutation B aus gesehen, heißt Hypostasis. Der Phänotyp von Mutation B wird vom Phänotyp von Mutation A verdeckt (B ist hypostatisch zu A). Epistasis der entsprechenden Mutationen ist oft ein Hinweis darauf, dass die betreffenden Gene im selben Prozess eine Rolle spielen. Bei *Additivität* ist der Phänotyp der Doppelmutante gleich der Summe der Phänotypen der jeweiligen Einzelmutanten, vorausgesetzt, dass deren Ausfall zum gleichen Phänotyp führt. Beide Gene agieren in separaten Wegen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten. Von *Synergismus* spricht man, wenn der Phänotyp der Doppelmutante stärker ist als die Summe der Phänotypen der beiden Einzelmutanten. Dies kann z. B. dadurch bedingt sein, dass beide Genprodukte ein überlappendes Substratspektrum besitzen. Wenn einer der beiden Wege ausfällt, können die normalerweise von Weg A bearbeiteten Substrate zum Teil von Weg B mitprozessiert werden, und umgekehrt. Dadurch haben die jeweiligen Einzelmutanten einen schwächeren Phänotyp als beim Ausfall der Prozessierung des Substrates zu erwarten wäre. In der Doppelmutante wird nun keines der Substrate mehr prozessiert, so dass es zu einem - im Vergleich zur Doppelmutante - sehr starken Phänotyp kommt. Von einer *Suppression* spricht man, wenn eine Mutation B in einer Mutante A den Wildtypphänotyp wieder herstellt. Die Einzelmutante B kann, muss aber selber keinen Phänotyp haben. Ein möglicher Interpretationsansatz wäre, dass Genprodukt B ein Substrat/Intermediat erzeugt, welches durch Genprodukt A weiter prozessiert wird. Bei Fehlen von A kommt es dann zu dem beobachteten Phänotyp. Wird zusätzlich B ausgeschaltet, tritt das Intermediat gar nicht erst auf, so dass auch der Phänotyp nicht beobachtet wird.

Die Funktion von *MPH1* soll durch Epistasianalysen weiter untersucht und dabei insbesondere das Zusammenspiel von Genen aus weiteren klassischen Reparaturwegen, wie der Basenexcisionsreparatur, der Doppelstrangbruchreparatur und der postreplikativen Reparatur näher in Augenschein genommen werden. Es wurden aber auch Gene herangezogen, deren Rolle bei der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität gesichert ist, wie *SGS1*, *SRS2*, *MRE11*, *MMS4*, *RAD27* und solche aus dem *DNA damage checkpoint*.

Der spontane Mutatorphänotyp wurde jeweils im Canavaninvorwärtsmutationssystem bestimmt (siehe Material und Methoden). Generell war zu beobachten, dass die Mutationsraten für dieselben Mutanten bei unterschiedlichen Experimenten variieren. Zum einen kann dies an statistischen Schwankungen liegen, wie sie bei der Medianmethode zwangsläufig auftreten können und sich theoretisch nur bei Auswertung einer unendlichen Zahl von Kulturen ganz vermeiden lassen. Zum anderen spielt bei den hier untersuchten Mutationen die Expositionen der Zellen zu exogenen Mutagenen während der Anzucht eine bedeutende Rolle. Eine wahrscheinliche Quelle für Mutationen ist das Wachstumsmedium. Die beim Autoklavieren stattfindenden Bräunungsreaktionen sind für die Generierung von mutagenen Substanzen bekannt (Karamelisierung und Maillard-Reaktion - die komplexe Reaktion, die beim Erhitzen von Proteinen und Kohlenhydraten stattfindet; Powrie *et al.* 1986). So wurde beobachtet, dass in sterilfiltrierten Medium die *mph1*-Mutationsraten geringer ausfallen, als in Experimenten, bei denen autoklaviertes Medium verwendet wurde (C. Rudolph, persönliche Mitteilung). Da es logistisch nicht möglich ist, für alle Experimente dasselbe YPD-Medium zu verwenden, wurden die spontanen Mutationsraten bei jedem Experiment mit einer einheitlichen Charge Medium durchgeführt und die Rate für den Wildtyp und der *mph1*-Mutante mitbestimmt. Die relativen Faktoren wurden dann auf den jeweiligen Wildtypwert bezogen.

Für die Untersuchung der Sensitivität der Mutanten wurde der *Drop Dilution Assay* herangezogen, bei dem Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase in Verdünnungen mit abnehmender Zellzahl dem Mutagen dauerhaft ausgesetzt werden. Als Mutagene wurden MMS (Methylmethansulfonat), 4-NQO (4-Nitrochinolin-1-oxid) und CPT (Camptothecin) verwendet. MMS ist ein alkylierendes Agens, welches hauptsächlich N⁷ von Guanin und N³ von Adenin alkyliert, was zum Verlust der modifizierten Basen führen kann (*AP-sites*) (Pegg *et al.* 1984). MMS gilt als replikationsarretierendes Agens. Wenn eine hohe Schadensdichte an Einzelstrangbrüchen auftritt, so können auch Doppelstrangbrüche auftreten (Milne *et al.* 1996).

Durch 4-NQO-Behandlung bilden sich sperrige Aminochinolin-1-oxid-Addukte, hauptsächlich an N²-, N⁶- und N⁷- von Guanin und Adenin (Turesky *et al.* 1994). Aber auch oxidative Schäden werden hervorgerufen (Ramotar *et al.* 1998).

Camptothecin stabilisiert die kovalente Bindung zwischen einem Tyrosylrest der Topoisomerase I und der DNA, wodurch die Religation der DNA nicht mehr erfolgen kann. Der so verbleibende Einzelstrangbruch kann an der Replikationsgabel zu einem Doppelstrangbruch führen. Am *leading strand* entsteht wahrscheinlich durch *run-off*-Replikation ein glatter Doppelstrangbruch, der zum Kollaps der Replikationsgabel führt, und von den Enzymen der Doppelstrangbruchreparatur prozessiert werden kann. Am *lagging strand*, so vermutet man, führt der Topoisomerase-DNA-Komplex

zum Arrest der Replikationsgabel, weil er möglicherweise eine Barriere der replikativen Helikasen darstellt (Pommier *et al.* 1998, Strumberg *et al.* 2000, Wang 2002).

Basen- und Nukleotidexcisionsreparatur

Bei der Basenexcisionsreparatur, die hauptsächliche zelluläre Antwort auf Methylierungsschäden, wird die geschädigte Base direkt entfernt. Die Entfernung der geschädigten Base erfolgt durch eine schadensspezifische Glykosylase. Die resultierenden apurinischen oder apyrimidinischen Stellen (*AP site*), die auch spontan entstehen können, müssen repariert werden. Dazu wird der DNA-Strang an der Phosphodiesterbindung, meist 5' zur AP-Stelle, von entweder AP-Endonukleasen oder der Lyaseaktivität der Glykosylase geschnitten. Der Zuckerrest wird von einer Exonuklease entfernt und die Lücke durch DNA-Neusynthese und Ligation aufgefüllt (Friedberg *et al.* 1995). Zwei Mutanten aus der Basenexcisionsreparatur wurden bereits bzgl. deren Sensitivität gegenüber MMS in Überlebenskurven untersucht (Scheller *et al.* 2000). Es handelte sich dabei um die 3-Methyladenin DNA-Glycosylase *MAG1* (Chen *et al.* 1990) und die Endonuklease *APN1* (Ramotar *et al.* 1991). Aus der gefundenen Additivität wurde geschlossen, dass *MPH1* kein Bestandteil der Basenexcisionsreparatur ist.

Tabelle 6: Einfluss von Mutationen aus der Basenexcisionsreparatur auf den *mph1*-Mutatorphänotyp im Canavanin vorwärtsmutationssystem.

Stamm	Mutationsrate	Faktor	Stamm	Mutationsrate	Faktor
wt	1) 2.9±0.42*10 ⁻⁷	1	<i>apn1</i>	1) 6.8±0.89*10 ⁻⁷	2
	2) 3.2±0.44*10 ⁻⁷	1	<i>apn1 mph1</i>	1) 99.6±9.3*10 ⁻⁷	35
<i>mph1</i>	1) 23.5±2.7*10 ⁻⁷	10	<i>apn1 rev3</i>	2) 3.6±0.53*10 ⁻⁷	1.1
	2) 19.4±2.2*10 ⁻⁷	6.1	<i>apn1 mph1 rev3</i>	2) 3.4±0.48*10 ⁻⁷	1.1
<i>mag1</i>	1) 2.9±0.42*10 ⁻⁷	1			
<i>mag1 mph1</i>	1) 41.1±4.3*10 ⁻⁷	14			

Gesamtzellzahl als Grundlage für die Bestimmung der Mutationsrate wurde mittels Zählkammer bestimmt. Die unterschiedlichen Experimente, in denen wt und *mph1* jeweils als interne Kontrolle mitgezogen wurden, sind durch die Indices 1)- 2) angegeben. Die Faktoren wurden durch Normalisierung der Mutantenmutationsraten zur wt-Mutationsrate in dem jeweiligen Experiment berechnet. Die Fehler geben die Standardabweichungen laut der Berechnung nach Lea und Coulson 1948 wieder.

Hier wurde nun der Mutatorphänotyp der Einzel- und Doppelmutanten untersucht. Bei den spontanen Mutationsraten fällt auf, dass die Werte für *mag1 mph1* leicht synergistisch, während sie bei *apn1 mph1* stark synergistisch erhöht sind (Tabelle 6). Durch Komplementation mit einem plasmidständigem *MPH1* konnte der *apn1 mph1* Synergismus wieder aufgehoben werden (nicht gezeigt), was bestätigt, dass der Phänotyp durch die Deletion von *MPH1* und nicht durch eine Hintergrundmutation hervorgerufen wird.

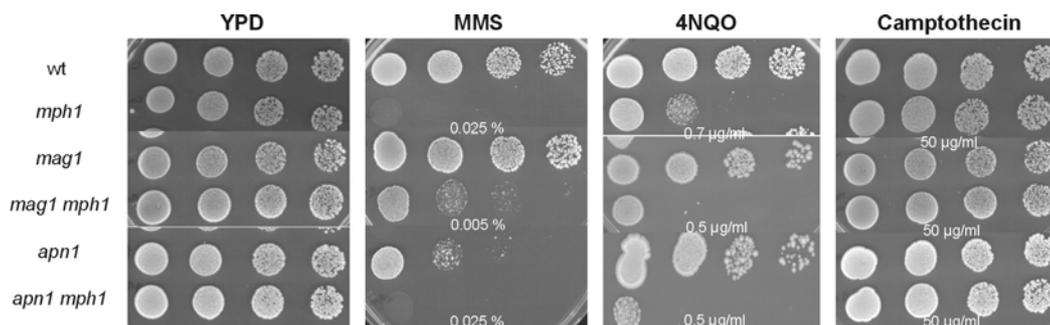


Abbildung 4: Sensitivität von Mutanten der Basenexcisionsreparatur gegenüber MMS, 4-NQO und CPT. Die jeweiligen Stämme wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, auf die Platten mit den Chemikalien getropft (Konzentration angegeben unter der jeweiligen Einzel- und Doppelmutante mit *mph1*).

Auch die Sensitivität auf MMS, 4-NQO und CPT im *Drop Dilution Assay*, bei dem die Zellen in dauerhafter Anwesenheit des Mutagens wachsen müssen, wurde untersucht. Nicht unerwartet ist besonders *mag1* und auch *apn1* gegenüber MMS stärker sensitiv als *mph1*, da gerade MMS die Schäden hervorruft, die von der Basenexcisionsreparatur bewältigt werden (Abbildung 4). Die Phänotypen der Doppelmutanten sind, wie schon in Scheller *et al.* 2000 gezeigt, additiv (vgl. auch Abbildung 5 und Abbildung 6).

Ausgehend von der Additivität bei den Sensitivitäten kann *MPH1* nicht der Basenexcisionsreparatur zugeordnet werden. Der synergistische Phänotyp bei der Mutationsrate deutet, formal gesehen, an, dass *MPH1* und die Basenexcisionsreparatur ein überlappendes Substratspektrum haben. Möglich wäre dies, wenn durch das Fehlen von *APN1* eine DNA-Läsion unrepariert bleibt, aber in Anwesenheit von *MPH1* noch fehlerfrei prozessiert werden kann. Durch den Ausfall beider Wege in der Doppelmutante mit *mph1* wird diese DNA-Läsion mutagen prozessiert.

Der spontane Mutatorphänotyp von *mph1* ist, wie in Scheller *et al.* 2000 gezeigt, von *REV3*, der katalytischen Untereinheit von Pol ζ (Nelson *et al.* 1996a), abhängig. Ist die synergistisch erhöhte spontane Mutationsrate von *apn1 mph1* ebenfalls durch verstärkte Transläsionssynthese bedingt? Dieser Annahme zufolge sollte der Synergismus in einer Tripelmutante mit *rev3* wieder aufgehoben sein. Es wurde also *apn1 rev3* und *apn1 mph1 rev3* konstruiert und der spontane Mutatorphänotyp untersucht. In der Tat, wie in Tabelle 6 aufgezeigt, ist der synergistische Phänotyp von *apn1 mph1* in der Tripelmutante mit *rev3* wieder auf den Wert des Wildtyps abgesunken. Dies bedeutet, dass die verstärkt auftretenden DNA-Läsionen in *apn1 mph1* durch Transläsionssynthese verursacht werden. Der Ausfall der drei Genprodukte führt dazu, dass diese DNA-Läsionen nicht mehr fehlerfrei über den *MPH1*-abhängigen Weg und auch nicht mehr über *REV3*-abhängige Transläsionssynthese prozessiert werden. Bei zusätzlicher DNA-Schädigung, wie im *Drop Dilution Assay* induziert, können die Zellen mit den auftretenden DNA-Läsionen nicht mehr umgehen und sterben (Abbildung 5).

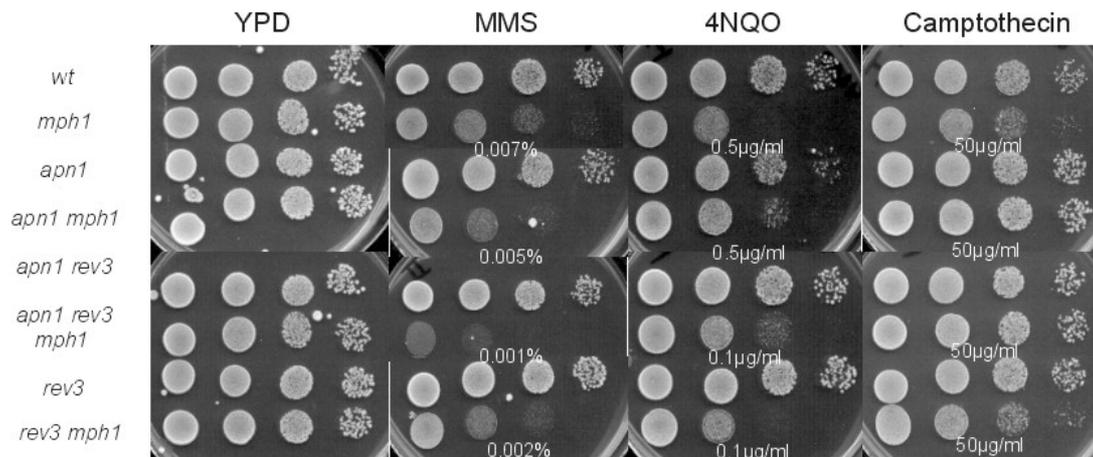


Abbildung 5: *REV3*-Abhängigkeit der Sensitivität von *apn1 mph1* gegenüber MMS, 4-NQO und CPT. Die jeweiligen Stämme wurden wie in Material und Methoden beschrieben auf die Platten mit den Chemikalien getropft (Konzentration angegeben unter der jeweiligen Einzel- und Doppelmutante mit *mph1*).

Ein synergistischer Mutatorphänotyp wurde bereits bei *rad14 mph1* beobachtet (Scheller *et al.* 2000). Rad14 wird der *RAD3*-Epistaisgruppe (Nukleotidexcisionsreparatur) zugeordnet. Die Genprodukte, die der Nukleotidexcisionsreparatur (NER) zugeordnet werden, reparieren DNA-Schäden, bei denen die Geometrie der DNA verändert ist. Hierzu zählen die UV-induzierten Schäden, wozu auch Thymindimere gehören. Der Ausfall von Genen der Nukleotidexcisionsreparatur äußert sich durch das Auftreten der Erbkrankheit *Xeroderma pigmentosum*, bei der eine extreme Lichtempfindlichkeit mit der verstärkten Ausprägung von Hautkrebs gekoppelt ist. *RAD14* kodiert für das XPA-Homolog aus Hefe (Bankmann *et al.* 1992) und ist bei der Schadenserkennung und der Aufladung weiterer NER-Faktoren beteiligt (zusammengefasst in de Laat *et al.* 1999). Im Gegensatz zur Basenexcisionsreparatur wird bei der NER nicht nur die geschädigte Base, sondern ein größeres Fragment um die Läsion herum (etwa 20 bp) heraus geschnitten, und die entstandene Lücke ebenfalls durch Neusynthese und Ligation wieder aufgefüllt. Unter der oben aufgestellten Hypothese, dass in Abwesenheit von *MPH1* spontan und induziert auftretende DNA-Läsionen in die Transläsionssynthese umgeleitet werden, sollte durch eine weitere Erhöhung der DNA-Läsionen der Mutatorphänotyp in einer *mph1*-Mutante stärker synergistisch ansteigen. Die Deletion von *APN2* sollte die Anzahl von DNA-Läsionen in der *apn1 mph1* weiter erhöhen. *APN2* kodiert neben *APN1* für eine weitere AP-Endonuklease in *Saccharomyces cerevisiae* und kann die Reparatur von spontanen und induzierten DNA-Läsionen in *apn1*-Mutanten übernehmen (Bennett 1999, Johnson *et al.* 1998).

Die verschiedenen Einzel-, Doppel- und Tripelmutanten aus *apn1*, *apn2* und *mph1* wurden konstruiert und die Mutationsraten ermittelt (Tabelle 7). Wie auch schon *apn1* zeigt *apn2* keine erhöhte Mutationsrate, da die vermehrt auftretenden DNA-Läsionen noch fehlerfrei durch andere Mechanismen repariert/umgangen werden können. Auch die Doppelmutante *apn1 apn2* zeigt in unserem Stammhintergrund (CEN.PK2) keinen Mutatorphänotyp, was nicht im Einklang mit zuvor beobachteten Daten steht (Bennett 1999). Auch wenn die relativen Raten in diesem Experiment (Tabelle 7) deut-

lich niedriger sind, wie in Tabelle 6 beschrieben, so ist der *apn1 mph1* Phänotyp dennoch deutlich synergistisch. Während *apn2* alleine keinen Einfluss auf den *mph1*-Mutatorphänotyp hat, so zeigt die Tripelmutante den bei weiten stärksten Mutatorphänotyp. Die vermutlich vermehrt auftretenden AP-sites in der *apn1 apn2*-Doppelmutante resultieren dann, in Abwesenheit von *mph1*, in einer verstärkten mutagenen Umgehung dieser DNA-Läsionen. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass *MPH1* die Funktion eines akzessorischen Faktors in der Basenexcisionsreparatur übernimmt.

Tabelle 7: Einfluss von *APN2* auf den Synergismus von *apn1 mph1* im Canavanin-vorwärtsmutationssystem.

Stamm	Mutationsrate	Faktor	Stamm	Mutationsrate	Faktor
wt	$6.3 \pm 0.89 \cdot 10^{-7}$	1	<i>apn2</i>	$8.2 \pm 1.1 \cdot 10^{-7}$	1.3
<i>mph1</i>	$39.9 \pm 4.6 \cdot 10^{-7}$	6.3	<i>apn2 mph1</i>	$32.4 \pm 3.7 \cdot 10^{-7}$	5.1
<i>apn1</i>	$6.9 \pm 0.99 \cdot 10^{-7}$	1.1	<i>apn1 apn2</i>	$5.1 \pm 0.91 \cdot 10^{-7}$	0.81
<i>apn1 mph1</i>	$117.0 \pm 12.4 \cdot 10^{-7}$	18.6	<i>apn1 apn2 mph1</i>	$212.0 \pm 23.3 \cdot 10^{-7}$	33.6

Die Faktoren wurden durch Normalisierung der Mutantenmutationsraten zur wt-Mutationsrate berechnet. Die Fehler geben die Standardabweichungen laut der Berechnung nach Lea und Coulson 1948 wieder.

Da ein synergistischer Phänotyp aber auch mit *rad14* (Scheller *et al.* 2000) beobachtet wurde, erscheint dies eher unwahrscheinlich. Auch sind *apn1* und *apn2*-Mutanten nicht sensitiv gegenüber NQO, jedoch führt die zusätzliche Deletion von *mph1* in der *apn1 apn2* Mutante zu einer Sensitivität, die vergleichbar mit der *mph1*-Einzelmutante ist (Abbildung 6). Die *apn1* und *apn2* Mutanten zeigen bzgl. der Sensitivität ein ähnliches Verhalten. Die Doppelmutante ist etwas stärker sensitiv. Dies kann daher rühren, dass für Apn2 neben der AP-Endonukleaseaktivität auch weitere enzymatische Aktivitäten gezeigt werden konnten (3'-5' Exonuklease und 3'-Phosphodiesterase, Unk *et al.* 2001), deren Ausfall in Kombination mit *apn1* diesen stärkeren Phänotyp hervorrufen. Es zeigt sich auch hier, dass *apn1*, bzw. *apn2* additiv zu *mph1* sind. Der Synergismus, der in Doppelmutanten von *mph1* mit Mutanten der Basenexcisionsreparatur und aber auch der Nukleotidexcisionsreparatur gefunden wurde, und die Additivität der Sensitivität der Basenexcisionsreparatur-Mutanten spricht gegen eine direkte Beteiligung von *MPH1* in der Basenexcisionsreparatur. Sehr viel wahrscheinlicher ist folgende Hypothese: In Anwesenheit von Mph1 werden die in *apn1*- und *apn1 apn2*-Mutanten verstärkt auftretenden DNA-Läsionen fehlerfrei umgangen. Fehlt hingegen *MPH1*, werden diese Läsionen stattdessen mutagen über Transläsionssynthese prozessiert wie die Abhängigkeit des *apn1 mph1*-Mutatorphänotyps von *REV3* zeigt (Tabelle 6).

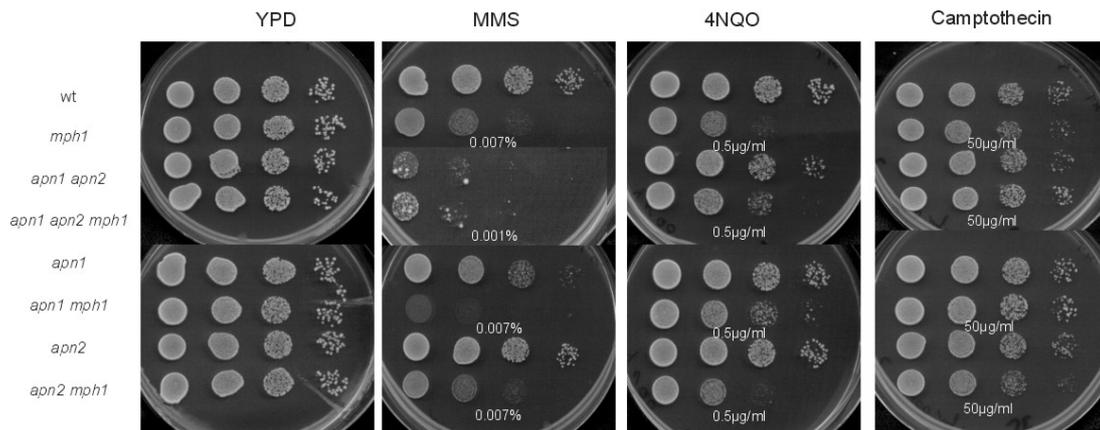


Abbildung 6: Sensitivität von Einzel-, Doppel- und Tripelmutanten von *apn1*-, *apn2*- und *mph1*- Mutanten gegenüber MMS, 4-NQO und CPT. Die jeweiligen Stämme wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, auf die Platten mit den Chemikalien getropft (Konzentration angegeben unter der jeweiligen Einzel- und Doppelmutante mit *mph1*).

Transkriptionsgekoppelte Reparatur

Die transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR) ist eine Untergruppe der Nukleotid-excisionsreparatur, die bevorzugt DNA-Läsionen, die sich im transkribierten Strang befinden und die RNA-Polymerase II hemmen, repariert. Zusätzlich zu den Proteinen der NER werden zwei weitere Proteine, Rad26/CSB (van Gool *et al.* 1994) und Rad28/CSA (Bhatia *et al.* 1996), für die TCR benötigt, die für den Austausch der Polymerase und die Rekrutierung der NER-Proteine wichtig sind (Tijsterman und Brouwer 1999). Der Ausfall beider Proteine ist, wie schon bei der Nukleotidexcisionsreparatur beschrieben mit einer Erbkrankheit, dem *Cockayne Syndrome* (Schmickel 1997), verbunden.

Tabelle 8: Einfluss von Mutationen aus der transkriptionsgekoppelten Reparatur auf den *mph1*-Mutatorphänotyp im Canavaninvorwärtsmutationssystem.

Stamm	Mutationsrate	Faktor	Stamm	Mutationsrate	Faktor
wt	1) $2.9 \pm 0.42 \cdot 10^{-7}$	1	<i>mph1</i>	1) $23.5 \pm 2.7 \cdot 10^{-7}$	8.1
	2) $1.6 \pm 0.24 \cdot 10^{-7}$	1		2) $12.4 \pm 1.5 \cdot 10^{-7}$	7.8
<i>rad26</i>	1) $1.0 \pm 0.25 \cdot 10^{-7}$	0.35	<i>rad28</i>	2) $0.7 \pm 0.44 \cdot 10^{-7}$	0.44
<i>rad26 mph1</i>	1) $27.3 \pm 3.1 \cdot 10^{-7}$	9.4	<i>rad28 mph1</i>	2) $9.3 \pm 1.1 \cdot 10^{-7}$	5.8

Gesamtzellzahl als Grundlage für die Bestimmung der Mutationsrate wurde mittels Zählkammer bestimmt. Die unterschiedlichen Experimente, in denen wt und *mph1* jeweils als interne Kontrolle mitgezogen wurden, sind durch die Indices 1)- 2) angegeben. Die Faktoren wurden durch Normalisierung der Mutantenmutationsraten zur wt-Mutationsrate in dem jeweiligen Experiment berechnet. Die Fehler geben die Standardabweichungen laut der Berechnung nach Lea und Coulson 1948 wieder.

Es wurden die *rad26* und *rad28* Einzel- und Doppelmutanten in Kombination mit *mph1* konstruiert und die Mutationsraten, sowie die Sensitivitäten untersucht. Wie in Tabelle 8 gezeigt, liegen die Mutationsraten von *rad26* und *rad28* deutlich unter dem Wildtyp-Wert. Dies könnte bedeuten, dass die Proteine neben einer Funktionen in der

TCR auch in weitere Prozesse involviert sind. Die Phänotypen der Doppelmutanten mit *mph1* ist augenscheinlich nicht auffällig.

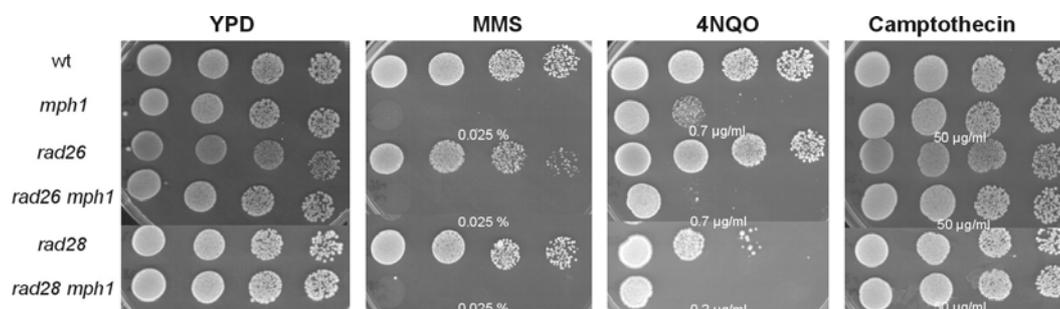


Abbildung 7: Sensitivität von Mutanten der transkriptionsgekoppelten Reparatur gegenüber MMS, 4-NQO und CPT. Die jeweiligen Stämme wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, auf die Platten mit den Chemikalien getropft (Konzentration angegeben unter der jeweiligen Einzel- und Doppelmutante mit *mph1*).

Die Ergebnisse aus den Sensitivitäten deuten am ehesten auf Additivität der Mutanten (Abbildung 7). Die Doppelmutanten zeigen eine Sensitivität, die vergleichbar mit dem Phänotyp der *mph1*-Mutante ist. Diese genetische Interaktionsstudie mit zwei Genen aus der transkriptionsgekoppelten Reparatur lassen es unwahrscheinlich erscheinen, dass *MPH1* eine Rolle in dieser Untergruppe der Nukleotidexcisionsreparatur spielt.

Doppelstrangbruchreparatur

Eine der potentiell gefährlichsten Läsionen für eine Zelle ist ein Doppelstrangbruch in der DNA. Es können ganze Chromosomen verloren gehen, wenn z. B. die Zellteilung erfolgt, bevor der Doppelstrangbruch repariert ist. Die synergistische Interaktion mit *apn1* führte zu der Hypothese, dass Mph1 für die fehlerfreie Umgehung von DNA Läsionen gebraucht wird. Experimente in *E. coli* zeigen, dass man hierfür RecA, RecBCD und RuvABC benötigt - Enzyme, die eine Rolle in der homologen Rekombination spielen (zusammengefasst in Michel 2000). Auch in Hefe und höheren Eukaryoten wird derzeit intensiv studiert, ob die homologe Rekombination bei der fehlerfreien Umgehung eine Rolle spielt. Die Funktion der homologen Rekombination wurde bisher nur in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen gesehen. Modelle zum fehlerfreien *bypass* von DNA-Läsionen erlauben jedoch Doppelstrangbruch-Intermediate (z. B. Cox *et al.* 2000, Rothstein *et al.* 2000). In Eukaryoten werden Doppelstrangbrüche neben der homologen Rekombination (HR) auch vom *non homologous end joining* (NHEJ) repariert. Die HR benötigt zur Reparatur des Doppelstrangbruches eine intakte doppelsträngige Kopie der Region, in der der Bruch aufgetreten ist. Dies kann nach der Replikation das Schwesterchromatid sein oder das homologe Chromosom in Diplonten. Bei der NHEJ erfolgt die Reparatur unabhängig von Homologiebereichen, da hier die beiden gebrochenen Enden (nach eventueller Prozessierung) wieder miteinander verknüpft werden. Allerdings ist die NHEJ in der Regel mit einem Verlust von Nukleotiden an der Bruchstelle verbunden und daher eher mutagen. Um zu überprüfen, ob *MPH1* in einer dieser Wege involviert ist, sollte

die genetische Interaktion von *mph1* mit Mutanten aus diesen beiden Wegen analysiert werden. Aus der NHEJ wurden die Gene *YKU70*, *YKU80* und *LIG4* und bei der HR zusätzlich zu *RAD52* (Scheller *et al.* 2000) die Gene *RAD51*, *RAD55* und *RAD57*, und *MRE11*, welches in beide Wege involviert ist, untersucht. Zunächst jedoch sollen die beiden Prozesse kurz beschrieben werden.

Die NHEJ-Reparatur involviert die folgenden Proteine: DNA-PK, Ku (bestehend aus den Untereinheiten Ku70 und Ku80), DNA-Ligase *LIG4* und deren Cofaktor *LIT4/XRCC4* (zusammengefasst in Barnes 2001, Valerie und Povirk 2003). Die beiden freien DNA-Enden werden von Ku70/80 (*YKU70/HDF1* und *YKU80/HDF2* in Hefe) gebunden, wodurch die DNA-Enden vor weiterem Abbau geschützt sind. Ku rekrutiert, bei höheren Eukaryoten, die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), wodurch die beiden DNA-Enden positioniert werden. In Hefe wurde allerdings bisher kein Homologes von DNA-PK identifiziert. DNA-PK wird dadurch aktiviert und kann dann verschiedene DNA-bindende Proteine phosphorylieren (Ku, WRN, XRCC4), einschließlich sich selbst, wodurch sie von den Enden der DNA abdissoziiert. Die Anlagerung von Lig4-Xrcc4 (über Ku und DNA-PK) ist für die Ligation der DNA-Enden notwendig. Eine enzymatische Prozessierung der Enden ist notwendig, wenn die terminalen Enden geschädigt oder nicht vollständig kompatibel vorliegen. Für diese Prozessierung sind vermutlich spezialisierte Polymerasen, wie Polymerase μ (Mahajan *et al.* 2002) und Pol4 (Wilson und Lieber 1999), zuständig. Auch der Mre11-Rad50-Nbs1/Xrs2-Komplex scheint eine Rolle beim *end joining* zu spielen, was jedoch bisher nur in der Bäckerhefe sicher gezeigt werden konnte (Moore und Haber 1996).

Dem MRX-Komplex werden Funktionen bei der Detektierung, Prozessierung und Reparatur von Doppelstrangbrüchen zugewiesen, was nicht nur Funktionen in der HR und der NHEJ einschließt, sondern auch im *DNA damage checkpoint* und an der Replikationsgabel direkt. Letzteres wird aus der Kollokalisierung mit PCNA geschlossen (Maser *et al.* 2001), als auch aus der synthetischen Letalität mit *RAD27* (Symington 1998, Tong *et al.* 2001). Der Komplex besteht aus drei Proteinen: Mre11, Rad50 und Xrs2 (NBS1 in Säugern, weshalb dort der Komplex mit MRN abgekürzt wird), wobei Mre11 der Komplexvermittler zu sein scheint (Johzuka und Ogawa 1995). Die Architektur des Komplexes legt nahe, dass der Komplex DNA-Enden überbrücken und damit verbinden kann, möglicherweise sogar über Schwesterchromatide hinweg (Hopfner *et al.* 2002). MRX wird nach ionisierender Bestrahlung nukleär in diskreten Foci gefunden, die mit Doppelstrangbrüchen assoziiert sind (Maser *et al.* 1997). Für die Rekrutierung des Komplexes an Stellen von Doppelstrangbrüchen ist die Histonvariante H2A (Paull *et al.* 2000) sowie BLM (Franchitto und Pichierri 2002) notwendig. Diese beiden selbst, wie auch der MRN-Komplex werden ATM/ATR-abhängig phosphoryliert, was die Verknüpfung mit dem *DNA damage checkpoint* andeutet. Die Verbindung zum *DNA damage checkpoint* über NBS1 (Xrs2) wird durch die Tatsache unterstützt, dass beide Proteine sogenannte FHA-Domänen besitzen (Varon *et al.* 1998). NBS1 besitzt zusätzlich auch eine BRCT-Domäne (Bork *et al.* 1997), die besonders für Proteininteraktionen innerhalb des *DNA damage checkpoint* öfters zu finden sind (siehe auch Kapitel *DNA damage checkpoint*). Für den MRN-Komplex wird diskutiert, ob er bei der homologen Rekombination die Funktion der Nuklease, die die Doppelstrangbruchenden prozessiert, wahrnimmt. Biochemisch wurden für Mre11 eine einzelstrangabhängige Endonukleaseaktivität und eine schwache

3'-5' Exonukleaseaktivität gezeigt (Paull und Gellert 1998; Furuse *et al.* 1998). Eine Rolle von Mre11 beim Prozessieren der Doppelstrangbruch-Enden zu einem DNA-Doppelstrang mit 3'-Einzelstrangüberhang scheinen durch diese *in vitro* Aktivität eher unwahrscheinlich, weil dafür eine 5'-3' Exonuklease benötigt würde. Mutanten von *mre11*, *rad50* oder *xrs2* zeigen keine Defekte in der heteroallelischen HR in Diplonten im Vergleich zu Wildtypzellen (Ivanov *et al.* 1992, Ajimura *et al.* 1993), sondern nur in der IR-induzierten Schwesterchromatidrekombination (Bressan *et al.* 1999). Es stellt sich damit immer mehr heraus, dass die zentrale Rolle des MRX/N-Komplexes in der Koordination von DNA-Replikation und *DNA damage checkpoint* zu liegen scheint (D'Amours und Jackson 2002). Der Ausfall von eines der Proteine dieses Komplexes beeinträchtigt damit wahrscheinlich nicht nur den Ausfall eines Reparaturweges, sondern ist von größerer Bedeutung, was durch die embryonale Letalität von *knock out* Mäusen von Mre11, Rad50 und Nbs1 unterunterstützt wird (Luo *et al.* 1999, Xiao und Weaver 1997, Zhu *et al.* 2001).

Für die homologe Rekombination werden bisher zwei hauptsächliche Funktionen diskutiert: Zum einen werden die Homologenpaare bei der Meiose vermutlich durch HR identifiziert und die nach Rekombination gebildeten Chiasmata dienen der korrekten Segregation der homologen Chromosomen in der Meiose I. In der Mitose dient die HR hauptsächlich der fehlerfreien Reparatur von Doppelstrangbrüchen, wie sie z. B. nach IR-Bestrahlung auftreten. Auch aktiv herbeigeführte Doppelstrangbrüche werden repariert, wie sie z. B. beim *mating type switch* in Hefe und der VDJ-Rekombination zur Ausbildung der Immunglobulindiversität in höheren Eukaryoten, und vermutlich auch bei der Reinitiation von arretierten Replikationsgabeln (Symington 2002, Paques und Haber 1999), vorkommen.

Es werden derzeit mehrere Modelle diskutiert, wie Doppelstrangbrüche durch HR repariert werden können (zusammengefasst in Symington 2002). Der erste Schritt hierbei ist die Erzeugung eines einzelsträngigen 3'-Überhanges. Beim Doppelstrangbruchreparaturmodell (DSBR, Szostak-Modell) invadiert das 3'-Ende die homologe Region unter Ausbildung eines *displacement loop* (*D-loop*). Der *D-loop* vergrößert sich in Folge der Strangverlängerung des invadierten Stranges und kann außerdem mit der anderen Seite des Doppelstrangbruches paaren, wodurch die DNA-Synthese des anderen, nicht invadierten 3'-Endes erfolgen kann. Hierbei bildet sich eine doppelte *Holliday-Junction*, die durch Schneiden von Resolvasen aufgelöst werden kann. Allerdings ist festzuhalten, dass in Hefe bisher keine nukleäre Resolvase identifiziert werden konnte.

Beim *synthesis-dependent strand annealing*-Modell (SDSA) erfolgen die ersten Schritte analog zum DSBR-Modell. Nach der Stranginvasion und der Verlängerung des invadierten Stranges wandert der *D-loop* mit der neusynthetisierten DNA. Der verlängerte DNA-Strang kann nach der Verdrängung vom Donorstrang mit dem anderen, nicht invadierten 3'-Ende paaren, wodurch auch dieser verlängert werden kann und der Doppelstrangbruch repariert ist. Man unterscheidet des weiteren noch das *break induced replication*-Rekombinationsmodell (BIR) und das *single strand annealing*-Modell (SSA). Bei der BIR invadiert analog wie oben beschrieben ein 3'-Überhang den Donorstrang und wird bis zum Ende des Chromosoms verlängert. Die SSA-Rekombination, die potentiell mutagen ist, ist beschränkt auf Reparatur von Doppelstrangbrüchen an *direct repeat*. Der Doppelstrangbruch wird ebenfalls zu 3'-

Überhängen prozessiert. Wenn jedoch dieses Zurechtschneiden über den Bereich des *repeat* hinausgeht, kann die homologe Paarung der beiden 3'-Einzelstrangenden mit dem jeweiligen noch verbleibenden *repeat* auf dem anderen Strang erfolgen, was dann zum Verlust eines *repeat* führt. Die noch überhängenden 3'-Enden können endonukleolytisch abgebaut werden und die Stränge durch Ligation verknüpft werden. Alle Modelle sind schematisch wiedergegeben in Paques und Haber 1999.

Für die Schritte nach Bildung des 3'-Überhanges werden die Proteine der RAD52-Epistasisgruppe (Rad51, Rad52, Rad54, Rad55, Rad57, Rad59) benötigt. RAD52 ist der Namensgeber der Epistasisgruppe, weil dessen Mutanten den stärksten Phänotyp haben, obwohl es keine embryonale Letalität in Mäusen hervorruft (Rijkers *et al.* 1998). Rad52 wird während des ganzen Zellzyklus exprimiert (Cole *et al.* 1987), ist jedoch speziell nach ionisierender Bestrahlung in der S-Phase in diskreten nukleären Foci lokalisiert (Lisby *et al.* 2001). Es bindet präferentiell ss-DNA-Enden und fördert das Anlagern eines komplementären Einzelstranges, weshalb es vermutlich für das SSA benötigt wird (Mortensen 1996). Rad52 interagiert mit Rad51 und dem Einzelstrangbindepotein RPA (Milne und Weaver 1993, Hays *et al.* 1998). Es wird postuliert, dass Rad52 RPA, welches möglicherweise Sekundärstrukturen von den ss-DNA-Enden entfernt (Sugiyama *et al.* 2002), gegen Rad51 austauscht, bzw. die Anlagerung von Rad51 erleichtert (Sung und Sung, 2000, Sugiyama *et al.* 2002). Rad51, Rad55 und Rad57 sind RecA-Homologe (Kans und Mortimer 1991, Lovett 1994), wobei Rad51 die größte Ähnlichkeit zu RecA besitzt (Basile *et al.* 1992). Rad51 ist in Säugern essentiell (Lim und Hasty 1996), was möglicherweise durch die postulierte Funktion bei der Wiederaufnahme von arretierten Replikationsgabeln erklärt werden kann. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass das Protein verstärkt in der S-Phase exprimiert wird (Tashiro *et al.* 1996, Basile *et al.* 1992). Rad51 bindet mit hoher Affinität an Einzelstrang-DNA und bildet einen kettenartigen Nukleoprotein-Komplex, dessen Ausbildung durch RPA beeinflusst wird (Mazin *et al.* 2000b, Mc Ilwraith *et al.* 2000, Sung 1997a). Das Rad51-Filament kann mit einem zweiten DNA-Molekül interagieren. Ein Schritt, der für die Stranginvasion und Homologiesuche bei der HR notwendig ist. Durch *Two Hybrid* konnte gezeigt werden, dass Rad51 mit sich selbst (Filamentbildung), Rad52, Rad54 und Rad55 interagiert (Clever *et al.* 1997, Hays *et al.* 1995). Für die Bildung des Filaments werden, wie oben erwähnt, Rad52 und RPA benötigt, aber auch ein Heterodimer aus Rad55 und Rad57 (New *et al.* 1998, Sung 1997b, Sugawara *et al.* 2003). Die unterstützende Rolle von Rad55 und Rad57 liegt wahrscheinlich in der Bildung und/oder Stabilisierung des Rad51-ss-DNA-Filamentes (Hays *et al.* 1995, Johnson und Symington 1995, Fortin und Symington 2002). Rad54 ist eine DNA-abhängige ATPase und Helikase (Eisen *et al.* 1995), die - stimuliert durch das Rad51-Filament - entlang einer DNA-Duplex wandern kann (Mazin *et al.* 2000a, Alexeev *et al.* 2003). Es wird angenommen, dass der DNA-Doppelstrang transient durch Rad54 getrennt wird und dadurch die *D-loop*-Bildung ermöglicht wird (Van Komen *et al.* 2000). Rad59 ist Homolog zu Rad52 und interagiert mit diesem (Davis und Symington 2001, Davis und Symington 2003). Über sein Funktion ist derzeit nicht viel bekannt, möglicherweise hat es überlappende Funktionen zu Rad52.

MPH1 zeigt keine Interaktion mit der NHEJ

Um eine Beteiligung von *MPH1* in der Doppelstrangbruchreparatur im *non homologous end joining* zu prüfen, wurde die genetische Interaktion von *mph1* mit *yku70* und *yku80* und *lig4* untersucht. Die Einzel- und Doppelmutanten wurden bzgl. des Mutatorphänotyps und der Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien untersucht.

Tabelle 9: Einfluss von Mutationen aus dem *non homologous end joining* auf den *mph1*-Mutatorphänotyp im Canavaninvorwärtsmutationssystem.

Stamm	Mutationsrate	Faktor	Stamm	Mutationsrate	Faktor
wt	1) $2.7 \pm 0.4 \cdot 10^{-7}$	1	<i>yku70</i>	1) $1.6 \pm 0.25 \cdot 10^{-7}$	0.59
	2) $3.1 \pm 0.61 \cdot 10^{-7}$	1	<i>yku70 mph1</i>	1) $29.4 \pm 3.3 \cdot 10^{-7}$	10.9
	3) $2.9 \pm 0.43 \cdot 10^{-7}$	1	<i>yku80</i>	2) $2.3 \pm 0.38 \cdot 10^{-7}$	0.74
<i>mph1</i>	1) $31.2 \pm 3.6 \cdot 10^{-7}$	11.6	<i>yku80 mph1</i>	2) $35.0 \pm 4.0 \cdot 10^{-7}$	11.3
	2) $46.2 \pm 5.3 \cdot 10^{-7}$	14.9	<i>lig4</i>	3) $4.1 \pm 0.59 \cdot 10^{-7}$	1.4
	3) $38.5 \pm 4.2 \cdot 10^{-7}$	13.3	<i>lig4 mph1</i>	3) $36.1 \pm 4.1 \cdot 10^{-7}$	12.4

Die unterschiedlichen Experimente, in denen wt und *mph1* jeweils als interne Kontrolle mitgezogen wurden, sind durch die Indices 1)- 3) angegeben. Die Faktoren wurden durch Normalisierung der Mutantenmutationsraten zur wt-Mutationsrate in dem jeweiligen Experiment berechnet. Die Fehler geben die Standardabweichungen laut der Berechnung nach Lea und Coulson 1948 wieder.

Die Mutationsraten, wie in Tabelle 9 gezeigt, deuten auf keine Beteiligung von *MPH1* im *non homologous end joining*. Die Phänotypen der Doppelmutanten zeigen ein additives Verhalten, auch wenn der Wert im Falle von *yku80 mph1* etwas darunter liegt. Bemerkenswert ist, dass die Mutationsraten von *yku70* und *yku80* kleiner der des Wildtyps sind.

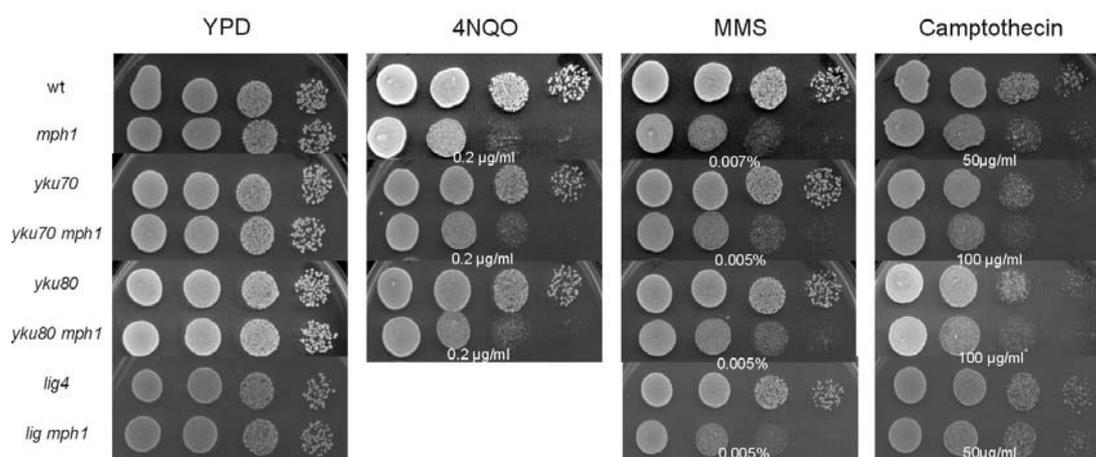


Abbildung 8: Sensitivität von Mutanten des *non homologous end joining* gegenüber MMS, 4-NQO und CPT. Die jeweiligen Stämme wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, auf die Platten mit den Chemikalien getropft (Konzentration angegeben unter der jeweiligen Einzel- und Doppelmutante mit *mph1*).

Da, wie vorn beschrieben, in einigen Fällen die enzymatische Prozessierung der Doppelstrangbrüchenden durch spezialisierte Polymerasen notwendig ist, kann spekuliert werden, dass auch Ku Einfluss auf die Wirkungsweise der Transläsionspolymerase ζ nimmt, die für einen Großteil spontan auftretender DNA-Läsionen in Hefe von Bedeutung ist (Harfe und Jinks-Robertson 2000).

Aber auch bei den Sensitivitäten (Abbildung 8) der Mutanten des *non homologous end joining* gegenüber den verschiedenen DNA-schädigenden Agenzien zeigen sich keine Auffälligkeiten. Die jeweiligen Doppelmutanten zeigen eine Sensitivität, die am ehesten als Additivität einstuftbar ist.

Beide Untersuchungen legen mit großer Wahrscheinlichkeit nahe, dass *MPH1* nicht in die Prozessierung von Substraten des *non homologous end joining* involviert ist.

mph1 ist hypostatisch zu *rad51*, *rad52* und *rad55*

Doppelstrangbrüche können, wie oben ausführlich erläutert, durch die Proteine der homologen Rekombination repariert werden. Während bei früheren Bestimmungen der Mutationsrate von *rad52 mph1* eine Additivität beobachtet wurde (Scheller *et al.* 2000), zeigen die in dieser Arbeit mehrfach wiederholten Messungen, dass *rad52* wohl eher epistatisch zu *mph1* ist (Tabelle 10). Dies wird auch durch die Bestimmung der Sensitivität gegenüber MMS, 4-NQO und CPT gestützt (Abbildung 9, Scheller *et al.* 2000).

Tabelle 10: Einfluss von *rad52* auf den *mph1*-Mutatorphänotyp im Canavanin-vorwärtsmutationssystem.

Stamm	Mutationsrate	Faktor	Stamm	Mutationsrate	Faktor
wt	1) $4.2 \pm 0.57 \cdot 10^{-7}$	1	<i>rad52</i>	1) $37.6 \pm 4.4 \cdot 10^{-7}$	8.9
	2) $1.0 \pm 0.17 \cdot 10^{-7}$	1		2) $5.5 \pm 0.8 \cdot 10^{-7}$	5.5
	3) $2.9 \pm 0.44 \cdot 10^{-7}$	1		3) $44.3 \pm 5.5 \cdot 10^{-7}$	15.3
	4) $12.7 \pm 2.1 \cdot 10^{-7}$	1		4) $126.0 \pm 16.3 \cdot 10^{-7}$	9.9
	5) $3.6 \pm 0.50 \cdot 10^{-7}$	1		5) $36.3 \pm 4.2 \cdot 10^{-7}$	10.1
	6) $4.0 \pm 0.6 \cdot 10^{-7}$	1		6) $30.8 \pm 4.1 \cdot 10^{-7}$	7.7
	7) $5.5 \pm 0.77 \cdot 10^{-7}$	1		7) $63.8 \pm 7.8 \cdot 10^{-7}$	11.6
<i>mph1</i>	1) $29.5 \pm 3.3 \cdot 10^{-7}$	7	<i>rad52 mph1</i>	1) $44.4 \pm 5.2 \cdot 10^{-7}$	10
	2) $4.6 \pm 0.62 \cdot 10^{-7}$	4.6		2) $7.2 \pm 1.0 \cdot 10^{-7}$	7.2
	3) $30.1 \pm 3.6 \cdot 10^{-7}$	10.4		3) $37.9 \pm 4.7 \cdot 10^{-7}$	13.1
	4) $86.6 \pm 9.9 \cdot 10^{-7}$	6.8		4) $70.2 \pm 9.3 \cdot 10^{-7}$	5.5
	5) $24.4 \pm 2.7 \cdot 10^{-7}$	6.7		5) $34.2 \pm 4.1 \cdot 10^{-7}$	9.5
	6) $21.2 \pm 2.7 \cdot 10^{-7}$	5.3		6) $18.4 \pm 2.5 \cdot 10^{-7}$	4.6
	7) $30.3 \pm 4.3 \cdot 10^{-7}$	5.5		7) $50.1 \pm 6.3 \cdot 10^{-7}$	9.1

Die unterschiedlichen Experimente, in denen wt und *mph1* jeweils als interne Kontrolle mitgezogen wurden, sind durch die Indices 1)- 7) angegeben. Die Faktoren wurden durch Normalisierung der Mutantenmutationsraten zur wt-Mutationsrate in dem jeweiligen Experiment berechnet. Die Fehler geben die Standardabweichungen laut der Berechnung nach Lea und Coulson 1948 wieder.

Um die Verknüpfung von *mph1* mit der Reparatur von Doppelstrangbrüchen weiter zu verifizieren wurde die genetische Interaktion mit weiteren Proteinen der HR, und zwar mit *rad51*, *rad55*, *rad54* und *rad57* untersucht. Tabelle 11 zeigt eine Zusammen-

fassung aller Mutationsraten. Wie bereits bei *rad52* beschrieben, ist *mph1* epistatisch zu *rad51* und *rad55*. *rad54* zeigt wie die anderen Mutanten der HR selbst eine erhöhte Mutationsrate, in der Doppelmutante ist die Mutationsrate fast additiv zu den beiden Einzelmutanten. *rad57* verhält sich als einziges Gen anders. Die Mutationsrate liegt unterhalb von der des Wildtyps. Außerdem wird die Mutationsrate in der Doppelmutante deutlich unter den *mph1*-Wert erniedrigt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Einfluss von Mutationen aus der homologen Rekombination auf den *mph1*-Mutatorphänotyp im Canavaninvorwärtsmutationssystem

Stamm	Mutationsrate	Faktor	Stamm	Mutationsrate	Faktor
wt	1) $3.0 \pm 0.43 \cdot 10^{-7}$	1	<i>rad51</i>	1) $28.3 \pm 3.3 \cdot 10^{-7}$	9.4
	2) $4.2 \pm 0.56 \cdot 10^{-7}$	1		2) $41.6 \pm 4.5 \cdot 10^{-7}$	9.9
	3) $4.0 \pm 0.60 \cdot 10^{-7}$	1	<i>rad51 mph1</i>	1) $30.8 \pm 3.6 \cdot 10^{-7}$	10.3
	4) $12.7 \pm 2.1 \cdot 10^{-7}$	1		2) $37.4 \pm 4.1 \cdot 10^{-7}$	8.9
	5) $2.5 \pm 0.34 \cdot 10^{-7}$	1	<i>rad55</i>	3) $30.5 \pm 3.4 \cdot 10^{-7}$	7.6
<i>mph1</i>	1) $25.5 \pm 2.9 \cdot 10^{-7}$	8.5	<i>rad55 mph1</i>	3) $30.9 \pm 3.5 \cdot 10^{-7}$	7.7
	2) $27.8 \pm 3.0 \cdot 10^{-7}$	6.6	<i>rad57</i>	4) $8.7 \pm 1.2 \cdot 10^{-7}$	0.68
	3) $21.2 \pm 2.7 \cdot 10^{-7}$	5.3	<i>rad57 mph1</i>	4) $42.4 \pm 5.0 \cdot 10^{-7}$	3.3
	4) $86.6 \pm 9.9 \cdot 10^{-7}$	6.8	<i>rad54</i>	5) $23.2 \pm 2.7 \cdot 10^{-7}$	9.3
	5) $17.4 \pm 1.1 \cdot 10^{-7}$	7.0	<i>rad54 mph1</i>	5) $31.6 \pm 3.6 \cdot 10^{-7}$	12.6

Die unterschiedlichen Experimente, in denen wt und *mph1* jeweils als interne Kontrolle mitgezogen wurden, sind durch die Indices 1)- 5) angegeben. Die Faktoren wurden durch Normalisierung der Mutantenmutationsraten zur wt-Mutationsrate in dem jeweiligen Experiment berechnet. Die Fehler geben die Standardabweichungen laut der Berechnung nach Lea und Coulson 1948 wieder.

In Abbildung 9 sind die Sensitivitäten dieser Mutanten gezeigt. Neben der beobachteten Epistasie von *rad52* zu *mph1* (Scheller *et al.* 2000), zeigt sich, dass auch *rad51*, *rad55* und *rad54* epistatisch zu *mph1* sind. Wiederum fällt *rad57* aus der Gruppe heraus: *rad57* ist nicht sensitiver als der Wildtyp und die Doppelmutante ist additiv.

Die Mutationsraten und die Sensitivitäten zeigen, dass *mph1* hypostatisch zu Mutanten der homologen Rekombination ist. Diese Epistasie deutet an, dass Mph1 als auch die Proteine der HR an der Prozessierung des gleichen Substrates, nämlich Doppelstrangbrüchen, beteiligt sind. Doppelstrangbrüche treten, wie eingangs beschrieben, bei der Meiose auf. Eine Rolle von *MPH1* bei der Prozessierung von Doppelstrangbrüchen in der Meiose ist eher unwahrscheinlich, da die Sporenüberlebensrate in *mph1*-Mutanten in etwa der von Wildtypzellen entspricht (Scheller *et al.* 2000). Eine Rolle von *MPH1* in der „klassischen“ Doppelstrangbruch-Reparatur erscheint auch unwahrscheinlich, da *mph1*-Zellen nicht sensitiv gegenüber IR sind (Scheller *et al.* 2000). Außerdem lassen sich Deletionsmutanten im *mph1*-Stammhintergrund nicht merklich schwieriger als mit Wildtypzellen konstruieren. Der *rad57*-Phänotyp hebt sich von den anderen Phänotypen ab. Rad57 wirkt als Heterodimer mit Rad55 bei der Stabilisierung des Rad51-ss-DNA-Filamentes mit, wobei Rad55 die Interaktion zu Rad51 herstellt und dadurch Rad57 indirekt an den Komplex gebunden wird (Johnson und Symington 1995). Man mag spekulieren, dass die Epistasie von *mph1* nur zu den Mutanten der HR beobachtbar ist, die direkt bei der Ausbildung und Stabilisierung des

Rad51-ss-DNA Filamentes eine Rolle spielen. Der Ausfall von *RAD52* oder *RAD55* würde die Bildung des Rad51-ss-DNA-Filamentes entweder verhindern oder destabilisieren, wodurch der Phänotyp von *rad51* beobachtbar ist. Der Ausfall von *RAD57* sollte dann primär den *mph1*-Phänotyp nicht beeinträchtigen, was bei den Sensitivitäten auch beobachtet werden kann (Abbildung 9). Die erniedrigte Mutationsrate von *rad57* in unserem Stammhintergrund steht nicht im Einklang mit Literaturdaten (Ratray *et al.* 2002). Eine Hintergrundmutation kann derzeit nicht ausgeschlossen werden.

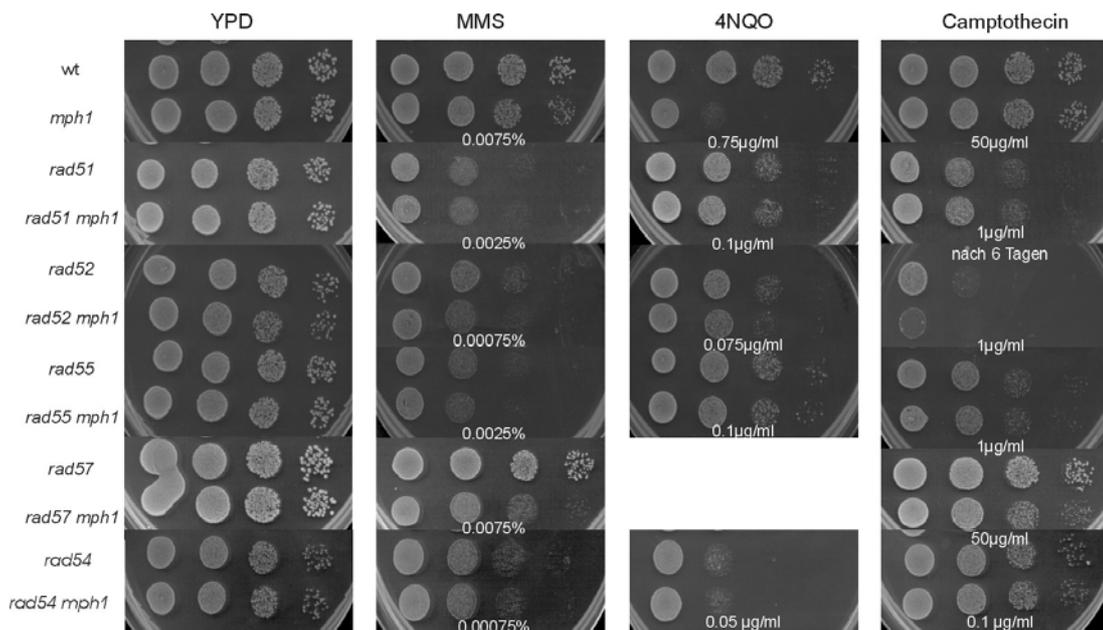


Abbildung 9: Sensitivität von Mutanten der homologen Rekombination gegenüber MMS, 4-NQO und CPT. Die jeweiligen Stämme wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, auf die Platten mit den Chemikalien getropft (Konzentration angegeben unter der jeweiligen Einzel- und Doppelmutterante mit *mph1*).

MPH1 ist nicht defekt in der mitotischen Rekombination

Obwohl die bereits erwähnten Phänotypen von *mph1* (Sporenüberlebensrate, fehlende IR-Sensitivität) gegen eine Involvierung von *MPH1* in der Meiose bzw. der „klassischen“ HR sprechen, wurde untersucht, ob *mph1*-Mutanten Defekte in der heteroallelicen mitotischen Rekombination zeigen. Würde die Verknüpfung von *MPH1* mit der HR in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen liegen, dann sollte die spontane mitotische Rekombination, wie auch in den HR-Mutanten, beeinträchtigt sein. Man erwartete dann einen Hyporekombinationsphänotyp für *mph1*. Die mitotische Rekombination von *mph1*-Diplonten wurde wie in Dora *et al.* 1999 beschrieben (S. 32), gemessen. Die jeweiligen Haplonten (NLBL1 und NLBL3) tragen unterschiedliche Allele von verschiedenen Markern, für die sie auxotroph sind. Nur die Diplonten können unter den jeweiligen Selektivbedingungen Kolonien hervorbringen, wenn bei einem der Allele die Wildtypsequenz wieder hergestellt wurde, was durch homologe Rekombination (z. B. nach dem erläuterten Modell der DSBR) möglich ist. Die Rekombinationsrate von *mph1*-Diplonten wurde für drei verschiedene hetero-

allelische Marker untersucht. Um zu zeigen, dass mit diesem System bereits bekannte Phänotypen reproduziert werden können, wurde *sgs1*, für das ein Hyperrekombinationsphänotyp bekannt ist (Watt *et al.* 1996), innerhalb der Versuchsreihe mitgeführt und auch die *mph1 sgs1*-Mutante untersucht.

Tabelle 12: Spontane mitotische Rekombinationsrate von homozygoten Wildtyp-, *mph1*-, *sgs1*- und *sgs1 mph1*-Diplonten.

Diplont	<i>HIS7</i>		<i>LYS2</i>		<i>MET13</i>	
	Rate	Faktor	Rate	Faktor	Rate	Faktor
Wildtyp	$1.9 \pm 0.31 \cdot 10^{-7}$	1	$9. \pm 1.3 \cdot 10^{-7}$	1	$15.9 \pm 1.9 \cdot 10^{-7}$	1
<i>mph1</i>	$2.2 \pm 0.35 \cdot 10^{-7}$	1.2	$17.6 \pm 2.2 \cdot 10^{-7}$	1.8	$19.9 \pm 2.4 \cdot 10^{-7}$	1.3
<i>sgs1</i>	$36.2 \pm 4.6 \cdot 10^{-7}$	19.1	$58.3 \pm 6.1 \cdot 10^{-7}$	6.0	$108 \pm 12 \cdot 10^{-7}$	6.8
<i>sgs1 mph1</i>	$67.0 \pm 7.9 \cdot 10^{-7}$	35.3	$133 \pm 14 \cdot 10^{-7}$	13.7	$189 \pm 20 \cdot 10^{-7}$	11.9

Die Faktoren wurden durch Normalisierung der Mutantenrekombinationsrate zu der des Wildtyps berechnet. Die Diplonten wurden aus NLBL1 und NLBL3-Derivaten konstruiert (vgl. S. 32). Die Fehler geben die Standardabweichungen laut der Berechnung nach Lea und Coulson 1948 wieder.

In Tabelle 12 sind die spontanen mitotischen Rekombinationsraten von *mph1*, *sgs1* und *sgs1 mph1* gezeigt. Bei *sgs1* ist die Rekombinationsrate bei den drei untersuchten Markern jeweils größer als die des Wildtyps. Der Hyperrekombinationsphänotyp konnte damit reproduziert werden. Da dieser Phänotyp durch eine zusätzliche Deletion der homologen Rekombination wieder aufgehoben werden kann (Onoda *et al.* 2001), wurde für Sgs1 eine antirekombinogene Funktion postuliert. Für die *mph1*-Mutante konnte eine Rekombinationsrate beobachtet werden, die mit der des Wildtyps vergleichbar ist. Bemerkenswert ist der synergistische Anstieg der mitotischen Rekombinationsrate in der *sgs1 mph1*-Mutante. *mph1* zeigt einen Hyperrekombinationsphänotyp im *sgs1*-Stammhintergrund. Anders ausgedrückt: Das Vorhandensein von Sgs1 kann den Hyperrekombinationsphänotyp von *mph1* unterdrücken. *sgs1*-Haplonten zeigen neben der erhöhten heteroallelischen Rekombinationsrate auch einen erhöhten Schwesterchromatidaustausch (SCE) (Onoda *et al.* 2000), das heißt, in *SGS1*-Zellen findet der Austausch von genetischem Material vom Schwesterchromatid weniger statt. Dies könnte andeuten, dass die rekombinative Auflösung des in *mph1*-Zellen auftretenden Substrates (unter Zuhilfenahme der Proteine der homologen Rekombination und der Information vom Schwesterchromatid) durch die Anwesenheit von Sgs1 unterdrückt wird. Im *sgs1*-Hintergrund wird dieses Substrat dann rekombinativ prozessiert.

mph1 zeigt keinen Hyporekombinationsphänotyp, wodurch die Hypothese, dass *MPH1* nicht in der „klassischen Reparatur“ von Doppelstrangbrüchen beteiligt ist, bekräftigt werden kann. Wahrscheinlicher ist eine Rolle von *MPH1* in einem Weg, der den Informationsaustausch vom Schwesterchromatid fördert, wobei die Proteine der homologen Rekombination involviert sind. In *mph1*-Diplonten wird kein Effekt beobachtet, weil die Rekombination zwischen den homologen Chromosomen nicht beeinträchtigt ist und Sgs1 bevorzugt den Schwesterchromatidaustausch verhindert. In *sgs1 mph1*-Diplonten käme es dann zu dem ausgeprägten Hyperrekombinationsphänotyp, weil der Schwesterchromatidaustausch nicht mehr verhindert würde.

MPH1 und *MRE11*

Für den MRX-Komplex wird postuliert, dass seine Bedeutung in der Reparatur und der Signalweiterleitung von Doppelstrangbrüchen liegt, speziell solchen, die bei der Replikation auftreten (D'Amours und Jackson 2002). Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass *mre11*, *rad50* und *xrs2*-Zellen zwar sensitiv gegenüber IR sind, was zunächst zu deren Einordnung in die *RAD52*-Epistasisisgruppe führte, aber keinen Defekt in der spontanen mitotischen heteroallelischen Rekombination zeigen. Vielmehr zeigen die Diplonten einen Hyperrekombinationsphänotyp. Ein solcher Effekt wurde für Proteine postuliert, die eine Rolle beim Informationsaustausch vom Schwesterchromatid spielen. In den diploiden Mutanten könnte die DNA-Läsionen durch die Information des homologen Chromosoms umgangen werden (Alani *et al.* 1990, Bressan *et al.* 1998, Ivanov *et al.* 1992). Dieselbe Erklärung könnte auch für den Hyperrekombinationsphänotyp von *mph1* im *sgs1*-Hintergrund zutreffen.

Tabelle 13: Einfluss von *mre11* auf den *mph1*-Mutatorphänotyp im Canavanin-vorwärtsmutationssystem.

Stamm	Mutationsrate	Faktor	Stamm	Mutationsrate	Faktor
wt	1) $4.5 \pm 0.59 \cdot 10^{-7}$	1	<i>mre11</i>	1) $12.3 \pm 1.6 \cdot 10^{-7}$	2.7
	2) $3.7 \pm 0.51 \cdot 10^{-7}$	1		2) $22.5 \pm 2.1 \cdot 10^{-7}$	6.1
	3) $2.5 \pm 0.4 \cdot 10^{-7}$	1		3) $16.1 \pm 2.0 \cdot 10^{-7}$	6.4
<i>mph1</i>	1) $27.7 \pm 3.4 \cdot 10^{-7}$	6.2	<i>mre11 mph1</i>	1) $58.5 \pm 6.7 \cdot 10^{-7}$	13.0
	2) $24.1 \pm 2.7 \cdot 10^{-7}$	6.5		2) $74.4 \pm 8.8 \cdot 10^{-7}$	20.1
	3) $12.4 \pm 1.6 \cdot 10^{-7}$	5.0		3) $44.6 \pm 5.4 \cdot 10^{-7}$	17.8

Die unterschiedlichen Experimente, in denen wt und *mph1* jeweils als interne Kontrolle mitgezogen wurden, sind durch die Indices 1)- 3) angegeben. Die Faktoren wurden durch Normalisierung der Mutantenmutationsraten zur wt-Mutationsrate in dem jeweiligen Experiment berechnet. Die Fehler geben die Standardabweichungen laut der Berechnung nach Lea und Coulson 1948 wieder.

Für die Untersuchung der genetischen Interaktion von *mre11* und *mph1* wurde von den jeweiligen Mutanten zunächst die Mutationsrate bestimmt (Tabelle 13). Die *mre11*-Mutante zeigt in unserem Stammhintergrund (CEN.PK2) den bereits in der Literatur beschriebenen Wachstumsdefekt (nicht gezeigt, Ajimura *et al.* 1993). Außerdem konnte der Mutatorphänotyp von *mre11* reproduziert werden (Chen und Kolodner, 1999). Der Mutatorphänotyp der Doppelmutante ist synergistisch zu *mre11* und *mph1*. Wenn man für Mre11 annimmt, dass es beim Zusammenhalten von Schwesterchromatiden eine Rolle spielt (Hopfner *et al.* 2002), dann sollte in *mre11* Mutanten die Umgehung von DNA-Läsionen über den Informationsaustausch des Schwesterchromatids schlechter möglich sein, und dafür - wie der Mutatorphänotyp andeutet - über Transläsionssynthese erfolgen. In *mph1*-Mutanten werden DNA-Läsionen ebenfalls mutagen umgangen (Scheller *et al.* 2000). Wir postulieren nun, dass für die Umgehung von DNA-Läsionen über den Informationstransfer vom Schwesterchromatid ebenfalls Mph1 benötigt wird. Der Ausfall von zwei Proteinen, die in diesem Prozess involviert sind, führt dann zu dem beobachteten synergistischen Mutatorphänotyp.

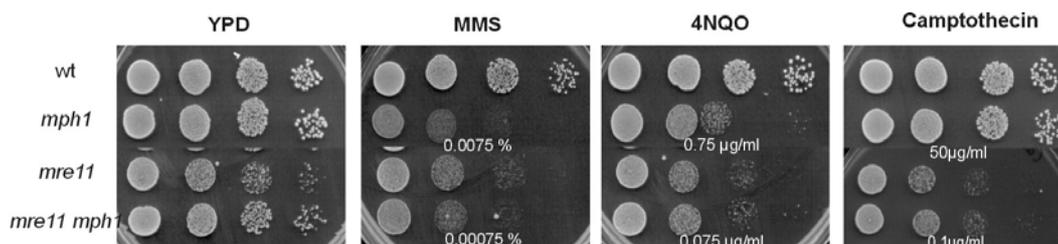


Abbildung 10: Sensitivität von *mre11* und *mre11 mph1* gegenüber MMS, 4-NQO und CPT. Die jeweiligen Stämme wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, auf die Platten mit den Chemikalien getropft (Konzentration angegeben unter der jeweiligen Einzel- und Doppelmutante mit *mph1*).

Bei den Sensitivitäten zeigt sich, dass *mph1* epistatisch zu *mre11* ist. Durch die Dauerinkubation der Mutanten mit den DNA-schädigenden Agenzien müssen die Zellen nicht nur mit spontan auftretenden Schäden, sondern auch mit den zusätzlich herbeigeführten DNA-Läsionen umgehen. Hierbei entstehen Schäden, wie z. B. Doppelstrangbrüche, für die Mph1 und im besonderen Mre11 benötigt werden, wie die Sensitivitäten der Einzelmutanten zeigen. Die Daten der Mutationsrate sprechen dagegen, dass Mph1 zum MRX-Komplex gehört. Die Epistasie bei den Sensitivitäten wäre unter der Annahme, dass beide Proteine an der Prozessierung desselben Substrates beteiligt sind, am plausibelsten erklärbar. Um die unterschiedlichen Phänotypen der *mre11 mph1*-Doppelmutante besser zu verstehen, sollte man in Betracht ziehen, dass Mre11 nicht als singuläres Protein beschrieben wird, sondern im Komplex mit Rad50 und Xrs2, wie u. a. Epistasieanalysen zeigen (Usui *et al.* 1998, Game und Mortimer 1974). Durch weiterführende genetische Interaktionsstudien von *mph1* mit *rad50* und auch mit *mre11-58*, einer Mutante von Mre11, die noch DNA-Bindeaktivität besitzt, aber *in vitro* keine Exo- und Endonukleaseaktivität mehr zeigt (Tsubouchi und Ogawa 1998), könnten Rückschlüsse gewonnen werden, ob die beobachteten Phänotypen auf die biochemische Aktivität des Komplexes und/oder auf die postulierte Funktion des Komplexes beim Zusammenhalten/Überbrücken von Schwesterchromatiden beruht.

RAD6-Epistasiegruppe

Der Begriff postreplikative Reparatur (PPR) wurde 1964 von Howard-Flanders in *E. coli* geprägt, um das Phänomen zu beschreiben, dass nach UV-Bestrahlung mit größeren Einzelstranglücken vorliegende DNA durch weitere Inkubation wieder zu hochmolekularer DNA zusammengefügt wird (Howard-Flanders *et al.* 1964). Ähnliche Experimente in Hefe haben gezeigt, dass dieses Phänomen auch hier zu beobachten ist (Prakash 1976) und das hierfür die Gene der RAD6-Epistasiegruppe erforderlich sind (Friedberg *et al.* 1995).

Die PRR wird in drei Untergruppen aufgeteilt (Xiao *et al.* 2000). Beim fehlerbehafteten Zweig (*error-prone*), zu dem *REV3*, *REV7* und *REV1* gehören, werden die DNA-Läsionen durch Transläsionssynthese umgangen. Der fehlerfreie Zweig (*error-free*), für den postuliert wird, dass die Schäden unter Zuhilfenahme der Information des Schwesterchromatids umgangen werden (Lawrence 1994), wird nochmals unterteilt in den *RAD5/MMS2/UBC13*- und *RAD30*-abhängigen Weg. Für all diese Untergruppen sind *RAD6* und *RAD18* notwendig (Cassier-Chauvat und Fabre 1991).

RAD6 kodiert für ein ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2), das zusammen mit dem *RAD18*-Genprodukt - über dessen RING-Finger-Domäne - ein Heterodimer bildet (Jentsch *et al.* 1987, Bailly *et al.* 1997). Rad18 ist ein DNA-bindendes Protein, welches durch die Heterodimer-Bildung Rad6 zur DNA rekrutiert (Bailly *et al.* 1994, Bailly *et al.* 1997). Rad18 kann auch mit Rad5 über dessen RING-Finger-Domäne interagieren (Ulrich und Jentsch 2000). *RAD5* kodiert für ein Protein der Snf2/Swi2-Familie mit DNA-Helikasedomäne (Pazin und Kadonaga 1997, Johnson *et al.* 1992) und einer ss-DNA-abhängigen ATPase-Aktivität (Johnson *et al.* 1994). Es interagiert mit dem Mms2/Ubc13-Komplex, einem Ubiquitin-konjugierenden Komplex, der K63-verknüpfte Multiubiquitinketten bilden kann (Hofmann und Pickart 1999, Ulrich und Jentsch 2000). Die Verknüpfung für Polyubiquitinketten als Markierung zum proteolytischen Abbau erfolgt über Lysin 48.

REV3 und *REV7* kodieren für die *error-prone* Translasiationspolymerase ζ (Nelson *et al.* 1996a), die zwar ineffizient im Überlesen von Schäden ist, aber effizienter als alle anderen bekannten Polymerasen fehlgepaarte Primerenden verlängern kann (Johnson *et al.* 2000, Haracska *et al.* 2001, Haracska *et al.* 2003). Vermutlich erfordert die Translasiations-synthese (TLS) zwei Polymerasen: eine, die das Nukleotid gegenüber dem Schaden inseriert und Pol ζ , die dann das fehlgepaarte Ende verlängert (Prakash und Prakash 2002). Rev1 ist eine Deoxycytidyltransferase, die bevorzugt Cytosin gegenüber einer *AP-site* einbaut (Nelson *et al.* 1996b, Nelson *et al.* 2000).

RAD30, kodierend für Polymerase η , kann effizient über Thymindimere mit hoher Genauigkeit hinweglesen, indem zwei Adenine eingebaut werden (Johnson *et al.* 1999, Washington *et al.* 2000), weswegen sie in den *error-free* Zweig eingeordnet wird. Sie ist aber ebenfalls an der mutagenen Prozessierung von Pyrimidin 6-4-Photoaddukten beteiligt.

Srs2, eine DNA-Helikase (Rong und Klein 1993) repräsentiert ein ungewöhnliches Mitglied der PRR. So konnte H. Ulrich zeigen, dass die Suppression der *rad6*- und *rad18*-UV-Sensitivität durch *srs2*, die durch homologe Rekombination bedingt ist (Schiestl *et al.* 1990), spezifisch den *RAD5/UBC13/MMS2*-Weg betrifft (Ulrich 2001). Es wird postuliert, dass Srs2 ein Substrat bildet und dessen Reparatur über die HR verhindert, dafür aber dem fehlerfreien *RAD5/MMS2/UBC13*-Weg oder der *REV3*-abhängigen Translasiations-synthese den Vorzug gibt (Aboussekhra *et al.* 1989, Xiao *et al.* 1999, Ulrich 2001).

Auch für *POL30*, kodierend für PCNA, wurde eine Funktion im *error-free* Zweig der PRR parallel zu *RAD5* postuliert (Torres-Ramos *et al.* 1996, Xiao *et al.* 2000). So wurde kürzlich von Hoege *et al.* sowie Stelter und Ulrich gezeigt, dass PCNA das Substrat der Rad6-Ubiquitinierung ist, aber auch der *small ubiquitin-like modifier* (SUMO) bei der Regulation von PCNA bei DNA-Replikation und Reparatur eine Rolle spielt. Die Autoren postulieren, dass die Sumoylierung für die normale Replikation von Bedeutung ist und dass die nach DNA-Schädigung stattfindende Übertragung eines Monoubiquitins durch den Rad6/Rad18-Komplex die *REV3*- oder *RAD30*-abhängige Translasiations-synthese bedingt. Der Rad5/Mms2/Ubc13-Komplex kann dies zu einer Multiubiquitinkette modifizieren, was zur fehlerfreien Umgehung der DNA-Läsion - unter Ausnutzung der Information vom Schwesterchromatid - führt (Hoege *et al.* 2002, Stelter und Ulrich 2003).

Das kürzlich charakterisierte *MGS1*-Gen, das für eine DNA-abhängige ATPase kodiert und *ss-annealing*-Aktivität zeigt, wurde aufgrund genetischer Interaktionen auch in die PRR eingeordnet. Es wird postuliert, dass es für die Aufrechterhaltung der DNA-Topologie an arretierten Replikationsgabeln benötigt wird (Hishida *et al.* 2001, Hishida *et al.* 2002, Branzei *et al.* 2002).

Der *mph1*-Mutatorphänotyp ist vom *error-prone* Zweig abhängig und wird durch *rad5* reduziert

Da für die postreplikative Reparatur eine Rolle bei der Umgehung von DNA-Schäden während der Replikation diskutiert wird, sollte die genetische Interaktion von *mph1* mit Genen aus diesem Reparaturweg analysiert werden. Zusätzlich zu *RAD6*, *REV3* und *MMS2*, die bereits in Scheller *et al.* 2000 untersucht wurden, wurden Mutanten von *RAD18*, *UBC13*, *RAD5*, *REV7* und *REV1* konstruiert, die Mutationsraten bestimmt und die Sensitivität gegenüber DNA-schädigende Agenzien untersucht.

Tabelle 14: Einfluss von Mutationen aus der postreplikativen Reparatur auf den *mph1*-Mutatorphänotyp im Canavaninvorwärtsmutationssystem.

Stamm	Mutationsrate	Faktor	Stamm	Mutationsrate	Faktor
wt	1) $2.4 \pm 0.39 \cdot 10^{-7}$	1	<i>mph1</i>	1) $27.0 \pm 3.3 \cdot 10^{-7}$	11.3
	2) $3.8 \pm 0.53 \cdot 10^{-7}$	1		2) $35.1 \pm 4.2 \cdot 10^{-7}$	9.2
	3) $3.0 \pm 0.41 \cdot 10^{-7}$	1		3) $21.8 \pm 2.4 \cdot 10^{-7}$	7.3
	4) $2.9 \pm 0.46 \cdot 10^{-7}$	1		4) $32.2 \pm 3.1 \cdot 10^{-7}$	11.1
	5) $2.5 \pm 0.34 \cdot 10^{-7}$	1		5) $17.4 \pm 1.1 \cdot 10^{-7}$	7.0
<i>rad5</i>	1) $5.1 \pm 0.89 \cdot 10^{-7}$	2.1	<i>mms2</i>	1) $16.1 \pm 2.2 \cdot 10^{-7}$	6.7
	2) $9.8 \pm 1.2 \cdot 10^{-7}$	2.6	<i>mms2 mph1</i>	1) $37.6 \pm 4.4 \cdot 10^{-7}$	15.7
	3) $5.1 \pm 0.77 \cdot 10^{-7}$	1.7	<i>ubc13</i>	1) $14.8 \pm 1.8 \cdot 10^{-7}$	6.2
<i>rad5 mph1</i>	1) $10.8 \pm 1.6 \cdot 10^{-7}$	4.5	2) $15.9 \pm 1.8 \cdot 10^{-7}$	4.2	
	2) $17.6 \pm 2.1 \cdot 10^{-7}$	4.6	<i>ubc13 mph1</i>	1) $21.4 \pm 2.6 \cdot 10^{-7}$	8.9
	3) $10.6 \pm 1.3 \cdot 10^{-7}$	3.5	2) $35.8 \pm 3.9 \cdot 10^{-7}$	9.4	
<i>rad6</i>	1) $7.1 \pm 1.1 \cdot 10^{-7}$	3.0	<i>rev1</i>	3) $1.1 \pm 0.27 \cdot 10^{-7}$	0.37
<i>rad6 mph1</i>	1) $2.6 \pm 0.45 \cdot 10^{-7}$	1.1	<i>rev1 mph1</i>	3) $6.4 \pm 0.81 \cdot 10^{-7}$	2.1
<i>rad18</i>	1) $11.8 \pm 1.7 \cdot 10^{-7}$	4.9	<i>rev7</i>	5) $1.6 \pm 0.24 \cdot 10^{-7}$	0.6
<i>rad18 mph1</i>	1) $6.7 \pm 0.95 \cdot 10^{-7}$	2.8	<i>rev7 mph1</i>	5) $4.9 \pm 0.67 \cdot 10^{-7}$	2.0
<i>mgs1</i>	4) $4.9 \pm 0.77 \cdot 10^{-7}$	1.7			
<i>mgs1 mph1</i>	4) $45.7 \pm 5.5 \cdot 10^{-7}$	15.8			

Die unterschiedlichen Experimente, in denen wt und *mph1* jeweils als interne Kontrolle mitgezogen wurden, sind durch die Indices 1)- 5) angegeben. Die Faktoren wurden durch Normalisierung der Mutantenmutationsraten zur wt-Mutationsrate in dem jeweiligen Experiment berechnet. Die Fehler geben die Standardabweichungen laut der Berechnung nach Lea und Coulson 1948 wieder.

Der *mph1*-Mutatorphänotyp ist *REV3*-abhängig (Scheller *et al.* 2000). Es ist daher nicht erstaunlich, dass die *mph1*-Mutationsrate, wie in Tabelle 14 zu verfolgen, durch *rad6* und *rad18* supprimiert wird, da das Rad6/Rad18-Heterodimer für die Initiation der TLS benötigt wird. Da Rev7 zusammen mit Rev3 die Polymerase ζ bilden, ist auch hier nicht verwunderlich, dass eine Suppression beobachtet werden kann. Auch die zusätzliche Deletion von *REV1* im *mph1*-Stammhintergrund schafft den Mutatorphänotyp ab. Für Rev1 wird eine Rolle in der Prozessierung von *AP-sites* angenommen

(Nelson *et al.* 2000). Obwohl auf Grund der Daten, die mit *apn1* und *apn2* erhalten wurden, postuliert werden kann, dass der *mph1*-Mutatorphänotyp u. a. von nicht reparierten *AP-sites* hervorgerufen wird, so zeigt sich durch die *rev1*-Suppression, dass die Rolle von Rev1 weitreichender sein muss (Nelson *et al.* 2000, Haracska *et al.* 2001).

Ein ähnlicher Effekt wurde auch für die *rad5 mph1*-Doppelmutante gefunden. *rad5* selbst zeigt einen leichten Mutatorphänotyp, der *rev1* (Tabelle 14), aber auch *srs2*- und *rev3*-abhängig, ist (Liefshitz *et al.* 1998). Die Doppelmutante zeigt eine zu *mph1* erniedrigte Mutationsrate. *mms2* und *ubc13* zeigen ebenfalls einen Mutatorphänotyp, der aber stärker als der von *rad5* ist (Tabelle 14, Broomfield *et al.* 1998, Stelter und Ulrich 2003). Während die *mms2 mph1*-Doppelmutante einen additiven Phänotyp zeigt, wird die *mph1*-Mutationsrate durch die *ubc13*-Deletion partiell reduziert. Der Wert sinkt aber nicht unter den Wert von *ubc13*. Obwohl Mms2 und Ubc13 als Komplex vorliegen und epistatisch zueinander sind (Hofmann und Pickart 1999), deuten diese unterschiedlichen Phänotypen an, dass das Fehlen der jeweiligen Genprodukte unterschiedliche Auswirkungen hat.

Die Mutanten der *RAD6*-Epistasigruppe zeichnen sich durch eine verstärkte UV-Sensitivität aus (Lawrence 1994), weshalb diese Mutanten auch auf die UV-Sensitivität untersucht wurden. Die Phänotypen der Doppelmutanten sind bzgl. UV-Bestrahlung (Abbildung 11) und auch der Sensitivität gegenüber MMS, 4-NQO und CPT (Abbildung 12) additiv. Der Phänotyp der *mgs1 mph1*-Mutante verhält sich additiv, sowohl bzgl. des Mutatorphänotypes als auch der Sensitivität gegenüber den DNA-schädigenden Agenzien (Abbildung 12).

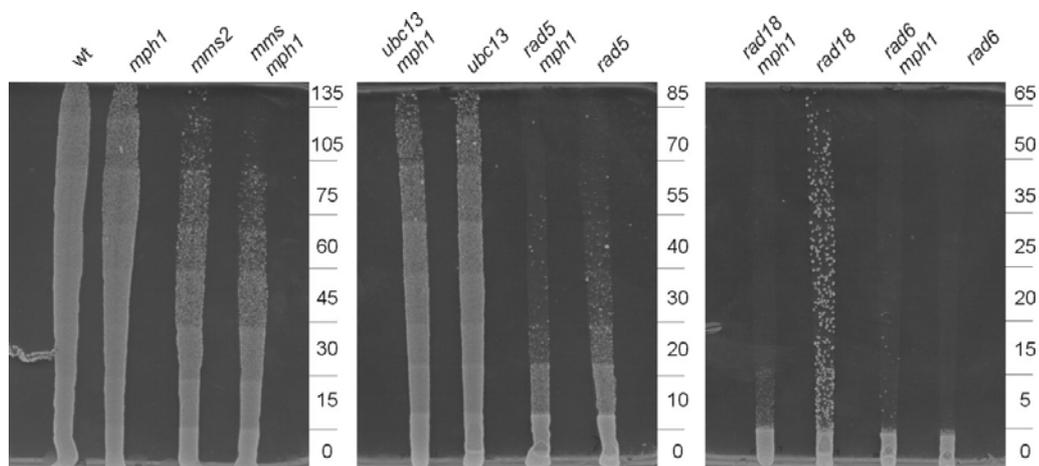


Abbildung 11: Sensitivität von Mutanten der postreplikativen Reparatur gegenüber UV-Bestrahlung. Die jeweiligen Stämme wurden, wie beim *Drop-dilution Assay* beschrieben (S. 31), angezogen und auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. 50 μ l davon wurden auf die Platte aufgetragen und zu einem Strich verteilt. Die Zellen wurden mit einer kalibrierten UV-Lampe bestrahlt (die Zahlen rechts neben der jeweiligen Platte geben die Bestrahlungsdauern in Sekunden an; Bestrahlungsdauer von 45 Sekunden entspricht 25 J/m^2) und sofort im dunkeln für 2 Tage bei 30°C inkubiert.

Die Untersuchung der Sensitivitäten zeigt, dass die *mph1*-Deletion in allen Fällen die Sensitivität der betreffenden PRR-Mutante verstärkt (Abbildung 11, Abbildung 12). Hieraus geht hervor, dass *MPH1* nicht zur *RAD6*-Epistasigruppe gehört.

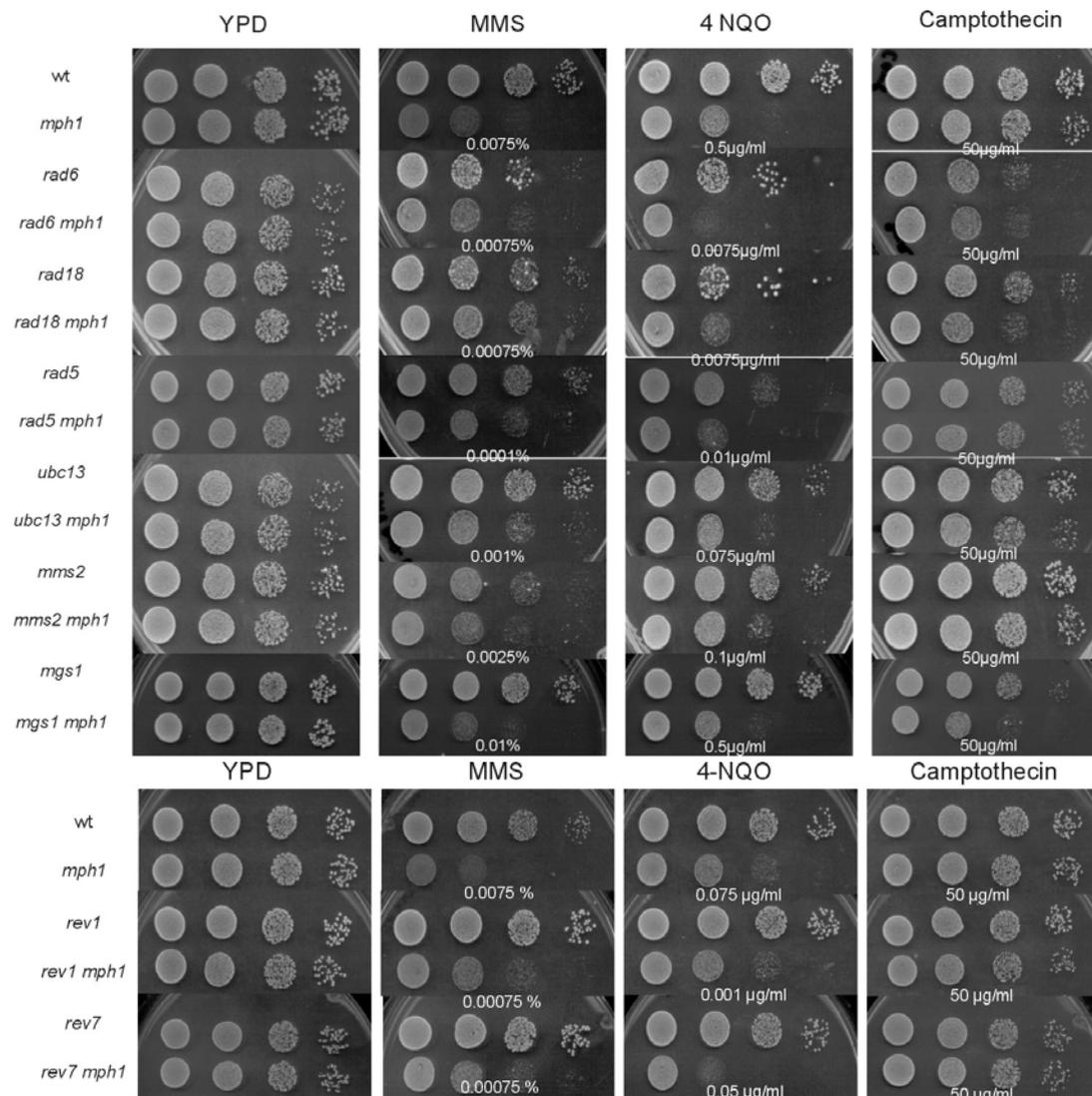


Abbildung 12: Sensitivität von Mutanten der postreplikativen Reparatur gegenüber MMS, 4-NQO und CPT. Die jeweiligen Stämme wurden wie in Material und Methoden beschrieben auf die Platten mit den Chemikalien getropft (Konzentration angegeben unter der jeweiligen Einzel- und Doppelmutante mit *mph1*).

Die Daten von *apn1 mph1* und *apn1 apn2 mph1* zeigen, dass in Abwesenheit von *mph1* DNA-Läsionen, die normalerweise fehlerfrei von *MPH1* prozessiert werden, über Transläsionssynthese umgangen werden. Der starke Synergismus von *rev7* (Abbildung 12) und *rev3* (Abbildung 5, S. 40; Scheller *et al.* 2000) zu *mph1* zeigt, dass das zusätzliche Blockieren der TLS in Anwesenheit von DNA-schädigenden Agenzien zum verstärkten Zelltod führt. Die Epistasie von *rev3*, *rev1*, *rev7*, *rad6* und *rad18* bzgl. des *mph1*-Mutatorphänotypes beruht darauf, dass die Ausprägung des Mutatorphänotypes einen intakten *error-prone* Ast der postreplikativen Reparatur erfordert und ist wohl ein Hinweis auf eine enge Interaktion zwischen *MPH1* und der PRR.

Warum wird der *mph1*-Mutatorphänotyp auch durch *rad5* verringert, welches dem *error-free* Ast zugeordnet wird? Produziert Rad5 ein Intermediat, dass zumindest

partiell über den *MPH1*-Weg (und damit auch über die Proteine der homologen Rekombination) fehlerfrei bearbeitet wird? In Abwesenheit von Mph1 kann/muss dieses Substrat von der Translasionssynthese prozessiert werden, was u. a. zum *mph1*-Mutatorphänotyp beiträgt. Aber auch Rad5 - im Komplex mit Mms2/Ubc13 - prozessiert auftretende DNA-Läsionen fehlerfrei. Da *rad5*-Mutanten selbst einen leichten spontanen Hyperrekombinationsphänotyp zeigen (ektopische Genkonversion, Liefshitz *et al.* 1998), der von *rad51* und *rad52* abhängig ist, wird postuliert, dass das entstehende Intermediat über Rekombination aufgelöst wird. Wenn in der *rad5 mph1*-Mutante dieses Intermediat gar nicht erst gebildet würde und die DNA-Läsionen durch einen alternativen fehlerfreien Mechanismus - z. B. durch Pol η , umgangen werden, wäre die Reduktion des *mph1*-Mutatorphänotypes erklärbar. Das Pol η - parallel zu Rev3 – in Abwesenheit der fehlerfreien PRR eine Rolle spielt, lässt der synergistische Phänotyp von *rad5* und *rad30* in der schadensinduzierten Mutagenese vermuten (McDonald *et al.* 1997).

Durch diese Hypothese ließe sich auch die beobachtete Hypostasis des *rad51* bzw. *rad51 mph1*-Mutatorphänotypes zu *rad5* erklären (Tabelle 15). Neben der Rolle eines alternativen fehlerfreien Weges parallel zu Rad5/Mms2/Ubc13 wäre der durch *rad5* reduzierte *mph1*- als auch der *rad51*- und *rad51 mph1*-Mutatorphänotyp durch einen stimulierenden Effekt von Rad5 auf die TLS plausibel erklärbar. In Anwesenheit von Rad5 findet bevorzugt die fehlerfreie Umgehung von DNA-Läsionen statt. Fällt ein fehlerfreier Weg aus, wie für *mph1* und *rad51*-Mutanten postuliert, könnte zusätzlich die Translasionssynthese stimuliert werden. In Abwesenheit von *rad5* fällt diese Stimulation weg, wodurch der reduzierte Mutatorphänotyp von *mph1* und *rad51* plausibel erscheint.

Tabelle 15: Einfluss von *rad5* auf den Mutatorphänotyp von *rad51* bzw. *rad52* und deren Tripelmutanten mit *mph1* im Canavaninvorwärtsmutationssystem.

Stamm	Mutationsrate	Faktor	Stamm	Mutationsrate	Faktor
wt	1) $3.0 \pm 0.43 \cdot 10^{-7}$	1	<i>mph1</i>	1) $25.5 \pm 2.9 \cdot 10^{-7}$	8.5
<i>rad5</i>	1) $7.4 \pm 0.99 \cdot 10^{-7}$	2.5	<i>rad5 mph1</i>	1) $11.5 \pm 1.5 \cdot 10^{-7}$	3.8
<i>rad51</i>	1) $28.3 \pm 3.3 \cdot 10^{-7}$	9.4	<i>rad51 mph1</i>	1) $30.8 \pm 3.6 \cdot 10^{-7}$	10.3
<i>rad5 rad51</i>	1) $8.8 \pm 1.3 \cdot 10^{-7}$	2.9	<i>rad5 rad51 mph1</i>	1) $6.1 \pm 1.1 \cdot 10^{-7}$	2.0
wt	2) $4.0 \pm 0.60 \cdot 10^{-7}$	1	<i>mph1</i>	2) $21.2 \pm 2.7 \cdot 10^{-7}$	5.3
	3) $4.5 \pm 0.59 \cdot 10^{-7}$	1		3) $27.7 \pm 3.4 \cdot 10^{-7}$	6.2
<i>rad5</i>	2) $8.2 \pm 1.2 \cdot 10^{-7}$	2.1	<i>rad5 mph1</i>	2) $10.3 \pm 1.5 \cdot 10^{-7}$	2.6
<i>rad52</i>	2) $30.8 \pm 4.1 \cdot 10^{-7}$	7.7	<i>rad52 mph1</i>	2) $18.4 \pm 2.5 \cdot 10^{-7}$	4.6
<i>rad5 rad52</i>	3) $24.3 \pm 3.4 \cdot 10^{-7}$	5.4	<i>rad5 rad52 mph1</i>	3) $18.7 \pm 2.6 \cdot 10^{-7}$	4.2

Die unterschiedlichen Experimente, in denen wt und *mph1* jeweils als interne Kontrolle mitgezogen wurden, sind durch die Indices 1)- 3) angegeben. Die Faktoren wurden durch Normalisierung auf die wt-Mutationsrate in dem jeweiligen Experiment berechnet. Die Fehler geben die Standardabweichungen laut der Berechnung nach Lea und Coulson 1948 wieder.

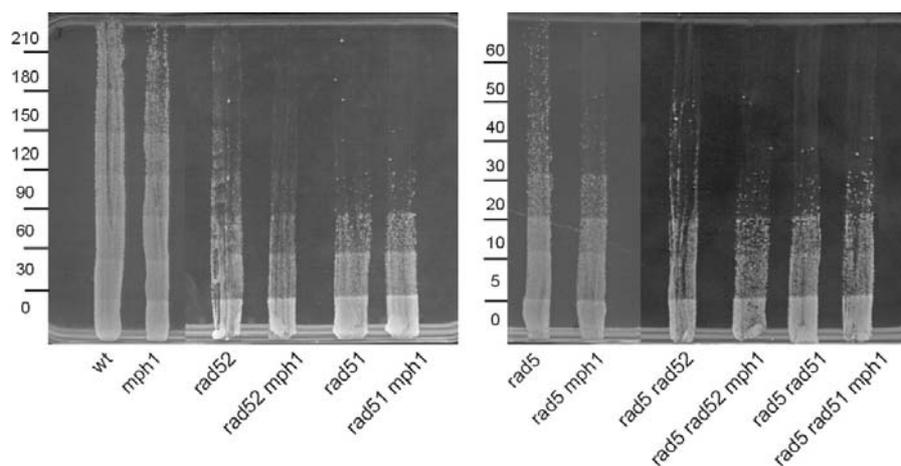


Abbildung 13: Sensitivität von *rad5*-, *rad51*-, *rad52*- und *mph1*-Mutanten gegenüber UV-Licht. Die jeweiligen Stämme wurden, wie beim *Drop dilution Assay* beschrieben (S. 31), angezogen und auf 1×10^7 Z/ml eingestellt. 50 μ l davon wurden auf die Platte aufgetragen und zu einem Strich verteilt. Die Zellen wurden mit einer kalibrierten UV-Lampe bestrahlt (die Zahlen rechts neben der jeweiligen Platte geben die Bestrahlungszeiten in Sekunden an; Bestrahlungsdauer von 45 Sekunden entspricht 25 J/m^2) und sofort im dunkeln für 2 Tage (*rad5 rad51* bzw. *rad5 rad52*) oder drei Tage (Tripelmutanten mit *mph1*) bei 30 °C inkubiert.

Neben der genetischen Interaktion von *rad5* mit *rad51* wurde auch die mit *rad52* untersucht. Die Mutationsrate von *rad52* (sowie *rad52 mph1*) wird durch die zusätzliche Deletion von *rad5* reduziert (Tabelle 15), wenn auch nicht so deutlich wie bei *rad51*. Dieser Unterschied zwischen *rad51* und *rad52* kann zum einen andeuten, dass die Funktionen von Rad51 und Rad52 - bei der Umgehung von DNA-Läsionen an der Replikationsgabel - nicht immer miteinander gekoppelt sind. Zum anderen scheint auch Rad51 - in Abwesenheit von Rad5 - einen Einfluss darauf zu nehmen, auf welche Art die DNA-Läsion umgangen wird.

Auch die Sensitivitäten gegenüber MMS, 4-NQO und Camptothecin (Abbildung 14) und bei UV-Bestrahlung (Abbildung 13) zeigen, dass *rad5 rad51* hypostatisch zu *rad5* ist. Bei *rad5 rad52* ist es schwer zu entscheiden, ob es sich um Additivität oder um Hypostasis zu *rad5* handelt. Da die Kopplung des *mph1*-Phänotypes an eine funktionstüchtige homologe Rekombination bereits gezeigt wurde, verwundert es nicht, dass die zusätzliche Deletion von *MPH1* keine Auswirkung auf den *rad5 rad51*- als auch *rad5 rad52*- Phänotyp hat.

Aus den gezeigten genetischen Interaktionen von *mph1* zu Mutanten der PRR geht hervor, dass *MPH1* mit großer Wahrscheinlichkeit nicht in die postreplikative Reparatur eingeordnet werden kann. Trotzdem scheint es eine enge Kooperation zwischen dem *MPH1*-Weg und der PRR zu geben, wie die Abhängigkeit des *mph1*-Mutatorphänotypes von *rad5* und dem *error-prone* Zweig der PRR zeigt. Eine plausible Erklärung für die Reduktion des *mph1*-Mutatorphänotypes durch *rad5* kann derzeit nicht gegeben werden. Da aber die Funktion von *MPH1* an die Proteine der homologen Rekombination gekoppelt ist (vgl. S. 48/49) und *rad5* auch Einfluss auf deren Mutatorphänotyp und Sensitivität hat (UV, MMS und 4-NQO), impliziert das, dass bei der fehlerfreien Umgehung von replikationsarretierenden DNA-Läsionen der *RAD5/MMS2/UBC13*-Weg vor dem *RAD51/RAD52*- und *MPH1*-Weg operiert.

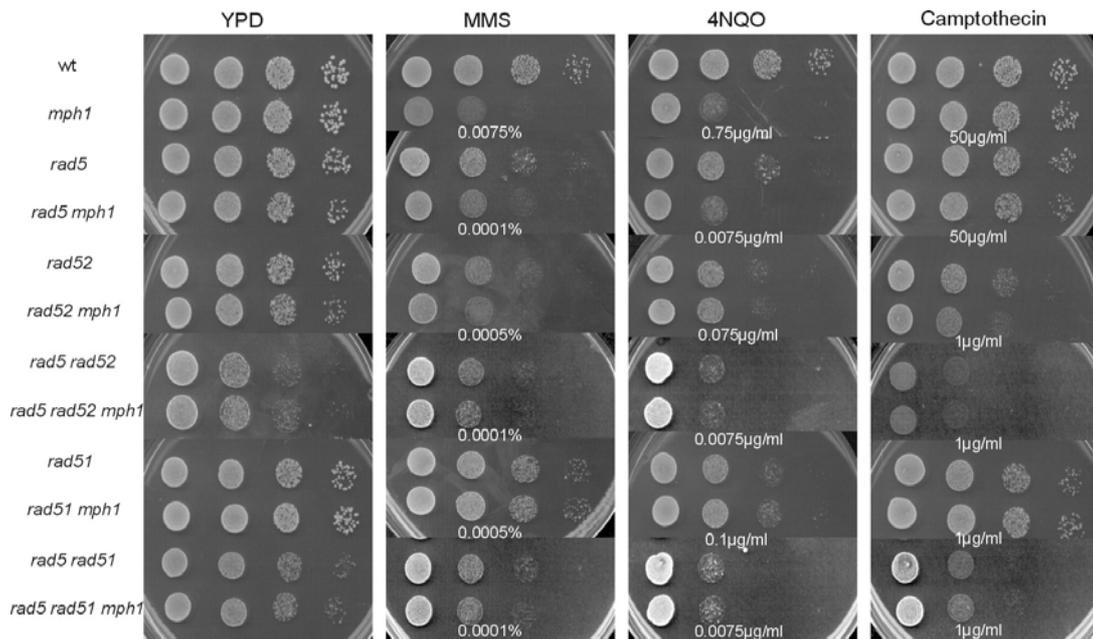


Abbildung 14: Sensitivität von *rad5*-, *rad51*-, *rad52*- und *mph1*-Mutanten gegenüber MMS, 4-NQO und CPT. Die jeweiligen Stämme wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, auf die Platten mit den Chemikalien getropft (Konzentration angegeben unter der jeweiligen Einzel- und Doppelmutante mit *mph1*).

Proteine mit einer Funktion an arretierten Replikationsgabeln

Sgs1 und Top3

Sgs1 gehört zur RecQ-Familie, zu der neben RecQ aus *E. coli*, welches für die RecBCD unabhängige Rekombination benötigt wird (Umezumi *et al.* 1990) und *rqh+* aus *Schizosaccharomyces pombe* auch fünf humane Proteine zählen (Gangloff *et al.* 1994a, Watt *et al.* 1995, Stewart *et al.* 1997). Drei von diesen sind ursächlich mit einer Erbkrankheit assoziiert: Beim Bloom-Syndrom führt der Ausfall des BLM-Proteins zum verstärkten Auftreten von Krebs, der durch genomische Instabilität bedingt ist (German *et al.* 1993). Das Werner-Syndrom (WRN) zeichnet sich durch frühzeitiges Altern aus (Yu *et al.* 1996). Der Ausfall von RECQL4 ist mit dem Rothmund-Thomson-Syndrom verbunden, einer Krankheit, die mit frühzeitigem Altern als auch einer Prädisposition zu Krebs verbunden ist (Kitao *et al.* 1999). Zellen, isoliert von Bloom-Patienten, zeigen eine erhöhte Frequenz von Rekombination zwischen Schwesterchromatiden (Ellis *et al.* 1995). Auch *sgs1*-Zellen zeigen einen Hyperrekombinationsphänotyp, der teilweise *RAD52*-unabhängig ist (Watt *et al.* 1996, Onoda *et al.* 2001, Myung *et al.* 2001b). Außerdem sind *sgs1*-Mutanten sensitiv gegenüber einer Vielzahl von DNA-schädigenden Agenzien wie MMS, 4-NQO, HU und UV-Licht (Mullen *et al.* 2000, Yamagata *et al.* 1998). *SGS1* kodiert für eine ATP-abhängige DNA-Helikase der DEXH-Box-Familie mit einer 3'-5'-Polarität (Bennett *et al.* 1998, Bennett *et al.* 1999). Für die Sensitivität der Mutante ist u. a. die fehlende

Helikaseaktivität verantwortlich (Saffi *et al.* 2000, Mankouri und Morgan 2001). Biochemische Untersuchungen von BLM, Sgs1 und RecQ haben gezeigt, dass diese Proteine ein ungewöhnliches Substratspektrum haben: Sie können u. a. auch synthetische 3- oder 4-armige X-Strukturen entwinden (Harmon und Kowalczykowski 1998, Bennett *et al.* 1999, Chakraverty und Hickson 1999). Für Sgs1 konnte gezeigt werden, dass es *in vitro* auch sogenannte G-Quadruplex-DNA auflösen kann, jedoch ist unklar, ob solche Strukturen *in vivo* von Bedeutung sind (Sun *et al.* 1999). BLM kann außerdem die Verschiebung (*branch migration*) von *Holliday Junctions* katalysieren (Karow *et al.* 2000, Mohaghegh *et al.* 2001). Diese Befunde führten zu der Hypothese, dass Sgs1/BLM *Holliday Junctions*, wie sie während des Strangtransfers bei der homologen Rekombination entstehen, entfernen kann, bevor sie von Resolvasen geschnitten werden, und damit Rekombination verhindert. Unterstützt wird dies durch Befunde, dass Sgs1/BLM nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien mit Rad51, RPA und BRCA1 kolokalisiert (Wu *et al.* 2001a, Bischof *et al.* 2001, Wang *et al.* 2000). Mit dieser Funktion, so wird derzeit postuliert, könnten die RecQ-Helikasen entweder eine Rolle bei der Aufhebung von arretierten Replikationsgabeln und/oder bei der Termination der Replikation haben (Gangloff *et al.* 1994b, Oakley und Hickson 2002). Für Sgs1 wird auch eine Rolle im Anschalten des *DNA damage checkpoint* diskutiert (Frei und Gasser 2000, Oakley und Hickson 2002, vgl. S. 79). Dies wird unterstützt durch den Befund, dass *SGS1* in der S-Phase transkribiert wird (Cho *et al.* 1998) und das Sgs1 mit neusynthetisierter DNA und dem ORC (*origin of replication complex*) kolokalisiert (Frei und Gasser 2000).

SGS1 wurde zum einen durch seine Interaktion mit Topoisomerasen identifiziert, als auch durch die Fähigkeit von *sgs1*-Mutanten, den Wachstumsdefekt der Mutante von Topoisomerase III aufzuheben (*sgs1: slow growth suppressor of top3*; Gangloff *et al.* 1994a, Watt *et al.* 1995). Sgs1 interagiert mit seiner N-terminalen Domäne mit Top3 (Gangloff *et al.* 1994a, Bennett *et al.* 2000, Ui *et al.* 2001). *top3*-Mutanten zeigen einen *RAD52*-abhängigen Hyperrekombinationsphänotyp und sind sporulationsdefekt (Wallis *et al.* 1989, Bailis *et al.* 1992). Der extreme Wachstumsdefekt von *top3*-Mutanten resultiert aus einer *RAD9*-abhängigen Verzögerung der G2/M-Phase. In der S-Phase, so wird postuliert, entstehen Substrate (wie z. B. Einzelstrang-DNA) und/oder Strukturen die in *top3*-Mutanten nicht aufgelöst werden können und den *DNA damage checkpoint* anschalten (Gangloff *et al.* 1994a, Chakraverty *et al.* 2001). Diese Verknüpfung zum *DNA damage checkpoint* wird unterstützt durch den Befund, dass Top3 mit Rad53 interagiert und dass *TOP3* - wie auch schon für *SGS1* beschrieben - besonders stark in der S-Phase exprimiert wird (Chakraverty *et al.* 2001). *TOP3* kodiert für eine Typ I-Topoisomerase, mit Homologien zu *topA* und *topB* aus *E. coli*, aber nicht zu *TOP1* und *TOP3* aus Hefe (Wallis *et al.* 1989). Top3 relaxiert ineffizient negative überspiralisierte (*supercoiled*) doppelsträngige-DNA (positive *supercoiled* DNA wird nicht relaxiert), kann dafür aber sehr effizient Hemikatenane auflösen und benötigt dazu einen Einzelstrang-DNA-Bereich (Kim und Wang 1992).

Epistasisanalysen deuten an, dass *SGS1* vor *TOP3* operiert. Für den Sgs1/Top3-Komplex wurde postuliert, dass die Sgs1-Helikase doppelsträngige DNA entwindet, dabei den ss-DNA-Bereich für Top3 bereitstellt (Bennet *et al.* 1999) und das Substrat schafft, dass dann von Top3 aufgelöst werden kann. Die konzertierte Aktion von Sgs1/Top3 wird mit der von sogenannten Reversen Gyrasen verglichen, die negative

supercoiled DNA spalten und damit positive *supercoiled* DNA erzeugen (Gangloff et al. 1994b). Derzeit werden zwei Funktionen für den Sgs1/Top3-Komplex in der Literatur diskutiert: Der Komplex könnte als Anti-Rekombinase agieren, indem er Katenane, wie sie bei Rekombinationsereignissen zwischen Schwesterchromatiden entstehen können, umwandelt und damit rekombinative Intermediate beseitigt (Watt et al. 1996, Wu et al. 2001b). Der G2-Defekt von *top3*-Mutanten stünde aber auch im Einklang mit der Hypothese, dass der Komplex für die terminale Phase der Replikation benötigt wird (Gangloff et al. 1994b, Oakley und Hickson 2002). Der Befund, dass das Fehlen der Funktion von *TOP3* zu erheblichen Defekten bei Mäuseembryos führt, steht im Einklang mit einer Funktion von Top3 bei der erfolgreichen Durchführung der Replikation (Kwan und Wang 2001).

sgs1 und *top3* reduzieren den *mph1*-Mutatorphänotyp

Für die Untersuchung einer genetischen Interaktion von *mph1* mit *sgs1* und *top3* wurden die Mutanten konstruiert und die Mutationsrate sowie die Sensitivität gegenüber den DNA-schädigenden Agenzien MMS, 4-NQO und CPT untersucht. *top3*-Mutanten zeigen einen starken Wachstumsdefekt, der durch eine spontane *sgs1*-Mutation unterdrückt werden kann (Gangloff et al. 1994). Um die Wahrscheinlichkeit einer solchen spontanen *sgs1*-Hintergrundmutation in *top3* so gering wie möglich zu halten, wurde die *top3*-Mutante vor jedem Experiment frisch durch Sporulation und Dissektion aus einem für *top3* heterozygoten Diplonten gewonnen. Das dabei nicht trotzdem eine *sgs1*-Hintergrundmutation aufgetreten ist bzw. sich angehäuft hat, kann nicht ausgeschlossen werden. Da sich aber die *top3*-Mutanten bei den Sensitivitäten deutlich von den *sgs1*-Mutanten unterscheiden, erscheint eine *sgs1*-Hintergrundmutation - bei den hier gezeigten Daten - eher unwahrscheinlich (Abbildung 15).

Tabelle 16: Einfluss von *sgs1* und *top3* auf den *mph1*-Mutatorphänotyp im Canavanin-vorwärtsmutationssystem.

Stamm	Mutationsrate	Faktor	Stamm	Mutationsrate	Faktor
wt	1) $4.5 \pm 0.59 \cdot 10^{-7}$	1	<i>top3</i>	1) $12.1 \pm 1.6 \cdot 10^{-7}$	2.7
	2) $5.4 \pm 0.76 \cdot 10^{-7}$	1	<i>top3 mph1</i>	1) $19.5 \pm 2.4 \cdot 10^{-7}$	4.3
	3) $3.7 \pm 0.51 \cdot 10^{-7}$	1	<i>sgs1</i>	2) $12.6 \pm 2.2 \cdot 10^{-7}$	2.3
<i>mph1</i>	1) $27.7 \pm 3.4 \cdot 10^{-7}$	6.2		3) $12.1 \pm 1.8 \cdot 10^{-7}$	3.3
	2) $30.3 \pm 4.3 \cdot 10^{-7}$	5.5	<i>sgs1 mph1</i>	2) $23.6 \pm 3.8 \cdot 10^{-7}$	4.3
	3) $24.1 \pm 2.7 \cdot 10^{-7}$	6.5		3) $16.5 \pm 2.1 \cdot 10^{-7}$	4.5

Die unterschiedlichen Experimente, in denen wt und *mph1* jeweils als interne Kontrolle mitgezogen wurden, sind durch die Indices 1)- 3) angegeben. Die Faktoren wurden durch Normalisierung der Mutantenmutationsraten zur wt-Mutationsrate in dem jeweiligen Experiment berechnet. Die Fehler geben die Standardabweichungen laut der Berechnung nach Lea und Coulson 1948 wieder.

Wie in Tabelle 16 zu sehen, haben *sgs1* und auch *top3* eine leicht erhöhte Mutationsrate. Die durch das Fehlen der Genprodukte von *SGS1* und *TOP3* erzeugten Substrate werden nicht nur rekombinativ prozessiert, wodurch der Hyperrekombinations-Phänotyp der Mutanten interpretiert wird, sondern führen anscheinend auch zu Mutationen. Der *mph1*-Mutatorphänotyp wird durch die zusätzliche Deletion

von *sgs1* bzw. *top3* erniedrigt. Wie man aus den mitotischen Rekombinationsraten von *sgs1 mph1* schließen kann, werden die auftretenden Substrate in Abwesenheit von *mph1* und *sgs1* vermehrt rekombinativ umgangen (Tabelle 12, S. 50), was die mutagene Prozessierung und damit die erniedrigte Mutationsrate bewirken könnte.

Bei der Untersuchung der Sensitivitäten (Abbildung 15) zeigt sich, dass *sgs1* und *top3* Mutanten sensitiv gegenüber MMS und 4-NQO sind. Die in der Literatur oftmals beschriebene HU-Sensitivität von *sgs1* kann in unserem Stammhintergrund nicht reproduziert werden (nicht gezeigt). Die *top3 mph1*-Doppelmutante verhält sich additiv. Der Phänotyp der *sgs1 mph1*-Doppelmutante ist nicht eindeutig zuordbar: Die Einordnung schwankt zwischen marginal additiv (Abbildung 15) und epistatisch (Abbildung 16). Auffallend ist die starke Sensitivität von *top3* gegenüber CPT, die sich in der *top3 mph1* Doppelmutante synergistisch verstärkt. Die durch Sgs1 geschaffenen Substrate können in der *top3*-Mutante nicht mehr aufgelöst werden und führen zu dem Wachstumsdefekt von *top3*-Mutanten (Gangloff *et al.* 1994). Die starke Sensitivität von *top3* auf CPT zeigt, dass die durch CPT induzierten DNA-Intermediate nicht mehr aufgelöst werden können. Der Synergismus der *top3 mph1*-Doppelmutante impliziert, dass beide Genprodukte an der Auflösung - der durch Sgs1 produzierten Substrate - beteiligt sind.

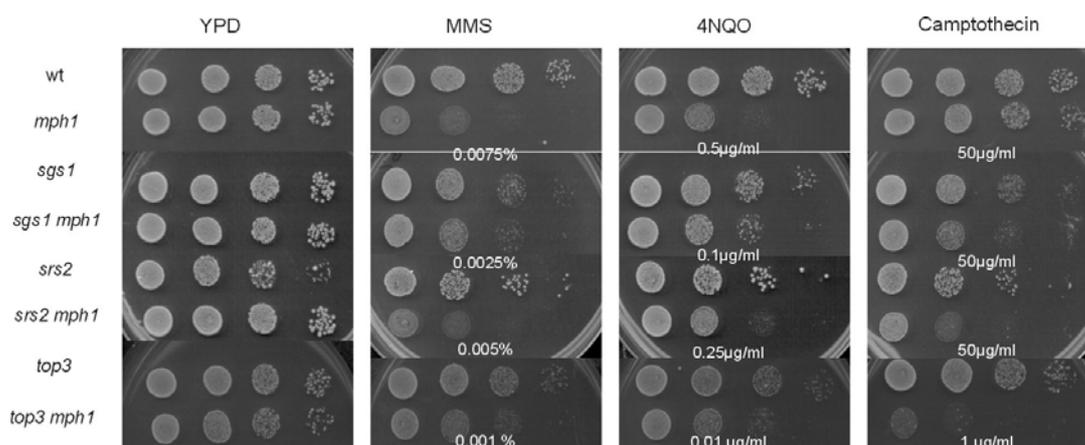


Abbildung 15: Sensitivität von *sgs1*, *top3*, *srs2* und *mph1* gegenüber MMS, 4-NQO und CPT. Die jeweiligen Stämme wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, auf die Platten mit den Chemikalien getropft (Konzentration angegeben unter der jeweiligen Einzel- und Doppelmutante mit *mph1*).

Eine Aussage, ob *sgs1* und *mph1* epistatisch oder additiv bzgl. der Sensitivitäten sind, ist nicht eindeutig möglich. Die Doppelmutante, wie in Abbildung 15 dargestellt, verhält sich marginal additiv. In Abbildung 16 zeigt sich jedoch ein epistatischer Effekt. Es ist somit hieraus schwer ableitbar, ob die Genprodukte an der Prozessierung eines Substrates im gleichen oder parallelen Weg beteiligt sind. Die additive Sensitivität von *top3* mit *mph1* impliziert, dass die Genprodukte an der Auflösung eines Substrates in parallelen Wegen beteiligt sind. Aus den anderen Phänotypen der Mutanten kann man ableiten, dass in Abwesenheit von *mph1* das Substrat mutagen umgangen wird (Scheller *et al.* 2000) und in Abwesenheit von *sgs1* und *top3* zum größeren Teil rekombinogen prozessiert wird (Watt *et al.* 1996). Wenn *sgs1* und *mph1* nicht zur Ver-

fügung stehen, wird das Substrat wie in *sgs1*-Mutanten über Rekombination umgangen (Tabelle 12, S. 50), was die Abnahme der *mph1*-Mutationsrate in der Doppelmutante erklärte. Da Sgs1 und Top3 im Komplex (Gangloff *et al.* 1994, Watt *et al.* 1995) vorliegen, wäre unter der gleichen Annahme die *top3 mph1*-Mutationsrate erklärbar. Der Synergismus von *top3 mph1* legt aber nahe, dass zumindest bei den durch CPT induzierten Schäden *TOP3* und *MPH1* an der Auflösung des gleichen Substrates, das wahrscheinlich durch *SGS1* erzeugt wird, beteiligt sind.

sgs1 reduziert den *rad52* Mutatorphänotyp

sgs1 ist bzgl. der MMS-Sensitivität epistatisch zu *rad51* und *rad52* und wird diesbezüglich in die *RAD52*-Epistasisgruppe eingeordnet (Wu *et al.* 2001a, Onoda *et al.* 2001). Dies konnte auch in unserem Stammhintergrund gezeigt werden. Auch gegenüber 4-NQO und CPT ist *rad52* epistatisch zu *sgs1* (Abbildung 16). Die zusätzliche Deletion von *mph1* hat keinen Effekt, was nicht erstaunlich ist, da der *MPH1*-Weg von *RAD52* abhängig ist (S. 48/49).

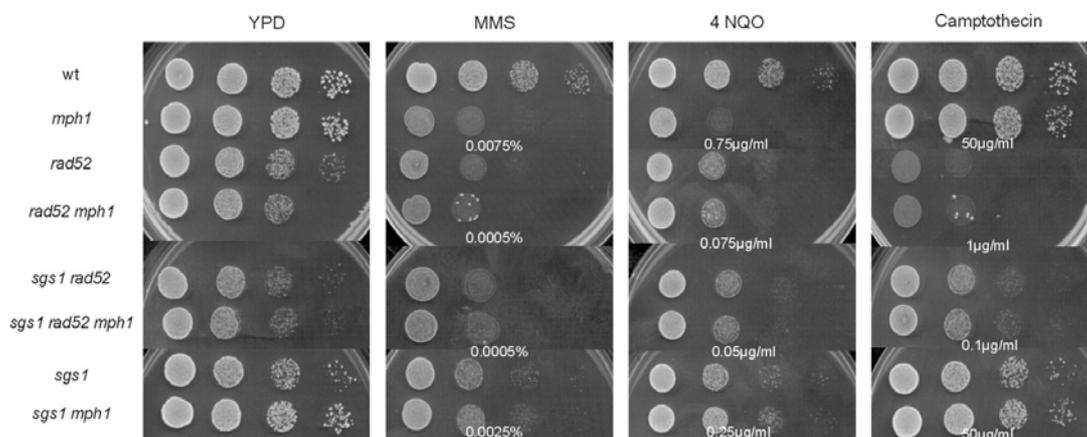


Abbildung 16: Sensitivität von *sgs1*, *rad52* und *mph1* gegenüber MMS, 4-NQO und CPT. Die jeweiligen Stämme wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, auf die Platten mit den Chemikalien getropft (Konzentration angegeben unter der jeweiligen Einzel- und Doppelmutante mit *mph1*).

Aufgrund der Mutationsraten kann *sgs1* jedoch nicht in die *RAD52*-Epistasisgruppe eingeordnet werden. Vielmehr zeigt *sgs1* den gleichen Effekt auf den *rad52*-Mutatorphänotyp, wie bereits bei *mph1* beobachtet. *rad52* ist hypostatisch zu *sgs1*, d. h. *sgs1* reduziert den Mutatorphänotyp von *rad52* (Tabelle 17). Da für den von *MPH1* beschriebenen Weg die Gene der *RAD51/RAD52*-Epistasisgruppe notwendig sind, ist es nicht verwunderlich, dass *sgs1* auf *rad52* den gleichen Effekt hat wie auf *mph1*.

Bei der Untersuchung der genetischen Interaktion von *sgs1*, *rad52* und *mph1* zeigt sich, dass *mph1* jeweils hypostatisch zu *rad52* ist. Die genetische Interaktion von *sgs1* und *rad52* ist jedoch unterschiedlich, je nachdem welchen Phänotyp man betrachtet. Bezogen auf den Mutatorphänotyp, bei dem die Fähigkeit der Mutanten der fehlerfreien Umgehung von DNA-Läsionen betrachtet wird, ist *sgs1* epistatisch zu *rad52*. Bei den Sensitivitäten ist *rad52* epistatisch zu *sgs1*. Bei der Untersuchung auf Sensitivität müssen die Mutanten mit der Daueranwesenheit von DNA-schädigenden

Agenzien umgehen. Hierbei werden mit großer Wahrscheinlichkeit mehr als nur die Schäden induziert, die durch fehlerfreie Umgehung prozessiert werden können. Vielmehr setzt sich die beobachtete Sensitivität einer Mutante aus allen Funktionen des entsprechenden Genproduktes zusammen. Da Rad52 - neben der postulierten Funktion bei der fehlerfreien Umgehung von replikationsarretierenden DNA-Schäden - unabdingbar für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen ist, ist es durchaus erklärbar, dass *rad52* epistatisch zu *sgs1*, wie bereits gezeigt (Onoda et al. 2001), als auch zu *mph1* ist.

Tabelle 17: Einfluss von *sgs1* auf den *rad52* und *rad52 mph1*-Mutatorphänotyp im Canavaninvorwärtsmutationssystem.

Stamm	Mutationsrate	Faktor	Stamm	Mutationsrate	Faktor
wt	$5.5 \pm 0.76 \cdot 10^{-7}$	1	<i>mph1</i>	$30.3 \pm 4.3 \cdot 10^{-7}$	5.5
<i>sgs1</i>	$12.6 \pm 2.2 \cdot 10^{-7}$	2.3	<i>sgs1 mph1</i>	$23.6 \pm 3.8 \cdot 10^{-7}$	4.3
<i>rad52</i>	$63.8 \pm 7.8 \cdot 10^{-7}$	11.6	<i>rad52 mph1</i>	$50.1 \pm 6.3 \cdot 10^{-7}$	9.1
<i>sgs1 rad52</i>	$22.5 \pm 2.1 \cdot 10^{-7}$	4.1	<i>sgs1 rad52 mph1</i>	$28.1 \pm 3.7 \cdot 10^{-7}$	5.1

Die Faktoren wurden durch Normalisierung der Mutantenmutationsraten zur wt-Mutationsrate in dem jeweiligen Experiment berechnet. Die Fehler geben die Standardabweichungen laut der Berechnung nach Lea und Coulson 1948 wieder.

BLM kann partiell den Phänotyp von *sgs1 mph1* komplementieren

Das Bloom-Gen ist das humane Homologe von *SGS1* aus Hefe (Watt et al. 1996). Für BLM wurde gezeigt, dass es *in vitro Holliday Junctions* verschieben kann (Karow et al. 2000). Die Hypothese, dass *SGS1* in einem nicht-rekombinativen Prozess bei der Auflösung von arretierten Replikationsgabeln involviert ist, wird durch diesen Befund gestützt, wenn man diese biochemische Aktivität auch für *Sgs1* annimmt. Wenn diese fehlende biochemische Aktivität den Phänotyp von *sgs1 mph1* bedingt, sollte der Phänotyp – zumindest teilweise – durch BLM komplementiert werden können. Für die Untersuchung der Komplementation wurden *sgs1*- und *sgs1 mph1*- Zellen mit verschiedenen *SGS1*- und BLM-Konstrukten transformiert. Bei den *single copy* Plasmiden pJH626 *SGS1* und pJH626 BLM (pRS316-Derivate) stehen die beiden Gene unter der Kontrolle des starken, konstitutiven humanen Promotors des *house keeping* Genes der Triosephosphat-Isomerase (TPI), so dass eine relativ große Menge an *Sgs1* und BLM zu erwarten ist. Damit wird bei *SGS1* wahrscheinlich nicht die natürlich vorkommende Menge des Proteins exprimiert, sondern deutlich mehr. Bei pYES *SGS1* und pYES BLM handelt es sich um *multi copy*-Plasmide (2 μ ori), wobei das Gen zusätzlich unter der Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors steht und damit zur Überexpression des jeweiligen Gens führen sollte.

Für die Untersuchung der Komplementation des Mutatorphänotypes von *sgs1 mph1* wurden die Zellen in SC-ura angezogen und ein Aliquot davon auf CAN-ura-Platten ausgestrichen. Bei *sgs1 mph1*-Zellen entstehen nur wenige canavanin-resistente Kolonien (Abbildung 17, pRS316), was den reduzierten *mph1*-Mutatorphänotyp durch *sgs1* widerspiegelt. Komplementiert mit *SGS1* (pJH626 *SGS1*) sind deutlich mehr Kolonien sichtbar (Abbildung 17, pJH *SGS1*). Der *mph1*-Mutatorphänotyp wird wieder hergestellt. Für die BLM-Komplementation wurden sowohl das

single copy TPI-Konstrukt (pJH626 BLM) als auch das *multi copy* GAL-Konstrukt (pYES BLM) verwendet. Das humane BLM-Protein kann den *sgs1 mph1*-Phänotyp komplementieren und den *mph1*-Mutatorphänotyp wieder herstellen, wenn auch nur beim *multi copy* GAL-Konstrukt (Abbildung 17, pYES BLM).

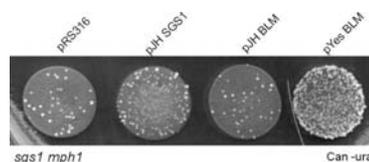


Abbildung 17: Komplementation von *sgs1 mph1* Zellen mit *SGS1* und *BLM* zur Untersuchung des Mutatorphänotypes im Canavaninvorwärtsmutationssystem. Die Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transformiert (Abkürzungen der Vektoren: pJH *SGS1* entspricht pJH626 *SGS1*, pJH *BLM* entspricht pJH626 *BLM*), in SC-ura angezogen und auf CAN-ura-Platten auf das Ausprägen von canavaninresistenten Zellen untersucht.

Da die Komplementation mit Glukosemedium durchgeführt wurde und dadurch der Galaktose-induzierbare Promotor reprimiert wird, sollten nur geringe Menge des *BLM*-Proteins vorhanden sein (unter der Annahme, dass die Repression des Promotors nicht vollständig ist). Eine Komplementation mit dem TPI-*BLM*-Konstrukt (pJH626 *BLM*) kann nicht beobachtet werden (Abbildung 17, pJH *BLM*).

Die Komplementation mit *SGS1* und *BLM* wurde auch bzgl. der Sensitivität der *sgs1 mph1*-Mutante gegenüber *MMS* und *CPT* untersucht. Auch hier kann *SGS1* sowohl die *MMS*, als auch die *CPT*-Sensitivität von *sgs1 mph1* wieder aufheben (Abbildung 18, Vergleich dritte Reihe mit erster Reihe und Abbildung 15). Auch das *BLM*-Protein kann die Sensitivität von *sgs1 mph1* partiell wieder aufheben (Abbildung 18, vierte und fünfte Reihe): *sgs1 mph1*-Zellen mit pJH626 *BLM* oder mit pYES *BLM* sind weniger sensitiv, als die gleichen Zellen mit dem Leerplasmid (Abbildung 18, zweite Reihe), und das sowohl bei *MMS*, als auch bei *CPT*.

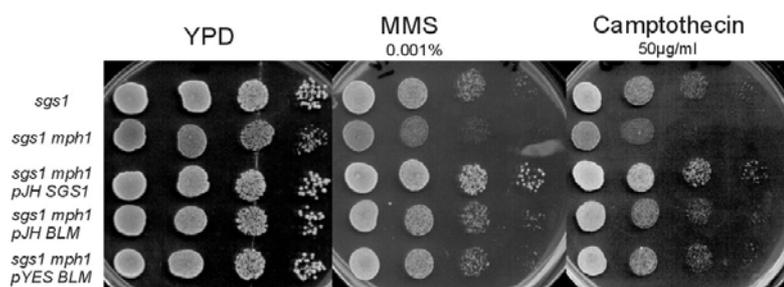


Abbildung 18: Sensitivität von *sgs1 mph1*-Zellen nach Komplementation mit *SGS1* und *BLM* gegenüber *MMS* und *Camptothecin*. Die Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transformiert (*sgs1* und *sgs1 mph1* wurden mit pRS316 transformiert, Abkürzungen der Vektoren: pJH *SGS1* entspricht pJH626 *SGS1*, pJH *BLM* entspricht pJH626 *BLM*), in SC-ura angezogen und, wie in Material und Methoden beschrieben, auf die Platten mit den Chemikalien getropft.

Durch die Komplementation mit pYES *BLM* auf Glukosemedium festigt sich die Hypothese, dass die unter diesen Bedingungen vermutlich nur geringen Mengen an

BLM ausreichen, um eine Komplementation zu erreichen. Weiterhin zeigt sich, dass die BLM-Kopie im pJH62 BLM funktionell intakt ist, aber offensichtlich die plausibel anzunehmende deutlich stärkere Expression die Komplementation, im Gegensatz zum Mutatorphänotyp, nicht verhindert.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass der *sgs1 mph1*-Phänotyp durch *SGS1* komplementiert werden kann: Der Mutatorphänotyp von *mph1* wird wieder hergestellt und die starke Sensitivität der Doppelmutante kann aufgehoben werden. Hierdurch kann eine zusätzliche Hintergrundmutation als Ursache für den beobachteten Phänotyp von *sgs1 mph1* ausgeschlossen werden. Aber auch BLM kann partiell die Phänotypen der *mph1*-Mutante wieder herstellen. Da das BLM Protein *in vitro Holliday Junctions* verschieben kann, ist anzunehmen, dass diese biochemische Aktivität zu der Komplementation beiträgt und dass diese fehlende biochemische Aktivität den *sgs1 mph1*-Phänotyp - zumindest zum Teil - bedingt. Des Weiteren kann man rückschließen, dass auch Sgs1 diese biochemische Aktivität besitzt. Durch das Verschieben z. B. einer *Holliday Junction* schafft somit Sgs1 ein Substrat, das in Abwesenheit von *mph1* über Translasionssynthese umgangen werden kann. In der *sgs1 mph1*-Mutante findet dann in geringerem Maße Translasionssynthese statt, weil diese Substrate rekombinogen umgangen werden (Tabelle 12, S. 50). Allerdings sollte man berücksichtigen, dass der Hyperrekombinationsphänotyp von *mph1* mit heteroallelischer mitotischer Rekombination gemessen wurde, bei dem der Informationsaustausch vom homologen Chromosom erfolgt und dass *SGS1* den Informationstransfer vom Schwesterchromatid negativ reguliert (Onoda *et al.* 2000). Die verstärkt rekombinogene Auflösung der Substrate ist also möglich, weil durch das Fehlen von *SGS1* der Schwesterchromatidaustausch nicht mehr verhindert wird. Die partielle Suppression des *sgs1 mph1*-Phänotyps durch BLM kann aber auch durch die physikalische Interaktion mit Top3 bedingt sein. Sgs1 interagiert mit seinem N-Terminus mit Top3 (Bennett *et al.* 2000). In Säugern gibt es zwei Isoformen von Top3, TOPO III α und TOPO III β . Für BLM konnte gezeigt werden, dass es mit TOPO III α interagiert (Wu *et al.* 2000, Hu *et al.* 2001). Wenn der Phänotyp der *sgs1 mph1*-Mutante also auch zum Teil durch die fehlende Interaktion und damit Funktion von Top3 bedingt ist, und diese Funktion durch BLM nicht vollständig hergestellt werden kann, wäre nur eine partielle Komplementation zu erwarten. Gestützt wird diese Hypothese von dem Befund, dass die N-terminale Domäne von Sgs1 für die Suppression der MMS-Sensitivität und des Hyperrekombinationsphänotyps von *sgs1* benötigt wird (Ui *et al.* 2001). Es bleibt also zu zeigen, ob der Phänotyp von *sgs1 mph1* durch die Helikaseaktivität und/oder auch durch die Top3-Sgs1-Interaktion verursacht wird.

Die *SGS1*-Überproduktion ist toxisch in *mph1*-Zellen

In *mph1*-Zellen werden DNA-Läsionen mutagen überlesen. Dies verringert sich, wenn durch das zusätzliche Fehlen von *sgs1* diese Läsionen vermehrt rekombinogen umgangen werden. Führt dann die verstärkte Expression von *SGS1* in *mph1*-Zellen zu einer verringerten Mutationsrate und Rekombinationsrate? Für die Überexpression von *SGS1* wurde der Vektor pJH626 *SGS1* verwendet, bei dem *SGS1* nicht unter Kontrolle des eigenen Promotors steht, sondern unter der Kontrolle des humanen Promotors des *house keeping* Gens der Triosephosphat-Isomerase (TPI). Die Über-

expression von *SGS1* sollte in Wildtyp-, *mph1*- und *sgs1*-Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen sowohl mit dem Leervektor pRS316, als auch mit pJH626 *SGS1* transformiert. Bereits bei der Transformation fiel auf, dass *mph1*-Zellen, transformiert mit pJH626 *SGS1*, nur sehr kleine Kolonien hervorbrachten und bei erneutem Ausstreichen der Kolonien sehr schlecht wuchsen. Diesen Wachstumsdefekt zeigten *mph1*-Zellen, transformiert mit pJH626 BLM, nicht (Abbildung 19).

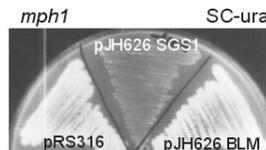


Abbildung 19: Überexpression von *SGS1* und BLM in *mph1*-Zellen. CEN.PK2-1c *mph1*-Zellen wurden mit pRS316, pJH626 *SGS1* oder pJH626 BLM transformiert und auf SC-ura-Medium ausgestrichen.

Um dies zu verifizieren, wurden Wachstumskurven von wt-, *sgs1*- und *mph1*- Zellen aufgenommen. Die Messung der Zunahme der optischen Dichte der Zellen, entweder transformiert mit pRS316 als Kontrolle oder mit pJH626 *SGS1* zur Überexpression von *SGS1*, wurde in SC-ura Medium durchgeführt. Wie in Abbildung 20 verdeutlicht, zeigen Wildtyp-, *sgs1*- und *mph1*-Zellen, transformiert mit pRS316, und die *sgs1*-Zellen mit dem Überexpressionskonstrukt fast keine Unterschiede in der Zunahme der optischen Dichte. Die optische Dichte nimmt jedoch bei *mph1*-Zellen, transformiert mit dem *SGS1*-Überexpressionskonstrukt nicht zu (Abbildung 20, links), was auf einen toxischen Effekt von *Sgs1* deutet. Um die Expression von *SGS1* besser kontrollieren zu können, wurden die Wachstumskurven erneut aufgenommen, jedoch stand hier das *SGS1*-Gen unter der Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors (pYES *SGS1*). Die Wachstumskurven mit diesem Konstrukt wurden unter nicht-induzierten (in Glukose) und induzierten (in Galaktose) Bedingungen aufgezeichnet (Abbildung 20, rechts). Während die Zellen unter den nicht-induzierten Bedingungen (weiß ausgefüllte Symbole) eine stetige Zunahme der optischen Dichte zeigen, so führt das Wachstum der gleichen Transformanten in Galaktose-haltigem Medium (schwarz ausgefüllte Symbole) zu einer deutlich geringeren Zunahme der optischen Dichte, und das nicht nur in *mph1*-Zellen, sondern auch im wt und in *sgs1*-Zellen (Abbildung 20 rechts). Dies verdeutlicht, dass die Überexpression von *SGS1* in Wildtyp- und *sgs1*-Zellen zu Wachstumsverzögerungen führt. Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei der Überexpression von *rqh*⁺ in *Schizosaccharomyces pombe* gezeigt (Ahmad *et al.* 2002). Der Verlust von Chromosomen und Probleme bei der Chromosomensegregation werden dabei als Ursache für diese Wachstumsverzögerung diskutiert. Hier kann gezeigt werden, dass die Überexpression von *SGS1* in *mph1*-Zellen nicht nur zur Wachstumsverzögerung führt, sondern toxisch ist.

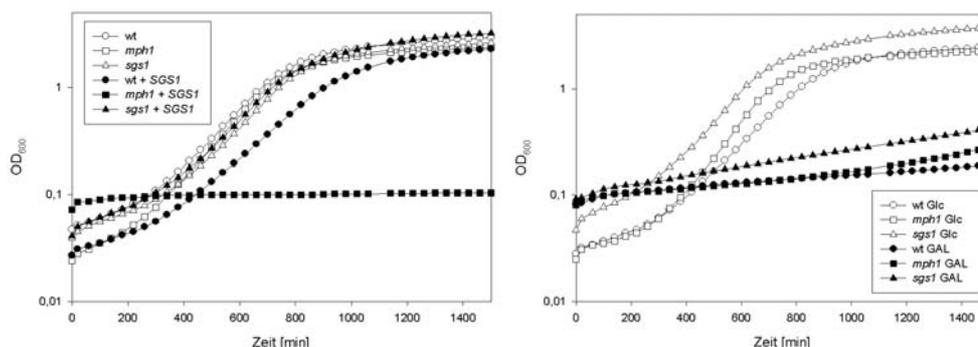


Abbildung 20: Wachstumskurven von Wildtyp-, *sgs1*- und *mph1*-Zellen.

Links: Die Wachstumskurven der Zellen, die mit pRS316 (ohne zusätzliche Beschriftung) oder mit pJH626 *SGS1* (+ *SGS1*) transformiert wurden, wurden in SC-ura Medium aufgenommen.

Rechts: Die Expression von *SGS1* wurde entweder durch Wachstum in SC-ura mit Glukose inhibiert oder durch Wachstum in SC-ura mit Galaktose als Kohlenstoffquelle induziert. Die Zellen (*wt*, *sgs1*, *mph1*) enthalten das *multi copy*-Plasmid pYES *SGS1*-Plasmid, bei dem *SGS1* unter der Kontrolle des Galaktose-induzierbaren *GAL*-Promotors steht. Die Wachstumskurven wurden, wie unter Material und Methoden (S. 32) beschrieben, aufgenommen und halblogarithmisch aufgetragen.

Die Untersuchung der mitotischen Rekombinationsrate, sowie der Mutationsrate von *mph1*-Zellen bei Überexpression von *SGS1* war auf Grund des schlechten Wachstums der Zellen nicht möglich. Es wurde aber der Einfluss der *SGS1*- als auch der *BLM*-Überexpression auf die Sensitivität von *mph1*-Zellen gegenüber CPT untersucht. Dazu wurden Wildtyp- und *mph1*-Zellen als auch *sgs1*- und *sgs1 mph1*-Zellen mit den *single copy* TPI-Konstrukten (pJH626 *SGS1*, pJH626 *BLM*) und den *multi copy* *GAL*-Konstrukten (pYES *SGS1*, pYES *BLM*) von *SGS1* und *BLM* und den jeweiligen Leerplasmiden (pRS316, pYES2) transformiert. Die Sensitivität wurde im *Drop Dilution* Assay untersucht, wobei die Zellen in glukosehaltigem SC-ura angezogen und auf YPD-Platten (Glukose als C-Quelle) mit den DNA-schädigenden Agenzien getropft wurden (Abbildung 21).

Die bereits beschriebene Toxizität der *SGS1*-Überproduktion in *mph1*-Zellen wird auch hier wieder deutlich. Wie in Abbildung 21 zu verfolgen, wachsen *mph1*-Zellen bei Überexpression von *SGS1* (pJH626 *SGS1*- und pYES2 *SGS1*-Konstrukt) schlechter, als Zellen mit dem Leerplasmid (pRS316, pYES2). Dieser Effekt wird deutlicher bei der Dauerinkubation mit Camptothecin: Die Überexpression von *SGS1* führt zum Absterben der Zellen. Selbst geringe Mengen an Sgs1, die man beim pYES *SGS1*-Konstrukt bei Anzucht in Glukose erwartet, führen zu diesem Effekt. Plausibel scheint die Überproduktion von *SGS1* zur Anhäufung eines Intermediates zu führen, welches in *mph1*-Zellen nur schwer aufgelöst werden kann und den extremen Wachstumsdefekt, ähnlich wie bei *top3* beschrieben, zur Folge hat. Werden zusätzlich durch Camptothecin Einzel- und Doppelstrangbrüche und damit Replikationsarreste induziert, können diese DNA-Läsionen nicht mehr aufgelöst werden und die Zellen sterben. Diskussionsbedürftig sind die Daten mit pYES2 *SGS1*. Auch unter nicht-induzierten Bedingungen, wobei nur wenige Proteine exprimiert werden sollten, kam es zu dem toxischen Effekt. Warum wird dieser Wachstumsdefekt dann nicht in *mph1*-

Zellen beobachtet, wo die Wildtypkopie von *SGS1* vorhanden ist? Zwei Möglichkeiten wären denkbar: Die Wildtypmenge an Sgs1 ist noch niedriger, als unter den durchgeführten Bedingungen (eine Abschätzung der Proteinmenge wurde nicht durchgeführt). Außerdem ist vorstellbar, dass *SGS1* einer transkriptionellen Kontrolle unterliegt, die im *mph1*-Stammhintergrund zum Tragen kommt. Die Expression von BLM führt in *mph1*-Zellen nicht zu dem drastischen Effekt (Abbildung 21). Möglicherweise kann BLM die volle Funktion von Sgs1, die zu diesem Phänotyp führt, nicht übernehmen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Funktion beider Proteine diesbezüglich unterscheidet oder dass für die vollständige Funktion von BLM weitere Interaktionspartner notwendig sind, die in der Hefe nicht zur Verfügung stehen.

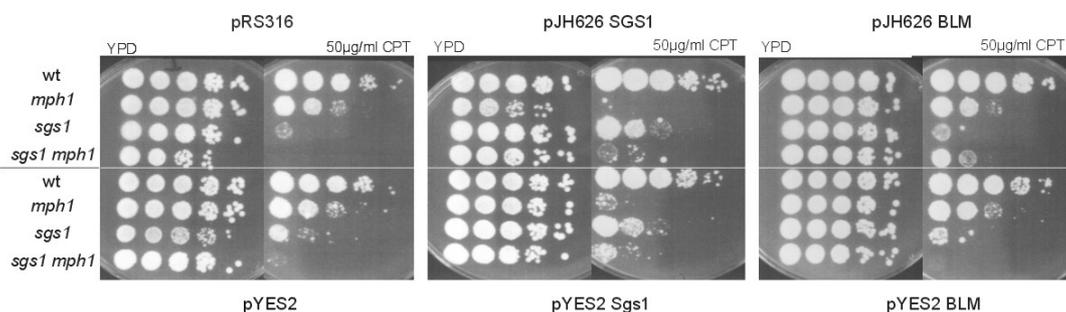


Abbildung 21: Sensitivität von *mph1*-Zellen unter Expression von *SGS1* und BLM gegenüber Camptothecin im Vergleich zu Wildtyp-, *sgs1*- und *sgs1 mph1*-Zellen. Die Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transformiert, in SC-ura (Glukose als C-Quelle) angezogen und, wie in Material und Methoden beschrieben, auf die YPD-Platten (Glukose als C-Quelle) mit den Chemikalien getropft.

Die Überexpression von *SGS1* in *mph1*-Zellen führt zu einer Wachstumsverzögerung der Zellen und ist nach Camptothecin-induzierten Schäden toxisch für die Zellen. Die Wachstumsverzögerung bei *SGS1*-Überproduktion in Wildtypzellen zeigt, dass die übermäßige Aktion von *SGS1* ein generelles Problem für die Zelle darzustellen scheint. Dies kann zum einen bedeuten, dass der Zellzyklus durch das vermehrte Auftreten eines Intermediates, welches sich durch die verstärkte Aktion von Sgs1 bildet, angeschaltet wird und dies die Wachstumsverzögerung bewirkt. Eine Involvierung von Sgs1 in die Signalweiterleitung über den *DNA damage checkpoint* wurde gezeigt (Frei und Gasser 2000).

SRS2

Eine Rolle bei der fehlerfreien Umgehung von DNA-Läsionen wurde ebenfalls für Srs2 postuliert, da die Suppression der UV-Sensitivität von *rad6* und *rad18* durch *srs2* speziell über den *RAD5/MMS2/IUBC13*-Weg vermittelt wird (Schiestl *et al.* 1990, Ulrich 2001). *SRS2* kodiert wie *SGS1* für eine ATP-abhängige DNA-Helikase mit 3'-5'-Polarität (Rong und Klein 1993). Srs2 gehört jedoch nicht zur RecQ-Familie, sondern zeigt Ähnlichkeit zu UvrD aus *E. coli* (Aboussekhra *et al.* 1989). Ein Homologes von Srs2 in Eukaryoten konnte bisher nicht identifiziert werden (Fabre *et al.* 2002). Das bevorzugte Substrat von Srs2 ist DNA mit einem 3'-Überhang (Veaute *et al.* 2003). Biochemisch konnte kürzlich gezeigt werden, dass Srs2 die Bildung des Rad51-Nukleo-

filamentes verhindern, bzw. wieder auflösen kann und dass es auch die Ausbildung des D-Loops verringert (Veaute *et al.* 2003, Krejci *et al.* 2003). *srs2*-Mutanten zeigen, wie *sgs1*-Mutanten, einen Hyperrekombinationsphänotyp (Rong *et al.* 1991). Außerdem haben *sgs1*- und *srs2*-Mutanten einen ähnlichen Phänotyp, wie z. B. die HU- und MMS-Sensitivität. Es konnte gezeigt werden, dass die *srs2*-Sensitivität durch *SGS1*-Überproduktion aufgehoben werden kann, aber nicht andersherum (Mankouri *et al.* 2002). Dies impliziert, dass beide Proteine ein überlappendes Substratspektrum haben. Die Deletion von *sgs1* und *srs2* führt zu einem extremen Wachstumsdefekt (Lee *et al.* 1999, Gangloff *et al.* 2000), der durch die Anhäufung rekombinogener Intermediate, die den *DNA damage checkpoint* aktivieren, erklärt wird, da sich der extreme Wachstumsdefekt durch Deletion von Genen der homologen Rekombination (*rad51*, *rad52*, *rad55*, *rad57*) wieder aufheben lässt (Gangloff *et al.* 2000, Klein *et al.* 2001, McVey *et al.* 2001). Neben dem bereits beschriebenen extremen Wachstumsdefekt von *srs2 sgs1*, zeigt *srs2* eine synthetisch letale Interaktion mit einer Vielzahl von Mutanten, für die alle eine Funktion bei der fehlerfreien Umgehung von DNA-Läsionen an arretierten Replikationsgabeln postuliert wurde. So ist *srs2* synthetisch letal mit *top3* und auch mit *rad54*, die wie bei *sgs1* durch Deletion von *rad51*, *rad52*, *rad55*, *rad57* wieder aufgehoben werden kann (Schild 1995, Klein 2001). Weitere synthetisch letale Interaktionspartner sind *rad27*, *rad50*, *mre11*, *xrs2* (Klein 2001) und wie kürzlich in einem genomischen Screen identifiziert u.a. *slx8* (Mullen *et al.* 2001), *mrc1*, *tof1* (Ooi *et al.* 2003). *Slx8* wurde durch eine synthetisch letale Interaktion mit *sgs1* identifiziert und *Mrc1* und *Tof1* sind Komponenten des *DNA damage checkpoint*. *Mrc1* wird, ähnlich wie *Rad9*, für die Aktivierung von *Rad53* benötigt (Alcasabas *et al.* 2001) und bildet einen Komplex mit *Tof1* (Katou *et al.* 2003). Eine Interaktion von *Srs2* mit dem *DNA damage checkpoint* ist bereits bekannt: *Srs2* wird *Rad53*-abhängig phosphoryliert (Liberi *et al.* 2000, Vaze *et al.* 2002, siehe S. 79). All diese Daten unterstreichen, dass in Abwesenheit von *srs2*, durch die Aktion der Proteine der homologen Rekombination, es vermehrt zum Auftreten von Intermediaten kommt, die den *DNA damage checkpoint* aktivieren und dass *Srs2* rekombinative Prozesse negativ reguliert, die sonst zu genomischer Instabilität führen würden.

Tabelle 18: Einfluss von *srs2* auf den *mph1*-Mutatorphänotyp im Canavanin-vorwärtsmutationssystem.

Stamm	Mutationsrate	Faktor	Stamm	Mutationsrate	Faktor
wt	1) $5.4 \pm 0.76 \cdot 10^{-7}$	1	<i>mph1</i>	1) $30.3 \pm 4.3 \cdot 10^{-7}$	5.5
	2) $2.5 \pm 0.4 \cdot 10^{-7}$	1		2) $16.1 \pm 2.0 \cdot 10^{-7}$	6.4
	3) $4.2 \pm 0.55 \cdot 10^{-7}$	1		3) $27.8 \pm 3.0 \cdot 10^{-7}$	7
<i>srs2</i>	1) $21.4 \pm 2.6 \cdot 10^{-7}$	3.9	<i>srs2 mph1</i>	1) $6.6 \pm 1.0 \cdot 10^{-7}$	1.2
	2) $7.5 \pm 1.0 \cdot 10^{-7}$	3		2) $2.7 \pm 0.42 \cdot 10^{-7}$	1.1
	3) $3.8 \pm 0.5 \cdot 10^{-7}$	0.9		3) $8.1 \pm 1.1 \cdot 10^{-7}$	1.9

Die unterschiedlichen Experimente, in denen wt und *mph1* jeweils als interne Kontrolle mitgezogen wurden, sind durch die Indices 1)- 3) angegeben. Die Faktoren wurden durch Normalisierung der Mutantenmutationsraten zur wt-Mutationsrate in dem jeweiligen Experiment berechnet. Die Fehler geben die Standardabweichungen laut der Berechnung nach Lea und Coulson 1948 wieder.

Es lag also nahe, die genetische Interaktion von *srs2* und *mph1* zu untersuchen. Die Einzel- und Doppelmutante wurden auf den Mutatorphänotyp und die Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien untersucht. Die *srs2*-Mutante zeigt einen mit *sgs1* vergleichbaren Phänotyp: Sie ist sensitiv gegenüber MMS, 4-NQO und auch leicht gegenüber CPT (Abbildung 15) und hat eine leicht erhöhte Mutationsrate (Tabelle 18).

Auch die Doppelmutante mit *mph1* verhält sich ähnlich wie die *sgs1 mph1*-Doppelmutante. Neuere Versuche in unserem Labor, die *srs2 mph1*-Doppelmutante zu rekonstruieren (E. Panico, unveröffentlicht), scheiterten. Dies erweckte die Hypothese, dass es sich bei *srs2* und *mph1* um eine synthetische Letalität handeln könnte und die bis dahin verwendete Doppelmutante durch eine zusätzliche Hintergrund-Mutation überleben kann. Die erfolgreiche Deletion eines Genes wird durch PCR nachgewiesen (Tabelle 3, Abbildung 2, S. 19). Auch im Falle der *srs2 mph1*-Doppelmutante konnten alle erforderlichen Produkte, die auf die Deletion von *SRS2* an der richtigen chromosomalen Position schließen ließen, erhalten werden (Abbildung 22). Aber in der Doppelmutante wurde auch ein PCR-Produkt erhalten, das nur in Wildtypzellen vorhanden sein sollte (Primerkombination: 5' intern und 3' screen). Es scheint also in der *srs2 mph1*-Mutante ein Wildtyp-*SRS2*-Genfragment erhalten geblieben zu sein, was das Überleben dieser Mutante sichern könnte.

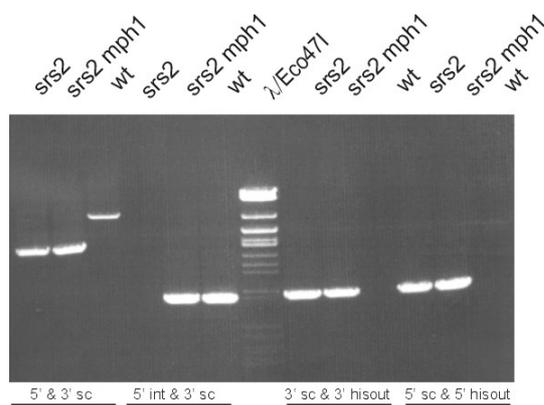


Abbildung 22: Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten zum Nachweis der *srs2*-Deletion von *srs2*- und *srs2 mph1*-Mutanten. Die zu erwartenden Produkte und die jeweiligen Primerkombinationen sind in Material und Methoden angegeben (S. 21). In der *srs2 mph1*-Doppelmutante werden wie in der *srs2*-Mutante alle erwarteten Produkte erhalten, jedoch zusätzlich eine Bande (5' int und 3' screen), die nur im Wildtyp zu einem Produkt führen sollte.

Eine synthetisch-letale genetische Interaktion von *srs2* mit *mph1* konnte bisher in genomisch angelegten Screens nicht aufgezeigt werden (Ooi *et al.* 2003). Neben der weiteren Festigung dieser genetischen Interaktion in unserem Labor durch Komplementation und Tradenanalyse wird derzeit ebenfalls in einem genomischen Screen durch Tradenanalyse (Tong *et al.* 2001) in Kooperation mit Amy Tong und Charlie Boone nach synthetisch letalen Interaktionspartnern von *mph1* gesucht.

RAD27 & MMS4

Die bisher gezeigten genetischen Interaktionen von *mph1*-Mutanten implizieren eine Funktion von *MPH1* bei der fehlerfreien Auflösung von arretierten Replikationsgabeln. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass z. B. durch *fork regression* rekombinative Intermediate (*Holliday Junctions*) an arretierten Replikationsgabeln auftreten können (Seigneur *et al.* 1998). *Holliday Junctions* (HJ) können durch Schneiden der DNA-Stränge durch Resolvasen wieder aufgelöst werden. Ein Aminosäuresequenzvergleich von Mph1 zeigte, dass die putativen Mph1-Homologe aus Archaea, Maus und Mensch C-terminal zusätzlich Homologien zu einer Endonuklease mit Homologien zur XPF-Endonuklease zeigen (W. Kramer, unveröffentlicht). Es stellt sich die Frage, ob die Funktion von Mph1 an die einer Endonuklease gekoppelt ist, z. B. indem eine Endonuklease die durch Mph1 gebildeten Substrate entfernen kann. XPF ist eine Struktur-spezifische Endonuklease, die als Heterodimer mit ERCC1 agiert und Funktionen in der Nukleotidexcisions-reparatur, aber auch bei der mitotischen Rekombination wahrnimmt (Niedernhofer *et al.* 2001). Die gleichen Rollen wurden für das XPF/ERCC1-Homologe in Hefe, dem Rad1/Rad10-Komplex, beschrieben (Prado und Aguilera 1995, Paques und Haber 1999), der Doppelstrang-DNA 5' von UV-induzierten Läsionen und 3'-Überhänge schneiden, und damit 3'-*flap*-Strukturen entfernen kann (Bardwell *et al.* 1994). Auch der Mms4/Mus81-Komplex ist ein XPF/ERCC1-Homologes (siehe unten). Eine weitere Endonuklease ist das Hefehomolog der humanen FEN1-Endonuklease Rad27/Rth1 (Harrington und Lieber 1994), die biochemisch eine 5'-3'-Exonuklease und eine PCNA stimulierte Endonukleaseaktivität zeigt (Li *et al.* 1995). Rad27 und FEN1 können 5'-*flap*-Strukturen auflösen, wobei hauptsächlich eine Funktion am *lagging strand* bei der Reifung von Okazakifragmenten angenommen wird. Dabei stellt man sich vor, dass die RNA-Primer, die am *lagging-strand* durch Primase/Pol α gebildet und dann durch Pol δ/ϵ zum Okazakifragment verlängert werden, durch die Aktion von Dna2-Helikase, RNase H1 und Rad27 entfernt werden. Dabei schält Dna2 den RNA-Primer ab (Budd *et al.* 1997), RNase H1 spaltet den RNA-Primer am DNA/RNA-Übergang (Murante *et al.* 1998) und Rad27 baut die überhängende 5'-Einzelstrang-DNA (*flap*-Struktur) ab, bevor die Okazakifragmente ligiert werden können. Neuere Daten legen nahe, dass Rad27 auch 5'-*flap*-Strukturen entfernen kann, die entstehen, wenn Pol δ/ϵ nicht rechtzeitig am Ende des vorherigen Okazakifragmentes anhält und dieses durch *strand displacement* abgeschält wird (Ayyagari *et al.* 2003). In *rad27*-Mutanten treten verstärkt Einzelstrang-Substrate auf (Parenteau und Wellinger 1999, Merrill und Holm 1998). Außerdem zeigen sie einen erhöhten spontanen Mutatorphänotyp, eine erhöhte mitotische Rekombinationsrate und sind u. a. stark sensitiv gegenüber MMS (Reagan *et al.* 1995). Außerdem ist *rad27* synthetisch letal mit Genen der homologen Rekombination und auch mit *srs2* (Tishkoff *et al.* 1997, Debrauwere *et al.* 2001). Die synthetisch letale Interaktion mit *sgs1* ist umstritten. Während Debrauwere keine synthetische Letalität gefunden haben (Debrauwere *et al.* 2001), wurde sie in zwei anderen Arbeiten, die synthetische Letalität im Arraymaßstab untersuchten, festgestellt (Ooi *et al.* 2003, Tong *et al.* 2001). Eine physikalische Interaktion von WRN und FEN1 und auch von BLM mit Rad27 konnte gezeigt werden und impliziert, dass beide Proteine an denselben Replikations- bzw. Reparaturprozessen beteiligt sind

(Brosh *et al.* 2001, Imamura und Campbell 2003). Aus diesen genetischen Interaktionen wird postuliert, dass während der Replikation in Abwesenheit von *RAD27* verstärkt Einzelstrangbereiche auftreten, die aus unligierten Okazakifragmenten resultieren.

Durch die Untersuchung der genetischen Interaktion von *rad27* und *mph1* soll abgeklärt werden, ob Rad27 im Mph1-Weg eine Rolle spielt. Die *rad27*-Einzelmutante und Doppelmutante mit *mph1* wurde auf den Mutatorphänotyp sowie auf die Sensitivität gegenüber MMS, 4-NQO und CPT getestet. Rad27 zeigt, wie in der Literatur beschrieben, einen Mutatorphänotyp. In der Doppelmutante mit *mph1* zeigt sich ein additiver Effekt (Tabelle 19).

Tabelle 19: Einfluss von *rad27* auf den *mph1*-Mutatorphänotyp im Canavanin-vorwärtsmutationssystem.

Stamm	Mutationsrate	Faktor	Stamm	Mutationsrate	Faktor
wt	$2.5 \pm 0.4 \cdot 10^{-7}$	1	<i>rad27</i>	$15.4 \pm 1.8 \cdot 10^{-7}$	6.2
<i>mph1</i>	$16.1 \pm 2.0 \cdot 10^{-7}$	6.4	<i>rad27 mph1</i>	$27.8 \pm 3.1 \cdot 10^{-7}$	11.1

Die Faktoren wurden durch Normalisierung der Mutantenmutationsraten zur wt-Mutationsrate in dem jeweiligen Experiment berechnet. Die Fehler geben die Standardabweichungen laut der Berechnung nach Lea und Coulson 1948 wieder.

Auch bei der Untersuchung der Sensitivität bestätigt sich der additive Effekt von *rad27* und *mph1* (Abbildung 23). In unserem Stammhintergrund (CEN.PK2) konnte jedoch die starke MMS-Sensitivität von *rad27*-Mutanten, beschrieben von Wu und Wang 1999, nicht festgestellt werden. Die genetische Interaktion von *mph1* mit *rad27* deutet an, dass beide Proteine in parallelen Wegen agieren. Damit erscheint es unwahrscheinlich, dass Rad27 z. B. eine von Mph1 gebildete Struktur auflöst.

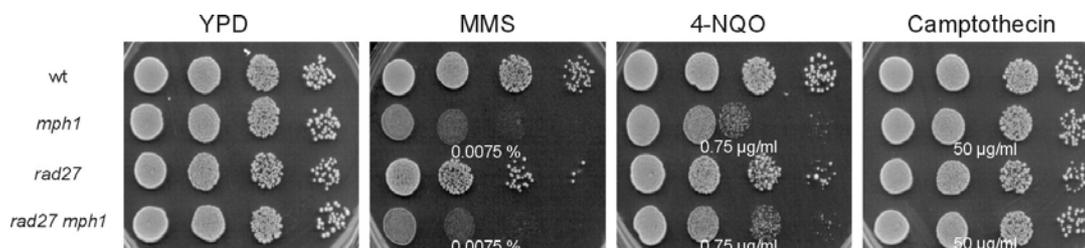


Abbildung 23: Sensitivität von *rad27* und *mph1* gegenüber MMS, 4-NQO und CPT. Die jeweiligen Stämme wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, auf die Platten mit den Chemikalien getropft (Konzentration angegeben unter der jeweiligen Einzel- und Doppelmutante mit *mph1*).

Das XPF-verwandte Protein Mus81 wurde in *Schizosaccharomyces pombe* durch seine Interaktion mit Cds1 (Homolog von Rad53) und mit Rad54 entdeckt (Boddy *et al.* 2000, Interthal und Heyer 2000). Mus81 ist essentiell in *rqh1*⁻-Zellen, was durch die Anhäufung von *Holliday Junctions* (HJ) während der Replikation interpretiert wird (Doe *et al.* 2000; Rqh1 ist das *Schizosaccharomyces pombe*-Homolog von Sgs1 und BLM). Diese Autoren konnten auch zeigen, dass die *rqh1*⁻-Phänotypen partiell durch die Expression von RusA, einer bakteriellen Resolvase, wieder aufgehoben werden

können. *sgs1* ist synthetisch letal mit *mus81* und *mms4* (Mullen *et al.* 2001). Es wurde postuliert, dass Mus81 in der rekombinativen Auflösung von HJ involviert ist, und zwar parallel zu einem nicht-rekombinativen Weg, der Rqh1-abhängig ist (Boddy *et al.* 2000). *mus81* ist epistatisch zu *mms4* (*eme1⁻* in *Schizosaccharomyces pombe*), was zu der Annahme führte, dass Mus81 und Mms4 im Komplex vorliegen (Mullen *et al.* 2001, Boddy *et al.* 2001). Für den Komplex konnte gezeigt werden, dass sowohl X- als auch Y-Strukturen aufgelöst werden können, indem der DNA-Doppelstrang 5' vom ds/ss-Übergang geschnitten wird (Boddy *et al.* 2001, Whitby *et al.* 2003, Kaliraman *et al.* 2001). Präferentiell werden aber auch Y-Strukturen bevorzugt, die arretierten Replikationsgabeln verwandt sind. Whitby *et al.* 2003 postulieren, dass diese Strukturen entstehen, wenn die Replikationsgabel zurückgeschoben wurde. Die Autoren von Bastin-Shanower *et al.* postulierten kürzlich, dass das bevorzugte Substrat jedoch eine 3'-*flap*-Struktur ist, wie sie nach dem *Reannealing* des invadierten und verlängerten 3'-Endes beim *synthesis-dependent strand annealing* auftreten kann (Bastin-Shanower *et al.* 2003).

Tabelle 20: Einfluss von *mms4* auf den *mph1*-Mutatorphänotyp im Canavaninvorwärts-mutationssystem.

Stamm	Mutationsrate	Faktor	Stamm	Mutationsrate	Faktor
wt	1.1±0.16*10 ⁻⁷	1	<i>mms4</i>	1.3±0.19*10 ⁻⁷	1.2
<i>mph1</i>	15.3±1.7*10 ⁻⁷	13.8	<i>mms4 mph1</i>	12.1±1.5*10 ⁻⁷	11

Gesamtzellzahl als Grundlage für die Bestimmung der Mutationsrate wurde mittels Zählkammer bestimmt. Die Faktoren wurden durch Normalisierung der Mutantenmutationsraten zur wt-Mutationsrate in dem jeweiligen Experiment berechnet. Die Fehler geben die Standardabweichungen laut der Berechnung nach Lea und Coulson 1948 wieder.

mms4 Mutanten zeigen einen zu *mph1* sehr ähnlichen Phänotyp: sie sind sensitiv gegenüber DNA-schädigenden Agenzien (wie MMS), sie haben einen spontanen Mutatorphänotyp und zeigen im *Two Hybrid* eine Transkriptionsaktivierung (Schürer 2000, Scheller *et al.* 2000, Xiao *et al.* 1998). Die Ähnlichkeit der Phänotypen, als auch die genetische Interaktion von *mph1* mit *sgs1*, implizierten die weitere Untersuchung der genetischen Interaktion mit *mms4*. So wurde der spontane Mutatorphänotyp, sowie die Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Giften untersucht. In unserem Stammhintergrund zeigt *mms4* keinen Mutatorphänotyp (Tabelle 20). Der Phänotyp der Doppelmutante ist in etwa additiv.

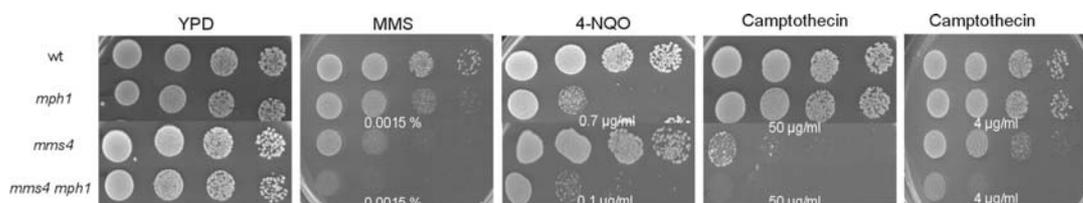


Abbildung 24: Sensitivität von *mms4* und *mph1* gegenüber MMS, 4-NQO und CPT. Die jeweiligen Stämme wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, auf die Platten mit den Chemikalien getropft (Konzentration angegeben unter der jeweiligen Einzel- und Doppelmutante mit *mph1*).

Bei den Sensitivitäten zeigt sich wie erwartet, dass *mms4*-Mutanten stark sensitiv sind, besonders gegenüber Camptothecin, bei dem vermutlich replikations-abhängige Doppelstrangbrüche erzeugt werden (vgl. Strumberg *et al.* 2000). Die Doppelmutante mit *mph1* ist jeweils stärker sensitiv als beide Einzelmutanten, und ist am ehesten als additiv einzustufen.

Die untersuchte MMS-Sensitivität in Flüssigkultur (Scheller *et al.* 2000), sowie die hier getesteten Phänotypen der *mms4* und *mph1*-Mutanten zeigen eine Additivität beider Gene. Die Sensitivitäten der Einzelmutanten zeigen, dass deren Genprodukte für das Überleben von DNA-Läsionen, die u. a. den Fortgang der Replikation beeinträchtigen, wichtig sind. Es scheint aber, dass *MMS4* und *MPH1*, wie auch schon für *RAD27* postuliert, in parallelen Wegen bei der Umgehung von replikations-arretierenden DNA-Läsionen agieren.

Interaktionen mit dem *DNA damage checkpoint*

Der Begriff *checkpoint* wurde für Mechanismen geprägt, die die einzelnen Schritte des Zellzyklus regulieren, indem aktiv der Beginn eines späteren Ereignisses vor dem angemessenen Abschluss eines früheren Ereignisses verhindert wird (Hartwell und Weinert 1989). Der *DNA damage checkpoint* (im folgenden DDC) ist ein Signaltransduktionsweg der den Zellzyklusfortgang (in G1 und G2) blockieren kann oder den Fortgang der Replikation (S-Phase) verzögert, wenn abnormale DNA Strukturen auftreten. Welches die Strukturen sind, die das tatsächliche Signal für die Aktivierung des *DNA damage checkpoint* darstellen, ist nicht genau bekannt. Sicher ist, dass DNA schädigende Agenzien und Fehler im Zellmetabolismus, wie z. B. der Arrest von Replikationsgabeln, dieses Signal hervorrufen können.

Der DDC beinhaltet Sensoren, Übermittler (*Transducer*) und Effektoren. Die Sensorproteine überwachen die DNA bzgl. Strukturabnormalitäten und initiieren das *checkpoint*-Signal. Die *Transducer* übertragen und verstärken dieses Signal. Eine bedeutende Rolle spielen dabei auch die sogenannten Adaptoren, die zwischen den Sensoren/*Transducer* und Effektoren „vermitteln“. Die Effektoren regulieren die biologischen Konsequenzen und sind Substrate von sowohl den Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI3K) als auch den CHK-Kinasen. Die Zelle reagiert dann auf die DNA-Schädigung mit Zellzyklusverzögerung, mit der Induktion von DNA-Reparatur, mit Transkriptionsaktivierung und in höheren Eukaryoten auch mit dem programmierten Zelltod (Apoptose).

Da alle Organismen mit den Problemen, die DNA-Schädigung und Replikationsblock hervorrufen, umgehen müssen, ist es nicht verwunderlich, dass die Hauptelemente und die generelle „Strategie“ des DDC bei Eukaryoten konserviert ist. Der Mechanismus des *DNA damage checkpoint* ist in *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* und in Säugern am besten verstanden. In Tabelle 21 sind die Namen der Homologen bei diesen Organismen zusammengestellt.

Die Frage nach dem eigentlichen Signal und dessen Erkennung durch die Sensoren im *DNA damage checkpoint* ist, wie oben bereits erwähnt, nach wie vor unklar. Während bei der normalen DNA Reparatur die abnormale DNA-Struktur durch eine spezifische Protein-DNA-Interaktion erkannt wird, reagiert der *DNA damage checkpoint* auf eine Vielzahl von Schäden. Ein Substrat, welches als häufiges Intermediat auftritt, ist

Einzelstrang-DNA, die *in vivo* nur gebunden an das eukaryotische Einzelstrangbindeprotein RPA vorkommt. So wurde tatsächlich kürzlich gezeigt, dass ein Komplex aus ss-DNA-RPA von ATR/ATRIR erkannt wird (Cortez *et al.* 2001, Carr 2003, Zou und Elledge 2003). Gleiches kann für den Mec1/Ddc2-Komplex (Paciotti *et al.* 2000, Rouse und Jackson, 2000) angenommen werden, wobei Ddc2 die ss-DNA-RPA-Struktur bindet und Mec1 auf die DNA lädt. Mec1 ist somit nicht nur ein *Transducer*, der über Phosphorylierung das Signal weiterleitet, sondern ist selbst ein Sensor. Mec1/ATR wird u. a. nach MMS- und HU-Behandlung und nach UV-Bestrahlung durch Autophosphorylierung aktiviert (Canman *et al.* 1998, Abraham 2001). Auch ATM/Tel1 bindet an DNA, wird jedoch hauptsächlich durch ionisierende Strahlung aktiviert (Autophosphorylierung; Canman *et al.* 1998). Für dieses PI3K-ähnliche Protein wird diskutiert, dass der Mre11/Rad50/Xrs2-Komplex, der mit ATM/Tel1 assoziiert ist, die Schadenserkennung (Doppelstrangbrüche) und DNA-Bindung übernimmt (Petrini 2000, D'Amours und Jackson 2001, Usui *et al.* 2001). Im Gegensatz zu ATM, führt die Deletion von ATR in Mäusen zu embryonaler Letalität (Brown und Baltimore, 2000). Dies gibt Hinweise darauf, dass ATR/Mec1/Rad3 beim Umgang mit genotoxischem Stress eine bedeutende Rolle zukommt, die möglicherweise bei der Überwachung und Wiederaufnahme von arretierten Replikationsgabeln liegt (Zhou und Elledge 2000).

Tabelle 21: Checkpoint-Homologe in verschiedenen Eukaryoten. Für Erläuterungen der Proteine und Abkürzungen siehe Text. Ebenfalls angegeben sind Erbkrankheiten, die kausal mit dem Ausfall der jeweiligen Proteine in Zusammenhang stehen. (?): Für diese Proteine wird eine Rolle in dem jeweiligen Prozess postuliert.

Funktionelle Klasse		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Säuger	Krankheiten
Sensoren	RFC-ähnlich	Rad24 Rfc2-5	Rad17 Rfc3	RAD17 RFC2-5	
	PCNA-ähnlich	Ddc1 Mec3 Rad17	Rad9 Hus1 Rad1	RAD9 HUS1 RAD1	
Sensoren/ Transducer		MRX ?	MRX ?	MRN ?	AT-like, NBS
	PI3K-ähnlich	Tel1 Mec1 Ddc2/Lcd1	Tel1 Rad3 Rad26	ATM ATR ATRIP	AT ATV
Adaptoren	BRCT	Rad9	Crb2/Rhp9	BRCA1? 53BP1 ?	Brustkrebs
		Mrc1	Mrc1	Claspin	
Effektor- kinasen	S/T-Kinasen	Rad53	Cds1	CHK2	Li-Fraumeni-S.
		Chk1	Chk1	CHK1	
Sonstige	RecQ-Helikase	Sgs1	Rqh	BLM WRN RECQL4	Bloom-S. Werner-S. RTH-S.

Weitere Kandidaten für Sensorproteine sind Rad24^{sc} (sc: *Saccharomyces cerevisiae*) und der Komplex aus Rad17^{sc}, Ddc1 und Mec3. Der Komplex aus Rad17/Ddc1/Mec3 (auch als 9-1-1 Komplex bezeichnet in Anlehnung an die *Schizosaccharomyces pombe*

und Säuger-Nomenklatur) ähnelt in seiner Struktur der eukaryotischen *sliding clamp* PCNA. Rad24 zeigt Homologie zu den Proteinen des *replication factor C* (RFC). Während der Replikation lädt der Rfc1-5 Komplex PCNA auf das DNA *template*. In analoger Weise, so stellt man sich vor, dass der Rad24^{sc}/Rfc2-5Komplex als Antwort auf DNA-Schaden den 9-1-1 Komplex auf die DNA lädt, der dann als Plattform für weitere *checkpoint* Proteine dient (Green *et al.* 2000). Nach der DNA Bindung der Komplexe, so wurde in *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* und Säugern gezeigt, werden PCNA- als auch die RFC-ähnlichen Proteine phosphoryliert (Kostrub *et al.* 1998, Paciotti *et al.* 1998, Bao *et al.* 2001). Diese Phosphorylierung bedingt aber nicht die Bindung, sondern erfolgt erst danach und ist abhängig von ATM/Tel1 oder ATR/Mec1 (Melo *et al.* 2001, Kondo *et al.* 2001). Die Schadenserkenkung scheint also zwei unabhängig auf die geschädigte DNA geladene Komplexe zu erfordern, um möglicherweise ein vorzeitiges aktivieren des DDC zu verhindern (Melo *et al.* 2001, Kondo *et al.* 2001).

ATR/ATRIR kann aber auch als Antwort auf Doppelstrangbrüche in Abwesenheit der anderen Proteine aktiviert werden, wobei das Signal nicht über die Effektorkinasen geleitet wird (Edwards *et al.* 1999). Diese Aktivierung geht mit der Phosphorylierung von Histon H2A einher (Downs *et al.* 2000). Auch in Säugern konnte die Phosphorylierung der Histonvariante H2AX als Antwort auf DSB gezeigt werden. Das Fehlen dieser Phosphorylierung beeinträchtigt die Rekrutierung von Proteinen wie BRCA1, NBS1 und 53BP1 (Rogakou *et al.* 1999, Paull *et al.* 2000, Celeste *et al.* 2002, Celeste *et al.* 2003). Dies legt nahe, dass die Histonphosphorylierung die Chromatinstruktur auflockert und somit den Zugang von Reparaturfaktoren erleichtert. Die Histonphosphorylierung scheint außerdem für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen während der S-Phase wichtig zu sein, die nicht vom intra-S-Phase *checkpoint* (s. u.) erkannt werden (Redon *et al.* 2003).

Ein weiterer Kandidat für die Schadenserkenkung ist der BASC-Komplex (*BRCA1-associated genome surveillance complex*; Wang *et al.* 2000). In diesem Komplex, der auch unabhängig von DNA-Schäden existiert, befinden sich eine Vielzahl von Proteinen, wie MSH2/6, MLH1/PMS1 und der MRE11-RAD50-NBS1- Komplex, die bereits in anderen Prozessen in der Schadenserkenkung involviert sind, aber auch ATM, BLM und drei Untereinheiten von RFC wurden identifiziert.

Nach der Schadenserkenkung wird der *DNA damage checkpoint* durch Rekrutierung und Phosphorylierung weiterer Proteine aktiviert. Die bereits als Sensoren erwähnten Phosphatidylinositol 3-Kinasen ATM/Tel1 und ATR/Mec1 sind die proximalen Kinasen, die je nach Art des DNA-Schadens (ATM hauptsächlich nach IR und ATR nach UV, HU, MMS und IR) und Zellzyklusphase-abhängig zum Teil die gleichen Proteine phosphorylieren (u. a. p53, BRCA1, MDM2, NBS1, RPA, Ddc1^{sc}, Rad26^{sp}/Ddc2^{sc}; zusammengefasst in Zhou und Elledge 2000). ATM phosphoryliert Proteine mit der Konsensussequenz Ser-Gln-Glu (SQE; O'Neill *et al.* 2000), die oftmals in Clustern vorliegen. Aber auch die Effektor-S/T-Kinasen CHK2/Cds1^{sp}/Rad53^{sc} und Chk1 gehören zu den Zielproteinen. In *Saccharomyces cerevisiae* ist als Antwort auf DNA-Schädigung und Replikationsarrest die Mec1-abhängige Aktivierung von Rad53 für den S-Phase-*checkpoint* notwendig. Für den G2/M-Phase-*checkpoint*, der den Zellzyklusarrest bewirkt, sind zwei unabhängige Zweige *via* Chk1 und Rad53

erforderlich, die beide Mec1-abhängig sind (Sanchez *et al.* 1999). Dies variiert jedoch in höheren Eukaryoten (Guo *et al.* 2000, Liu *et al.* 2000).

Für die Aktivierung der Effektor-kinasen sind die sogenannten Adaptoren Rad9 und Mrc1, die zur BRCT-repeat-Familie gehören, notwendig. Rad9 kann mit Rad53 und Chk1 interagieren und bewirkt dadurch einen G2/M-Arrest. Zu einem geringeren Anteil ist Rad9 auch für den S-Phase Arrest notwendig (Vialard *et al.* 1998, Sanchez *et al.* 1999). Auch Mrc1 kann mit Chk1 und Chk2/Rad53 interagieren und wird Mec1/ATM-abhängig phosphoryliert. Die Interaktion von Mrc1 mit Rad53/Cds1 ist für die Aktivierung des *DNA damage checkpoint* in der S-Phase in *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* notwendig (Alcasabas *et al.* 2001, Tanaka und Russell 2001). Die meisten molekularen Erkenntnisse über die Adaptoren-Aktivierung stammen von Rad9: Nach DNA-Schädigung wird Rad9 Mec1- oder Tel1-abhängig phosphoryliert, was dessen Oligomerisierung *via* der BRCT-Domäne erlaubt (Vialard *et al.* 1998, Soulier und Lowndes 1999). Dadurch kann Rad9 Rad53 über dessen FHA-Domäne (*forkhead associated*) binden und bewirkt dessen Autophosphorylierung *in trans*. Dies hat wiederum die Abdissoziation von Rad9 zur Folge (Sun *et al.* 1998, Gilbert *et al.* 2001). Ein ähnlicher Mechanismus kann für die Aktivierung von Chk1 angenommen werden (Sanchez *et al.* 1999).

Ein humanes Rad9-Homolog wurde noch nicht identifiziert, aber 53BP1 und/oder BRCA1 scheinen geeignete Kandidaten zu sein. 53BP1 lokalisiert nach IR an DNA-Schäden und wird ATM-abhängig phosphoryliert (Schultz *et al.* 2000). BRCA1, kodierend für ein Protein, das in 50 % der familiär vererbten Brustkrebsfälle mutiert ist (Easton *et al.* 1993), wird nach DNA-Schaden ATM-abhängig (IR; Cortez *et al.* 1999) oder ATR-abhängig (UV-Bestrahlung, HU; Tibbetts *et al.* 2000) phosphoryliert. Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass ATR-Foci mit BRCA1-Foci kolokalisieren (Scully *et al.* 1997, Tibbetts *et al.* 2000). Analog dem Rad9/Rad53 Mechanismus in *Saccharomyces cerevisiae* wurde BRCA1 als Substrat von hCHK2 identifiziert und dissoziiert nach dessen Phosphorylierung vom aktivierten hCHK2 Komplex ab (Lee *et al.* 2000). Dies unterstützt die Hypothese, dass BRCA1, ähnlich wie Rad9, eine Adaptorfunktion im *DNA damage checkpoint* hat (Melo und Toczyski, 2002).

Die aktivierten S/T Kinasen phosphorylieren als Antwort auf die DNA-Schädigung eine Vielzahl von Proteinen, die entweder den Zellzyklusarrest bewirken (p53, MDM2, Cdc25C, Pds1, Dun1, Swi6, Dbf4) oder in der DNA-Reparatur involviert sind (BRCA1, NBS1, Rad55, RPA; zusammengefasst in Foiani *et al.* 2000, Zhou und Elledge 2000).

Der *DNA damage checkpoint* wird in den G1-, S- und G2/M-Phase-*checkpoint* unterteilt. Man unterscheidet zusätzlich noch den intra-S-Phase *checkpoint* und den *replication checkpoint*, die, so wird postuliert, speziell als Antwort auf kollabierte bzw. arretierte Replikationsgabeln operieren. Die Behandlung von Zellen mit genotoxischen Substanzen, die Replikationsarreste verursachen, führt nicht nur zum Zellzyklusarrest, sondern auch zum Verlangsamten der Replikation selbst. Vermittelt über Mec1 und Rad53, wird aktiv das Initiieren der späten *origin of replication* verhindert (Santocanale und Diffley 1998, Shirahige *et al.* 1998). Außerdem wurde gezeigt, dass Rad53 und auch Mrc1 zusammen mit Tof1 eine Rolle bei der Stabilisierung von kollabierten Replikationsgabeln haben, was für die Wiederaufnahme der Replikation unabdingbar ist (Sogo *et al.* 2002, Lopes *et al.* 2001, Tercero und Diffley

2001, Katou *et al.* 2003). In *Schizosaccharomyces pombe* spielen deren Homologe Rad3 und Cds1 ebenfalls im intra-S-Phase-*checkpoint* eine Rolle.

Auch die beiden Helikasen Rqh1 (Sgs1^{sc}) und Srs2, denen eine Rolle bei der Regulation von Rekombinationsreparatur und Rekombinationsbypass zugeschrieben wird, sind hierbei von Bedeutung (Marchetti *et al.* 2002). In *Saccharomyces cerevisiae* gibt es Evidenzen, dass zumindest Sgs1 im intra-S-Phase *checkpoint* involviert ist. Sgs1 wird hauptsächlich in der S-Phase exprimiert (Cho *et al.*, 1998). Außerdem lokalisiert Sgs1 S-Phase-abhängig in nukleären Foci, zusammen mit ORC-Komponenten und Rad53. Auch ist die Phosphorylierung von Rad53 in einer *sgs1 rad24* Mutante stark reduziert, während die jeweiligen Einzelmutanten das Wildtyp-Level aufweisen. Die Autoren positionieren *SGS1* oberhalb von *RAD53* und *MEC1*, parallel zur *RAD24* Epistasisgruppe, aber mit zum Teil redundanter Funktion zu *RAD9* (Frei und Gasser 2000). Srs2 wird als Antwort auf intra-S-Phase DNA-Schäden *checkpoint*-abhängig phosphoryliert, was die Umlagerung eines Proteinkomplexes mit hoher molarer Masse in drei kleinere Komplexe zur Folge hat (Chiolo *et al.*, Poster auf der XXI. Yeast Conference 2003, Göteborg, Schweden). Zusätzlich ist die Rad53-Phosphorylierung und dessen Kinaseaktivität in *srs2*-Mutanten reduziert (Liberi *et al.* 2000). Srs2 scheint des weiteren notwendig zu sein, um den *DNA damage checkpoint* wieder abzuschalten. Vaze und Kollegen konnten zeigen, dass *srs2*-Mutanten sowohl defekt in der Wiederaufnahme der Replikation (*recovery*) sind, obwohl die DNA repariert wurde, als auch in der Adaptation (Fortführung des Zellzyklus bei unvollständiger Reparatur). Rad53 bleibt in diesen Zellen nach Induktion von Doppelstrangbrüchen permanent phosphoryliert. (Das *recovery* setzt nur ein, wenn Rad53 dephosphoryliert wurde.) Die Autoren vermuten, dass die Helikasefunktion von Srs2 zur Entfernung von *DNA damage checkpoint*-Proteinen vom Chromatin notwendig ist, was zum Abschalten des *DNA damage checkpoint* führt und den Fortgang des Zellzyklus ermöglicht (Vaze *et al.* 2002).

mph1 zeigt eine synergistische Interaktion mit *rad9* und *mec1*

Um eine genetische Interaktion von *mph1* mit dem *DNA damage checkpoint* zu untersuchen, wurde jeweils ein Gen kodierend für ein Protein aus dem RFC-ähnlichen (*RAD24*) und dem PCNA-ähnlichen Komplex (*RAD17*), die beiden PI3-Kinasen *MEC1* und *TEL1*, die Effektor kinase *RAD53* und das Adaptorprotein *RAD9* gewählt. Die entsprechenden Einzel- und Doppelmutanten mit *mph1* wurden auf den Mutatorphänotyp und die Sensitivität gegenüber den DNA-schädigenden Giften MMS, 4NQO und CPT untersucht. Da *mec1* und *rad53* essentielle Gene sind, mussten diese Mutanten im *sm11*-Stammhintergrund konstruiert werden, wodurch die Letalität supprimiert wird. Das Genprodukt von *SML1* inhibiert die Ribonukleotidreduktase (*RNR*). Bei Bedarf von dNTPs (Replikation, Reparatur nach DNA-Schäden) wird Sml1 Mec1- und Rad53-abhängig phosphoryliert, wodurch die Bindung und damit die Inhibition von Rnr1 aufgehoben wird (Zhao *et al.* 1998, Zhao *et al.* 2000). Die Letalität von *mec1* und *rad53* beruht also auf einen zu niedrigen dNTP-Pool in *SML1*-Zellen.

rad17, *rad24*, *rad9* und *tel1* selbst zeigen eine gering erhöhte Mutationsrate (Tabelle 22). In der Doppelmutante mit *mph1* sind die Werte in etwa additiv. Da *rad9* und *rad17* unterschiedlichen Epistasisgruppen zugeordnet werden, ist es nicht verwunderlich, dass der Wert von *rad9 rad17* ebenfalls additiv ist. In der Tripelmutante

ist der Wert zwar größer als die Werte der jeweiligen Einzelmutanten, aber keinesfalls additiv. *rad53* und *mec1* haben Mutationsraten, die unterhalb der vom Wildtyp liegen. Die *sml1*-Deletion hat keinen Einfluss (Tabelle 22, Werte in Klammer). *mec1* scheint den Mutatorphänotyp von *mph1* partiell aufzuheben. Bei *rad53 mph1* ist der Wert größer als additiv (Tabelle 22). Zusammenfassend: Es konnte keine epistatische Interaktion von *MPH1* mit dem *DNA damage checkpoint* festgestellt werden. Eine leicht verringerte Mutationsrate konnte in der *mec1 mph1* Doppelmutante gezeigt werden, in der *rad53 mph1* Mutante dagegen war die *mph1*-Mutationsrate leicht erhöht. Es scheint damit als relativ unwahrscheinlich, dass *MPH1* direkt in den *DNA damage checkpoint* involviert ist.

Tabelle 22: Einfluss von Mutationen aus den unterschiedlichen Bereichen des *DNA damage checkpoint* auf den *mph1*-Mutatorphänotyp im Canavaninvorwärtsmutationssystem.

Stamm	Mutationsrate	Faktor	Stamm	Mutationsrate	Faktor	
wt	1) $0.87 \pm 0.14 \cdot 10^{-7}$	1	<i>sml1</i>	4) $5.5 \pm 0.78 \cdot 10^{-7}$	1 (0.97)	
	2) $4.2 \pm 0.57 \cdot 10^{-7}$	1	<i>sml1 mph1</i>	4) $28.1 \pm 3.1 \cdot 10^{-7}$	5 (5.1)	
	3) $1.5 \pm 0.22 \cdot 10^{-7}$	1	<i>mec1</i>	4) $2.2 \pm 0.32 \cdot 10^{-7}$	0.4	
	4) $5.7 \pm 0.80 \cdot 10^{-7}$	1	5) $5.2 \pm 0.80 \cdot 10^{-7}$	2		
	5) $2.9 \pm 0.46 \cdot 10^{-7}$	1	<i>mec1 mph1</i>	4) $21.2 \pm 2.5 \cdot 10^{-7}$	4	
<i>mph1</i>	1) $6.8 \pm 0.84 \cdot 10^{-7}$	8	5) $24.6 \pm 3.2 \cdot 10^{-7}$	8.5		
	2) $29.5 \pm 3.3 \cdot 10^{-7}$	7	<i>rad53</i>	4) $3.0 \pm 0.42 \cdot 10^{-7}$	0.6	
	3) $15.9 \pm 1.8 \cdot 10^{-7}$	11	<i>rad53 mph1</i>	4) $42.8 \pm 4.6 \cdot 10^{-7}$	8	
	4) $28.5 \pm 3.1 \cdot 10^{-7}$	5	<i>tel1</i>	3) $2.6 \pm 0.39 \cdot 10^{-7}$	1.8	
	5) $32.2 \pm 3.1 \cdot 10^{-7}$	11	<i>tel1 mph1</i>	3) $16.5 \pm 1.9 \cdot 10^{-7}$	11	
<i>rad17</i>	1) $3.1 \pm 0.42 \cdot 10^{-7}$	4	<i>rad9</i>	1) $1.3 \pm 0.21 \cdot 10^{-7}$	1.5	
<i>rad17 mph1</i>	1) $9.0 \pm 1.1 \cdot 10^{-7}$	10		2) $4.9 \pm 0.69 \cdot 10^{-7}$	1.2	
<i>rad24</i>	1) $3.3 \pm 0.45 \cdot 10^{-7}$	4		5) $3.6 \pm 0.61 \cdot 10^{-7}$	1.2	
<i>rad24 mph1</i>	1) $13.0 \pm 1.5 \cdot 10^{-7}$	15		<i>rad9 mph1</i>	1) $26.3 \pm 2.9 \cdot 10^{-7}$	30
<i>rad9 rad17</i>	1) $6.5 \pm 0.79 \cdot 10^{-7}$	7.5		2) $35.3 \pm 3.7 \cdot 10^{-7}$	8.4	
<i>rad9 rad17 mph1</i>	1) $11.3 \pm 1.3 \cdot 10^{-7}$	13	5) $31.8 \pm 3.8 \cdot 10^{-7}$	11		

Die Gesamtzellzahl als Grundlage für die Bestimmung der Mutationsrate wurde mittels Zählkammer 1) oder ausgehend vom Lebendtitel 2)- 5) bestimmt. Die Faktoren wurden durch Normalisierung der Mutantenmutationsraten zur jeweiligen wt-Mutationsrate berechnet. Die unterschiedlichen Experimente, in denen wt und *mph1* jeweils als interne Kontrolle mitbestimmt wurden, sind durch die Indices 1)- 5) angegeben. Die Faktoren bei *mec1* und *rad53* sind auf den *sml1*-Wert bezogen. Die Werte in () geben den Faktor von *sml1* und *sml1 mph1* bezogen auf den wt-Wert in diesem Experiment an.

Bei den Sensitivitäten der Mutanten der *RAD9* und *RAD17/24* Epistasisgruppe (Abbildung 25) zeigt sich, dass alle Einzelmutanten (*rad9*, *rad17*, *rad24*) gegenüber MMS, 4-NQO und CPT stärker sensitiv sind als *mph1*. Bei MMS und 4-NQO sind die Doppelmutanten von *rad17* und *rad24* mit *mph1* in etwa additiv sensitiv. Die Doppelmutante *rad9 rad17* ist noch mal stärker sensitiv als die beiden Einzelmutanten, was sich aus der Parallelität der *RAD9* und *RAD17/24* Epistasisgruppe erklären lässt. Die Tripelmutante mit *mph1* ist additiv. Die *rad9 mph1*-Doppelmutante fällt durch eine synergistische Sensitivität gegenüber MMS auf, was auf ein überlappendes Substratspektrum deuten könnte. Und bei Camptothecin fällt auf, dass die *mph1*-

Doppelmutante jeweils epistatisch zu *rad24* und *rad9* ist (Abbildung 25). Unklar ist, warum die *mph1* Deletion in *rad17 rad9* deren Sensitivität wieder etwas aufhebt.

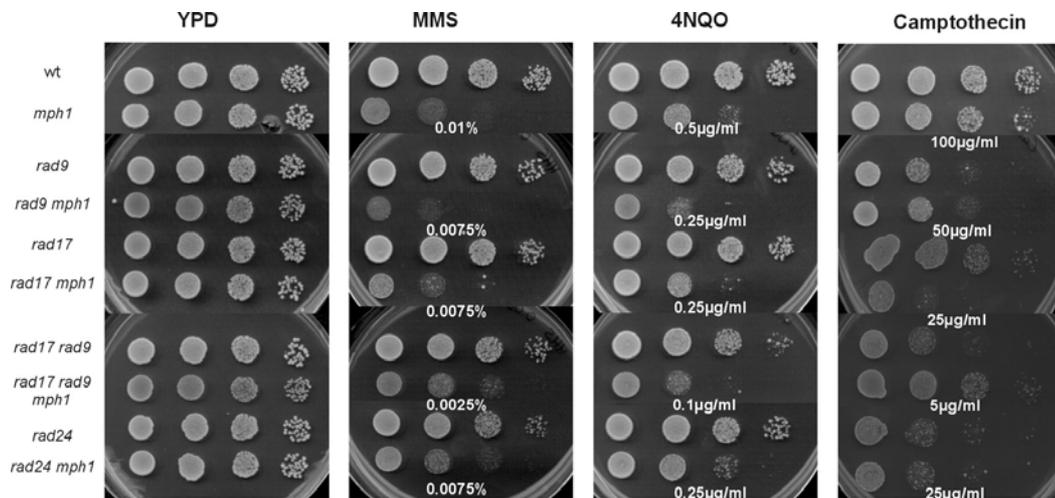


Abbildung 25: Sensitivität von Mutanten der *RAD9*- und *RAD24*- Epistasisgruppe des *DNA damage checkpoint* gegenüber MMS, 4-NQO und CPT. Die jeweiligen Stämme wurden, wie in Material und Methoden, beschrieben auf die Platten mit den Chemikalien getropft (Konzentration angegebenen jeweils unter dem Paar von Einzel- und Doppelmutante mit *mph1*).

Um auszuschließen, dass der beobachtete Synergismus der *rad9 mph1*-Mutante gegenüber MMS auf einer Hintergrundmutation beruht, wurde die Sensitivität mit Komplementation durch ein plasmidständiges *MPH1*-Gen erneut untersucht. Dabei wurden die Stämme mit pRS313 (Sikorski und Hieter 1989) oder pRS313 *Mph1* transformiert. Wie in Abbildung 26 zu sehen, lässt sich der *rad9 mph1* Synergismus bei MMS reproduzieren (Abbildung 26, *rad9 mph1* pRS313) als auch durch *MPH1* komplementieren (Abbildung 26, *rad9 mph1* pRS313 *MPH1*). Auch der Phänotyp von *rad9 rad17 mph1* auf CPT wurde durch Komplementation mit einem plasmidständigen *MPH1* untersucht. Gegenüber MMS und 4-NQO lassen sich die Sensitivitäten von *rad9 rad17* und *rad9 rad17 mph1* komplementieren, jedoch nicht bei CPT (Abbildung 26). Da sich bei Versuchswiederholung das gleiche Bild zeigte, und die Richtigkeit der Stämme durch PCR verifiziert wurde, kann eine Hintergrundmutation als Ursache für den beobachteten Effekt (auf CPT) nicht ausgeschlossen werden.

Die Mutanten der *checkpoint*-Kinasen wurden ebenfalls auf die Sensitivität untersucht (Abbildung 27). *sml1* und *sml1 mph1* Mutanten zeigen keinen Unterschied zu Wildtyp und *mph1*. Alle Einzelmutanten (*mec1*, *rad53*, *tel1*) sind jeweils stärker sensitiv gegenüber MMS, 4-NQO und CPT als *mph1*. Bei CPT ist *tel1* am stärksten sensitiv, was im Einklang mit der Funktion von Tel1 beim Auftreten von Doppelstrangbrüchen steht. Bei den Doppelmutanten mit *mph1* fällt auf, dass bei CPT *mph1* epistatisch zu *tel1* ist. Wie schon bei *rad9* beobachtet werden konnte, zeigt *mph1* eine synergistische Interaktion - und zwar mit *mec1* - bei allen drei DNA-schädigenden Agenzien (MMS, 4-NQO und CPT). Die *rad53* Doppelmutante zeigt keine Auffälligkeiten.

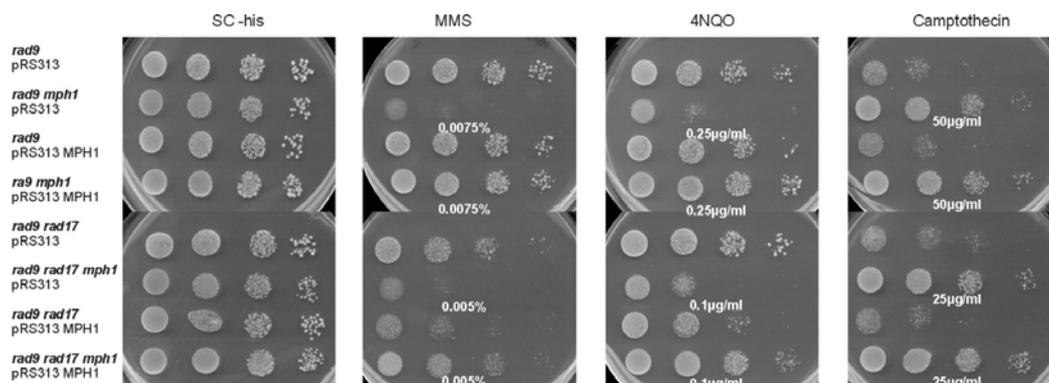


Abbildung 26: MPH1-Komplementation der Sensitivität von *rad9* und *rad9 rad17*-Mutanten mit *mph1* gegenüber MMS, 4-NQO und CPT. Die jeweiligen Stämme wurden in SC-his angezogen und wie in Material und Methoden beschrieben auf SC-his Platten mit den Chemikalien getropft (Konzentration angegebenen jeweils unter dem Paar von Einzel- und Doppelmutante mit *mph1*).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es eine genetische Interaktion von *mph1* mit dem *DNA damage checkpoint* gibt. Bei den Sensitivitäten verhält sich *mph1* synergistisch zu *mec1* (MMS, 4-NQO, CPT) und zu *rad9* (MMS). Literaturdaten zeigen, dass durch diese Chemikalien u. a. DNA-Läsionen auftreten, die zum Arrest der Replikation führen. Der *DNA damage checkpoint*, insbesondere der S-Phase *checkpoint* (*intra-S-phase* und *replication checkpoint*), reagiert auf solche DNA-Läsionen. Rad9 wird für den Arrest in der S-Phase-Arrest benötigt (Vialard *et al.* 1998, Sanchez *et al.* 1999). Mec1 ist u. a. im *intra-S-Phase checkpoint* bei der Stabilisierung von arretierten Replikationsgabeln involviert (Santocanale und Diffley 1998).

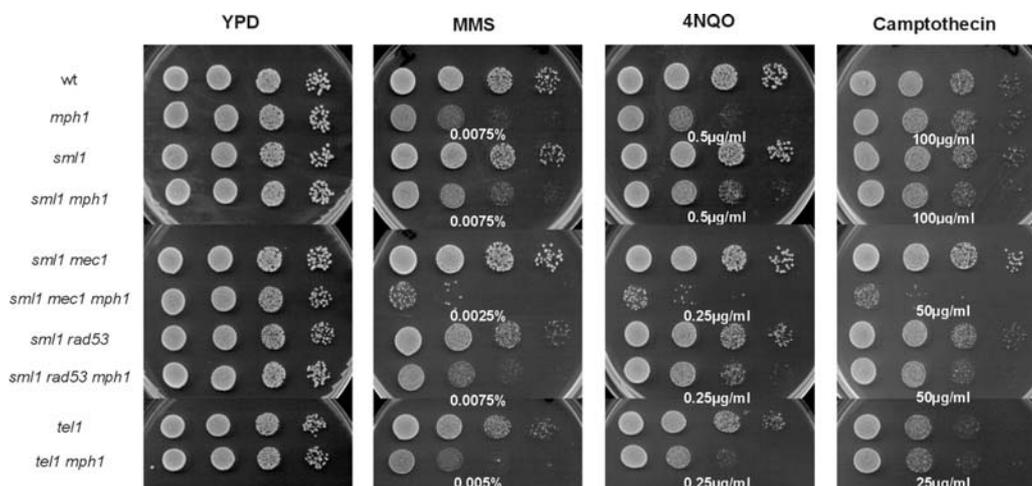


Abbildung 27: Sensitivität von *mec1*-, *rad53*- und *tel1*-Mutanten des *DNA damage checkpoint* gegenüber MMS, 4-NQO und CPT. Die jeweiligen Stämme wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, auf die Platten mit den Chemikalien getropft (Konzentration angegebenen jeweils unter dem Paar von Einzel- und Doppelmutante mit *mph1*).

Da für Mph1 eine Funktion bei der Wiederaufnahme von arretierten Replikationsgabeln postuliert wird, sollten in Abwesenheit von Mph1 und in Anwesenheit von DNA-schädigenden Agenzien vermehrt solche Substrate (arretierte Replikationsgabeln) auftreten. Der Synergismus mit *mec1* und *rad9* wäre zum einen dadurch plausibel erklärbar, dass diese DNA-Strukturen nur unzureichend detektiert und/oder weitergeleitet werden und die Fortführung des Zellzyklus zum Zelltod führt. Denkbar ist auch, dass durch den Ausfall von Mec1 und/oder Rad9 die Reparatur der DNA-Läsionen nur ungenügend erfolgt. Dem *DNA damage checkpoint* wurde auch eine Rolle bei der direkten Beseitigung von DNA-Läsionen zugeordnet (Aboussekhra *et al.* 1996). Eine genetische Interaktion mit *rad53* konnte nicht festgestellt werden. Rad53 ist ebenfalls für die Stabilisierung von arretierten Replikationsgabeln von Bedeutung (Santocanale und Diffley 1998, Lopes *et al.* 2001, Sogo *et al.* 2002) und es wird Mec1- und Rad9-abhängig aktiviert (Vialard *et al.* 1998, Soulier und Lowndes 1999). Die genetische Interaktion von *MPH1* mit dem *DNA damage checkpoint* ist scheinbar unabhängig von *RAD53*, bedingt aber *MEC1* und *RAD9*. Für Mec1/ATR ist gezeigt, dass es als Antwort auf Doppelstrangbrüche - unabhängig der Effektorinasen - das Signal weiterleiten kann (Edwards *et al.* 1999). Hierzu werden Proteine wie BRCA1 und p53BP, potentielle Homologe von Rad9, phosphoryliert.

Ist Mph1 ein Substrat der Kinasen des *DNA damage checkpoint*?

Aufgrund der zentralen regulatorischen Funktion des *DNA damage checkpoint* bei der Koordination der zellulären Antworten auf DNA-Schäden, schien es naheliegend zu untersuchen, ob auch Mph1 durch die *DNA damage checkpoint*-Kinasen phosphoryliert wird. Mec1, das *Saccharomyces cerevisiae* ATR-Homolog, wird für die Erkennung von DNA-Läsionen und Replikationsstress, aber auch bei der Erkennung von Doppelstrangbrüchen benötigt (Edwards *et al.* 1999). Das Signal wird über Phosphorylierung von Mec1/ATR an verschiedene Zielproteine des *DNA damage checkpoint* (Rad9, Rad17, Rad24, Rad53, Chk1; Melo *et al.* 2001, Kondo *et al.* 2001) als auch an direkte Reparaturproteine (BRCA1, Rad51) weitergeleitet. Die Substrate für eine effiziente Phosphorylierung durch ATM zeichnen sich durch die Konsensussequenz Ser-Gln-Glu (SQE) aus (O'Neill *et al.* 2000), die auch von ATR phosphoryliert werden kann (Siloh 2001). In *Saccharomyces cerevisiae* wurde gezeigt, dass das Histon 2A (H2A) ebenfalls C-terminal eine SQE-Sequenz aufweist, die als Antwort auf Doppelstrangbrüche Mec1-abhängig phosphoryliert wird (Downs *et al.* 2000). Mph1 zeigt ebenfalls SQ-Motive. Die 4 SQ-Motive treten in zwei *Cluster* und zwar an den Positionen 322 und 333 sowie C-terminal an den Positionen 961 und 982 auf (vgl. S. 126). Diese SQ-Motive entsprechen zwar nicht der ATM/ATR-Konsensussequenz, die Ergebnisse von Downs *et al.* 2000 zeigen aber, dass der Austausch des Glutamats (E) gegen Alanin nur zu einer leichten MMS-Sensitivität von *hta1*-Mutanten führt, während der Austausch von Serin (S) oder Glutamin (Q) gegen Alanin zu einer erheblichen MMS-Sensitivität führt. Dies deutet an, dass das SQ-Motiv eine wichtige Rolle spielt und die Funktion von Glutamat eher von untergeordneter Rolle zu sein scheint. Kim *et al.* 1999 konnten zeigen, dass das SQ-Motiv die minimal notwendige Sequenzanforderung für die ATM/ATR-abhängige Phosphorylierung ist. Die Bedeutung der SQ-Motive für die Mph1-Funktion und eine mögliche Phosphorylierung von Mph1 sollten deshalb untersucht werden.

Es wurde zunächst die beiden C-terminalen SQ-Motive an den Positionen 961 und 982 mutiert, indem das Serin gegen Alanin zur Sequenz AQ ausgetauscht wurde. Die beiden SQ-Motive wurden auf einem plasmidständigem *MPH1*-Gen mutiert und das resultierende Plasmid pRS313 e6e9 MPH1 SQ_{3/4} mut (S. 27) mit den AQ-Motiven in der Mph1-Sequenz in *mph1*-Zellen zur Komplementation eingesetzt. Der Mutatorphänotyp von *mph1* konnte jedoch nicht aufgehoben werden (nicht gezeigt). Der Einfluss auf die Sensitivität von *mph1*-Mutanten wurde nicht getestet. Es scheint also, dass zumindest für die Funktion von Mph1, die den Mutatorphänotyp bei Ausfall des Proteins bedingt, diese beiden SQ-Motive keine essentielle Rolle spielen. Möglicherweise ist ein Effekt erst beobachtbar, wenn alle vier SQ-Motive mutiert sind.

Parallel dazu sollte eine mögliche posttranslationale Modifikation von Mph1 untersucht werden. Da für Mph1 bisher keine Antikörper vorhanden sind, wurde eine chromosomale Kopie von *MPH1* 3' mit einem immunochemisch nachweisbaren tag versehen (vgl. S. 17; CEN.PK2-1c MPH1-6HA). Da vorherige Versuche gezeigt haben, dass Mph1 mit nur einem Immunotag (Sendai-Epitop) versehen in einem Standard-Westernblot bei Entwicklung mit NBT/BCIP, vermutlich aufgrund zu geringer Proteinmengen, nicht sichtbar gemacht werden konnte (nicht gezeigt), wurde als tag eine 6-fache Kopie des HA-Epitops verwendet. Die Untersuchung auf eine mögliche Phosphorylierung von Mph1 aus Gesamtzellextrakt (vgl. S. 33) erfolgte zunächst mit Zellen, die in der log-Phase - ohne und mit DNA-schädigenden Agenzien (Inkubation für weitere drei Stunden mit 0.5 µg/ml 4-NQO oder 50 µg/ml CPT bei 30 °C unter Schütteln) - angezogen wurden. Die prominentere, obere Bande zwischen den Markerbanden bei 100.000 und 150.000 (Abbildung 28), die in der Kontrolle nicht detektiert werden konnte (Abbildung 29, rechts), repräsentiert sehr wahrscheinlich das Mph1-6HA-Konstrukt. Mph1 selbst hat ein errechnetes Molekulargewicht von 116.000, mit dem 6HA-Konstrukt liegt das Molekulargewicht bei etwa 125.000. Die elektrophoretische Mobilität von Mph1 scheint zu einem höheren Molekulargewicht bei etwa 140.000 hin verschoben zu sein, wie dies auch schon bei der Überexpression des *MPH1*-Gens festgestellt wurde (Schürer 2000). Die zweite, untere Bande, oberhalb von 100.000, wurde häufig beobachtet und ist am ehesten als N-terminales Abbauprodukt von Mph1 deutbar. In Abbildung 28 ist erkennbar, dass die prominente Bande (unterhalb von 150 kD) als Doppelbande auftritt, was auf eine posttranslationale Modifikation deuten könnte.

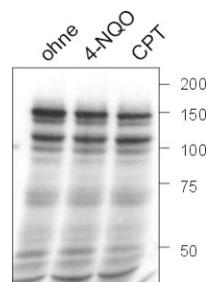


Abbildung 28: Immunochemischer Nachweis von Mph1-6HA (CEN.PK2-1c MPH-6HA). Die Zellen wurden in der log-Phase ohne (ohne) oder mit 0.5 µg/ml 4-NQO (4-NQO) oder 50 µg/ml Camptothecin (CPT) für drei Stunden inkubiert. Der Mph1-6HA Nachweis erfolgte mit einem anti-HA Antikörper (S. 33). Die Bande unterhalb der 150 kD Markierung korrespondiert mit Mph1.

Die putative Mph1-Bande bei etwa 140.000 - als auch die schwächere Bande mit geringerem Molekulargewicht - verändern sich bei der Inkubation mit den verschiedenen Mutagenen nicht. Im Falle einer posttranslationalen Modifikation, die wie im Falle einer Phosphorylierung eine negative Ladung mitbringt, erwartet man, dass das modifizierte Protein unter denaturierenden Bedingungen eine elektrophoretische Mobilität verschoben zu niedrigeren Molekulargewichten zeigt, wie dies hier zu sehen ist (Abbildung 28). Ob es sich tatsächlich um eine Phosphorylierung handelt, kann durch Phosphatase-Behandlung des Zellextraktes (λ -Phosphatase) untersucht werden. Dabei sollte die phosphorylierte Bande bei Vergleich mit unbehandelten Zellextrakten nicht mehr zu sehen sein.

Nicht reparierte DNA-Schäden sind gerade während der Replikation eine Gefahr für die Zelle, da es zum Arrest der Replikationsgabel kommen kann. Für viele Proteine, die hier eine Rolle spielen, ist eine zellzyklusabhängige Transkription gezeigt (Cho *et al.* 1998). *MPH1* scheint keiner zellzyklusabhängigen Regulation zu unterliegen (Scheller *et al.* 2000). Es ist aber denkbar, dass durch eine Modifikation die Aktivität oder Lokalisation von Mph1 beeinflusst werden kann. Deshalb wurde eine mögliche Phosphorylierung in Abhängigkeit der Zellzyklusphase untersucht. Proteinextrakte wurden von Zellen in der log-Phase, in G1 und in der S-Phase ohne und mit 4-NQO-Behandlung präpariert und Mph1-6HA durch Immunopräzipitation (vgl. S. 33) gewonnen. Der Blot wurde zunächst mit einem Antikörper, der das HA-Epitop erkennt, entwickelt. Um eine mögliche Phosphorylierung von Mph1 zu untersuchen, wurde der selbe Blot ein zweites mal mit einem Antikörper, der phosphoryliertes Serin/Threonin/Tyrosin erkennt, entwickelt. Bei der Entwicklung mit dem anti-HA-Antikörper zeigt sich die putative Mph1-Bande, wie schon unter Abbildung 28 gezeigt, nicht nur in der log-Phase, sondern auch in G1 (α -Faktor) und in der S-Phase (HU-Behandlung), als Doppelbande. In den jeweiligen Zellzyklusphasen ist - mit oder ohne Mutagenbehandlung - kein Unterschied zu erkennen (Abbildung 29, links oben). Dies legt nahe, dass eine mögliche Mph1-Phosphorylierung nicht durch verstärktes Auftreten von DNA-Schäden reguliert wird. Was jedoch auffällt, ist der Unterschied der Intensität der beiden Doppelbanden. Während bei den log-Phase-Präzipitaten die obere Bande, wie bereits oben beschrieben, die prominentere Bande ist, verschiebt sich dieses Verhältnis in der G1-Phase. Hier sind beide Banden in etwa gleich stark. In den HU-behandelten Zellen ist die obere Bande stärker (Abbildung 29, links oben). Eine Aussage darüber, ob mehr oder weniger Mph1-Protein in den jeweiligen Zellzyklusphasen detektierbar ist, ist schwer machbar, da die Gesamtproteinmenge nicht bestimmt wurde, sondern gleiche OD₆₀₀-Mengen für die Immunopräzipitation eingesetzt wurden. Bei der zweiten Entwicklung des Blots mit dem anti-phospho-Ser/Thr/Tyr-Antikörper kann in der Höhe der Mph1-HA-Bande eine Bande, wenn auch bedeutend schwächer, detektiert werden, die mit der unteren Bande der Doppelbande korrespondiert (Abbildung 29, links unten). Das dieses Signal von der ersten Antikörperinkubation herrührt, erscheint unwahrscheinlich, da zum einen die mitgeführte CEN.PK2-1c-Kontrolle bei der anti-phospho-Ser/Thr/Tyr-Antikörper-Färbung einen stärkeren Hintergrund aufwies (nicht gezeigt). Zum anderen wird die schwächere Bande der Doppelbande durch diesen Antikörper angefärbt.

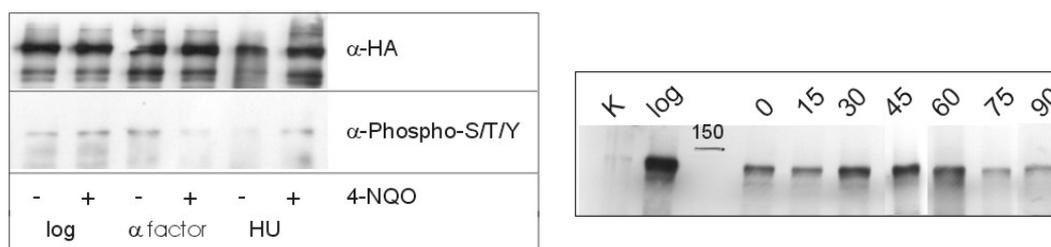


Abbildung 29: Zellzyklusabhängigkeit der Modifikation von Mph1-6HA.

Links: CEN.PK2-1c MPH1-6HA-Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase (log), in G1-Phase (α -Factor) oder in der S-Phase (HU, log-Phase Zellen wurden in 100 mM Hydroxyurea für vier Stunden inkubiert) ohne (-) oder nach (+) 15-minütiger Inkubation in 2 μ g/ml 4-NQO geerntet und die aufgetrennten Proteine durch Immunopräzipitation mit einem anti-HA-Antikörper gewonnen. Der Blot wurde zuerst mit dem anti-HA-Antikörper entwickelt und nach Entfernen des ersten Antikörpers ein weiteres mal mit anti-phospho-Ser/Thr/Tyr-Antikörper entwickelt. **Rechts:** CEN.PK2-1c MPH1-6HA-Zellen wurden mit α -Faktor in G1 arretiert und nach dem Entfernen des α -Faktor durch zweimaliges Waschen aller 15 min Proben für die Analyse entnommen. Es wurden nicht gleiche Proteinmengen aufgetragen, sondern gleiche Zellmengen aufgeschlossen (bestimmt durch die optische Dichte). Als Kontrolle (K) wurde CEN.PK2-1c und log-Phase Zellen von CEN.PK2-1c MPH1-6HA (log) mitgeführt.

Die Zellzyklusabhängigkeit der Mph1-Phosphorylierung wurde weiter verfolgt. CEN.PK2-1c MPH1-6HA-Zellen wurden in G1 arretiert (vgl. S. 34) und nach dem Entfernen des α -Faktors aller 15 min Proben für die Analyse entnommen. Der Fortgang des Zellzyklus wurde mikroskopisch verfolgt: zum Zeitpunkt Null und auch nach 15 min waren die Zellen in G1 (keine Knospenbildung, *shmoo* sichtbar). Nach 30 min zeigten ca. 20 % der Zellen und nach 45 min ca. 80 % der Zellen kleine Knospen (S-Phase). Ab 75 min waren bei die meisten Zellen Knospen sichtbar, die der Größe der Mutterzelle entsprach (späte S-Phase/G2). Im Westernblot ist erkennbar (Abbildung 29, rechts), dass die Mph1-Bande wiederum als Doppelbande detektierbar war, mit einem leicht stärkeren Auftreten der unteren Bande bei 30 min und 45 min.

Die Frage, ob Mph1 phosphoryliert wird, lässt sich mit diesen ersten Experimenten noch nicht eindeutig beantworten. Allerdings liefert der Blot mit dem anti-phospho-Ser/Thr/Tyr-Antikörper (Abbildung 29) schon gute Hinweise auf eine Phosphorylierung. Dies bedarf jedoch noch der Gegenprobe: die Behandlung mit Phosphatase. Es ist aber der Grundstein gelegt, um die eingangs gestellte Frage einer Mph1-Phosphorylierung in Abhängigkeit der Kinasen des *DNA damage checkpoint* zu beantworten.

Lokalisation von Mph1

Für Proteine, die an der Prozessierung arretierter Replikationsgabeln beteiligt sind, konnte gezeigt werden, dass sie nicht nur kernlokalisiert sind, sondern auch in diskreten Foci, die mit DNA-Schädigung einhergehen, zu finden sind (z. B. Lisby *et al.* 2003).

Lokalisiert Mph1 auch in diskreten Foci, die der Replikationsgabel entsprechen? Eine Kernlokalisierung von Mph1-GFP konnte bereits gezeigt werden (Scheller *et al.* 2000 und Abbildung 30, rechts), wobei das MPH1-GFP-Konstrukt unter der Kontrolle

eines Galaktose-induzierbaren Promotors stand und die Experimente unter induzierten Bedingungen durchgeführt wurden. Eine mögliche subnukleäre Lokalisation könnte unter diesen Bedingungen (Überproduktion des Gens) überdeckt worden sein.

Die Lokalisation von Mph1-GFP wurde hier erneut unter der Kontrolle des *MPH1*-Promotors untersucht. Dazu wurden *mph1*-Zellen mit pRS313-Mph1-GFP (vgl. S. 26) transformiert, in Selektivmedium angezogen und ohne Fixierung der Zellen mikroskopisch untersucht. Die GFP-Fluoreszenz von Mph1-GFP konnte auch unter diesen Bedingungen, wenn auch deutlich schwächer und nicht in allen Zellen, detektiert werden (Abbildung 30, links). In Abbildung 30 rechts ist die Lokalisation von Mph1-GFP unter der Kontrolle des Galaktose-induzierbaren Promotors (bei induzierten Bedingungen), wie in Scheller *et al.* 2000 gezeigt, reproduziert. Die GFP-Fluoreszenz ist deutlich auf einen abgegrenzten Bereich in der Zelle eingeschränkt und sollte mit dem Kern korrespondieren (vgl. Scheller *et al.* 2000). Eine Färbung des Kernes mit DAPI erfolgte nicht, da bei der Fixierung der Zellen entstehende Artefakte vermieden werden sollten.

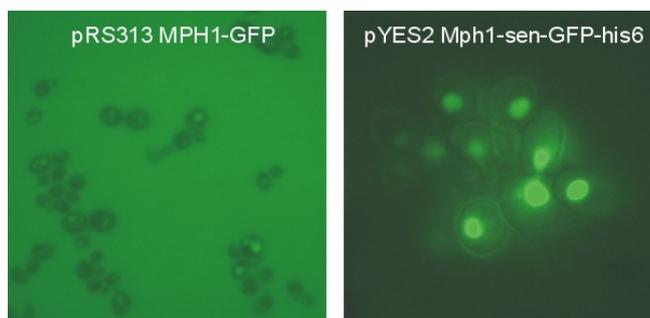


Abbildung 30: Lokalisation von Mph1. *mph1*-Zellen wurden mit pRS313 Mph1-GFP (links, vgl. S. 26) oder pYES2 Mph1-sen-GFP-his6 (rechts, vgl. S. 26) transformiert und auf die Lokalisation des Mph1-GFP-Konstruktes fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Für Rad52 wurde gezeigt, dass in unbehandelten Zellen vereinzelt Foci beobachtbar sind, die nach IR-Behandlung in deutlich größerer Zahl in der S-Phase auftraten (Lisby *et al.* 2001, Lisby *et al.* 2003). Um eine mögliche Lokalisation von Mph1 in Foci zu untersuchen, wurden *mph1*-Zellen mit dem pRS313 MPH1-GFP-Konstrukt, und zum Vergleich, Zellen mit einem chromosomalen Rad52-YFP-Konstrukt (W3749-14C; Lisby *et al.* 2003) mit α -Faktor (in SC Medium angezogen) in G1 arretiert und auf die GFP- bzw. YFP-Fluoreszenz hin untersucht. In Abbildung 31 links sind die Zellen mit dem RAD52-YFP-Konstrukt gezeigt. In vielen Zellen ist eine stärkere Fluoreszenz, die dem Kern entsprechen sollte, erkennbar. In vereinzelt Zellen ist innerhalb dieses Bereiches ein stärker leuchtender Punkt erkennbar, der einem Rad52-Fokus an einem spontan aufgetretenen DNA-Schaden (Doppelstrangbruch) entsprechen sollte (Lisby *et al.* 2003). Bei den unter den gleichen Bedingungen (α -Faktor-Arrest, in SC-his Medium angezogen) untersuchten *mph1*-Zellen konnte in ca. 60 % der Zellen die Kernlokalisierung detektiert werden. Wie bei Rad52 war in einzelnen Zellen eine stärkere, punktierte GFP-Fluoreszenz detektierbar (Abbildung 31, Mitte). Vergrößerungen solcher Zellen (Abbildung 31, rechts) sollen dies nochmals verdeutlichen. Anscheinend loka-

lisiert Mph1-GFP nicht nur diffus im Kern, sondern ist partiell auch in Foci detektierbar. Ob es sich hierbei auch um eine Kolokalisation mit DNA handelt, kann derzeit nicht sichergestellt werden. Es schlossen sich weitere Untersuchungen mit log-Phase-, G1-Phase- und S-Phase-Zellen, die ohne und mit DNA-schädigenden Agenzien inkubiert wurden, an (15 minütige Inkubation mit den DNA-schädigenden Agenzien entweder direkt im α -Faktor-Arrest für G1 oder 45 min nach dem *Release* für die S-Phase; 4-NQO: 1 μ g/ml, Stammlösung: 2.5 mg/ml in Ethanol; HU: 200 mM, Stammlösung 2 M in Wasser). Auch hier war neben der diffusen Kernfärbung in einigen Zellen eine als Fokus deutbare verstärkte GFP-Fluoreszenz sichtbar (nicht gezeigt), wobei zum jetzigen Zeitpunkt qualitativ keine Aussage gemacht werden kann, ob sich die Häufigkeit oder auch die Intensität der Foci unter den verschiedenen Bedingungen ändert.

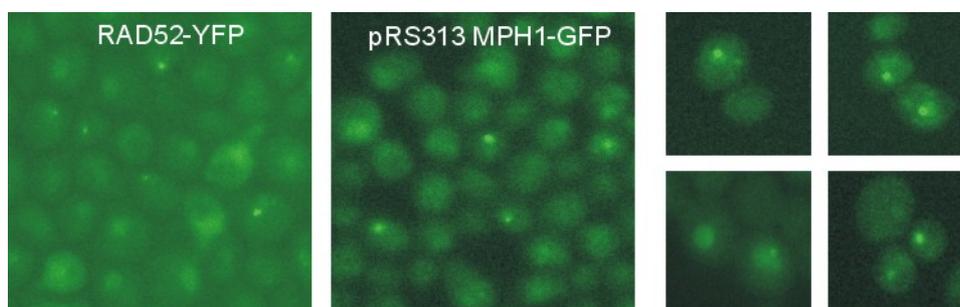


Abbildung 31: Lokalisation von Rad52 und Mph1. **Links:** W3749-14C (*MAT α* , *ADE2*, *bar1::LEU2*, *trp1-1*, *LYS2*, *RAD52-YFP*, *RAD5*; Lisby *et al.* 2003) wurde mit α -Faktor in G1 arretiert, um die Rad52-YFP-Lokalisation zu untersuchen. Da das GFP und das YFP-Emissionspektrum überlappt, wurde die YFP-Fluoreszenz mit dem gleichen Filter wie für GFP (S. 34) untersucht. **Mitte:** α -Faktor arretierte *mph1*-Zellen wurden mit pRS313 Mph1-GFP transformiert und auf die Lokalisation des Mph1-GFP-Konstruktes fluoreszenzmikroskopisch untersucht. **Rechts:** Ausgewählte α -Faktor arretierte *mph1*-Zellen mit dem pRS313 Mph1-GFP-Konstrukt. Innerhalb eines stärker fluoreszierenden Bereiches in der Zelle (Kern) ist ein kleiner Bereich mit einer stärkeren GFP-Fluoreszenz (Fokus) erkennbar.

Die bisher erhaltenen Daten lassen die Frage aufkommen, ob Mph1 mit Rad52 kolokalisiert? Die Zellen mit dem chromosomalen Rad52-YFP-Konstrukt (W3749-14C) wurden mit pRS313 MPH1-GFP transformiert und wie oben beschrieben in G1 arretiert. Wegen technischer Schwierigkeiten mit dem vorhandenen Equipment konnte die Kolokalisation von Rad52 und Mph1 jedoch nicht untersucht werden. Da diese Experimente im Labor von Per Sunnerhagen, Universität Göteborg, Schweden durchgeführt wurden, konnten die Untersuchungen nicht fortgeführt werden.

Diese ersten Untersuchungen zur subnukleären Lokalisation von Mph1 deuten jedoch an, dass Mph1-GFP nicht nur diffus im Kern zu finden ist. In einzelnen Zellen sind diskrete Foci mit einer stärkeren GFP-Fluoreszenz, die mit Mph1 korrespondieren sollten, erkennbar. Für eine Vielzahl von Proteinen, die bei Replikation, Rekombination und im *DNA damage checkpoint* eine Rolle spielen, wurde diese Art von Lokalisation gezeigt. Oftmals konnten unterschiedliche Proteine in den gleichen Foci gefunden werden oder die Lokalisation des einen Proteins bedingte die Lokalisation des anderen. Für Mph1 bleibt die Frage offen, ob es sich bei den gezeigten Foci tatsächlich um Replikationsgabeln handelt (z. B. durch Kolokalisation

mit PCNA) und/oder ob Mph1 mit Proteinen, für die eine Rolle bei der Wiederaufnahme von arretierten Replikationsgabel postuliert wurde und mit denen in dieser Arbeit eine genetische Interaktion gezeigt werden konnte, kolokalisiert. Erste Hinweise, auf eine Lokalisation von Mph1 in einem Komplex mit Proteinen, für die sowohl eine Rolle bei der Replikationsreinitiation diskutiert wird und auch eine genetische Interaktion mit *mph1* hier gezeigt werden konnte, liegen vor (Gavin *et al.* 2002). Die Autoren haben Proteinkomplexe von *Saccharomyces cerevisiae* aufgereinigt und massenspektrometrisch die einzelnen Proteine identifiziert. Dabei konnte Mph1 zweimal, ausgehend von unterschiedlichen Ausgangsproteinen, mit zum Teil den gleichen Proteinen, detektiert werden. Zu diesen Proteinen zählen u. a. Msh2, Ddc2, Mec1, Rad52 und auch Sgs1 (Gavin *et al.* 2002).

Das putative Homologe von MPH1 in *Schizosaccharomyces pombe*

MPH1 zeigt genetische Interaktionen mit einer Reihe von Genen, deren Produkte evolutionär konserviert sind. Bei einem Sequenzvergleich mit Mph1 wurden in Bakterien keine sequenzidentischen Proteine gefunden, wohl jedoch in Archaea und Eukaryoten (Abbildung 32). Dies deutet an, dass der Mechanismus, in den Mph1 involviert ist, nicht nur bei *Saccharomyces cerevisiae* sondern generell bei Eukaryoten (und Archaea) vorhanden ist.

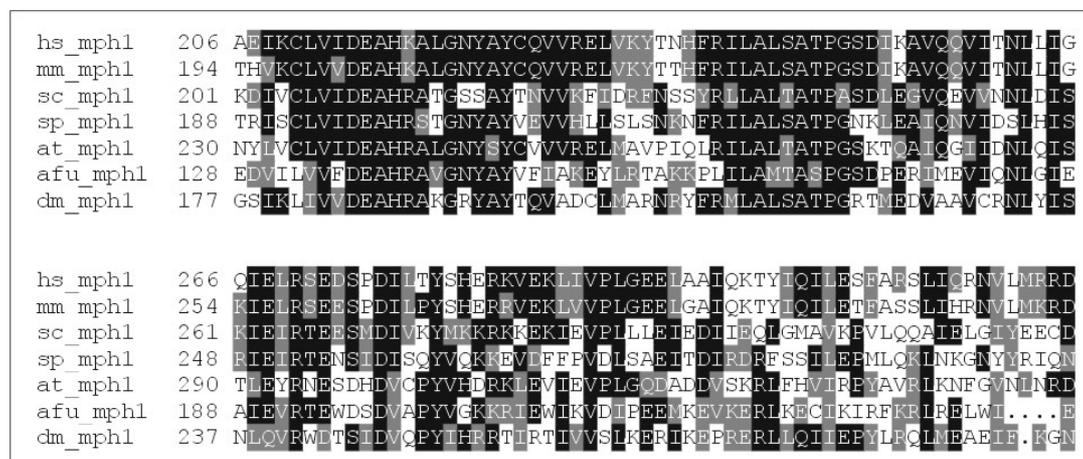


Abbildung 32: Sequenzvergleich der deduzierten *MPH1*-Aminosäuresequenzen verschiedener Organismen mit *MPH1* von *Saccharomyces cerevisiae* (Quelle: W. Kramer). Die Sequenzen wurden verglichen mit dem Pileup Programm vom *GCG package* mit der Blossum62 Matrix. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Boxshade Programm bearbeitet (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html), um Identitäten (schwarz) und Ähnlichkeiten (grau) hervorzuheben. Hs: *Homo sapiens*, mm; *Mus musculus*, sc: *Saccharomyces cerevisiae*, sp: *Schizosaccharomyces pombe*, at: *Arabidopsis thaliana*, afu: *Archaeglobus fulgidus*, dm: *Drosophila melanogaster*.

Phänotypische Charakterisierung von *spmph1*⁻-Mutanten

Sind diese putativen Sequenzhomologe auch Funktionshomologe von Mph1? Um dieser Frage nachzugehen, sollte das Homologe von *Schizosaccharomyces pombe* charakterisiert werden. Das betreffende Gen, dessen deduzierte Aminosäuresequenz zu 38 % identisch mit der von Mph1 ist, liegt auf Chromosom I (SPAC 9.05; im folgenden *spmph1*⁺ genannt) und ist 2605 bp lang. Es trägt wahrscheinlich ein Intron. In einem ersten Ansatz sollte untersucht werden, ob die Mutante *spmph1* die gleichen phänotypischen Eigenschaften aufweist, wie die Mutante der Bäckerhefe. Zuerst wurde das Gen einschließlich Promotor- und Terminatorbereiche kloniert (pGEMZf(-) *spmph1*⁺). Ausgehend von diesem Konstrukt wurde eine Deletionskassette konstruiert (pGEMZf(-) *spmph1*::kanMX4) und die Mutanten hergestellt (vgl. S. 28).

Saccharomyces cerevisiae mph1 Mutanten zeigen eine erhöhte Mutationsfrequenz und sind sensitiv gegenüber verschiedenen DNA schädigenden Agenzien. Auch die putativen *spmph1*-Mutanten von *Schizosaccharomyces pombe* sollten bzgl. dieser beiden Phänotypen charakterisiert werden. Die Untersuchung der Sensitivität gegenüber MMS und 4-NQO von *spmph1*⁻- und Wildtyp-Zellen erfolgte im Vergleich mit *mph1* und Wildtyp-Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* im *Drop dilution assay*. Die Zellen wurden in YE-Medium angezogen und auf YPD-Platten mit den DNA-schädigenden Agenzien getropft. Wie in Abbildung 33 zu sehen, sind die *Schizosaccharomyces pombe spmph1*⁻-Mutanten sensitiv gegenüber MMS und 4-NQO. Der Wildtyp verhält sich bei der gegebenen Konzentration wie auf der YPD-Wachstumskontrolle, bei der auch die Mutanten normal wachsen. Es ist kein Unterschied zwischen den beiden Paarungstypen (h+, h-) feststellbar. Die *Saccharomyces cerevisiae mph1* Mutanten zeigen die bekannte Sensitivität.

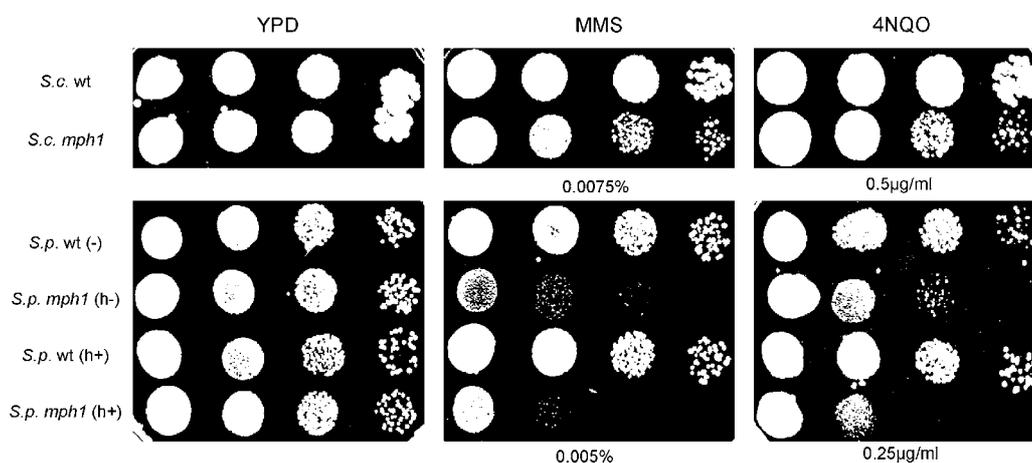


Abbildung 33: Sensitivität von *Saccharomyces cerevisiae* (sc) und *Schizosaccharomyces pombe* (sp) Wildtyp- und *mph1*-Mutanten gegenüber MMS und 4-NQO. Die jeweiligen Stämme wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, auf YPD mit und ohne den Chemikalien (Konzentration unter der jeweiligen Platte angegebenen) getropft.

Ein Sequenzvergleich mit der deduzierten Aminosäuresequenz des *CAN1*-Genes aus *Saccharomyces cerevisiae* zeigte, dass es auch in *Schizosaccharomyces pombe* sehr wahrscheinlich ein Homologes zur Argininpermease gibt (56 % Identität). Daher sollte

das Canavaninvorwärtsmutationssystem auch geeignet sein, um die Mutationsfrequenz der *spmph1*-Mutanten zu bestimmen. Abbildung 34 zeigt, dass alle untersuchten Stämme auf der EMM-Kontrollplatte wachsen, jedoch auf EMM/CAN sind bei *spmph1* im Vergleich zum Wildtyp mehr canavaninresistente Kolonien sichtbar.

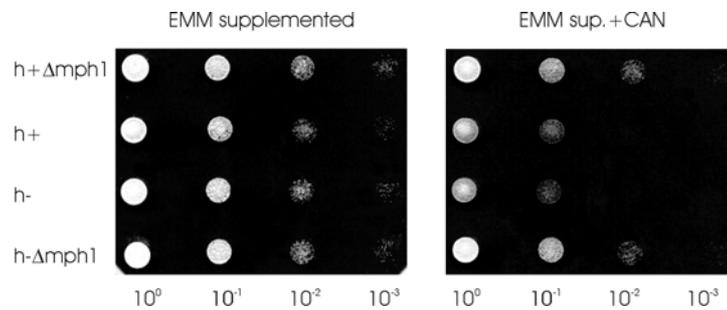


Abbildung 34: Mutationsfrequenz von *Schizosaccharomyces pombe* Wildtyp- und *mph1*-Zellen unter Verwendung des Canavaninvorwärtsmutationssystems. Die Stämme wurden in YE über Nacht angezogen, drei 1:10 Verdünnungen hergestellt und je 10 μ l auf EMM und EMM/CAN (40mg/l) getropft und bis zum Sichtbarwerden von Kolonien bei 30 °C inkubiert.

Diese ersten Daten der phänotypischen Charakterisierung der Mutanten des putativen *MPH1*-Homologen aus der Spaltheife zeigen, dass *spmph1*-Mutanten einen ähnlichen Phänotyp wie *Saccharomyces cerevisiae mph1*-Mutanten besitzen. Das Sequenzhomologe von *MPH1* scheint daher auch ein Funktionshomologes zu sein.

Komplementation

Die Hypothese, dass *spmph1*⁺ ein Funktionshomologes von *scMPH1* ist, kann durch eine interspezifische Komplementation gestützt werden. Hierfür wurde das *spmph1*⁺-Gen in den *Saccharomyces cerevisiae* spezifischen Vektor pRS316 kloniert (pRS316 *spmph1*⁺, vgl. S. 28). Für die Untersuchung der Komplementation wurden *Saccharomyces cerevisiae mph1*-Zellen mit pRS316, pRS316 *MPH1* (S. 26) und pRS316 *spmph1*⁺ transformiert. *URA*⁻-Transformanten wurden auf die Sensitivität gegenüber MMS und 4-NQO und den Mutatorphänotyp untersucht.

In Abbildung 35 ist die Komplementation der Sensitivität gezeigt. Die Zellen wurden in Selektivmedium (SC-ura) angezogen und sowohl auf YPD-Platten als auch auf SC-ura-Platten getropft. Da kein Unterschied zwischen den YPD- und SC-ura-Platten festgestellt werden konnte, ist es ausreichend, wenn die Zellen zum Plasmiderhalt in Selektivmedium angezogen werden. Die Sensitivität von *mph1* (Abbildung 35, zweite Reihe) lässt sich erwartungsgemäß durch das *Saccharomyces cerevisiae MPH1*-Gen komplementieren (Abbildung 35, dritte Reihe). Durch das *spmph1*⁺ Gen lässt sich die *mph1*-Sensitivität jedoch nicht wieder aufheben (Abbildung 35, vierte Reihe).

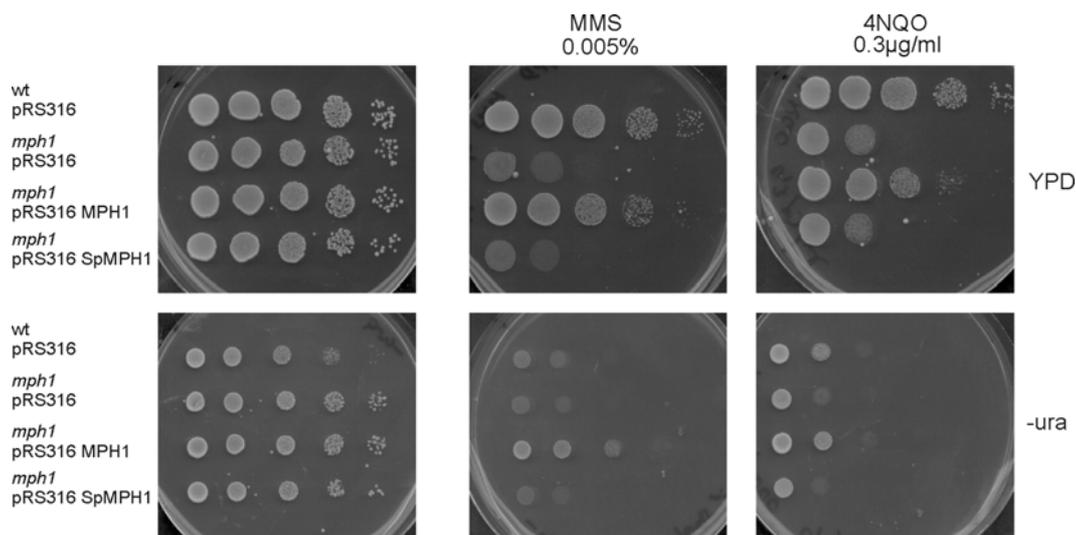


Abbildung 35: Komplementation der Sensitivität von *Saccharomyces cerevisiae* Wildtyp und *mph1*-Mutanten gegenüber MMS und 4-NQO. Die jeweiligen Stämme wurden in SC-ura angezogen, auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt und je 10 µl von 1:10 Verdünnungen auf die YPD- und SC-ura-Platten ohne und mit den DNA schädigenden Agenzien in den angegebenen Konzentrationen getropft.

Die Komplementation des *mph1*-Mutatorphänotyps ist in Abbildung 36 gezeigt. Wildtypzellen bilden nur vereinzelt canavaninresistente Kolonien (Abbildung 36, wt pRS316). Die Deletion von *MPH1* ruft dagegen eine erhöhte Zahl von canavaninresistenten Kolonien hervor (Abbildung 36, *mph1* pRS316), die sich durch ein plasmidständiges *MPH1*-Gen (Abbildung 36, *mph1* pRS316 MPH1) wieder aufheben lässt. Das Einbringen von *spmph1*⁺ in *mph1*-Mutanten hebt den Mutatorphänotyp partiell auf (Abbildung 36, *mph1* pRS316 *spmph1*⁺).

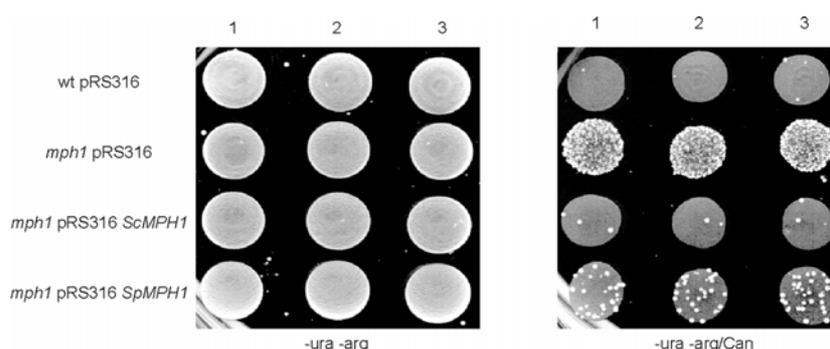


Abbildung 36: Komplementation der Mutationsfrequenz von *Saccharomyces cerevisiae* Wildtyp- und *mph1*-Zellen unter Verwendung des Canavaninvorwärtsmutationssystems. Jeweils drei verschiedene Transformanten wurden in SC-ura angezogen, je 50 µl auf SC-ura-arg als Wachturmskontrolle und auf und SC-ura-arg/CAN-Platten getropft und bis zum Sichtbarwerden von Kolonien bei 30 °C inkubiert.

Obwohl bei der Komplementation mit dem *spmph1*⁺-Gen mehr canavaninresistente Kolonien auftreten, als bei der Komplementation mit dem *MPH1*-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae*, ist die Kolonienzahl doch deutlich geringer als bei mit dem

Leervektor transformierten *mph1*-Mutanten. Dies weist darauf hin, dass das *spmph1*⁺-Gen zumindest partiell den *mph1*-Phänotyp komplementieren kann, was die Vermutung eines Funktionshomologen Gens stark unterstützt. Dass die Komplementation nur partiell erfolgt, könnte daran liegen, dass das *spmph1*⁺-Gen ein Intron enthält, welches nur unzureichend gespleißt wird, da die Spleißsequenz nicht mit der für *Saccharomyces cerevisiae* bestimmten Spleißkonsensus-Sequenz (5'-*splice site*: GUAUGU, *branchpoint*: UACUAAC, 3' *splice site*: YAG; Jones *et al.* 1992) übereinstimmt.

DISKUSSION

Mph1 agiert in einem Weg zur fehlerfreien Umgehung von DNA-Läsionen

Die genetische Interaktion von *mph1*-Mutanten aus *Saccharomyces cerevisiae* mit Mutanten aus der Basenexcisionsreparatur, der Nukleotidexcisionsreparatur, der Transkriptionsgekoppelten Reparatur, der postreplikativen Reparatur, der Reparatur von Doppelstrangbrüchen (homologe Rekombination, *non-homologous end joining*), dem *DNA damage checkpoint* und weiterer ausgewählter Gene, wie *SGS1*, *SRS2*, *MRE11*, *RAD27* und *MMS4* wurde untersucht. Dabei wurde der Einfluss von Mutationen in diesen Genen auf den Mutatorphänotyp und die Sensitivität von *mph1*-Mutanten gegenüber den DNA schädigenden Agenzien MMS, 4-NQO und Camptothecin analysiert.

Mit Mutanten aus der Basen- und Nukleotidexcisionsreparatur wurde folgende genetische Interaktionen beobachtet: *mph1* ist synergistisch im Bezug auf den Mutatorphänotyp mit *mag1* und *apn1*, wobei der Synergismus mit *apn1* besonders stark ausgeprägt ist. *MAG1* kodiert für eine DNA-Glykosylase und *APN1* für eine AP-Endonuklease, die beide in der Basenexcisionsreparatur involviert sind. Der Synergismus war in einer *apn1 apn2 mph1* Tripelmutante, bei der eine weitere AP-Endonuklease in Hefe inaktiviert ist, noch stärker ausgeprägt (S. 40). Ein synergistischer Phänotyp von *mph1* war bereits mit *rad14*, einer Mutante aus der Nukleotidexcisionsreparatur, beobachtet worden (Scheller et al. 2000).

Reparaturmutanten haben häufig einen Mutatorphänotyp, da es auf Grund des Reparaturdefektes zu einer Anhäufung von DNA-Läsionen kommt, die bei der Replikation z. B. durch Transläsionssynthese zu Mutationen führen. Es wäre daher möglich, daß Mph1 ein akzessorischer Faktor dieser Reparatursysteme ist und bei seinem Ausfall mehr Schäden in der DNA auftreten. Dies erscheint aber aus mehreren Gründen unwahrscheinlich. Zum einen müßte Mph1 sowohl in der Basen- als auch in der Nukleotidexcisionsreparatur beteiligt sein, die beide sehr unterschiedliche Mechanismen benutzen (de Laat et al. 1999, Kelly et al. 2003). Zum anderen verhalten sich die Mutanten additiv bezüglich der Sensitivität gegenüber DNA-Schäden (Abbildung 5, S. 39; Abbildung 6, S. 40). Das gewichtigste Argument gegen eine Beteiligung von Mph1 an der Excisionsreparatur ist aber, dass weder *apn1*-Mutanten noch *apn1 apn2*-Doppelmutanten einen nennenswerten Mutatorphänotyp besitzen. Erst durch die Deletion von *MPH1* kommt es zu einem starken Anstieg des Mutatorphänotyps. Die mögliche Erklärung, dass Mph1 für eine effektive Wirkung der Glykosylasen benötigt wird, kann nicht zutreffen, da *AP-sites* mit relativ hoher Frequenz auch durch spontane hydrolytische Depurinierung vor allem von Guanosin entstehen (Guillet und Boiteux 2003). Viel wahrscheinlicher ist daher die Erklärung, dass in Anwesenheit von Mph1 die in den *apn*-Mutanten vermehrt auftretenden AP-

sites (Johnson *et al.* 1998) bei der Replikation nahezu quantitativ fehlerfrei umgangen werden. Fehlt hingegen Mph1, werden sie stattdessen mutagen durch Transläsionssynthese prozessiert.

Die Kanalisierung von Läsionen in die Transläsionssynthese wird dadurch gestützt, dass der Mutatorphänotyp von *mph1* und *apn1 mph1* abhängig von *REV3* ist, welches für die katalytische Untereinheit der Transläsionspolymerase Pol ζ kodiert (Scheller *et al.* 2000; vgl. Tabelle 6, S. 37). Die Abhängigkeit des *mph1*-Mutatorphänotypes von der Transläsionssynthese zeigt sich auch bei Mutanten von *Rev7*, der regulatorischen Untereinheit von Pol ζ und *Rev1*, einer Deoxycytidyltransferase, die bevorzugt C gegenüber einer AP-site einbaut (Nelson *et al.* 1996a, Nelson *et al.* 1996b, Nelson *et al.* 2000). Auch durch die Deletion dieser Gene wird der Mutatorphänotyp abgeschafft (Tabelle 14, S. 54). Transläsionspolymerasen weisen eine im Vergleich zu replikativen DNA-Polymerasen geringere Genauigkeit auf und können über DNA-Läsionen hinweglesen, die replikative DNA-Polymerasen nicht kopieren können. Die Transläsionssynthese stellt offensichtlich die Hauptalternative zur Mph1-abhängigen fehlerfreien Umgehung dar, wie die synergistische Sensitivität der *rev3 mph1* und auch *rev7 mph1* Mutanten gegenüber MMS und 4-NQO zeigt (Abbildung 5, S. 39; Abbildung 12, S. 56). DNA-Schäden, die in diesen Doppelmutanten weder fehlerfrei durch Mph1 noch durch Transläsionssynthese prozessiert werden können, führen zum Tod der Zelle.

Mph1 ist nicht in die postreplikative Reparatur involviert

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, spielen die Gene der *RAD6*-Epistasisgruppe bei der Umgehung von replikationsarretierenden DNA-Läsionen eine wichtige Rolle. Neben dem *error-prone*-Zweig, zu dem die Transläsionssynthese gezählt wird, unterscheidet man in der postreplikativen Reparatur auch einen *error free* Zweig, zu dem *RAD5*, *MMS2* und *UBC13* gehören. Rad5, dessen ATPase-Aktivität durch einzelsträngige DNA stimuliert wird, bindet mit seiner RING-Finger-Domäne Ubc13, ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (Johnson *et al.* 1994, Ulrich und Jentsch 2000). Ubc13 bildet mit Mms2 ein Heterodimer, welches über Lysin 63-verknüpfte Polyubiquitinketten bilden kann (Hofmann und Pickart 1999). Rad5 interagiert auch mit Rad18, welches ebenfalls Einzelstrang-DNA-Bindeaktivität zeigt und Rad6 zur DNA rekrutiert (Bailly *et al.* 1994). So kommt es zur Ausbildung eines Multienzymkomplexes aus Rad6/Rad18-Rad5/Ubc13/Mms2. Rad6 ist ein ubiquitinübertragendes Enzym, für das kürzlich gezeigt werden konnte, dass es für die Monoubiquitinierung von *proliferation cell nuclear antigen* (PCNA), dem Prozessierungsfaktor der replikativen Polymerase, verantwortlich ist und das dies Voraussetzung für Transläsionssynthese ist. Diese Monoubiquitinierung kann durch Rad5/Ubc13/Mms2 zu einer Multiubiquitinierung ausgebaut werden und wird vermutlich für die fehlerfreie Umgehung von DNA-Läsionen benötigt (Hoege *et al.* 2002, Stelter und Ulrich 2003). *MMS2* und *UBC13* wurden aufgrund genetischer Interaktionen in den fehlerfreien Zweig der postreplikativen Reparatur eingeordnet und sind epistatisch zueinander (Hofmann und Pickart 1999, Broomfield *et al.* 1998, Brusky *et al.* 2000). Bezüglich des spontanen Mutatorphänotyp unterscheiden sich jedoch die Interaktionen von *mms2* und *ubc13*

mit *mph1* (Tabelle 14, S. 54). Während *mms2* und *mph1* partiell additiv sind, ist *ubc13* hypostatisch zu *mph1*. Auch bei genetischen Interaktion mit *rad6*, bezogen auf die UV-Sensitivität, zeigten sich Unterschiede: *mms2* ist hypostatisch zu *rad6*, während *ubc13* die starke UV-Sensitivität von *rad6*-Mutanten partiell wieder aufheben kann (Brusky et al. 2000). Obwohl Mms2 und Ubc13 nur als Heterodimer Polyubiquitinierungsaktivität zeigen (Hofman und Pickart 1999), scheinen sie dennoch nicht funktionell äquivalent zu sein. Aus der additiven UV-Sensitivität von *mms2* und *rad4* (Broomfield et al. 1998) kann geschlossen werden, dass *MMS2* nicht in die Reparatur von UV-induzierten Läsionen über die Nukleotidexcisionsreparatur involviert ist. Sowohl *mms2* als auch *ubc13* sind synergistisch sensitiv in Kombination mit *rev3*, einen Phänotyp den wir auch mit *mph1 rev3* beobachtet haben (Brusky et al. 2000, Broomfield et al. 1998, Abbildung 5, S.39). *mms2* zeigt eine Mutatorphänotyp (Tabelle 14, S. 54), der durch *rev3* wieder aufgehoben werden kann (Broomfield und Xiao 2002). Hieraus kann geschlossen werden, dass *MMS2* und *UBC13*, ähnlich wie *MPH1*, eine Funktion bei der fehlerfreien Umgehung von DNA-Läsionen haben, und der Ausfall dieser Gene zur Transläsionssynthese führt. Dieser fehlerfreie *bypass* agiert aber unabhängig von *MPH1*, wie man aus der Additivität der UV-, MMS- und 4-NQO-Sensitivitäten von *mms2/ubc13* und *mph1* ableiten kann (Abbildung 11, S. 55; Abbildung 12, S. 56). Der fehlerfreie *MMS2/UBC13*-Weg scheint – im Gegensatz zum *MPH1*-Weg – unabhängig von *RAD52* zu agieren, weil auch hier die Phänotypen bzgl. der UV-Sensitivität additiv sind (Ulrich 2001). Die genetische Interaktion von *mph1* mit Mutanten der post-replikativen Reparatur legen nahe, dass *MPH1* nicht in einen dieser Zweige eingeordnet werden kann. Viel wahrscheinlicher ist, dass *MPH1* einen fehlerfreien Weg zur Umgehung von DNA-Läsionen beschreibt, der parallel zu *MMS2/UBC13* ist. Die Suppression des Mutatorphänotyps von *mph1* durch *rev3/rev7* und *rev1* erklärt sich dann aus der Notwendigkeit, die in Abwesenheit von *mph1* verbleibenden DNA-Läsionen mutagen zu umgehen. Hierdurch läßt sich auch die Suppression des *mph1*-Mutatorphänotyps durch *rad6* und *rad18* erklären, da beide Gene, wie oben ausgeführt, für die Transläsionssynthese notwendig sind. Unklar in diesem Zusammenhang ist allerdings noch die partielle Suppression des *mph1*-Mutatorphänotyps durch *rad5* (Tabelle 14, S. 54). Die Sensitivität der *rad5 mph1*-Doppelmutante ist, wie bei allen anderen PRR-Mutanten auch, höher als die der jeweiligen Einzelmutanten, weswegen *MPH1* nicht in diesen Weg eingeordnet werden kann. Andererseits ist *RAD5* nicht für die Transläsionssynthese notwendig (Cejka et al. 2001). Eine mögliche Erklärung wäre, daß Rad5 dennoch die Transläsionssynthese stimuliert, indem es die alternative Modifikation von PCNA mit SUMO reguliert (Stelter und Ulrich 2003). Dies ist aber ohne zusätzliche Untersuchungen zur Funktion von Rad5 zur Zeit nicht beantwortbar.

Die fehlerfreie Umgehung von DNA-Schäden durch Mph1 erfordert Proteine der homologen Rekombination

Im Gegensatz zum *RAD5/MMS2/UBC13*-Weg ist der *MPH1*-Weg abhängig vom *RAD52*-Weg, bzw. von *rad51*, *rad52* und *rad55*. Sowohl in Bezug auf den Mutator-

phänotyp als auch der Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien ist *mph1* hypostatisch zu *rad51*, *rad52* und *rad55* (Tabelle 10, S. 47; Tabelle 11, S. 48; Abbildung 9, S. 49). Die *RAD52*-Epistasisgruppe wird für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch homologe Rekombination benötigt. Mutanten dieses Weges sind u. a. sensitiv gegenüber ionisierender Strahlung und defekt in der Meiose und der hetero-allelischen mitotischen Rekombination (Game und Mortimer 1974, Rattrey und Symington 1994). *mph1*-Mutanten hingegen sind nicht sensitiv gegenüber Röntgenstrahlen, sind nicht sporulationsdefekt (Scheller *et al.* 2000) und zeigen zum Wildtyp vergleichbare Rekombinationsraten (Tabelle 12, S. 50). Damit erscheint es unwahrscheinlich, dass *MPH1* an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt ist. In der Literatur wird für die Gene der *RAD52*-Epistasisgruppe immer mehr eine Funktion bei der fehlerfreien Umgehung von DNA-Läsionen postuliert (u. a. McGlynn und Lloyd 2002a, Cox 2002, Oakley und Hickson 2002). Fehlerfreie Umgehung bedeutet, dass eine DNA-Läsion, die den Fortgang der Replikation behindert, umgangen werden kann, indem die Information vom Schwesterchromatid ausgenutzt wird, um über die DNA-Läsion hinweg lesen zu können (Abbildung 1, S. 10). Hierbei wird vermutlich das Rad51-Filament, für dessen Ausbildung in Anwesenheit von RPA Rad52 und der Rad55/57-Komplex erforderlich sind, für den Strangtransfer ins Schwesterchromatid benötigt. Aufgrund der genetischen Interaktionen und der Phänotypen der *mph1*-Mutante ist es daher wahrscheinlich, daß *MPH1* am Informationstransfer vom Schwesterchromatid bei der fehlerfreien Umgehung von replikationsarretierenden DNA-Schäden durch homologe Rekombination benötigt wird, aber nicht bei der Doppelstrangbruchreparatur.

Modelle zur chicken foot-Bildung durch homologe Rekombination

Für die fehlerfreie Umgehung von DNA-Läsionen auf der *lagging strand* Matrize wurde, wie in Abbildung 1 A (a-f, S. 10) schematisch verdeutlicht, in der Literatur eine Beteiligung von Enzymen der homologen Rekombination angenommen (z. B. Fabre *et al.* 2002). Für die Umgehung von Schäden auf der Matrize des *leading strand* wird der *chicken foot* als wichtiges Intermediat postuliert. Der *chicken foot*, der strukturell einer *Holliday junction* gleicht, kann dabei durch die Wirkung einer Helikase, die die *fork regression* katalysiert, erzeugt werden (Abbildung 1 B, S. 10). In *E. coli* wird diese Funktion möglicherweise von RecG ausgeübt (McGlynn und Lloyd 2002a, Singleton *et al.* 2001)

Laut der deduzierten Aminosäuresequenz gehört Mph1 zur DEAH/DExH-Familie (Scheller *et al.* 2000), zu der eine Reihe von Helikasen gehören (Cruz *et al.* 1999). In ersten Untersuchungen konnte für Mph1 eine 3'-5'-Helikaseaktivität gezeigt werden (L. Krejci, persönliche Kommunikation). Eine zunächst plausibel erscheinende Hypothese wäre, dass Mph1 ähnlich wie RecG die *fork regression via* Helikaseaktivität katalysiert. Dann wäre allerdings nicht zu erklären, wieso *mph1* hypostatisch zu Mutationen der homologen Rekombination ist. Im Falle der Auflösung der *Holliday junction* durch *reverse branch migration* würde homologe Rekombination überhaupt

nicht benötigt und *mph1* sollte einen stärkeren Mutatorphänotyp als *rad51* haben. Würde die *Holliday junction* hingegen durch Resolvasen geschnitten, entstünde ein Doppelstrangende, welches in Abwesenheit von homologer Rekombination höchstwahrscheinlich toxisch sein sollte, da die Replikationsgabel nicht wieder hergestellt werden kann (Abbildung 1 B, S. 10). Dann sollten aber die Sensitivitäten von *rad51* und *mph1* zumindest additiv sein. Da jedoch beide aus dieser Hypothese vorhergesagten Phänotypen der Doppelmutante nicht zutreffen, muß man diese verwerfen.

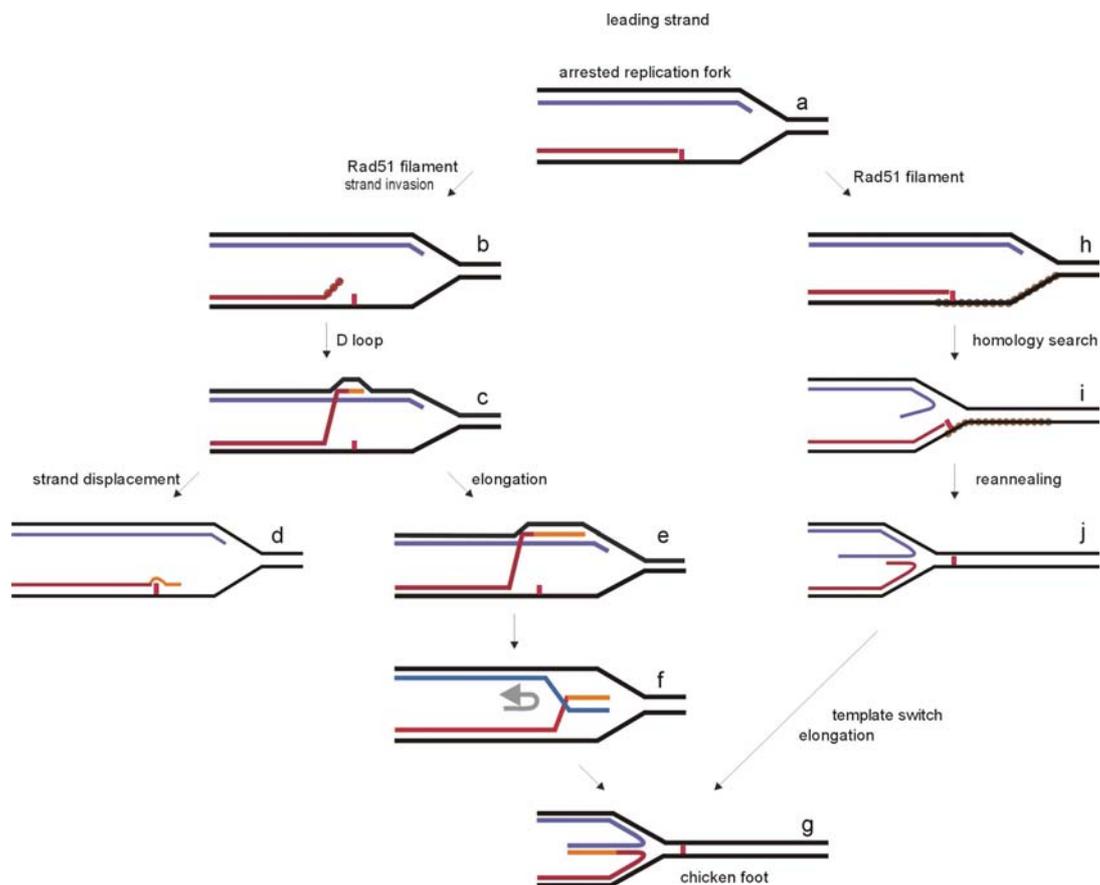


Abbildung 37: Alternative Möglichkeiten zur Bildung des *chicken foot* bei einer DNA-Läsion auf dem *leading strand* zur fehlerfreien Reinitiation von arretierten Replikationsgabeln. Die Details sind im Text erklärt. Die parentalen *leading* und *lagging strands* sind schwarz, der neusynthetisierte *lagging strand* in blau, der neusynthetisierte *leading strand* in weinrot dargestellt. DNA-Neusynthese, um die DNA-Läsion zu umgehen ist in orange dargestellt. Das rote Kästchen auf dem parentalen *leading strand* stellt eine DNA-Läsion und die braunen Kügelchen bei b, h und i stellen das Rad51-Filament dar.

Als Alternative zur Helikase-vermittelten *fork regression* wird in *E. coli* aber auch eine Bildung des *chicken foot* über homologe Rekombination unter Beteiligung von RecA diskutiert (Cox 2001, Cox 2002, und Robu *et al.* 2001). In Abbildung 37 ist schematisch gezeigt, wie man sich die *chicken foot* Bildung über homologe Rekombination vorstellen kann. Wenn die replikative Polymerase an einer DNA-Läsion

auf der Matrize des *leading strand* arretiert (Abbildung 37 a), kann der abgebrochene *leading strand* abgeschält werden und nach Bildung des Rad51-Filamentes (dem RecA-Funktionshomologen von Eukaryoten; Abbildung 37 b) in die Duplex des Schwesterchromatids unter Ausbildung eines *D-loop* invadieren (Abbildung 37 c), wobei der *leading* mit dem *lagging strand* hybridisiert. Wird das 3'-Ende des *leading strand* mit dem *lagging strand* als Matrize verlängert und klappt es danach wieder auf die Matrize des *leading strand* zurück, indem der *D-loop* an der Seite der Stranginvasion in Elongationsrichtung verschoben wird (*strand displacement*) und zwar schneller, als die Elongation erfolgt, ist die DNA-Läsion fehlerfrei umgangen (Abbildung 37 d).

Erfolgt die Elongation jedoch bis zum Ende des als Matrize dienenden Okazaki-Fragmentes (Abbildung 37 e), ohne dass der *D-loop* (weit) verschoben wird, so resultiert auch dies in der Ausbildung des *chicken foot* (Abbildung 37 f und g). Der *chicken foot* kann aber auch gebildet werden, wenn sich das Rad51-Filament auf dem - vor der Replikationsmaschinerie bereits entwundenen - Einzelstrangbereich der *leading strand*-Matrize bildet (Abbildung 37 h). Dieses Rad51-Filament ist ebenfalls zur Homologiesuche fähig und kann mit der Matrize des *lagging strand* paaren, wobei zunächst der neusynthetisierte *lagging strand* abgeschält wird (Abbildung 37 i) und dann auch der neusynthetisierte *leading strand*. Diese beiden Stränge sind komplementär und können unter Ausbildung des *chicken foot* paaren (Abbildung 37 j). Wenn nun die DNA-Polymerase auf diesen Strang wechselt, kann das abgebrochene 3'-Ende des *leading strand* wieder fehlerfrei mit dem *lagging strand* als Matrize verlängert werden (Abbildung 37 g). Die Reinitiation der Replikation ist möglich, wenn der *chicken foot*, wie in Abbildung 1 (S. 10) schematisch skizziert, durch *reverse branch migration* aufgelöst oder durch eine *Holliday junction*-Resolvase geschnitten wird und das resultierende Doppelstrangende nach Prozessierung rekombinativ in das vollständige Chromatid eingefädelt wird.

Mph1 hat vermutlich eine Funktion bei der D-loop-Stabilisierung

Bei dem Modell wie in Abbildung 37 (a, h, i, j) geschildert, entsteht zunächst vor der arretierten *leading strand* Polymerase ein größerer Bereich Einzelstrang-DNA. Dieser wird *in vivo* höchstwahrscheinlich zunächst vom Einzelstrang-Bindeprotein RPA besetzt. Für die Ausbildung des Rad51-Filamentes auf einer mit RPA besetzten Einzelstrang-DNA ist aber Rad52 (sowie Rad55/Rad57) notwendig (New *et al.* 1998, Sung *et al.* 1997b). Da Rad52 bevorzugt einzelsträngige DNA-Enden bindet (Mortensen *et al.* 1996, Benson *et al.* 1998, Parson *et al.* 2000), die in diesem Falle nicht vorliegen, ließe sich bei dieser Variante nicht ohne weiteres erklären, warum *mph1* nicht nur hypostatisch zu *rad51*, sondern auch zu *rad52* ist.

Die Hypostasis von *mph1* zu *rad52* ist aber auf dem in Abbildung 37 (a, b, c, e, f, g) skizzierten Weg erklärbar. Hier wird zunächst ein einzelsträngiges DNA-Ende erzeugt, an welches Rad52 binden kann. Von daher erscheint diese Variante von den möglichen Alternativen die plausibelste. Zur Erzeugung dieses Einzelstrangendes wäre vermutlich

eine 5'-3'-Helikase notwendig, die das 3'-Ende des neusynthetisierten *leading strand* abschält (Abbildung 37 b), damit sich das Rad51-Filament bilden kann. Da aber, wie oben erwähnt, Mph1 wahrscheinlich eine 3'-5'-Helikaseaktivität besitzt, kommt es höchstwahrscheinlich für diesen Schritt ebenfalls nicht in Frage.

Der nächste Schritt in diesem Modell beinhaltet die Stranginvasion unter Ausbildung eines *D-loop* (Abbildung 1c). Rad54 ist eine DNA-abhängige ATPase und Helikase (Eisen *et al.* 1995), für die eine Funktion bei der *D-loop*-Bildung angenommen wird, vor allem wenn die Rezipienten-DNA *supercoiled* vorliegt (Van Komen *et al.* 2000). Im Gegensatz zu *rad51*, *rad52* und *rad55* wurde für *rad54* eine partielle Additivität des Mutatorphänotyps mit *mph1* beobachtet (Tabelle 11 S. 48) Dies könnte bedeuten, daß Rad54 und Mph1 teilweise parallele Funktionen bei der Ausbildung bzw. Stabilisierung des *D-loop* ausüben. Ist nur eines der beiden Proteine vorhanden, wird zwar die Effizienz der fehlerfreien Umgehung reduziert, aber sie sollte immer noch bis zu einem gewissen Grade möglich sein. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass die Rad51-abhängige Stranginvasion, wenn auch ineffizient, ohne Rad54 möglich ist, wie es tatsächlich auch beobachtet wurde (Petukhova *et al.* 1998).

Nach der Bildung des *D-loop* muß das 3'-Ende des invadierten *leading strand* durch eine DNA-Polymerase verlängert werden (Abbildung 37 c). Plausiblerweise benötigt man hierfür eine DNA-Helikase, die den *D-loop* in Polymerisationsrichtung entwindet. Wenn Mph1 diese Funktion ausübt, wäre zum einen erklärbar, warum *mph1*-Mutanten einen Mutatorphänotyp besitzen, da dann dieser - für die fehlerfreie Umgehung essentielle - Prozess nicht mehr, oder nur noch mit verminderter Effizienz, stattfinden kann. Nimmt man an, dass eine andere Helikase - wenn auch schlechter - Mph1 hierbei ersetzen kann, könnte man die Additivität der *rad54 mph1*-Doppelmutante dadurch erklären, daß durch das Fehlen von Rad54 die Effizienz der Stranginvasion und durch das Fehlen von Mph1 die Effizienz der Elongation reduziert wird. Beim Fehlen nur eines der beiden Proteine könnte der Prozess aber dennoch - wenn auch mit stark reduzierter Effizienz - stattfinden.

Nach der Verlängerung des 3'-Endes des invadierten *leading strand* ist eine Verzweigung möglich (Abbildung 37 d oder e). Um zu dem in Abbildung 37 d gezeigten Intermediat zu gelangen, muss der *D-loop* gleichzeitig mit der Elongation verschoben werden. Wie weiter unten diskutiert, könnte möglicherweise Sgs1 diese Funktion ausüben. Wenn eine solche Aktivität in der Zelle vorhanden ist, muss aber verhindert werden, dass der *D-loop* vor der Elongation wieder auflöst wird, da der Prozess ansonsten unproduktiv im Sinne einer fehlerfreien Umgehung ist. Es ist daher auch denkbar, daß Mph1 an der Seite des *D-loop* bindet, an der der invadierende Strang eintritt, und das vorzeitige Auflösen des *D-loop* verhindert. Auch in diesem Szenario ließe sich die Additivität von *rad54* und *mph1* mit analogen Argumenten wie oben erklären, indem nämlich das Fehlen von Mph1 eine verringerte Stabilität des *D-loop* zur Folge hat.

Die hier aufgeführte Argumentation, dass Mph1 eine Funktion bei der Stabilisierung des *D-loop* hat, erlaubt es auch, eine weitere Beobachtung zu erklären. Experimente im Labor von Wilfried Kramer haben gezeigt, dass *mph1* und *srs2* sehr wahrscheinlich synthetisch letal sind und dass sich diese Letalität durch *rad51*, *rad52* und *rad53* supprimieren lässt (E. Panico, unveröffentlicht). Auch *rad54* ist synthetisch letal mit *srs2* (Klein 2001) und die Letalität ist auch hier abhängig von der HR und vom

DNA damage checkpoint, das heißt die synthetische Letalität kann durch *rad51*, *rad52*, *rad55*, *rad57* und durch *rad17*, *rad24* und *mec3* wieder aufgehoben werden (Klein 2001, Paladino und Klein 1992). Diese genetische Interaktion ist dadurch interpretierbar, dass Rad54 nach Rad51, Rad52, Rad55 und Rad57 agiert und dass sich in *srs2 rad54* ein Substrat anhäuft, das den *checkpoint* anschaltet, der dann einen andauernden Zellzyklusarrest auslöst. Bei diesem Substrat handelt es sich möglicherweise um ein Rad51-Filament. Zumindest für RPA besetzte ssDNA konnte kürzlich gezeigt werden, dass ATR, das humane Mec1-Homologe, über ATRIR einen ssDNA-RPA-Komplex bindet, was dann den *checkpoint* aktiviert (Zou und Elledge 2003). Auch in Hefe konnte eine Verbindung von arretierten Replikationsgabeln, Einzelstrang-DNA und *checkpoint*-Aktivierung gezeigt werden (Sogo *et al.* 2002). Wenn ein ssDNA-RPA-Komplex bereits vorliegt, so kann man spekulieren, dass sich ein Rad51-Filament auf diesem Einzelstrang ausbilden kann und das Rad51-Filament auch als *checkpoint*-Signal fungieren könnte. Für Srs2, einer 3'-5' Helikase (Rong und Klein 1993), konnte kürzlich gezeigt werden, dass es *in vitro* die Rad51-Filamente abbauen kann, bzw. deren Bildung verhindert (Krejci *et al.* 2003, Veaute *et al.* 2003). Für die *srs2 rad54*-Mutante kann dann plausibel angenommen werden, dass es nicht zum Abbau des ssDNA-Rad51-Filamentes kommt und bei gleichzeitigem Fehlen von Rad54 ein nur ungenügender Strangtransfer stattfindet. Die vermehrte Ansammlung von ssDNA-Rad51-Filament könnte dann den *checkpoint* aktivieren. Wenn es nicht zum Abbau des Signals kommt und die Zellen dauerhaft arretieren und letztendlich sterben, erklärte dies die synthetische Letalität von *srs2 rad54*. Die Verknüpfung von Srs2 und dem *DNA damage checkpoint* konnte mehrfach bereits gezeigt werden (vgl. S. 70). So ist z. B. Srs2 für das Abschalten des *DNA damage checkpoint* notwendig. Vaze *et al.* konnten zeigen, dass *srs2*-Mutanten sowohl defekt in der Wiederaufnahme der Replikation (*recovery*) sind als auch in der Adaptation (Fortführung des Zellzyklus bei unvollständiger Reparatur; Vaze *et al.* 2002). Nicht im Einklang mit dieser Hypothese steht allerdings der Befund der Autoren, dass der Defekt in der *recovery*, auch wenn die DNA repariert wurde, anhält. Die Funktion von Srs2 muss also noch weitreichender sein als die Zerstörung des Rad51-Filamentes. Auf Grund dieser Befunde wird für Srs2 eine Rolle bei der Entfernung von *checkpoint*-Proteinen vom Chromatin diskutiert, was dann erst den Fortgang des Zellzyklus ermöglicht (Vaze *et al.* 2002).

Wenn die Erklärung der synthetischen Letalität durch eine Anhäufung von nicht prozessierten ssDNA-Rad51-Filamenten zutreffend ist, ließe sich die gleiche Argumentationskette auch auf die synthetische Letalität von *mph1* und *srs2* übertragen. Eine unzureichende Stabilisierung des *D-loop* in Abwesenheit von Mph1 führt dann ebenfalls zu freien ssDNA-Rad51-Filamenten. In *rad51/rad52* käme es gar nicht erst zur Ausbildung des Filamentes und in *rad53*-Zellen nicht zur Aktivierung des *DNA damage checkpoints*, was dann die synthetische Letalität wieder aufhebt. Unter dieser Annahme operiert Mph1 aber nach Rad51/Rad52, und wie die Mutationsraten andeuten eher parallel zu Rad54. Dies ist ein weiteres Argument dafür, dass Mph1 nicht die Helikase ist, die zur Ausbildung des 3'-Überhanges am abgebrochenen *leading strand* beiträgt (Abbildung 37 b).

Die Toxizität der *SGS1*-Überproduktion in *mph1*-Zellen, lässt sich ebenfalls unter dieser Annahme erklären. Wenn Mph1 den *D-loop* stabilisiert und Sgs1 diesen

destabilisiert (s. u.), sollte in *mph1*-Zellen durch die verstärkte Aktivität von Sgs1, die *D-loop*-Bildung stark beeinträchtigt sein. Unter diesen Bedingungen würde es dann zur Anhäufung von nicht prozessierten ssDNA-Rad51-Filamenten kommen, die das Signal für den *DNA damage checkpoint* darstellen und diesen anschalten. Damit wäre plausibel der Wachstumseffekt bei *SGS1*-Überproduktion (Abbildung 20, S.68), bzw. die Toxizität bei zusätzlicher Induktion von DNA-Schäden, die das verstärkte Auftreten von ssDNA-Rad51-Filamente zur Folge haben sollten, erklärbar (Abbildung 21, S. 69).

Destabilisiert Sgs1 den D-loop?

Das menschliche Bloom-Protein – wie das Hefehomologe Sgs1 eine RecQ-Helikase – kann *in vitro Holliday junctions* verschieben (Karow *et al.* 2000) und ist auch in der Lage, synthetisch hergestellte *D-loops* aufzulösen (I. Hickson, persönliche Kommunikation). Vermutlich besitzt auch Sgs1 sehr ähnliche biochemische Aktivitäten, da BLM verschiedene *sgs1*-Phänotypen komplementieren kann (Yamagata *et al.* 1998, Heo *et al.* 1999; Abbildung 17; Abbildung 18, S. 65). Im Kontext der oben vorgestellten Modelle könnte Sgs1 daher das Protein sein, welches den *D-loop* destabilisiert. Diese Hypothese ist im Einklang mit den Befunden, dass *sgs1* den spontanen Mutatorphänotyp von *mph1* partiell supprimiert. Wenn Sgs1 den *D-loop* auflöst und Mph1 ihn stabilisiert, könnte es in Abwesenheit beider Proteine wieder zu einer höheren Rate von fehlerfreier Umgehung kommen, ohne auf Translänionsynthese zurückgreifen zu müssen. Obwohl diese Hypothese angesichts der wahrscheinlichen biochemischen Aktivitäten von Sgs1 plausibel erscheint, ist sie bei Betrachtung weiterer *sgs1*-Phänotypen in dieser einfachen Form nicht haltbar.

In einem System zur Untersuchung der Stabilität von repetitiven Sequenzen (Rudolph 2003), bei dem die Deletion einer direkten Sequenzduplikationen anhand der Wiederherstellung einer Antibiotikaresistenz gemessen wurde (Reversion), zeigen *sgs1*-Zellen nach Induktion von DNA-Läsionen mit 4-NQO eine im Vergleich zu Wildtypzellen erniedrigte Reversionsfrequenz. Das hieße, dass Sgs1 rekombinative Prozesse nach Auftreten von 4-NQO induzierten DNA-Schäden fördert. Wenn Sgs1 den *D-loop* destabilisiert, müßte man hier eine erhöhte Reversionsfrequenz im Vergleich zum Wildtyp erwarten. Umgekehrt konnte aber mit diesem System für *sgs1*-Zellen gezeigt werden, dass sowohl die spontane als auch die durch Camptothecin induzierte Reversionsfrequenz deutlich höher als beim Wildtyp ist. Hier unterdrückt Sgs1 offensichtlich rekombinative Prozesse. Auf Grund dieser Daten kann man spekulieren, dass spontan auftretende Schäden am ehesten denen von Camptothecin induzierten Schäden entsprechen. Camptothecin hemmt die Topoisomerase I, indem es das Intermediat stabilisiert, bei dem eine kovalente Bindung zwischen einem Tyrosylrest der Topoisomerase I und der DNA ausgebildet worden ist. Auf der Matrize des *leading strand* entsteht an dem Einzelstrangbruch durch *run-off*-Replikation ein Doppelstrangende (Kollaps der Replikationsgabel), welches von den Enzymen der homologen Rekombination prozessiert werden kann. Bei Addukten auf der Matrize des *lagging strand* treten keine Doppelstrangenden auf, so dass man vermuten kann, dass der Topoisomerase I-DNA-Komplex zum Arrest der Replikationsgabel führt, bevor die

lagging strand-Synthese den Einzelstrangbruch erreicht hat (Pommier *et al.* 1998, Strumberg *et al.* 2000, Wang 2002). Eine Schadensumgehung mittels der bisher diskutierten Mechanismen erscheint nicht möglich. Um die Replikation fortzuführen, müsste die Replikationsgabel warten, bis das replikationsarretierende Protein-DNA-Addukt beseitigt ist. Hierbei spielt die Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase (Tdp1), die die Bindung zwischen der Topoisomerase und der DNA hydrolysieren kann, eine wichtige Rolle (Interthal *et al.* 2001). Eine Möglichkeit, um die erhöhte Reversionsfrequenz von *sgs1* bei CPT-induzierten Schäden zu erklären, wäre, dass Sgs1 bei Auftreten von solchen Arresten rekombinative Prozesse so lange verhindert, bis der Schaden z. B. durch Tdp1 beseitigt wurde und die Replikation ganz normal fortgesetzt werden kann. Dies legt nahe, dass Sgs1 schadensabhängig unterschiedliche Funktionen ausführt. Bei replikationsarretierenden Schäden, wie durch 4-NQO induziert, scheint Sgs1 Rekombination zu fördern. Bei Camptothecin-induzierten und spontan auftretenden Replikationsarresten zeigt *sgs1* beim Schwesterchromatidaustausch einen Hyperrekombinationsphänotyp (Rudolph 2003, Onoda *et al.* 2001), was eine anti-rekombinative Wirkung von Sgs1 impliziert. Die unterschiedlichen Effekte von Sgs1 auf rekombinative Prozesse konnten auch bei der heteroallelischen mitotischen Rekombination beobachtet werden. Während *sgs1*-Mutanten einen spontanen Hyperrekombinationsphänotyp aufweisen (Watt *et al.* 1996; Tabelle 12, S. 50), zeigten sie nach MMS-Behandlung einen Hyporekombinationsphänotyp (Onoda *et al.* 2001). Bei der Regulation der Funktion von Sgs1 nach spontan oder induziert auftretenden Schäden mag die Einbettung von Sgs1 in einen Komplex (Gavin *et al.* 2002) eine Rolle spielen. Unterstützt wird die These der schadensinduzierten Umlagerung eines Komplex durch Daten aus dem Labor von Marco Foiani: Es konnte gezeigt werden, dass Sgs1 in normal wachsenden Zellen in einem Komplex mit hohem Molekulargewicht, u. a. mit Srs2 und Mre11, zu finden ist. Nach MMS-Induktion findet eine *DNA damage checkpoint* abhängige Umlagerung in drei Subkomplexe mit geringerer relativer Molekularmasse statt (Chiolo *et al.*, Poster auf der XXI. Yeast Conference 2003, Göteborg, Schweden).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die eingangs aufgestellte Hypothese, dass Sgs1 den *D-loop* destabilisiert, noch nicht verworfen werden muss. Allerdings erfordert sie sicher eine Reihe von Modifikationen, bei denen auch der *DNA damage checkpoint* vermutlich eine wichtige Rolle spielen wird. Desweiteren wurde bei der Formulierung der Hypothese angenommen, dass die Mutationen, die in der *sgs1 mph1*-Doppelmutante auftreten, die gleiche Herkunft, wie die in *mph1*-Mutanten auftretenden Mutationen haben. Angesichts der Tatsache, dass *top3*-Mutanten ebenfalls einen mit *sgs1* vergleichbaren Mutatorphänotyp aufweisen (Tabelle 16, S. 61), erscheint dies zumindest prüfenswert. Wie auf S. 59 ausgeführt, interagiert Sgs1 mit Top3. Im Rahmen der vorgestellten Modelle zur fehlerfreien Umgehung von DNA-Schäden ist aber eine Rolle von Topoisomerase III nicht ohne weiteres vorstellbar. Es ist durchaus möglich, dass die Mutationen in *top3* und auch in *sgs1* durch die Fehlprozessierung von Arresten entstehen, wie sie z. B. durch Camptothecin ausgelöst werden.

Die Funktion von Mph1 ist mit dem Informationstransfer vom Schwesterchromatid gekoppelt

mph1-Mutanten zeigen – wenn überhaupt – eine im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöhte Rate bei der heteroallelicen mitotischen Rekombination (Tabelle 12, S. 50). Dies bekräftigt die Hypothese, dass Mph1 – trotz der Hypostasis zu Mutanten der homologen Rekombination – kein genereller akzessorischer Faktor der homologen Rekombination ist. Im *sgs1*-Stammhintergrund zeigen *mph1*-Mutanten vielmehr einen synergistischen Hyperrekombinationsphänotyp.

Obwohl Mutanten von *mre11*, *rad50* oder *xrs2* sensitiv gegenüber ionisierender Strahlung und defekt in der meiotischen Rekombination (Alani *et al.* 1990) sind, besitzen sie dennoch keinen Defekt in der spontanen mitotischen Rekombination. Im Gegenteil, sie weisen einen Hyperrekombinationsphänotyp bei der heteroallelicen Rekombination auf (Ajimura *et al.* 1993, Bressan *et al.* 1998, Ivanov *et al.* 1992). In Diplonten kann eine DNA-Läsionen sowohl mit Hilfe der Information des homologen Chromosoms als auch des Schwesterchromatids fehlerfrei umgangen werden (Alani *et al.* 1990, Bressan *et al.* 1998, Ivanov *et al.* 1992). Mutanten, bei denen der Informationstransfer vom Schwesterchromatid gestört ist, weisen im Diplonten einen erhöhten Zugriff auf die Information des homologen Chromosoms auf, wodurch der Hyperrekombinationsphänotyp erklärt werden kann. Strukturdaten vom MRX-Komplex unterstützen diese Interpretation der genetischen Daten: Die Architektur des Mre11/Rad50/Xrs2 Komplexes legt nahe, dass er eine Rolle beim Zusammenhalten der Schwesterchromatide spielt (Hopfner *et al.* 2002). Überträgt man diese Argumentation auf die Phänotypen von *mph1*-Mutanten, kann man postulieren, daß Mph1 vornehmlich den Austausch zwischen Schwesterchromatiden fördert. Dies wäre in Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß die *mre11 mph1* Doppelmutante einen additiven Mutatorphänotyp aufweist (Tabelle 13, S. 51). Beim Ausfall von Mre11 wäre dann die Interaktion mit dem Schwesterchromatid generell gestört, da dieses nicht mehr in räumlicher Nähe gehalten werden könnte, wodurch sich der Mutatorphänotyp der *mre11*-Einzelmutante erklären ließe. Wenn Mph1 ebenfalls vornehmlich den Informationstransfer vom Schwesterchromatid fördert, sollten sich in der Doppelmutante die beiden Effekte addieren. Der leichte Hyperrekombinationsphänotyp von *mph1* wäre dann dadurch zu erklären, dass Diplonten auch hier im Falle eines gestörten Informationstransfers vom Schwesterchromatid vermehrt auf das homologe Chromosom ausweichen.

Erstaunlich ist allerdings, dass angesichts der Stärke des Mutatorphänotyps von *mph1*-Einzelmutanten der Hyperrekombinationsphänotyp nicht deutlicher ausgeprägt ist. Dies ließe sich dadurch erklären, daß Sgs1, welches in *mph1*-Einzelmutanten noch vorhanden ist, auch Interaktionen mit dem homologen Chromosom unterdrücken kann. In *mph1*-Mutanten initiierte Rekombinationsereignisse mit dem homologen Chromosom (wegen eines Defektes bei der Schwesterchromatidinteraktion) würden dann wegen der Anwesenheit von Sgs1 nicht zu Rekombinanten führen. Nur in der *sgs1 mph1* Doppelmutante könnten sich all diese initiierten Ereignisse manifestieren, was den synergistischen Hyperrekombinationsphänotyp (Tabelle 12, S. 50) erklären würde.

Mph1 und der DNA damage checkpoint

Für *mph1* konnte auch eine genetische Interaktion mit dem *DNA damage checkpoint* gezeigt werden (Abbildung 25, S. 81; Abbildung 27, S. 82): *mph1* ist synergistisch sensitiv mit *mec1* und *rad9*. Für *Sgs1*, *Mre11* und auch *Srs2* gibt es Evidenzen, dass sie in den *DNA damage checkpoint* involviert sind oder regulatorische Aufgaben erfüllen. So erscheint es nicht unwahrscheinlich, dass die Funktion von *Mph1* an die des *DNA damage checkpoint* gekoppelt ist. Ein häufiges Merkmal des *checkpoints* ist die Phosphorylierung von Zielproteinen. Für ATR/Mec1 konnte gezeigt werden, dass dafür ein SQ-Motiv ausreichend ist (Kim *et al.* 1999). Auch die Aminosäuresequenz von *Mph1* weist solche Motive auf. Erste Hinweise, dass *Mph1* posttranslational modifiziert wird, konnten erbracht werden. Es bleibt offen zu zeigen, ob es sich um eine *DNA damage checkpoint*-abhängige Phosphorylierung handelt.

Dem *DNA damage checkpoint* wird nicht nur eine Rolle beim Verlangsamen des Zellzyklus zugeordnet, sondern auch bei der Entscheidung, einen Schaden mutagen durch Transläsionssynthese oder fehlerfrei z. B. durch Aktivierung der homologen Rekombination zu umgehen. Die rekombinative Umgehung scheint in Hefe die bevorzugte Variante zu sein (Paulovich *et al.* 1998). Eine Rolle dabei spielt *Rad9*. So zeigen *rad9* Mutanten eine erhöhte Frequenz an chromosomalen Rearrangements (Fasullo *et al.* 1998, Paulovich *et al.* 1998). Auch ist die Transkription von *Rad51* abhängig von *Rad9* (Aboussekhra *et al.* 1996). Für *Rad9* wurde desweiteren gezeigt, dass es nach DNA-Schädigung *Mec1*- oder *Tel1*-abhängig phosphoryliert werden kann (Vialard *et al.* 1998, Soulier und Lowndes 1999). Diese Phosphorylierung ist für die Aktivierung von *Rad53* notwendig und bewirkt einen G2/M-Arrest (Sun *et al.* 1998, Gilbert *et al.* 2001). *Rad9* wird aber auch für den Arrest in der S-Phase benötigt (Vialard *et al.* 1998, Sanchez *et al.* 1999). *Mec1* ist u. a. auch im intra-S-Phase-checkpoint bei der Stabilisierung von arretierten Replikationsgabeln involviert (Santocanale und Diffley 1998). Der Ausfall von *Mec1* und/oder *Rad9* in Kombination mit *Mph1* könnte z. B. bedeuten, dass die fehlerfreie Prozessierung einer DNA-Läsionen nur ungenügend erfolgt, weil ein weiterer redundanter Weg durch das Fehlen von *Mec1* oder *Rad9* nicht aktiviert wird. Es verwundert allerdings, warum keine genetische Interaktion mit *rad53* festgestellt werden konnte. *Rad53* ist ebenfalls für die Stabilisierung von arretierten Replikationsgabeln von Bedeutung (Santocanale und Diffley 1998, Lopes *et al.* 2001, Sogo *et al.* 2002). Die genetische Interaktion von *MPH1* mit dem *DNA damage checkpoint* ist also anscheinend unabhängig von *RAD53*, benötigt aber *MEC1* und *RAD9*. Für *Mec1*/ATR ist gezeigt, dass als Antwort auf Doppelstrangbrüche - unabhängig der Effektorinasen - Proteine wie *BRCA1* und *P53BP*, potentielle Homologe von *Rad9*, phosphoryliert werden und so das Signal weitergeleitet werden kann (Edwards *et al.* 1999). Das Signal in *mph1*-Mutanten könnte das ssDNA-*Rad51*-Filament sein, das in *mph1*-Zellen den *DNA damage checkpoint* anschaltet und in Abwesenheit von *mec1* und *rad9*, bei zusätzlicher Schadensinduktion, ausbleibt und die Zellen durch z. B. Chromosomenverlust sterben. Dies stünde im Einklang mit dem Befund, dass zwar in *mph1*-Zellen keine merklich verlängerte Verdopplungszeit festgestellt werden kann, aber dennoch eine leichte Verzögerung des Zellzyklus beim S-Phase/G2-Übergang, im Vergleich zu Wildtypzellen,

beobachtbar ist (nicht gezeigt). Eine Aussage darüber, inwieweit die Funktion von Mph1 – neben einer möglichen Regulation durch Phosphorylierung – mit dem *DNA damage checkpoint* verknüpft ist, ist aber auf Grund der bisher erhaltenen genetischen Daten nicht möglich.

Evolutionäre Konservierung von MPH1

Eine arretierte Replikationsgabel ist für jede Zelle – ob Einzeller- oder multi-zellulärer Organismus – ein potentiell lebensbedrohender Prozess. Es ist daher nicht verwunderlich, dass zahlreiche Proteine diesen Prozess überwachen und sich verschiedene redundante, zum Teil hochkonservierte, Mechanismen evolviert haben. Sowohl in Archaea als auch in Eukaryoten wurden Sequenzhomologe zu Mph1 gefunden (Abbildung 32, S. 89). Im Fall des Homologen von *Schizosaccharomyces pombe* handelt es sich, wie die ersten Charakterisierungen einer Nullmutante andeuten, tatsächlich um ein Funktionshomologes. Durch Interspezies-Komplementation in *Saccharomyces cerevisiae* konnte der *mph1*-Mutatorphänotyp partiell aufgehoben werden, was die Verwandtschaft der Prozesse unterstreicht, an denen diese beiden Gene beteiligt sind.

MPH1 zeigt genetische Interaktionen mit Genen aus verschiedenen Wegen, die genomischer Instabilität entgegenwirken. Mutanten vieler dieser Gene führen in der Maus zu embryonaler Letalität (BLM, ATR, RAD51, REV3) und sind im Menschen mit Erbkrankheiten, die Merkmale von genomischer Instabilität zeigen (u. a. ATM, ATR, CHK2, BLM, WRN, BRCA1, MRE11, vgl. Tabelle 21 S.76) verknüpft. Die Ergebnisse in der Bäckerhefe weisen *MPH1* ebenfalls eine Rolle bei der Aufrechterhaltung genomischer Stabilität zu. Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, ob das putative humane Homolog ebenfalls eine Determinante für genomische Instabilität ist und damit mit dem Auftreten von Krankheiten wie Krebs o. ä. in Verbindung gebracht werden muss.

ZUSAMMENFASSUNG

Das *MPH1*-Gen von *Saccharomyces cerevisiae* kodiert für ein Protein der DEAH/DExH-Familie. *mph1*-Mutanten zeigen einen *REV3*-abhängigen spontanen Mutatorphänotyp und sind sensitiv gegenüber DNA-schädigenden Agenzien.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der genetischen Interaktionen von *mph1* mit Mutanten aus Basenexcisionsreparatur, Nukleotid-excisionsreparatur, Transkriptionsgekoppelten Reparatur, postreplikativer Reparatur, homologer Rekombination, *non-homologous end joining*, *DNA damage checkpoint* und mit Mutanten weiterer Gene, denen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Genomstabilität zugesprochen wird (*SGS1*, *SRS2*, *MRE11*, *RAD27*, *MMS4*). Die verwendeten Phänotypen waren spontane Mutationsrate und Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien (MMS, 4-NQO und Camptothecin).

Aus den beobachteten Interaktionen lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

1. Der Synergismus von *mph1* mit Mutanten der Basen- und der Nukleotidexcisionsreparatur und die Abhängigkeit der *mph1*-Mutationsrate von *REV1*, *REV3* und *REV7* ist am schlüssigsten durch eine Beteiligung von Mph1 an einem fehlerfreien Mechanismus zur Umgehung replikationsarretierender Läsionen zu erklären.

2. Die Additivität der Sensitivität von *mph1* mit Mutanten der postreplikativen Reparatur (*RAD6*-Epistasisgruppe) zeigt, dass *MPH1* nicht in diesen Weg, der ebenfalls eine Rolle bei der Umgehung von DNA-Läsionen spielt, eingeordnet werden kann.

3. Die Hypostasis von *mph1* zu Mutanten der homologen Rekombination (*rad51*, *rad52* und *rad55*) spricht dafür, dass Mph1 bei der fehlerfreien Umgehung von DNA-Läsionen Proteine der homologen Rekombination benötigt.

4. Die partielle Additivität der Mutationsrate von *mph1* mit *rad54* legt nahe, dass Mph1 nach Rad51, Rad52 und Rad55 agiert, da Rad54 erst nach Ausbildung des Rad51-Filamentes für die Stranginvasion erforderlich ist.

5. Die synergistische Mutationsrate von *mre11 mph1* und die synergistisch erhöhte Rate bei heteroallelischer Rekombination von *sgs1 mph1*-Diplonten legt nahe, dass Mph1 die Rekombination zwischen Schwesterchromatiden fördert, da Mre11 eine Rolle beim Zusammenhalt der Schwesterchromatiden spielt und Sgs1, eine Helikase der RecQ-Familie, heteroallelische Rekombination unterdrückt.

6. Die partielle Suppression des *mph1*-Mutatorphänotyp durch *sgs1* kann durch eine antagonistische Wirkung von Sgs1 und Mph1 erklärt werden. Die Komplementation der Suppression durch das humane Sgs1-Homologe BLM spricht für ähnliche biochemische Aktivitäten von Sgs1 und BLM. Für BLM war in einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt worden, dass es u. a. *Holliday junction* verschieben kann.

7. Die synergistische Sensitivität von *mph1* mit *mec1* und *rad9* Mutanten deutet an, dass die Aktivität von Mph1 vom *DNA damage checkpoint* reguliert wird. Es konnten erste Hinweise gewonnen werden, dass Mph1 posttranslational modifiziert wird.

8. Die partielle Komplementation des *mph1*-Mutatorphänotyps durch ein Gen von *Schizosaccharomyces pombe*, welches für ein putatives Sequenzhomologes von *MPH1* kodiert, macht es sehr wahrscheinlich, dass der Mechanismus zur fehlerfreien Umgehung von DNA-Schäden, an dem Mph1 beteiligt ist, evolutionär konserviert ist. Dies wird auch durch die Phänotypen der entsprechenden *S. pombe*-Mutanten gestützt.

Die erzielten Ergebnisse erlauben die Formulierung eines Modells für die Umgehung von DNA-Läsionen bei der Replikation unter Beteiligung von Mph1. Nach dem Arrest einer replikativen DNA-Polymerase an einer Läsion wird das entsprechende 3'-Ende durch eine bisher nicht identifizierte Helikase abgeschält. Auf dem einzelsträngigen DNA-Ende assembliert sich unter Beteiligung von Rad52 und Rad55 ein Rad51-Filament, welches unter Mitwirkung von Rad54 in das Schwesterchromatid invadiert. Der entstandene *D-loop* wird durch Mph1 stabilisiert, entweder indem er weiter entwunden wird, um die Elongation des 3'-Endes durch eine DNA-Polymerase zu ermöglichen, oder indem die vorzeitige Auflösung des *D-loop* durch eine andere Helikase verhindert wird, wobei der beste Kandidat für diese Helikase Sgs1 ist. Nach Zurückführen des elongierten 3'-Endes auf den ursprünglichen Matrizenstrang – eventuell ebenfalls durch Sgs1 katalysiert – ist die Läsion fehlerfrei umgangen und die Replikation kann fortgesetzt werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abraham, R.T.** (2001) Cell cycle checkpoint signalling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* **15**: 2177
- Aboussekhra, A., Chanet, R., Zgaga, Z., Cassier-Chauvat, C., Heude, M., et al.** (1989) *RADH*, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a putative DNA helicase involved in DNA repair. Characteristics of *radH* mutants and sequence of the gene. *Nucleic Acids Res* **17**: 7211
- Aboussekhra, A., Vialard, J.E., Morrison, D., Torr-Ruiz, M.A., Cernakova L. et al.** (1996) A novel role for the budding yeast *RAD9* checkpoint gene in DNA damage-dependent transcription. *EMBO J* **15**: 3912
- Ahmad, F., Kaplan, C.D. und E. Stewart** (2002) Helicase activity is only partially required for *Schizosaccharomyces pombe* Rqh1p function. *Yeast* **19**: 1381
- Ajimura, M., Leem, S.H. und H. Ogawa** (1993) Identification of new genes required for meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **133**: 51
- Alani, E., Cao, L. und N. Kleckner** (1987) A method for gene disruption that allow a repeated use of *URA3* selection in the construction of multiply disrupted yeast strains. *Genetics* **116**: 541
- Alani, E., Padmore, R. und N. Kleckner** (1990) Analysis of wild type and *rad50* mutants of yeast suggests an intimate relationship between meiotic chromosome synapsis and recombination. *Cell* **61**: 419
- Alcasabas, A.A., Osborn, A.J., Bachant, J., Hu, F., Werler, P.J. et al.** (2001) Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nat Cell Biol* **3**: 958
- Alexeev, A., Mazin, A. und S.C. Kowalczykowski** (2003) Rad54 protein possesses chromatin-remodeling activity stimulated by the Rad51-ssDNA nucleoprotein filament. *Nat Struct Biol* **10**: 182
- Ayyagari, R., Gomes, X.V., Gordenin, D.A. und P.M. Burgers** (2003) Okazaki fragment maturation in yeast. I. Distribution of functions between FEN1 and DNA2. *J Biol Chem* **278**: 1618
- Bähler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., Mc Kenzie, A. et al.** (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**: 943
- Bailis, A.M., Arthur, L. und R. Rothstein** (1992) Genome rearrangement in *top3* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* requires a functional *RAD1* excision repair gene. *Mol Cell Biol* **12**: 4988
- Bailly, V., Lamb, J., Sung, P., Prakash, S. und L. Prakash** (1994) Specific complex formation between yeast *RAD6* and *RAD18* proteins: a potential mechanism for targeting *RAD6* ubiquitin-conjugating activity to DNA damage sites. *Genes Dev* **8**: 811
- Bailly, V., Lauder, S., Prakash, S. und L. Prakash** (1997) Yeast DNA repair proteins Rad6 and Rad18 form a heterodimer that has ubiquitin conjugating, DNA binding, and ATP hydrolytic activities. *J Biol Chem* **272**: 23360
- Bankmann, M., Prakash, L., und S. Prakash** (1992) Yeast *RAD14* and human xeroderma pigmentosum group A DNA-repair genes encode homologous proteins. *Nature* **355**: 555
- Bao, S., Tibbetts, R.S., Brumbaugh, K.M., Fang, Y., Richardson D A. et al.** (2001) ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. *Nature* **411**: 969
- Bardwell, A.J., Bardwell, L., Tomkinson, A.E. und E.C. Friedberg** (1994) Specific cleavage of model recombination and repair intermediates by the yeast Rad1-Rad10 DNA endonuclease. *Science* **265**: 2082

- Barnes, D.E.** (2001) Non-homologous end joining as a mechanism of DNA repair. *Curr Biol* **11**: R455-7
- Basile, G., Aker, M. und R. Mortimer** (1992) Nucleotide sequence and transcriptional regulation of the yeast recombinational repair gene *RAD51*. *Mol Cell Biol* **12**: 3235
- Bastin-Shanower, S.A., Fricke, W.M., Mullen, J.R. und S.J. Brill** (2003) The mechanism of Mus81-Mms4 cleavage site selection distinguishes it from the homologous endonuclease Rad1-Rad10. *Mol Cell Biol* **23**: 3487
- Bennett, R.A.** (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* *ETH1* gene, an inducible homolog of exonuclease III that provides resistance to DNA-damaging agents and limits spontaneous mutagenesis. *Mol Cell Biol* **19**: 1800
- Bennett, R.J., Sharp, J.A. und J.C. Wang** (1998) Purification and characterization of the Sgs1 DNA helicase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**: 9644
- Bennett, R.J., Keck, J.L. und J.C. Wang** (1999) Binding specificity determines polarity of DNA unwinding by the Sgs1 protein of *S. cerevisiae*. *J Mol Biol* **289**: 235
- Bennett, R.J., Noiro-Gros, M.F. und J.C. Wang** (2000) Interaction between yeast *sgs1* helicase and DNA topoisomerase III. *J Biol Chem* **275**: 26898
- Benson, F.E., Baumann, P. und S.C. West** (1998) Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. *Nature* **391**: 401
- Bhatia, P.K., Verhage, R.A., Brouwer, J. und E.C. Friedberg** (1996) Molecular cloning and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* *RAD28*, the yeast homolog of the human Cockayne syndrome A (CSA) gene. *J Bacteriol* **178**: 5977
- Bischof, O., Kim, S.H., Irving, J., Beresten, S., Ellis, N.A., et al.** (2001) Regulation and localization of the Bloom syndrome protein in response to DNA damage. *J Cell Biol* **153**: 367
- Boddy, M.N., Lopez-Girona, A., Shanahan, P., Interthal, H., Heyer, W.D., et al.** (2000) Damage tolerance protein Mus81 associates with the FHA1 domain of checkpoint kinase Cds1. *Mol Cell Biol* **20**: 8758
- Boddy, M.N., Gaillard, P.H., McDonald, W.H., Shanahan, P., Yates J.R., et al.** (2001) Mus81-Eme1 are essential components of a Holliday junction resolvase. *Cell* **107**: 537
- Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A.F., Altschul, S.F. et al.** (1997) A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J* **11**: 68
- Branzei, D., Seki, M., Onoda, F. und T. Enomoto** (2002) The product of *Saccharomyces cerevisiae* *WHIPIMGS1*, a gene related to replication factor C genes, interacts functionally with DNA polymerase δ . *Mol Genet Genomics* **268**: 371
- Bressan, D.A., Baxter, B.K. und J.H. Petrini** (1999) The Mre11-Rad50-Xrs2 protein complex facilitates homologous recombination-based double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 7681
- Broomfield, S., Chow, B.L. und W. Xiao** (1998) *MMS2*, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5678
- Broomfield, S. und W. Xiao** (2002) Suppression of genetic defects within the *RAD6* pathway by *srs2* is specific for error-free post-replication repair but not for damage-induced mutagenesis. *Nucleic Acids Res* **30**: 732
- Brosh, R.M. Jr., von Kobbe, C., Sommers, J.A., Karmakar, P., Opresko, P.L., et al.** (2001) Werner syndrome protein interacts with human flap endonuclease 1 and stimulates its cleavage activity. *EMBO J* **20**: 5791
- Brown, E.J. und D. Baltimore** (2000) ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev* **14**: 397
- Brusky, J., Zhu, Y. und W. Xiao** (2000) *UBC13*, a DNA-damage-inducible gene, is a member of the error-free postreplication repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **37**: 168
- Budd, M.E. und J.L. Campbell** (1997) A yeast replicative helicase, Dna2 helicase, interacts with yeast FEN-1 nuclease in carrying out its essential function. *Mol Cell Biol* **17**: 2136

- Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, J. et al.** (1998) Activation of the ATM kinase by ionising radiation and phosphorylation of p53. *Science* **381**: 1677
- Carr, A.M.** (2003) Beginning at the end. *Science* **300**: 1521
- Cassier-Chauvat, C. und F. Fabre** (1991) A similar defect in UV-induced mutagenesis conferred by the *rad6* and *rad18* mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* **254**: 247
- Cejka, P., Vondrejs, V. und Z. Storchova** (2001) Dissection of the functions of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 postreplicative repair group in mutagenesis and UV sensitivity. *Genetics* **159**: 953
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W. et al.** (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* **5**: 675
- Celeste, A., Peterson, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T. et al.** (2002) Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* **296**: 922
- Cha, R.S. und N. Kleckner** (2003) ATR homolog Mec1 promotes fork progression, thus averting breaks in replication slow zones. *Science* **297**: 602
- Chakraverty, R.K. und I.D. Hickson** (1999) Defending genome integrity during DNA replication: a proposed role for RecQ family helicases. *Bioessays* **21**: 286
- Chakraverty, R.K., Kearsley, J.M., Oakley, T.J., Grenon, M., de La Torre Ruiz, M.A., et al.** (2001) Topoisomerase III acts upstream of Rad53p in the S-phase DNA damage checkpoint. *Mol Cell Biol* **21**: 7150
- Chen, C. und R.D. Kolodner** (1999) Gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* replication and recombination defective mutants. *Nat Genet* **23**: 81
- Chen, J., Derfler, B. und L. Samson** (1990) *Saccharomyces cerevisiae* 3-methyladenine DNA glycosylase has homology to the AlkA glycosylase of *E. coli* and is induced in response to DNA alkylation damage. *EMBO J* **9**: 4569
- Cho, R.J., Campbell, E.A., Winzler, L., Steinmetz, A., Conway, L. et al.** (1998) A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol Cell* **2**: 65
- Clever, B., Interthal, H., Schmuckli-Maurer, J., King, J., Sigrist, M. und W.D. Heyer** (1997) Recombinational repair in yeast: functional interactions between Rad51 and Rad54 proteins. *EMBO J* **16**: 2535
- Cole, G.M., Schild, D., Lovett, S.T. und R.K. Mortimer** (1987) Regulation of RAD54- and RAD52-lacZ gene fusions in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **7**: 1078
- Cordeiro-Stone, M., Makhov, A.M., Zaritskaya, L.S. und J.D. Griffith** (1999) Analysis of DNA replication forks encountering a pyrimidine dimer in the template to the leading strand. *J Mol Biol* **289**: 1207
- Cortez, D., Wang, Y., Qin, J. und S.J. Elledge** (1999) Requirement of ATM-dependent phosphorylation of BRCA1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* **286**: 1162
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J. und S.J. Elledge** (2001) ATR and ATRIP: partners in checkpoint signalling. *Science* **294**: 1713
- Cox, M.M., Goodman, M.F., Kreuzer, K.N., Sherratt, D.J., Sandler, S.J. et al.** (2000) The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* **404**: 37
- Cox, M.M.** (2001) Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli*: questions. *Annu Rev Genet* **35**: 53
- Cox, M.M.** (2002) The nonmutagenic repair of broken replication forks via recombination. *Mutat Res* **510**: 107
- Cruz de la, J., Kressler, D. und P. Linder** (1999) Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem Sci* **24**: 192
- D'Amours, D. und S.P. Jackson** (2001) The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation. *Genes Dev* **15**: 2238
- D'Amours, D. und S.P. Jackson** (2002) The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 317

- Davis, A.P und L.S. Symington** (2001) The yeast recombinational repair protein Rad59 interacts with Rad52 and stimulates single-strand annealing. *Genetics* **159**: 515
- Davis, A.P und L.S. Symington** (2003) The Rad52-Rad59 complex interacts with Rad51 and replication protein A. *DNA Repair* **2**: 1127
- Debrauwere, H., Loeillet, S., Lin, W., Lopes, J. und A. Nicolas** (2001) Links between replication and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*: a hypersensitive requirement for homologous recombination in the absence of Rad27 activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 8263
- De Laat, W., Jasper, N.G.J. und J.H.J. Hoeijmakers** (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* **13**: 768
- Deschavanne, P.J. und I. Harosh** (1993) The Rad3 protein from *Saccharomyces cerevisiae*: a DNA and DNA:RNA helicase with putative RNA helicase activity. *Mol Microbiol* **7**: 831
- Doe, C.L., Dixon, J., Osman, F. und M.C. Whitby** (2000) Partial suppression of the fission yeast *rqh1(-)* phenotype by expression of a bacterial Holliday junction resolvase. *EMBO J* **19**: 2751
- Dora, E.G., Rudin, N., Martell, J.R., Esposito, M.S. und R.M. Ramirez** (1999) *RPD3 (REC3)* mutations affect mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **35**: 68
- Downs, J.A., N.F. Lowndes und S.P. Jackson** (2000) A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* **408**: 1001
- Easton, D.F., Bishop, D.T., Ford, D. und G.P. Crookford** (1993) Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* **52**: 678
- Edwards, R.J., Bentley, N.J. und A.M. Carr** (1999) A Rad3-Rad26 complex responds to DNA damage independently of other checkpoint proteins. *Nat Cell Biol* **1**: 393
- Einberger, H., Mertz, R., Hofschneider, P.H. und W.J. Neubert** (1990) Purification, renaturation, and reconstituted protein kinase activity of the Sendai virus large (L) protein: L protein phosphorylates the NP and P proteins *in vitro*. *J Virol* **64**: 4274
- Eisen, J.A., Sweder, K.S. und P.C. Hanawalt** (1995) Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res* **23**: 2715
- Ellis, N.A., Lennon, D.J., Proytcheva, M., Alhadeff, B., Henderson, E.E., et al.** (1995) Somatic intragenic recombination within the mutated locus BLM can correct the high sister-chromatid exchange phenotype of Bloom syndrome cells. *Am J Hum Genet* **57**: 1019
- Entian, K.D., Schuster, T., Hegemann, J.H., Becher, D., Feldmann, H., et al.** (1999) Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol Gen Genet* **262**: 683
- Fabre, F., Chan, A., Heyer, W.D. und S. Gangloff** (2002) Alternate pathways involving Sgs1/Top3, Mus81/ Mms4, and Srs2 prevent formation of toxic recombination intermediates from single-stranded gaps created by DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 16887
- Fasullo, M., Bennett, T., Ahching, P. und J. Koudelik** (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* *RAD9* checkpoint reduces the DNA damage-associated stimulation of directed translocations. *Mol Cell Biol* **18**: 1190
- Feldmann, H. und E.L. Winnacker** (1993) A putative homologue of the human autoantigen Ku from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **268**: 12895
- Feldmann, H., Driller, L., Meier, B., Mages, G., Kellermann, J., et al.** (1996) *HDF2*, the second subunit of the Ku homologue from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**: 27765
- Foiani, M., Pellicoli, A., Lopes, M., Lucca, C., Ferrari, M. et al.** (2000) DNA damage checkpoints and DNA replication controls in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mut Res* **451**: 187
- Fortin, G.S. und S.L. Symington** (2002) Mutations in yeast Rad51 that partially bypass the requirement for Rad55 and Rad57 in DNA repair by increasing the stability of Rad51-DNA complexes. *EMBO J* **21**: 3160
- Franchitto, A. und P. Pichierri** (2002) Protecting genomic integrity during DNA replication: correlation between Werner's and Bloom's syndrome gene products and the MRE11 complex. *Hum Mol Genet* **11**: 2447
- Frei, C. und S.M. Gasser** (2000) The yeast Sgs1p helicase acts upstream of Rad53p in the DNA replication checkpoint and colocalizes with Rad53p in S-phase-specific foci. *Genes Dev* **14**: 81

- Friedberg, E.C., Walker, G.C. und W. Siede** (1995) DNA repair mutagenesis. ASM Press (Washington D.C.)
- Friedberg, E.C., Wagner, R. und M. Radman** (2002) Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. *Science* **296**: 1627
- Friedberg E.C.** (2003) DNA repair and damage. *Nature* **421**: 436
- Fujiwara, Y. und M. Tatsumi** (1976) Replicative bypass repair of ultraviolet damage to DNA of mammalian cells: caffeine sensitive and caffeine resistant mechanisms. *Mutat Res* **37**: 91
- Furuse, M., Nagase, Y., Tsubouchi, H., Murakami-Murofushi, K., Shibata, T. et al.** (1998) Distinct roles of two separable *in vitro* activities of yeast Mre11 in mitotic and meiotic recombination. *EMBO J* **17**: 6412
- Game, J.C. und R.K. Mortimer** (1974) A genetic study of x-ray sensitive mutants in yeast. *Mutat Res* **24**: 281
- Gangloff, S., McDonald, J.P., Bendixen, C., Arthur, L. und R. Rothstein** (1994a) The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Mol Cell Biol* **14**: 8391
- Gangloff, S., Lieber, M.R. und R. Rothstein** (1994b) Transcription, topoisomerases and recombination. *Experientia* **50**: 261
- Gangloff, S., Soustelle, C. und F. Fabre** (2000) Homologous recombination is responsible for cell death in the absence of the Sgs1 and Srs2 helicases. *Nat Genet* **25**: 192
- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., et al.** (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**: 141
- German, J.** (1993) Bloom syndrome: a mendelian prototype of somatic mutational disease. *Medicine* **72**: 393
- Gilbert, C.S., Green, C.M. und N.F. Lowndes** (2001) Budding yeast Rad9 is an ATP-dependent Rad53 activating machine. *Mol Cell* **8**: 129
- Gietz, R.D. und A. Sugino** (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**: 527
- Gietz, R.D., St. Jean, A., Woods, R.A. und R.H. Schiestl** (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**: 1425
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., et al.** (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546, 563-567
- Green, C.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und N.F. Lowndes** (2000) A novel Rad 24 checkpoint protein complex closely related to replication factor C. *Curr Biol* **10**: 39
- Goodman, M.F. und B. Tippin** (2000) The expanding polymerase universe. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 101
- Guillet, M. und S. Boiteux** (2003) Origin of endogenous DNA abasic sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **23**: 8386
- Guo, Z., Kumagai, A., Wang, S.X. und W.G. Dunphy** (2000) Requirement for ATR in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev* **14**: 2745
- Haber, J.E.** (1999) DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci* **24**: 271
- Hanada, K., Ukita, T., Kohno, Y., Saito, K., Kato, J., et al.** (1997) RecQ DNA helicase is a suppressor of illegitimate recombination in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 3860
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557
- Haracska, L., Unk, I., Johnson, R.E., Johansson, E., Burgers, P.M., et al.** (2001) Roles of yeast DNA polymerases delta and zeta and of Rev1 in the bypass of abasic sites. *Genes Dev* **15**: 945
- Haracska, L., Prakash, S. und L. Prakash** (2003) Yeast DNA polymerase zeta is an efficient extender of primer ends opposite from 7,8-dihydro-8-Oxoguanine and O6-methylguanine. *Mol Cell Biol* **23**: 1453
- Harfe, B.D. und S. Jinks-Robertson** (2000) DNA polymerase ζ introduces multiple mutations when bypassing spontaneous DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **6**: 1491

- Harmon, F.G. und S.C. Kowalczykowski** (1998) RecQ helicase, in concert with RecA and SSB proteins, initiates and disrupts DNA recombination. *Genes Dev* **12**: 1134
- Harmon, F.G., DiGate, R.J. und S.C. Kowalczykowski** (1999) RecQ helicase and topoisomerase III comprise a novel DNA strand passage function: a conserved mechanism for control of DNA recombination. *Mol Cell* **3**: 611
- Harrington, J.J. und M.R. Lieber** (1994) The characterization of a mammalian DNA structure-specific endonuclease. *EMBO J* **13**: 1235
- Hartwell, L.H. und T.A. Weinert** (1989) Checkpoint: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**: 629
- Hays, S.L., Firmenich, A.A. und P. Berg** (1995) Complex formation in yeast double-strand break repair: participation of Rad51, Rad52, Rad55, and Rad57 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 6925
- Hays, S.L., Firmenich, A.A., Massey, P., Banerjee, R. und P. Berg** (1998) Studies of the interaction between Rad52 protein and the yeast single-stranded DNA binding protein RPA. *Mol Cell Biol* **18**: 4400
- Heo, S.J., Tatebayashi, K., Ohsugi, I., Shimamoto, A., Furuichi, Y. et al.** (1999) Bloom's syndrome gene suppresses premature ageing caused by Sgs1 deficiency in yeast. *Genes Cells* **4**: 619
- Higgins, N.P., Kato, K. und B. Strauss** (1976) A model for replication repair in mammalian cells. *J Mol Biol* **101**: 417
- Hishida, T., Iwasaki, H., Ohno, T., Morishita, T. und H. Shinagawa** (2001) A yeast gene, *MGS1*, encoding a DNA-dependent AAA(+) ATPase is required to maintain genome stability. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 8283
- Hishida, T., Ohno, T., Iwasaki, H., und H. Shinagawa** (2002) *Saccharomyces cerevisiae* *MGS1* is essential in strains deficient in the *RAD6*-dependent DNA damage tolerance pathway. *EMBO J* **21**: 2019
- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G. und S. Jentsch** (2002) *RAD6*-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**: 135
- Hofmann, R.M. und C.M. Pickart** (1999) Noncanonical *MMS2*-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* **96**: 645
- Hopfner, K.P., Craig, L., Moncalian, G., Zinkel, R.A., Usui, T. et al.** (2002) The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* **418**: 562
- Howard-Flanders, P., Simson, E. und L. Theriot** (1964) The Excision of thymine dimers from DNA, Filament formation and sensitivity to ultraviolet light in *Escherichia coli* K12. *Mutat Res* **106**: 219
- Hu, P., Beresten, S.F., van Brabant, A.J., Ye, T.Z., Pandolfi, P.P., et al.** (2001) Evidence for BLM and Topoisomerase III α interaction in genomic stability. *Hum Mol Genet* **10**: 1287
- Imamura, O. und J.L. Campbell** (2003) The human Bloom syndrome gene suppresses the DNA replication and repair defects of yeast *dna2* mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**: 8193
- Interthal, H. und W.D. Heyer** (2000) *MUS81* encodes a novel helix-hairpin-helix protein involved in the response to UV- and methylation-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **263**: 812
- Interthal, H., Pouliot, J.J. und J.J. Champoux** (2001) The tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 is a member of the phospholipase D superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 12009
- Ivanov, E.L., Korolev, V.G. und F. Fabre** (1992) *XRS2*, a DNA repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is needed for meiotic recombination. *Genetics* **132**: 651
- Jentsch, S., McGrath, J.P. und A. Varshavsky** (1987) The yeast DNA repair gene *RAD6* encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature* **329**: 131
- Johnson, R.D. und L.S. Symington** (1995) Functional differences and interactions among the putative RecA homologs Rad51, Rad55, and Rad57. *Mol Cell Biol* **15**: 4843
- Johnson, R.E., Henderson, S.T., Petes, T.D., Prakash, S., Bankmann, M., et al.** (1992) *Saccharomyces cerevisiae* *RAD5*-encoded DNA repair protein contains DNA helicase and zinc-

- binding sequence motifs and affects the stability of simple repetitive sequences in the genome. *Mol Cell Biol* **12**: 3807
- Johnson, R.E., Prakash, S. und L. Prakash** (1994) Yeast DNA repair protein *RAD5* that promotes instability of simple repetitive sequences is a DNA-dependent ATPase. *J Biol Chem* **269**: 28259
- Johnson, R.E., Torres-Ramos, C.A., Izumi, T., Mitra, S., Prakash, S. et al.** (1998) Identification of *APN2*, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the major human AP endonuclease HAP1, and its role in the repair of abasic sites. *Genes Dev* **12**: 3137
- Johnson, R.E., Prakash, S. und L. Prakash** (1999) Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Pol η . *Science* **283**: 1001
- Johnson, R.E., Washington, M.T., Haracska, L., Prakash, S. und L. Prakash** (2000) Eukaryotic polymerases ι and ζ act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature* **406**: 1015
- Johzuka, K. und H. Ogawa** (1995) Interaction of Mre11 and Rad50: two proteins required for DNA repair and meiosis-specific double-strand break formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **139**: 1521
- Jones, E.W., J.R. Pringle und J.R. Broach** (Edit) (1992) The Molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: Gene Expression (Volume 2) Cold Spring Harbor Laboratory Press New York
- Kaliraman, V., Mullen, J.R., Fricke, W.M., Bastin-Shanower, S.A. und S.J. Brill** (2001) Functional overlap between Sgs1-Top3 and the Mms4-Mus81 endonuclease. *Genes Dev* **15**: 2730
- Kans, J.A. und R.K. Mortimer** (1991) Nucleotide sequence of the *RAD57* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **105**: 139
- Karow, J.K., Constantinou, A., Li, J.L., West, S.C. und I.D. Hickson** (2000) The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of holliday junctions. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6504
- Katou, Y., Kanoh, Y., Bando, M., Noguchi, H., Tanaka, H. et al.** (2003) S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form stable replication-pausing complex. *Nature* **424**: 1078
- Kelley, M.R., Kow, Y.W. und D.M. Wilson** (2003) Disparity between DNA base excision repair in yeast and mammals: translational implications. *Cancer Res* **63**: 549
- Kim, R.A. und J.C. Wang** (1992) Identification of the yeast *TOP3* gene product as a single strand-specific DNA topoisomerase. *J Biol Chem* **267**: 17178
- Kim, S.T., Lim, D.S., Canman, C.E. und M.B. Kastan** (1999) Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J Biol Chem* **274**: 37538
- Kitao, S., Shimamoto, A., Goto, M., Miller, R.W., Smithson, W.A., et al.** (1999) Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. *Nat Genet* **22**: 82
- Klein, H.L.** (2001) Mutations in recombinational repair and in checkpoint control genes suppress the lethal combination of *srs2 Δ* with other DNA repair genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **157**: 557
- 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
- Kolodner, R.D., Putnam, C.D. und K. Myung** (2002) Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **297**: 552
- Kondo, T., Wakayama, T., Naiki, T., Matsumoto, K. und K. Sugimoto** (2001) Recruitment of Mec1 and Ddc1 checkpoint proteins to double strand breaks through distinct mechanisms. *Science* **294**: 867
- Kostrub, C.F., Knudsen, K., Subramani, S. und T. Enoch** (1998) Hus1p, a conserved fission yeast checkpoint protein, interacts with Rad1p and is phosphorylated in response to DNA damage *EMBO J* **17**: 2055
- Krejci, L., Van Komen, S., Li, Y., Villemain, J., Reddy, M.S., et al.** (2003) DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament. *Nature* **423**: 305
- Kunkel, T.A. und K. Bebenek** (2000) DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem* **69**: 497

- Kunz, B.A., Peters, M.G., Kohalmi, S.E., Armstrong, J.D., Glattke, M. et al.** (1989) Disruption of the *RAD52* gene alters the spectrum of spontaneous *SUP4-o* mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 535
- Kwan, K.Y. und J.C. Wang** (2001) Mice lacking DNA topoisomerase IIIbeta develop to maturity but show a reduced mean lifespan. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 5717
- Larimer, F.W., Perry, J.R. und A.A. Hardgree** (1989) The *REV1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: isolation, sequence, and functional analysis. *J Bacteriol* **171**: 230
- Lawrence, C.W.** (1994) The *RAD6* DNA repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: what does it do, and how does it do it? *Bioessays* **16**: 253
- Lea, D.E. und C.A. Coulson** (1948) The distribution of mutants in bacterial populations. *J Genet* **49**: 248
- Lee, C.S., Davis, R.W. und N. Davidson** (1970) A physical study by electron microscopy of the terminally repetitive, circularly permuted DNA from the coliphage particles of *Escherichia coli* 15. *J Mol Biol* **48**: 1-22
- Lee, S.K., Johnson, R.E., Yu, S.L., Prakash, L. und S. Prakash** (1999) Requirement of yeast *SGS1* and *SRS2* genes for replication and transcription. *Science* **286**: 2339
- Lee, J.S., Collins K.M., Brown, A.L., Lee, C.H. und J.H. Chung** (2000) hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature* **404**: 201
- Lengauer, C., Kinzler, K.W. und B. Vogelstein** (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**: 643
- Li, X., Li, J., Harrington, J., Lieber, M. und P.M. Burgers** (1995) Lagging strand DNA synthesis at the eukaryotic replication fork involves binding and stimulation of FEN-1 by proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* **270**: 22109
- Liberi, G., Chiolo, I., Pellicoli, A., Lopes, M., Pievani, P., et al.** (2000) Srs2 DNA helicase is involved in checkpoint response and its regulation requires a functional Mec1-dependent pathway and Cdk1 activity. *EMBO J* **19**: 5027
- Liefshitz, B., Steinlauf, R., Friedl, A., Eckardt-Schupp, F. und M. Kupiec** (1998) Genetic interactions between mutants of the 'error-prone' repair group of *Saccharomyces cerevisiae* and their effect on recombination and mutagenesis. *Mutat Res* **407**: 135
- Lim, D.S. und P. Hasty** (1996) A mutation in mouse *rad51* results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol Cell Biol* **16**: 7133
- Lisby, M., Rothstein, R. und U.H. Mortensen** (2001) Rad52 forms DNA repair and recombination centers during S phase. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 8276
- Lisby, M., Mortensen, U.H. und R. Rothstein** (2003) Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nat Cell Biol* **5**: 572
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K. et al.** (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by ATR and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* **14**: 1448
- Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Pellicoli, A., Liberi, G., Plevani, P. et al.** (2001) The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* **412**: 557
- Lowndes, N.F. und J.R. Murguia** (2000) Sensing and responding to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* **10**: 17-25
- Luo, G., Yao, M.S., Bender, C.F., Mills, M., Bladl, A.R., et al.** (1999) Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 7376
- Lovett S.T.** (1994) Sequence of the *RAD55* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: similarity of *RAD55* to prokaryotic RecA and other RecA-like proteins. *Gene* **142**: 103
- Lovett, S.T. und R.K. Mortimer** (1997) Characterization of null mutants of the *RAD55* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: effects of temperature, osmotic strength and mating type. *Genetics* **116**: 547
- Lydall, D. und T. Weinert** (1995) Yeast checkpoint genes in DNA damage processing: implications for repair and arrest. *Science* **270**: 1488

- Mahajan, K.N., Nick McElhinny, S.A., Mitchell, B.S. und D.A. Ramsden** (2002) Association of DNA polymerase μ (pol μ) with Ku and ligase IV: role for pol μ in end-joining double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **22**: 5194
- Mankouri, H.W. und A. Morgan** (2001) The DNA helicase activity of yeast Sgs1p is essential for normal lifespan but not for resistance to topoisomerase inhibitors. *Mech Ageing Dev* **122**: 1107
- Mankouri, H.W., Craig, T.J. und A. Morgan** (2002) Sgs1 is a multicopy suppressor of srs2: functional overlap between DNA helicases. *Nucleic Acids Res* **30**: 1103
- Marchetti, M.A., Kumar, S., Hartsuiker, E., Maftahi, M., Carr, A.M. et al.** (2002) A single unbranched S-phase DNA damage and replication fork blockage checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 7472
- Maser, R.S., Mosen, K.J., Nelms, B.E. und J.H. Petrini** (1997) hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* **17**: 6087
- Maser, R.S., Mirzoeva, O.K., Wells, J., Olivares, H., Williams, B. et al.** (2001) Mre11 complex and DNA replication: linkage to E2F and sites of DNA synthesis. *Mol Cell Biol* **21**: 6006
- Mazin, A.V., Bornarth, C.J., Solinger, J.A., Heyer, W.D. und S.C. Kowalczykowski** (2000a) Rad54 protein is targeted to pairing loci by the Rad51 nucleoprotein filament. *Mol Cell* **6**: 583
- Mazin, A.V., Zaitseva, E., Sung, P. und S.C. Kowalczykowski** (2000b) Tailed duplex DNA is the preferred substrate for Rad51 protein-mediated homologous pairing. *EMBO J* **19**: 1148
- Mc Donald, J.P., Levine, A.S. und R. Woodgate** (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* RAD30 gene, a homologue of *Escherichia coli* dinB and umuC, is DNA damage inducible and functions in a novel error-free postreplication repair mechanism. *Genetics* **147**: 1557
- Mc Glynn, P. und R.B. Lloyd** (2000) Modulation of RNA polymerase by (p)ppGpp reveals a RecG-dependent mechanism for replication fork progression. *Cell* **101**: 35
- Mc Glynn, P. und R.B. Lloyd** (2002a) Genome stability and the processing of damaged replication forks by RecG. *Trends Genet* **18**: 413
- Mc Glynn, P. und R.B. Lloyd** (2002b) Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 859
- Mc Ilwraith, M.J., Van Dyck, E., Masson, J.Y., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., et al.** (2000) Reconstitution of the strand invasion step of double-strand break repair using human Rad51 Rad52 and RPA proteins. *J Mol Biol* **304**: 151
- McVey, M., Kaeberlein, M., Tissenbaum, H.A. und L. Guarente** (2001) The short life span of *Saccharomyces cerevisiae* sgs1 and srs2 mutants is a composite of normal aging processes and mitotic arrest due to defective recombination. *Genetics* **157**: 1531
- Melo, J.A., Cohen, J. und D.P. Toczyski** (2001) Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. *Genes Dev* **15**: 2809
- Melo, J.A. und D.Toczyski** (2002) A unified view of the DNA damage checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 237
- Merrill, B.J. und C. Holm** (1998) The RAD52 recombinational repair pathway is essential in pol30 (PCNA) mutants that accumulate small single-stranded DNA fragments during DNA synthesis. *Genetics* **148**: 611
- Michel, B.** (2000) Replication fork arrest and DNA recombination. *Trends Biochem Sci* **25**: 173
- Milne G.T. und D.T. Weaver** (1993) Dominant negative alleles of RAD52 reveal a DNA repair/recombination complex including Rad51 and Rad52. *Genes Dev* **7**: 1755
- Milne, G.T., Jin, S., Shannon, K.B. und D.T. Weaver** (1996) Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Bio* **8**: 4189
- Mohaghegh, P., Karow, J.K., Brosh, R.M., Bohr, V.A. und I.D. Hickson** (2001) The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases. *Nucleic Acids Res* **29**: 2843

- Moore, J.K und J.E. Haber** (1996) Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**: 2164
- Morrison, A., Christensen, R.B., Alley, J., Beck, A.K., Bernstine, E.G., et al.** (1989) *REV3*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene whose function is required for induced mutagenesis, is predicted to encode a nonessential DNA polymerase. *J Bacteriol* **171**: 5659
- Mortensen, U.H., Bendixen, C., Sunjevaric, I. und R. Rothstein** (1996) DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10729
- Mullen, J.R., Kaliraman, V. und S.J. Brill** (2000) Bipartite structure of the *SGS1* DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **154**: 1101
- Mullen, J.R., Kaliraman, V., Ibrahim, S.S. und S.J. Brill** (2001) Requirement for three novel protein complexes in the absence of the Sgs1 DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **157**: 103
- Murante, R.S., Henricksen, L.A. und R.A. Bambara** (1998) Junction ribonuclease: an activity in Okazaki fragment processing. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 2244
- Myung, K., Datta, A. und R.D. Kolodner** (2001a) Suppression of spontaneous chromosomal rearrangements by S phase checkpoint functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **104**: 397
- Myung, K., Datta, A., Chen, C. und R.D. Kolodner** (2001b) *SGS1*, the *Saccharomyces cerevisiae* homologue of BLM and WRN, suppresses genome instability and homeologous recombination. *Nat Genet* **27**: 113
- Nakayama, H., Nakayama, K., Nakayama, R., Irino, N., Nakayama, Y., et al.** (1984) Isolation and genetic characterization of a thymineless death-resistant mutant of *Escherichia coli* K12: identification of a new mutation (*recQ1*) that blocks the RecF recombination pathway. *Mol Gen Genet* **195**: 474
- Nelson, J.R., Lawrence, C.W. und D.C. Hinkle** (1996a) Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta. *Science* **272**: 1646
- Nelson, J.R., Lawrence, C.W. und D.C. Hinkle** (1996b) Deoxycytidyl transferase activity of yeast *REV1* protein. *Nature* **382**: 729
- Nelson, J.R., Gibbs, P.E., Nowicka, A.M., Hinkle, D.C. und C.W. Lawrence** (2000) Evidence for a second function for *Saccharomyces cerevisiae* Rev1p. *Mol Microbiol* **37**: 549
- New, J.H., Sugiyama, T., Zaitseva, E. und S.C. Kowalczykowski** (1998) Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* **391**: 407
- Niedernhofer, L.J., Essers, J., Weeda, G., Beverloo, B., de Wit, J., et al.** (2001) The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required for targeted gene replacement in embryonic stem cells. *EMBO J* **20**: 6540
- Oakley, T.J. und I.D. Hickson** (2002) Defending genome integrity during S-phase: putative roles for RecQ helicases and topoisomerase III. *DNA Repair* **1**: 175
- O'Neill, T., Dwyer, A.J., Ziv, J., Chan, D.W., Lees-Miller, S.P., et al.** (2000) Utilization of oriented peptide libraries to identify substrate motifs selected by ATM. *J Biol Chem* **275**: 22719
- Onoda, F., Seki, M., Miyajima, A. und T. Enomoto** (2000) Elevation of sister chromatid exchange in *Saccharomyces cerevisiae* *sgs1* disruptants and the relevance of the disruptants as a system to evaluate mutations in Bloom's syndrome gene. *Mutat Res* **459**: 203
- Onoda, F., Seki, M., Miyajima, A. und T. Enomoto** (2001) Involvement of *SGS1* in DNA damage-induced heteroallelic recombination that requires *RAD52* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **264**: 702
- Ooi, S.L., Shoemaker, D.D. und J.D. Boeke** (2003) DNA helicase gene interaction network defined using synthetic lethality analyzed by microarray. *Nat Genet* **35**: 277
- Paciotti, V., Lucchini, G., Plevani, P. und M.P. Longhese** (1998) Mec1p is essential for phosphorylation of the yeast DNA damage checkpoint protein Ddc1, which physically interacts with Mec3p. *EMBO J* **17**: 2055
- Paciotti, V., Clerici, M., Lucchini, G. und M.P. Longhese** (2000) The checkpoint protein Ddc2, functionally related to *S. pombe* Rad26, interacts with Mec1 and is regulated by Mec1-dependent phosphorylation in budding yeast. *Genes Dev* **14**: 2046

- Palladino, F. und H.L. Klein** (1992) Analysis of mitotic and meiotic defects in *Saccharomyces cerevisiae* SRS2 DNA helicase mutants. *Genetics* **132**: 23
- Paques, F. und J.E. Haber** (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 349
- Parenteau, J. und R.J. Wellinger** (1999) Accumulation of single-stranded DNA and destabilization of telomeric repeats in yeast mutant strains carrying a deletion of RAD27. *Mol Cell Biol* **19**: 4143
- Parsons, C.A., Baumann, P., Van Dyck, E. und S.C. West** (2000) Precise binding of single-stranded DNA termini by human RAD52 protein. *EMBO J* **19**: 4175
- Paull, T.T. und M. Gellert** (1998) The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* **1**: 969
- Paull, T.T. Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., et al.** (2000) A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* **10**: 886
- Paulovich, A.G., Armour, C.D. und L.H. Hartwell** (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* RAD9, RAD17, RAD24 and MEC3 genes are required for tolerating irreparable, ultraviolet-induced DNA damage. *Genetics* **150**: 75
- Pazin, M.J. und J.T. Kadonaga** (1997) SWI2/SNF2 and related proteins: ATP-driven motors that disrupt protein-DNA interactions? *Cell* **88**: 737
- Pegg, A.E.** (1984) Methylation of the O6 position of guanine in DNA is the most likely initiating event in carcinogenesis by methylating agents. *Cancer Invest* **2**: 223
- Petukhova, G., Stratton, S. und P. Sung** (1998) Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature* **393**: 91
- Petrini, J.H.** (2000) The Mre11 complex and ATM: collaborating to navigate S phase. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 293
- Pommier, Y., Pourquier, P., Fan, Y. und D. Strumberg** (1998) Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta* **1400**: 83
- Postow, L., Crisona, N.J., Peter, B.J., Hardy, C.D. und N.R. Cozzarelli** (2001) Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8219
- Powrie, W.D., Wu, C.H. und V.P. Molund** (1986) Browning reaction systems as sources of mutagens and antimutagens. *Environ Health Perspect* **67**: 47
- Prado, F. und A. Aguilera** (1995) Role of reciprocal exchange, one-ended invasion crossover and single-strand annealing on inverted and direct repeat recombination in yeast: different requirements for the RAD1, RAD10, and RAD52 genes. *Genetics* **139**: 109
- Prakash, L.** (1976) The relation between repair of DNA and radiation and chemical mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* **41**: 241
- Prakash, S. und L. Prakash** (2002) Translesion DNA synthesis in eukaryotes: a one- or two-polymerase affair. *Genes Dev* **16**: 1872
- Ramotar, D., Popoff, S.C., Gralla, E.B. und B. Demple** (1991) Cellular role of yeast Apn1 apurinic endonuclease/3'-diesterase: repair of oxidative and alkylation DNA damage and control of spontaneous mutation. *Mol Cell Biol* **11**: 4537
- Ramotar, D., Belanger, E., Brodeur, I., Masson, J.Y. und E.A. Drobetsky** (1998) A yeast homologue of the human phosphotyrosyl phosphatase activator PTPA is implicated in protection against oxidative DNA damage induced by the model carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *J Biol Chem* **34**: 21489
- Ratray, A.J. und L.S. Symington** (1994) Use of a chromosomal inverted repeat to demonstrate that the RAD51 and RAD52 genes of *Saccharomyces cerevisiae* have different roles in mitotic recombination. *Genetics* **138**: 587
- Ratray, A.J., Shafer, B.K., McGill, C.B. und J.N. Strathern** (2002) The roles of REV3 and RAD57 in double-strand-break-repair-induced mutagenesis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **162**: 1063

- Redon, C., Pilch, D.R., Rogakou, E.P., Orr, A.H., Lowndes, N.F. et al.** (2003) Yeast histone H2A serine 129 is essential for the efficient repair of checkpoint-blind DNA damage. *EMBO J* **4**: 678
- Reagan, M.S., Pittenger, C., Siede, W. und E.C. Friedberg** (1995) Characterization of a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* with a deletion of the *RAD27* gene, a structural homolog of the *RAD2* nucleotide excision repair gene. *J Bacteriol* **177**: 364
- Rijkers, T., Van Den Ouweland, J., Morolli, B., Rolink, A.G., Baarends, W.M., et al.** (1998) Targeted inactivation of mouse *RAD52* reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation. *Mol Cell Biol* **18**: 6423
- Robu, M.E., Inman, R.B. und M.M. Cox** (2001) RecA protein promotes the regression of stalled replication forks *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 8211
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C. und W.M. Bonner** (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double strand breaks *in vivo*. *J Cell Biol* **146**: 905
- Rong, L., Palladino, F., Aguilera, A. und H.L. Klein** (1991) The hyper-gene conversion *hpr5-1* mutation of *Saccharomyces cerevisiae* is an allele of the *SRS2/RADH* gene. *Genetics* **127**: 75
- Rong, L. und H.L. Klein** (1993) Purification and characterization of the *SRS2* DNA helicase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **268**: 1252
- Rothstein, R.** (1991) Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods Enzymol* **194**: 281
- Rothstein, R., Michel, B. und S. Gangloff** (2000) Replication fork pausing and recombination or "gimme a break". *Genes Dev* **14**: 1
- Rouse, J. und S.P. Jackson** (2000) *LCD1*: an essential gene involved in checkpoint control and regulation of the *MEC1* signalling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **19**: 5801
- Rudolph, C.** (2003) Untersuchungen zur Rolle des *MPH1*-Gens aus *Saccharomyces cerevisiae* bei der Reinitiation der Replikation nach schadensindzierten Arresten. Dissertation, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen
- Saffi, J., Pereira, V.R. und J.A. Henriques** (2000) Importance of the Sgs1 helicase activity in DNA repair of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **37**: 75
- Sanchez, Y., Bachant, J., Wang, H., Hu, F., Liu, D., et al.** (1999) Control of the DNA damage checkpoint by Chk1 and Rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science* **286**: 1166
- Santocanale, C. und J.F. Diffley** (1998) A Mec1- and Rad53- dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature* **395**: 615
- Santocanale, C., Sharma, K. und J.F. Diffley** (1999) Activation of dormant origins of DNA replication in budding yeast. *Genes Dev* **13**: 2360
- Scully, R., Chen, A., Ochs, R.L. Keegan, K.M., Hoekstra, M., et al.** (1997) Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* **90**: 425
- Schiestl, R.H., Prakash, S. und L. Prakash** (1990) The *SRS2* suppressor of *rad6* mutations of *Saccharomyces cerevisiae* acts by channeling DNA lesions into the *RAD52* DNA repair pathway. *Genetics* **124**: 817
- Scheller, J.** (1999) Charakterisierung des neuen Mutatorgens *MPH1* aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen
- Scheller, J., Schürer, A., Rudolph, C., Hettwer, S. und W. Kramer** (2000) *MPH1*, a yeast gene encoding a DEAH protein, plays a role in protection of the genome from spontaneous and chemically induced damage. *Genetics* **155**: 1069
- Schild, D.** (1995) Suppression of a new allele of the yeast *RAD52* gene by overexpression of *RAD51*, mutations in *srs2* and *ccr4*, or mating-type heterozygosity. *Genetics* **140**: 115
- Schmickel, R.D., Chu, E.H., Trosko, J.E. und C.C. Chang** (1977) Cockayne syndrome: a cellular sensitivity to ultraviolet light. *Pediatrics* **60**: 135
- Schürer, A.** (2000) Genetische und biochemische Untersuchungen zur Funktion des Mutatorgens *MPH1* aus *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen

- Schultz, L.B., Chehab, N.H., Malikzay, A. und T.D. Halazonetis** (2000) p53 binding protein (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double strand breaks. *J Cell Biol* **151**: 1381
- Seigneur, M., Bidnenko, V., Ehrlich, S.D. und B. Michel** (1998) RuvAB acts at arrested replication forks. *Cell* **95**: 419
- Seigneur, M., Ehrlich, S.D. und B. Michel** (2000) RuvABC-dependent double-strand breaks in dnaBts mutants require recA. *Mol Microbiol* **38**: 565
- Shirahige, K., Hori, Y., Shiraishi, K., Yamashita, M., Takahashi, K. et al.** (1998) Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression. *Nature* **395**: 618
- Siede, W., Nusspaumer, G., Portillo, V., Rodriguez, R. und E.C. Friedberg** (1996) Cloning and characterization of *RAD17*, a gene controlling cell cycle responses to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **24**:1669
- Sikorski, R.S. und J.D. Boeke** (1991) *In vitro* mutagenesis and plasmid shuffling: from cloned gene to mutant yeast. *Methods Enzymol* **194**: 302
- Sikorski, R.S. und P. Hieter** (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19
- Siloh, Y.** (2001) ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* **11**: 71
- Singleton, M.R., Scaife, S. und D.B. Wigley** (2001) Structural analysis of DNA replication fork reversal by RecG. *Cell* **107**: 79-89.
- Sogo, J.M., Lopes, M. und M. Foiani** (2002) Fork reversal and ss-DNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoints defects. *Science* **297**: 599
- Soulier, J. und N.F. Lowndes** (1999) The BRCT domain of *S. cerevisiae* checkpoint protein Rad9 mediates a Rad9-Rad9 interaction after DNA damage. *Curr Biol* **9**: 551
- Stelter, P. und H.D. Ulrich** (2003) Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* **425**: 188
- Stewart, E., Chapman, C.R., Al-Khodairy, F., Carr, A.M. und T. Enoch** (1997) *rqh1+*, a fission yeast gene related to the Bloom's and Werner's syndrome genes, is required for reversible S phase arrest. *EMBO J* **16**: 2682
- Strumberg, D., Pilon, A.A., Smith, M., Hickey, R., Malkas, L. et al.** (2000) Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Mol Cell Biol* **20**: 3977
- Sugawara, N., Wang, X. und J.E. Haber** (2003) *In vivo* roles of Rad52, Rad54, and Rad55 proteins in Rad51-mediated recombination. *Mol Cell* **12**: 209
- Sugiyama T. und S.C. Kowalczykowski** (2002) Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. *J Biol Chem* **277**: 31663
- Sun, Z., Hsiao, J., Fay, D.S. und D.F. Stern** (1998) Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint. *Science* **281**: 272
- Sun, H., Bennett, R.J. und N. Maizels** (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* *Sgs1* helicase efficiently unwinds G-G paired DNAs. *Nucleic Acids Res* **27**: 1978
- Sung, P.** (1997a) Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase. *J Biol Chem* **272**: 28194
- Sung, P.** (1997b) Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase. *Genes Dev* **11**: 1111
- Sung, B. und P. Sung** (2000) Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange. *J Biol Chem* **275**: 15895
- Symington, L.** (1998) Homologous recombination is required for the viability of *rad27* mutants. *Nucleic Acids Res* **26**: 5589
- Symington, L.** (2002) Role of *RAD52* epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 630
- Tanaka, K. und P. Russell** (2001) Mrc1 channels the DNA replication arrest signal to checkpoint kinase Cds1. *Nat Cell Biol* **3**: 966

- Tashiro, S., Kotomura, N., Shinohara, A., Tanaka, K., Ueda, K., et al.** (1996) S phase specific formation of the human Rad51 protein nuclear foci in lymphocytes. *Oncogene* **12**: 2165
- Teo, S.H. und S.P. Jackson** (1997) Identification of *Saccharomyces cerevisiae* DNA ligase IV: involvement in DNA double-strand break repair. *EMBO J* **16**: 4788
- Tercero, J.A. und J.F. Diffley** (2001) Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature* **412**: 553
- Tibbetts, R.S., Cortez, D., Brumbaugh, K.M., Scully, R., Livingston, D. et al.** (2000) Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev* **14**: 2989
- Tijsterman, M. und J. Brouwer** (1999) Rad26, the yeast homolog of the cockayne syndrome B gene product, counteracts inhibition of DNA repair due to RNA polymerase II transcription. *J Biol Chem* **274**: 1199
- Tishkoff, D.X., Filosi, N., Gaida, G.M. und R.D. Kolodner** (1997) A novel mutation avoidance mechanism dependent on *S. cerevisiae* RAD27 is distinct from DNA mismatch repair. *Cell* **88**: 253
- Tong, A.H., Drees, B., Nardelli, G., Bader, G.D., Brannetti, B., et al.** (2001) A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules. *Science* **295**: 321
- Torres-Ramos, C., Yoder, B.L., Burgers, P.M., Prakash, S. und L. Prakash** (1996) Requirement of proliferating cell nuclear antigen in RAD6-dependent post replicational DNA repair. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 9676
- Torpey, L.E., Gibbs, P.E., Nelson, J. und C.W. Lawrence** (1994) Cloning and sequence of REV7, a gene whose function is required for DNA damage-induced mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**:1503
- Tsubouchi, H. und H. Ogawa** (1998) A novel *mre11* mutation impairs processing of double-strand breaks of DNA during both mitosis and meiosis. *Mol Cell Biol* **18**: 260
- Turesky, R.J.** (1994) DNA adducts of heterocyclic aromatic amines, arylazides and 4-nitroquinoline 1-oxide. *IARC Sci Publ* **125**: 217
- Ui, A., Satoh, Y., Onoda, F., Miyajima, A., Seki, M., et al.** (2001) The N-terminal region of Sgs1, which interacts with Top3, is required for complementation of MMS sensitivity and suppression of hyper-recombination in *sgs1* disruptants. *Mol Genet Genomics* **265**: 837
- Ulrich, H.D. und S. Jentsch** (2000) Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *EMBO J* **19**: 3388
- Ulrich, H.D.** (2001) The *srs2* suppressor of UV sensitivity acts specifically on the RAD5- and MMS2-dependent branch of the RAD6 pathway. *Nucleic Acids Res* **29**: 3487
- Umezu, K., Nakayama, K. und K. Nakayama** (1990) *Escherichia coli* RecQ protein is a DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 5363
- Unk, I., Haracska, L., Prakash, S. und L. Prakash** (2001) 3'-phosphodiesterase and 3'-->5' exonuclease activities of yeast Apn2 protein and requirement of these activities for repair of oxidative DNA damage. *Mol Cell Biol* **21**: 1656
- Usui, T., Ohta, T., Oshiumi, H., Tomizawa, J., Ogawa, H. und T. Ogawa** (1998) Complex formation and functional versatility of Mre11 of budding yeast in recombination. *Cell* **95**: 705
- Usui, T., Ogawa, H. und J.H. Petrini** (2001) A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex. *Mol Cell* **7**: 1255
- Valerie, K. und L.F. Povirk** (2003) Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* **22**: 5792
- van Gool, A.J., Verhage, R., Swagemakers, S.M., van de Putte, P., Brouwer, J. et al.** (1994) RAD26, the functional *S. cerevisiae* homolog of the Cockayne syndrome B gene ERCC6. *EMBO J* **13**: 5361
- Van Komen, S., Petukhova, G., Sigurdsson, S., Stratton, S. und P. Sung** (2000) Superhelicity-driven homologous DNA pairing by yeast recombination factors Rad51 and Rad54. *Mol Cell* **6**: 563

- Varon, R., Vissinga, C. Platzer, M., Cerosaletti, K.M., Chrzanowska, K.H., et al.** (1998) Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* **93**: 467
- Vaze, M.B., Pellicoli, A., Lee, S.E., Ira, G., Liberi, G., et al.** (2002) Recovery from checkpoint-mediated arrest after repair of a double-strand break requires Srs2 helicase. *Mol Cell* **10**: 373
- Veaute, X., Jeusset, J., Soustelle, C., Kowalczykowski, S.C., Le Cam, E., et al.** (2003) The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature* **423**: 309
- Vialard, J.E., Gilbert, C.S., Green, C.M. und N.F. Lowndes** (1998) The budding yeast Rad9 checkpoint protein is subjected to Mec/Tel1-dependent hyperphosphorylation and interacts with Rad53 after DNA damage. *EMBO J* **17**: 5678
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. und P. Philippsen** (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793
- Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C. und P. Philippsen.** (1997) Heterologous *HIS3* marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1065
- Wang, J.C.** (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 430
- Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S.J. und J. Qin** (2000) BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* **14**: 927
- Wallis, J.W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M. und R. Rothstein** (1989) A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* **58**: 409
- Washington, M.T., Johnson, R.E., Prakash, S. und L. Prakash** (2001) Mismatch extension ability of yeast and human DNA polymerase ϵ . *J Biol Chem* **276**: 2263
- Watt, P.M., Louis, E.J., Borts, R.H. und I.D. Hickson** (1995) Sgs1: a eukaryotic homolog of *E. coli* RecQ that interacts with topoisomerase II *in vivo* and is required for faithful chromosome segregation. *Cell* **81**:253
- Watt, P.M., Hickson, I.D., Borts, R.H. und E.J. Louis** (1996) *SGS1*, a homologue of the Bloom's and Werner's syndrome genes, is required for maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **144**: 935
- Whitby, M.C., Osman, F. und J. Dixon** (2003) Cleavage of model replication forks by fission yeast Mus81-Eme1 and budding yeast Mus81-Mms4. *J Biol Chem* **278**: 6928
- Wilson, T.E. und M.R. Lieber** (1999) Efficient processing of DNA ends during yeast nonhomologous end joining. Evidence for a DNA polymerase beta (Pol4)-dependent pathway. *J Biol Chem* **274**: 23599
- Wu, X. und Z. Wang** (1999) Relationships between yeast Rad27 and Apn1 in response to apurinic/apyrimidinic (AP) sites in DNA. *Nucleic Acids Res* **27**: 956
- Wu, L., Davies, S.L., North, P.S., Goulaouic, H., Riou, J.F., et al.** (2000) The Bloom's syndrome gene product interacts with topoisomerase III. *J Biol Chem* **275**: 9636
- Wu, L., Davies, S.L., Levitt, N.C. und I.D. Hickson** (2001a) Potential role for the BLM helicase in recombinational repair via a conserved interaction with RAD51. *J Biol Chem* **276**: 19375
- Wu, L. und I.D. Hickson** (2001b) RecQ helicases and topoisomerases: components of a conserved complex for the regulation of genetic recombination. *Cell Mol Life Sci* **58**: 894
- Xiao, Y. und D.T. Weaver** (1997) Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* **25**: 2985 RAD50
- Xiao, W., Chow, B.L. und C.N. Milo** (1998) Mms4, a putative transcriptional (co)activator, protects *Saccharomyces cerevisiae* cells from endogenous and environmental DNA damage. *Mol Gen Genet* **257**: 614
- Xiao, W., Chow, B.L., Fontanie, T., Ma, L., Bacchetti, S., et al.** (1999) Genetic interactions between error-prone and error-free postreplication repair pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* **435**: 1

- Xiao, W., Chow, B.L., Broomfield, S. und M. Hanna** (2000) The *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 group is composed of an error-prone and two error-free postreplication repair pathways. *Genetics* **155**: 1633
- Yamagata, K., Kato, J., Shimamoto, A., Goto, M., Furuichi, Y., et al.** (1998) Bloom's and Werner's syndrome genes suppress hyperrecombination in yeast *sgs1* mutant: implication for genomic instability in human diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 8733
- Yu, C.E., Oshima, J., Fu, Y.H., Wijsman, E.M., Hisama, F., et al.** (1996) Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* **272**: 258
- Zhou, L. und S.J. Elledge** (2000) The DNA damage response putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**: 433
- Zhao, X., Muller, E.G. und R. Rothstein** (1998) A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol Cell* **2**: 329
- Zhao, X., Georgieva, B., Chabes, A., Domkin, V., Ippel, J.H. et al.** (2001) Mutational and structural analyses of the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 define its Rnr1 interaction domain whose inactivation allows suppression of *mec1* and *rad53* lethality. *Mol Cell Biol* **20**: 9076
- Zhu, J., Petersen, S., Tessarollo, L. und A. Nussenzweig** (2001) Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol* **11**: 105
- Zou, L. und S.J. Elledge** (2003) Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **300**: 1542

ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

AT	<i>Ataxia telangiectasia</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia and Rad-related</i>
ATV	<i>Ataxia telangiectasia variant</i>
BER	Basenexcisionsreparatur
BRCT	BRCA1 <i>C-terminal domain</i>
CPT	Camptothecin
DDC	<i>DNA damage checkpoint</i>
DSB	Doppelstrangbruch
EMS	Ethylmethansulfonat
IR	ionisierende Strahlung
MMS	Methylmethansulfonat
NBS	<i>Nijmegen breakage syndrome</i>
NER	Nukleotidexcisionsreparatur
4-NQO	4-Nitrochinolin-1-oxid
ORC	<i>origin of replication complex</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigene</i>
PI-3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PRR	Postreplikative Reparatur
RPA	<i>replication protein A</i> , eukaryotisches Einzelstrangbindeprotein
RTH	Rothmund-Thomson-Syndrom
HU	Hydroxyharnstoff/Harnstoffurea

Nuklotidsequenz von MPH1

1 ATGGCTAGTGCAGATGATTACTTTTAGTGATTTTGAAGATGACGAGCTGGATAAACTGTAT
 M A S A D D Y F S D F E D D E L D K L Y

 61 GAAAAGGCTATCAATAAATCTGTGAAGGAACTATAACGAGACGTGCTGTACCAGTTCAA
 E K A I N K S V K E T I T R R A V P V Q

 121 AAAGACCTTCATGATAACGTTTTACCTGGGCAGAAAACGTGTGTACGAAGAAATTCAAAGA
 K D L H D N V L P G Q K T V Y E E I Q R

 181 GATGTCAGTTTTGGACCCACTCATCATGAGCTTGATTACGATGCTTTGTGCTTCTACGTG
 D V S F G P T H H E L D Y D A L S F Y V

 241 TACCCTACAAATTACGAGGTAAGGGATTATCAGTATAACAATTGTTCCAAAATCACTGTTT
 Y P T N Y E V R D Y Q Y T I V H K S L F

 301 CAAAATACGTTATGCGCCATCCCAACGGGTATGGGTAAAACGTTTCATTGCCAGTACAGTA
 Q N T L C A I P T G M **G K T** F I A S T V

 361 ATGTTAAATTATTTTCGTTGGACCAAAAAAGCCAAAATAATCTTTACTGCTCCAACAAGA
 M L N Y F R W T K K A K I I F T A **P T R**

 421 CCTTTGGTAGCCAGCAAATTAAGGCATGCTTAGGTATAACAGGAATACCTTCGGATCAA
 P L V A Q Q I K A C L G I T G I P S D Q

 481 ACTGCTATATTACTCGATAAAAAGCAGGAAAAATAGAGAAGAAATTTGGGCCAATAAGAGA
 T A I L L D K S R K N R E E I W A N K R

 541 GTTTTCTTTGCCACACCGCAAGTAGTGGAGAATGACTTGAAGAGGGGTGTATTGGATCCT
 V F F A **T P Q** V V E N D L K R G V L D P

 601 AAGGATATTGTATGTCTTGTTCATCGATGAAGCTCACAGAGCTACTGGCTCCTCTGCGTAT
 K D I V C L V I **D E A H** R A T G S S A Y

 661 ACAAATGTGGTAAAATTCATAGATAGGTTCAATTCATCATAACAGATTATTAGCATTGACC
 T N V V K F I D R F N S S Y R L L A L **T**

 721 GCTACACCAGCCTCTGACCTGGAAGGTGTCCAAGAAGTGGTTAATAACTTAGATATTTT
A T P A S D L E G V Q E V V N N L D I S

 781 AAGATTGAAATTAGGACTGAAGAAAGCATGGATATCGTGAAATATATGAAGAAAAGAAAA
 K I E I R T E E S M D I V K Y M K K R K

 841 AAGGAAAAAATTGAAGTGCCCTTTTGTGGAAAATTGAAGACATAATCGAACAAATTAGGT
 K E K I E V P L L L E I E D I I E Q L G

 901 ATGGCCGTCAAACCAGTGCTTCAACAGGCAATTGAACTCGGTATATATGAGGAATGTGAC
 M A V K P V L Q Q A I E L G I Y E E C D

 961 CCTTCACAAATAAACGCCTTCAAAGCCATGCAACAAAGCCAAAAAATTATTGCTAACCTT
 P **S Q** I N A F K A M Q Q **S Q** K I I A N P

1021 ACTATACCTGAAGGAATTAAGTGGAGGAACCTCTTTATTTTACAGTTATTGAACAATGTG
T I P E G I K W R N F F I L Q L L N N V

1081 GGTCAAATGCTAAAGAGATTA AAAAATTTATGGAATAAGGACATTTTTCAATTACTTCCAG
G Q M L K R L K I Y G I R T F F N Y F Q

1141 AATAAATGTACAGAATTCACTACGAAATATAATCTTAAAAAATCTACTAATAAAATTGCA
N K C T E F T T K Y N L K K S T N K I A

1201 GCTGAGTTTTATTACCATCCGATTTTTGAAAAACATCAAAAATCAATGCGAAAATTATTTA
A E F Y Y H P I L K N I K N Q C E N Y L

1261 AGTGATCCAAAGTTTGTCCGGTCATGGGAAGTTACAATGTGTTAGAGATGAACTAATGGAC
S D P K F V G H G K L Q C V R D E L M D

1321 TTTTTTCAGAAAAGGGTTCCGACTCGAGGGTTATTATTTTTTACAGAATTAAGAGAAAAGC
F F Q K R G S D S R V I I F T E L R E S

1381 GCACTTGAAATTGTGAAGTTCATAGACTCGGTAGCTGACGATCAAATCAGGCCTCATATT
A L E I V K F I D S V A D D Q I R P H I

1441 TTTATTGGACAAGCTCGTGCAAAAAGAAGTTTTGATGAGGTCAAATACACAAGAAAACAT
F I G Q A R A K E G F D E V K Y T R K H

1501 GCGCCAAAGGGAAGGAAGAAGGTAGAGAGATTGCATAGGCAAGAGCAAGAGAAAATTTTTG
A P K G R K K V E R L H R Q E Q E K F L

1561 GAAGCTGAACGAACTAAGAGAGCGGCGAATGATAAACTTGAAAGAAGTGCCAGACGAACG
E A E R T K R A A N D K L E R S A R R T

1621 GGGAGCTCTGAAGAGGCTCAGATTAGCGGAATGAACCAAAAAATGCAAAAAGAGGTTATC
G S S E E A Q I S G M N Q K M Q K E V I

1681 CATAATTTCAAAAAGGGTGAATATAATGTTCTCGTTTGTACATCAATTGGAGAAGAAGGT
H N F K K G E Y N V L V C T S I G E E G

1741 TTGGATATCGGAGAAGTTGATTTAATAATCTGTTATGATACTACAAGTAGTCCAATCAAA
L D I G E V D L I I C Y D T T S S P I K

1801 AATATTCAGCGTATGGGTAGAACAGGCAGAAAACGAGATGGTAAGATAGTACTACTGTTT
N I **Q** R M **G** R T **G** R K R D **G** K I V L L F

1861 AGCAGTAATGAATCATACAAATTCGAGCGTGCTATGGAAGACTATTCAACCCTGCAAGCG
S S N E S Y K F E R A M E D Y S T L Q A

1921 CTTATATCCAAGCAATGCATTGACTATAAAAAATCAGATCGGATAATCCCTGAAGACATT
L I S K Q C I D Y K K S D R I I P E D I

1981 ATTCCGGAATGTCACGAGACATTGATCACGATTAATGATGAAAACGAAATAATTAATGAA
I P E C H E T L I T I N D E N E I I N E

2041 ATGGAAGATGTTGACGAAGTTATTTCGTTATGCGACTCAGTGTATGATGGGCAAAAAGGTG
M E D V D E V I R Y A T Q C M M G K K V

2101 AAGCCAAAAAAGCCATAACAAAGAAGAAGAGAGTTTCAGGAAAATAAAAAACCGAAGAAG
K P K K A I T K K K R V Q E N K K P K K

ANHANG

2161 TTCTTTATGCCTGATAATGTTGAGACCAGTATTGTTAGTGCAAGCACTTTAATTAATAAG
F F M P D N V E T S I V S A S T L I N K

2221 TTCTTGGTGAATGAAAAGTGGCGGGAACAACACTAGTAACGAGTAATGAAAACCCAAGTAAG
F L V N E S G G K Q L V T S N E N P S K

2281 AAGCGGAAGATTTTTAAAGCTTTGGATAATCTGGAGAATGATTC AACCGAGGAAGCTTCC
K R K I F K A L D N L E N D S T E E A S

2341 TCCTCATTAGAAACTGAAGATGAAGAAGTCAGTGATGATAATAATGTTTTATTGCGGAA
S S L E T E D E E V S D D N N V F I A E

2401 GGGCAGAATGGATGCCAAAAAGATTTGGAAACTGCCATTATTCGCACTGGCGAAAGTCTT
G Q N G C Q K D L E T A I I R T G E S L

2461 ACCCACTCAAGCCACTTCATAATTTTGAACGCCCTAATATGGCTTTATTTGTGAATGAT
T T L K P L H N F E R P N M A L F V N D

2521 TGTGGTCTTCCAACATAAAATCGAGAAAAATGTGAAAGACATCCGAGGAAATCAACACAAC
C G L P T K I E K N V K D I R G N Q H N

2581 CTTGAAAAAGAAAAAGAGCTGTACTGTTGACAAGAATAACATGGTATTGAGTTTGGACGAT
L E K E K S C T V D K N N M V L S L D D

2641 TGGAATTTTTTTCAGAAACCGCTATATCCCAGAAGGTGTTTCCTTCGATGTGGAGCCCAAT
W N F F R N R Y I P E G V S F D V E P N

2701 TTTGTACAATACACCAAAGGGGTAAAAGTCCGCATTGTCACAAAGTTTCAAAAATCATT
F V Q Y T K G V K V P H C H K V S K I I

2761 ACGTTATTTAACGACGAGAGTAATGATAATAAGAAGAGGACAATTGATATGAACTATACT
T L F N D E S N D N K K R T I D M N Y T

2821 AAATGTTTGGCGAGAGGCATGTTACGAGACGAAAAAAAAATTTGTAAGTTAACGATAAA
K C L A R G M L R D E K K F V K V N D K

2881 AGTCAAGTCGATAACAACAGTGTCAACCATGATTCATCCCAATCTTTTACCTTATCGAAC
S Q V D N N S V N H D S **S Q** S F T L S N

2941 GCAGAATTAGATGACATACTGGGCTCAGATTCTGATTTTTGA
A E L D D I L G S D S D F *

Sequenz des *MPH1*-Genes. Angegeben ist die Nukleotidsequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz. Die Zahlen markieren die Anzahl der Nukleotide. Konservierte Aminosäuren innerhalb der DEAD/DEH-Box- Familie und die Kernlokalisationssequenz sind fett dargestellt, ebenso die putativen SQ-Phosphorylierungsstellen.
Kursiv: Kernlokalisationssequenz.

Danksagung

Dreieinhalb Jahre Kampf an vorderster Front mit den Hefen gehen nicht spurlos, und ohne Beeinflussung anderer, an einem vorüber.

Wilfried Kramer möchte ich u. a. danken, dass er mir Mph1 anvertraut hat. Es war/ist ein spannendes und faszinierendes Thema. Danke auch für die Hilfe bei all meinen Problemen und Fragestellungen, für die freizügige Überlassung der Mutantenwahl, für die Geduld bei meinen „bauchgesteuerten“ Diskussionen und für die „Schweine“. Dem „alten“ 350-Labor und seiner damaligen Mannschaft (Alexander Wentzel, Andreas Christmann, Martin Laging, Jürgen Scheller, Kerstin Walter und Dirk Ponsel) ist zu verdanken, dass mich *MPH1* weiter in seinen Bann ziehen konnte.

Den Kaffee zwischendurch und manche wissenschaftliche und auch nicht-wissenschaftliche Kommunikation (Frauen brauchen das manchmal) habe ich mit Martina Henn-Sax und Vytaute Starkuviene getrunken.

Für meinen gefüllten Kühlschrank und damit den Fortgang meiner Promotion bin ich neben meinen Eltern zu Dank verpflichtet: Andreas Schwienhorst, Helle Ulrich (Marburg), Harald Kolmar (Selecure GmbH) und Peter Wiechmann (Fa. naUnd).

Ein ganz großer Dank gebührt Brigit Zeike. Ohne Deine exzellente wissenschaftliche Handhabung der von mir in Sklaventreiber-Manier ausgearbeiteten allmorgendlichen „Wochen“-Arbeitspläne wäre dieses Schmachtwerk (trotz vielerlei Kopfschmerzen) nur halb so dick geworden.

Mit ihrem GPII und Laborpraktika haben einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet: Kai Bentlage, Gundula Rohde, Maren Mönich, Henrik Müller, Ramazan Karaduman, Zeynep Dereli, Johann Böhm, Simon Trowitzsch, Cornelia Grebe, sowie den damals angehenden technischen Assistenten Katja Dittner und Johannes König, und natürlich Christina Lauterbach (Selecure GmbH) nicht zu vergessen.

Meinem *MPH1*-Mitstreiter Christian Rudolph danke ich für die vielen Kleinen und Großen Dinge (u. a. das Zentraldokument: ja, er beherrscht es!). Unsere Gespräche über das allzu „zwischenmenschliche“ werden mir fehlen.

Die Arbeitsgruppenleiter Hans Joachim Fritz, Andreas Schwienhorst, Susanne Behrens (alles Gute für Dich/Euch), Harald Kolmar (lass Dich von Selecure nicht auffressen) und Reinhard Sterner haben in so manchem Arbeitsbericht die Diskussion über *MPH1* nicht ganz sterben lassen. Danke.

Prof. Gerhard Braus danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Marita Kalck sei neben jeder Büroklammer auch für jedes Bonbon und jeden Plausch gedankt. Das gleiche gilt für Olaf Waase und Rainer Merkl, wobei die ersten beiden Dinge gegen Schraubenzieher und „Steht doch im Intranet“ jeweils zu ersetzen sind. Und so manche Mutationsrate wäre auch nicht ohne Marlies Bartels, Angelika Löffler, Bettina Hucke und Patrik Regin zustande gekommen.

Rene Hempel, Henrik Müller und Martina Henn-Sax haben Korrektur gelesen und all die Rad's über sich ergehen lassen müssen.

Danke, dass ihr bei meinen Arbeitsberichten tapfer ausgeharrt habt: Steffen Schmidt, Birte Höcker, Catharina Jürgens, Stefan Hettwer, Martina Henn-Sax, Vytaute

Starkuviene, Thorsten Adams (Nie mehr *RAD52*? Sei Dir da nicht so sicher), Hans-Uli-Schmold(i), Stefan Becker, Milena Ninkovic, Rüdiger Dietrich, Gülden Aral, Christian Hildmann, Christian Klug, Rene Hempel, Dennis Wegener, Gerrit Hennecke, Christiane Preiß, Stina Schiller, Eva Kansy, Julia Wittmann, Saskia Flörl, Jenny Uhlendorf, Corinna Capellaro,...'tschuldigung, falls ich jemanden vergaß.

Dank auch den neuen Mitgliedern unserer Arbeitgruppe, die mir in der Endphase aufmunternd zugesprochen haben: Marion Rudolph und Evandro Panico.

Jag vill också tacka Dr. Per Sunnerhagen och Swaminathan för hjälpa med svenskan & svenskarna, Eva Asp för att hon förklarade vikten av logaritmisk tillväxt i pombe, Bessi Bilsland-Marchesan för att ha visat mig till rätta på lab och speciellt Claes Molin för all trevlig tid i mörkret med foci och annat.

Danke Mutti und Vati für Eure Unterstützung über all die Jahre meiner Ausbildung.

Danke *MPH1*! Du wirst mir fehlen. Wirklich!

...und immer, immer wieder geht die Sonne auf...

Die Zeit ist das Feuer, dass uns verbrennt.

unbekannt

Kirsten Anke Schürer

geboren am: 31.12.1970 in Zwickau
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

1977 – 1987 Zehnklassige allgemeinbildende Polytechnische
Oberschule, Zwickau
1991 – 1994 Abendgymnasium Göttingen

Beruflicher Werdegang

1987 – 1990 Berufsausbildung zur
Medizinisch-Technischen Radiologieassistentin,
Medizinische Fachschule, Zwickau
1990 – 1994 Berufstätigkeit als Medizinisch-
Technische Radiologieassistentin,
Radiologische Gemeinschaftspraxis, Göttingen

Hochschulausbildung

1994 – 1998 Beginn des Studiums der Biologie
an der Georg-August-Universität Göttingen
1999 – 2000 Diplomarbeit am Institut für Molekulare Genetik und
Präparative Molekularbiologie bei Prof. H.-J. Fritz
April 2000 Beginn der Dissertation am Institut für Molekulare
Genetik und Präparative Molekularbiologie
bei PD Dr. Wilfried Kramer
2003 Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation
bei Dr. Per Sunnerhagen als Marie Curie Stipendiat
am *Göteborg Yeast Centre*, Schweden

