

Untersuchungen zur Rolle des *MPH1*-Gens
aus *Saccharomyces cerevisiae*
bei der Reinitiation der Replikation
nach schadensinduzierten Arresten

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

vorgelegt von *Christian Rudolph*
aus der Freien Hansestadt Bremen.

Göttingen 2003

Diese Arbeit wurde durch die DFG im Rahmen des Graduiertenkollegs
»Chemische Aktivitäten von Mikroorganismen«
sowie durch die Studienstiftung des Deutschen Volkes e.V. gefördert.

Alle Rechte vorbehalten

D7

Referent: PD Dr. Wilfried Kramer
Korreferent: PD Dr. Harald Kolmar
Tag der mündlichen Prüfung: 5. November 2003

EINLEITUNG – 10

Replikation in *E. coli* – 10

Initiation der Replikation – 10

Die Replikation muß vor der Zellteilung abgeschlossen werden – 12

Die Replikation erfolgt in stationären Replikationskomplexen – 12

Mögliche Strukturen des Replisoms – 14

Arreste der Replikation – 15

Unterschiedliche Barrieren führen

zu unterschiedlichen Replikationsintermediaten – 17

Kleine Läsionen führen zu einer Entkopplung der *leading* und *lagging strand* Synthese – 17

Arreste der Synthese des lagging strand – 17

Arreste der Synthese des leading strand – 17

Arreste der replikativen Helikasen – 18

Arreste an Protein-DNA-Komplexen – 18

Arreste an replication fork barriers – 19

Einzelstrangbrüche führen zu einem »Kollaps« der Replikation – 20

Mechanismen zur Reinitiation arretierter Replikationsgabeln – 20

Reinitiation der Replikation durch Transläsionssynthese – 20

Reinitiation nach Arrest der *leading strand* Polymerase – 21

Reinitiation nach dem Kollaps einer Replikationsgabel an einem Einzelstrangbruch – 22

Reinitiation nach einem Arrest an helicaseblockierenden Strukturen – 22

Assemblierung des Reinitiationsprimosoms – 24

Das MPH1-Gen von *Saccharomyces cerevisiae* – 27

MATERIAL – 29

Chemikalien – 29

Enzyme – 30

Antikörper – 31

Kits – 31

Nährmedien – 31

Nährmedien für die Anzucht von *E. coli* – 31

Nährmedien für die Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae* – 32

Vektoren – 33

Klonierungsvektoren – 33

Hefevektoren – 33

METHODEN – 34

Hefestämme – 34

Bestimmung von Mutationsraten und Mutationsfrequenzen – 34

Bestimmung von spontanen Mutationsraten nach der Medianmethode
(Lea & Coulson, 1948) – 34

Abschätzung der Mutationsraten – 35

Bestimmung der Mutationsfrequenzen nach Mutagenbehandlung – 36

Anzucht der Zellen und Mutagenbehandlung – 36

Auswertung – 37

Bestimmung von Reversionsraten und Reversionsfrequenzen – 38

Bestimmung der spontanen Reversionsrate nach der Medianmethode – 38

Bestimmung der Reversionsfrequenzen nach Mutagenbehandlung – 38

Drop dilution assay zur Bestimmung von Mutagensensitivitäten – 38

Molekularbiologische Methoden – 39

Phenol-Chloroform-Extraktion – 39

Ethanolpräzipitation von DNA aus wäßrigen Lösungen – 39

Partialverdau von DNA-Fragmenten – 40

Agarosegelelektrophorese – 41

Isolation von DNA aus Agarosegelen – 42

Isolation von DNA-Fragmenten mit dem NucleoTrap®-Extraction Kit (Macherey-Nagel) – 42

Reinigung von DNA-Fragmenten mit dem QIAquick-Extraction Kit (Qiagen) – 43

Ligation von DNA-Fragmenten – 43

Ligation kohäsiver Enden – 43

Ligation von Enden ohne Überhänge – 44

Transformation von *E. coli*-Zellen – 44

Präparation chemisch-kompetenter DH5 α -Zellen (nach Inoue et al., 1990) – 44

Transformation von DH5 α mit Hilfe eines Hitzeschocks (nach Inoue et al., 1990) – 44

*Erzeugung elektrokompenter *E. coli*-Zellen für die Transformation der Zellen mit Plasmiden – 45*

Kolonie-PCR zum schnellen Nachweis geclonter Klonierungen – 45

Mini-Präparation von Plasmid-DNA – 46

Präparation von Plasmid-DNA mit Hilfe von JETStar™-Säulen – 47

Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* – 47

Protokoll für die Transformation zur chromosomalen Integration linearer DNA-Fragmente – 47

*Protokoll für die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* mit Plasmiden – 48*

Anlage von Gefrierkulturen – 49

Präparation chromosomaler DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*
(nach Philippsen et al., 1991) – 49

**Chromosomale Integration des KanKanMX4-Moduls in Wildtyp
und mph1-Deletionsmutante – 51**

Umklonierung des KanKanMX4-Moduls in den Integrationsvektor YIplac211 – 51

PCR-Amplifikation von *recG* aus *E. coli* – 51

Klonierung des amplifizierten *recG*-Gens – 52

Klonierung über die mittels der Primer eingeführten Schnittstellen – 52
Erzeugung stumpfer Enden mit Hilfe von T4-DNA-Polymerase
und anschließende Klonierung – 52
Umklonierung des recG-Gens in den Hefe-Expressionsvektor pYGET – 53

Elektronenmikroskopie – 53

Trägernetze (Grids) – 53
Herstellung von Kunststoffolie (modifiziert nach Mahl & Möldner, 1973) – 53
 Anzucht und Einbettung der Zellen – 54
Anzucht und Vorbereitung – 54
Tiefemperatur-Einbettung von Zellsuspensionen in Lowicryl-K4M-Harz
(nach Hoppert, 2003) – 54
 Trimmen der Proben – 55
 Herstellung von Glasmessern – 55
 Herstellung von Ultradünnschnitten – 56
 Immunelektronenmikroskopie – 56
Immun-Gold-Markierungen an Ultradünnschnitten – 56
Kontrastierung mit Bleicitrat und Uranylacetat – 57

Fluoreszenzmikroskopie – 58

Anzucht und Präparation der Zellen – 58
Anzucht und Vorbereitung – 58
Immobilisierung der Spheroblasten auf multiwell slides – 58

ERGEBNISSE – 60

Experimente zur Induzierten Mutagenese – 60

Die Mutationsfrequenz läßt sich in *mph1*-Deletionsmutanten durch die Behandlung mit Mutagenen steigern – 60

Untersuchungen zur Stabilität repetitiver Sequenzen

in *mph1*-Deletionsmutanten – 62

Arretierte Replikationsgabeln führen in *E. coli* zur Instabilität von direkten Sequenzduplikationen – 62
 Entwicklung eines Systems zur Untersuchung der Stabilität von Sequenzduplikationen in *Saccharomyces cerevisiae* – 64
 Bestimmung von Reversionsrate und Reversionsfrequenzen des KanKanMX4-Fragmentes in *mph1*-Deletionsmutanten – 66
*Die Reversionsrate des KanKanMX4-Moduls ist in *mph1*-Deletionsmutanten erniedrigt – 66*
*Die Reversionsfrequenz nach Behandlung mit 4-NQO ist in *mph1*-Deletionsmutanten deutlich erniedrigt – 67*
*Die Reversionsfrequenz nach Behandlung mit Camptothecin ist in *mph1*-Deletionsmutanten nur leicht erniedrigt – 68*
*Die Reversionsfrequenz eines chromosomal integriertem KanKanMX4-Moduls ist nach Behandlung mit 4-NQO in *mph1*-Deletionsmutanten deutlich erniedrigt – 71*
*Die Reversionsfrequenz eines chromosomal integriertem KanKanMX4-Moduls ist nach Behandlung mit Camptothecin in *mph1*-Deletionsmutanten nur leicht erniedrigt – 72*

Untersuchungen zur Beteiligung der homologen Rekombination an den Reversionsereignissen in *Saccharomyces cerevisiae* – 73

Untersuchungen zum Zusammenspiel von Transläsionssynthese und fehlerfreier Umgehung replikationsarretierender Läsionen – 75

Die Reversionsfrequenzen nach Behandlung von rev3-Deletionsmutanten mit 4-Nitrochinolin-1-oxid sind deutlich erhöht – 77

Die Reversionsfrequenzen nach Behandlung von rev3-Deletionsmutanten mit Camptothecin sind nur leicht verändert – 78

Die spontanen Reversionsraten zeigen in rev3-Deletionsmutanten nur geringfügige Änderungen – 80

Die Deletion von RAD30 führt zu keiner Suppression des Mutatorphänotyps der mph1-Deletionsmutante – 81

In rad30-Deletionsmutanten läßt sich die Mutationsfrequenz durch Behandlung mit 4-Nitrochinolin-1-oxid erhöhen – 82

Die Reversionsfrequenzen des KanKanMX4-Moduls sind nach Behandlung mit 4-NQO in rad30-Deletionsmutanten gegenüber dem Wildtyp deutlich erniedrigt – 84

Die Reversion des KanKanMX4-Moduls ist in rad30-Deletionsmutanten nach Behandlung mit Camptothecin nur wenig verändert – 86

Untersuchungen zum Zusammenspiel unterschiedlicher Wege zur Prozessierung arretierter Replikationsgabeln – 87

Durch Mms4 werden *in vitro* Replikationsintermediate geschnitten – 87

Die Deletion von MMS4 führt nur zu einer moderaten Erhöhung der Mutationsraten – 89

In mms4-Deletionsmutanten ist die Reversionsfrequenz des KanKanMX4-Moduls nach Behandlung mit 4-NQO erniedrigt – 90

Die Reversionsfrequenz ist in mms4-Deletionsmutanten nach Behandlung mit Camptothecin stark erniedrigt – 91

Die mms4-Deletionsmutante zeigt eine erhöhte spontane Reversionsrate – 93

Untersuchungen zur Reversion des KanKanMX4-Moduls in sgs1-Deletionsmutanten – 94

Die sgs1-Deletionsmutante zeigt eine erhöhte spontane Reversionsrate – 97

Die Reversionsfrequenz des KanKanMX4-Moduls ist in sgs1-Deletionsmutanten nach Behandlung mit 4-NQO erniedrigt – 98

Die Reversionsfrequenz des KanKanMX4-Moduls ist in sgs1-Deletionsmutanten nach Behandlung mit Camptothecin erhöht – 100

Die Mutationsfrequenzen sind in sgs1-Mutanten deutlich erhöht – 101

Untersuchungen zur Reversion des KanKanMX4-Moduls in srs2-Deletionsmutanten – 103

Die Reversionsfrequenz des KanKanMX4-Moduls ist in srs2-Deletionsmutanten nach Behandlung mit 4-NQO erniedrigt – 106

Die Reversionsfrequenz des KanKanMX4-Moduls ist in srs2-Deletionsmutanten auch nach Behandlung mit Camptothecin erniedrigt – 109

srs2-Deletionsmutanten zeigen eine erniedrigte spontane Reversionsrate – 110

Effekt einer heterologen Expression von *E. coli* recG in *Saccharomyces cerevisiae* – 111

- Die Rolle von RecG bei der Reinitiation arretierter Replikationsgabeln: Experimentelle Befunde in *E. coli* – 111
- Durch heterologe Expression von *recG* in Wildtyp und *mph1*-Deletionsmutante lässt sich ein dominant negativer Effekt, aber keine Komplementation zeigen – 115
- Die Expression von recG führt zu einer Erniedrigung der spontanen Mutationsrate im Wildtyp und der mph1-Deletionsmutante – 115*
- Die Reversionsfrequenzen des KanKanMX4-Moduls sind nach Behandlung der Zellen mit 4-NQO sowohl im Wildtyp als auch in der mph1-Deletionsmutante erniedrigt – 117*
- Durch Expression von recG in Wildtyp und mph1-Deletionsmutante erfolgt keine Änderung der Reversionsfrequenzen des KanKanMX4-Moduls nach Behandlung der Zellen mit Camptothecin – 119*
- Die Expression von RecG führt zu einer Erhöhung der Sensitivität gegenüber Camptothecin im Wildtyp und zu einer Verringerung der Sensitivität gegenüber 4-NQO in mph1-Mutanten – 121*
- Das klonierte recG-Gen enthält eine Mutation – 122*

Intrazelluläre Lokalisation des Mph1-Proteins – 123

- Bestimmung der Lokalisation des Mph1-Sen-Proteins mit Hilfe von Immunoelektronenmikroskopie – 124
- Durch immuno-elektronenmikroskopische Aufnahmen lässt sich eine mitochondriale Lokalisation nicht bestätigen – 124*
- Bestimmung der Lokalisation des Mph1sen-Proteins mit Hilfe von Immunfluoreszenzmikroskopie – 126
- Das Mph1-Protein lässt sich mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nicht in den Mitochondrien nachweisen – 126*
- Untersuchung der Lokalisation von Mph1 in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus – 127*
- Untersuchung der Lokalisation von Mph1 in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus nach Behandlung mit 4-NQO – 128*

DISKUSSION – 130

Möglichkeiten für den Nachweis von Arresten des Replisoms – 130

- Biochemischer Nachweis von arretierten Replikationsgabeln – 130
- Nachweis von Doppelstrangbrüchen – 130*
- Nachweis von Holliday junctions – 130*
- Indirekte Systeme zum Nachweis von Reinitiationsintermediaten – 131
- In E. coli führen Mutationen von Genen, welche eine Instabilität der Replikationsgabeln bewirken, vermehrt zur Deletion von Sequenzduplikationen – 131*
- In Eukaryonten führt die Behandlung mit Mutagenen zu einer Erhöhung der Frequenzen von Deletionseignissen – 132*
- Eignet sich die Messung der Deletionen von Sequenzduplikationen für die Bestimmung von Replikationsarresten? – 133*

Welche Strukturen können bei einem Arrest des Replisoms entstehen? – 135

- Die Strukturen der bei einem Arrest der Replikation entstehenden Intermediate sind vielfältig und hängen von der Natur des Arrests ab – 135

Die unterschiedlichen Replikationsintermediate können auf unterschiedliche Arten aufgelöst werden – 136

Fehlerfreie Reinitiation nach Arresten an kleinen DNA-Läsionen – 136

Reinitiation an Strukturen, bei welchen die Helikase arretiert wurde – 137

Welche Läsionen werden durch die eingesetzten Chemikalien ausgelöst? – 140

4-NQO führt primär zu kleinen Läsionen der DNA – 140

Die Behandlung von Zellen mit Camptothecin führt zu unterschiedlichen Läsionen – 141

Untersuchungen zum Zusammenspiel fehlerfreier und fehlerbehafteter

Mechanismen zur Umgehung von DNA-Läsionen – 142

Das Mph1-Protein wird für die fehlerfreie Umgehung kleiner DNA-Läsionen benötigt – 142

Das Mph1-Protein wird für die fehlerfreie Umgehung eines spezifischen Substrates von DNA-Läsionen benötigt – 143

Die vorhandenen Daten deuten auf eine spezifische Erkennung von DNA-Läsionen hin – 143

Das Mph1-Protein ist an einem rekombinativen Mechanismus zur Umgehung kleiner DNA-Läsionen beteiligt – 145

Die experimentellen Daten deuten auf eine Beteiligung von Mph1 an der Prozessierung von Replikationsintermediaten hin – 146

An welchem Prozeß könnte Mph1 beteiligt sein? – 146

Durch die heterologe Expression von *recG* wird der *mph1*-Phänotyp nicht komplementiert – 147

Das RecG-Protein ist an der Prozessierung kleiner DNA-Läsionen beteiligt – 147

An welchem Reinitiationsweg ist RecG beteiligt? – 149

Der Ausfall von *REV3* führt in An- und Abwesenheit von *MPH1* verstärkt zu Reversionsereignissen – 150

In Abwesenheit einer funktionalen Transläsionspolymerase ζ werden verstärkt rekombinative Prozesse für die Reinitiation genutzt – 150

Die enigmatische Rolle von Polymerase η – 153

Durch Rad30 werden kleine Läsionen der DNA größtenteils fehlerfrei umgangen – 153

Die Deletion von RAD30 führt nicht zu einer verstärkten Bildung von Doppelstrangbrüchen nach Behandlung der Zellen mit 4-NQO – 153

Auf Schäden, welche von Mph1 fehlerfrei umgangen werden, haben die Deletionen von RAD30 und REV3 unterschiedliche Einflüsse – 154

Sgs1 ist ein Regulator von Rekombinationsprozessen – 155

Sgs1 ist an der Prozessierung unterschiedlicher Läsionen beteiligt – 155

Sgs1 ist offenbar nicht an der vermehrten Bildung von Holliday junctions beteiligt – 156

Srs2 ist ein positiver Regulator von Rekombinationsprozessen – 157

Über das Zusammenspiel von Mms4 und Mph1 – 159

Mms4 ist an der Prozessierung eines zu Mph1 inversen Schadensspektrums beteiligt – 159

Der Mms4-Mus81-Komplex könnte an der Prozessierung mehrerer Substrate beteiligt sein – 160

ZUSAMMENFASSUNG – 165

LITERATURVERZEICHNIS – 168

ANHANG – 179

Verzeichnis ungebräuchlicher Abkürzungen – 179

Oligonukleotidsequenzen – 179

Nukleotid- und deduzierte Aminosäuresequenz von *recG* aus *E. coli* – 180

Multipler Sequenzvergleich von ausgewählten putativen RecG-Orthologen – 182

EINLEITUNG

Replikation in E. coli

Initiation der Replikation

Der Prozeß der Replikation läßt sich in *E. coli* in drei Schritte unterteilen. Zunächst erfolgt am Replikationsursprung (*origin of replication*) die strikt regulierte Initiation. Nach der Initiation werden die Tochterstränge der DNA mit mindestens 1000 Basenpaaren pro Sekunde synthetisiert. Auf der dem Replikationsursprung gegenüberliegenden Seite wird die Replikation schließlich angehalten (HYRIEN, 2000).

Für eine erfolgreiche Zellteilung muß gewährleistet werden, daß die Tochterzelle genau eine Kopie des Chromosoms bekommt. Dies ist nur möglich, wenn die Replikation genau einmal während des Zellzyklus erfolgt. Die Replikation muß einerseits abgeschlossen sein, bevor die Zellteilung erfolgt. Es darf aber andererseits nicht zu einer Überreplikation kommen. Sowohl für pro- als auch für eukaryontische Organismen, die bisher untersucht wurden, konnte gezeigt werden, daß die Initiation der Replikation genau einmal pro Zellzyklus erfolgt (BOYE *et al.*, 2000), wobei bei Prokaryonten die Zellzyklen verschachtelt sein können. Man findet in schnell wachsenden Zellen dann noch vor der eigentlichen Teilung der Zellen erneute Initiationsereignisse an den Replikationsursprüngen.

Um die Synchronisation von Initiation und Zellteilung zu gewährleisten, gibt es in *E. coli* eine Reihe unterschiedlicher, fein abgestimmter Mechanismen (BOYE *et al.*, 2000). Einer dieser Mechanismen ist die Bindung der replikativen Helikase DnaB an die einzelsträngige DNA der Matrize des *lagging strand*. Um eine Bindung an falscher Stelle zu verhindern, ist DnaB nicht allein in der Lage an einzelsträngiger DNA zu binden. DnaB bildet einen Komplex mit DnaC. Durch diese Komplexbildung ist DnaC in der Lage, mit dem Initiatorprotein DnaA zu interagieren. Zusätzlich wird durch die Interaktion mit DnaB eine DNA-Bindestelle aktiviert, durch welche erst eine Bindung an DNA möglich ist (MARIANS, 2000).

DnaA erkennt spezifisch den Replikationsursprung *oriC* und bindet dort. Hierdurch wird die Struktur des Replikationsursprungs dergestalt geändert, daß die Doppelhelix aufgeschmolzen wird (KECK & BERGER, 2000). Durch die Interaktion von DnaA mit dem DnaB-DnaC-Komplex kann der letzte an die DNA binden. Die initiale Replikationsblase wird auf diese Weise mit zwei DnaB-Hexameren beladen. Anschließend bindet die Primase DnaG im Initiationsbereich, welches für die Synthese der Primer benötigt wird. Durch eine Interaktion von DnaG und DnaB wird der erste Primer gebildet, wobei sich

am Primerende das PolIII-Holoenzym anlagert. Durch die Interaktion zwischen der τ -Untereinheit der Polymerase und DnaB kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der Helikasefunktion von DnaB. Da die Bindung von DnaB spezifisch an der Matrize des *lagging strand* erfolgt, kann durch die Interaktion die Polymerase zur *lagging-strand*-Synthese definiert werden (MARIANS, 2000).

Das PolIII-Kernenzym wird aus der α -Untereinheit mit der Polymerase-Aktivität, der ϵ -Untereinheit mit der 3'-5'-Exonukleaseaktivität (*proof reading*) und der θ -Untereinheit, deren Funktion bisher nicht bekannt ist, gebildet (KNIPPERS, 1997). Zwei PolIII-Kernenzyme werden über die τ -Untereinheit zusammengehalten (KIM *et al.*, 1996). Die Prozessivität von PolIII wird durch die β -Untereinheit (*sliding clamp*) massiv gesteigert. Diese Untereinheit besteht in *E. coli* aus einem Proteindimer, welches einen Ring um die DNA bildet, wodurch ein Abfallen der Polymerase von der DNA weitgehen verhindert wird. In Eukaryonten besteht die *sliding clamp* aus einem Trimer, welches mit PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) bezeichnet wird (KECK & BERGER, 2000).

Die Beladung der DNA mit der *sliding clamp* erfolgt durch den γ -Komplex (*clamp loader*). Nach Bindung von ATP bildet die β -Untereinheit einen Komplex mit dem *clamp loader*, wobei durch diese Interaktion der Ring geöffnet wird, so daß die DNA eingefädelt werden kann. Durch die folgende Hydrolyse des ATP geht die Interaktion des γ -Komplex mit der *sliding clamp* verloren, so daß sich diese um die DNA schließt (BAKER & BELL, 1998).

Wird nach der Bildung des ersten Primers das PolIII-Holoenzym an die Primerenden gebunden, kommt es zu einer Interaktion der β -Untereinheit mit DnaA. Durch diese Interaktion wird DnaA inaktiviert, indem eine Hydrolyse des durch DnaA gebundenen ATPs erfolgt. Durch diese Inaktivierung wird insbesondere zu Beginn der Replikation eine erneute Initiation am *oriC* unterbunden. Zusammen mit weiteren Mechanismen (für Details siehe BOYE *et al.*, 2000 sowie BAKER & BELL, 1998) kann auf diese Weise gewährleistet werden, daß die Replikation am Replikationsursprung genau einmal pro Zellzyklus initiiert wird.

Auch in Eukaryonten ist die Initiation der Replikation strikt reguliert. Ein zusätzliches Problem gegenüber Bakterien ist, daß Eukaryonten mehrere *origins* besitzen. In Eukaryonten wird der Regulationsprozeß für die einmalige Initiation auch als *licensing* bezeichnet. Dieser Begriff beruht auf dem Modell, daß jeder *origin* einmal pro Zellzyklus eine Lizenz zur Initiation erhält. Hieran sind in *Saccharomyces cerevisiae* u.a. sowohl die MCM-Proteine (*mini-chromosome maintenance*) als auch Cykline und die cyklin-abhängigen Kinasen (Cdks) beteiligt, welche den Präreplikationskomplex am *origin* bilden. Nach Beginn der Replikation wird den *origins* die Lizenz »entzogen«, indem z.B. das Protein, welches für das Aufladen der MCMs notwendig ist, phosphoryliert und aufgrund der Phosphorylierung degradiert wird. Zusätzlich werden die MCM-Proteine während der S-Phase ebenfalls phosphoryliert und aus dem Kern transportiert, so daß kein Präreplikationskomplex mehr gebildet werden kann (BOYE *et al.*, 2000).

Aufgrund der in Eukaryonten weitaus höheren Komplexität der Prozesse im Verlauf der Replikation wurden die im folgenden vorgestellten Modelle fast ausschließlich anhand von Experimenten in *E. coli* entwickelt. Daher beschränkt sich die Darstellung auf die für *E. coli* entwickelten Modellvorstellungen, da das Gesamtbild der ablaufenden Prozesse in Eukaryonten noch wesentlich lückenhafter als in Bakterien ist.

Die Replikation muß vor der Zellteilung abgeschlossen werden

Neben einer strikten Regulation der Initiation muß allerdings auch gewährleistet werden, daß die Teilung der Zellen erst dann erfolgt, wenn die Replikation abgeschlossen ist, so daß jede Zelle eine Kopie des Chromosoms enthält. Einen Hinweis darauf, daß die Replikation nicht grundsätzlich reibungslos verläuft, liefern spezielle Terminationsbereiche des *E. coli*-Chromosoms.

Die Termination der Replikation erfolgt normalerweise symmetrisch gegenüber des Initiationsbereiches in einer Region, in welcher nach vollendeter Replikation auch die Decatenation der zirkularen Chromosomen durch die Topoisomerase IV stattfindet. Zusätzlich findet man in dieser Region spezielle Sequenzbereiche, welche mit *ter* bezeichnet werden und das Tus-Protein binden. Dieser *ter*/Tus-Komplex blockiert das Vorschreiten der Replikationsgabel durch die Hemmung der replikativen Helikase DnaB. Die *ter*-sites sind derart angeordnet, daß sie die Replikation nur dann hemmen, wenn eine Replikationsgabel den normalen Terminationsbereich überlaufen hat, da sie dort nicht auf die aus der Gegenrichtung kommende Replikationsgabel trifft. Die Entwicklung derart spezialisierter Terminationssignale ist ein Hinweis darauf, daß es im Zuge der Replikation zu einem asynchronen Vorschreiten beider Replikationsgabeln kommen kann (ROTHSTEIN *et al.*, 2000).

Dies ist u.a. dann der Fall, wenn es während der Replikation zu einem Arrest einer Replikationsgabel kommt. Ist dieser Arrest irreversibel, könnte die Replikation nicht beendet werden, da die zweite Replikationsgabel an den *ter*/Tus-Komplexen dauerhaft arretiert wird. In diesem Fall könnte die Replikation nicht abgeschlossen werden, was den Tod der betroffenen Zelle zur Folge hat. Es muß also Mechanismen geben, durch welche die Replikation an arretierten Replikationsgabeln wieder reinitiiert werden kann, um einen Abschluß der DNA-Synthese zu ermöglichen.

In den folgenden Abschnitten soll die Struktur der Replikationsgabeln kurz dargestellt und erläutert werden, durch welche Barrieren die Replikation abseits der Terminationsbereiche arretiert werden kann. Anschließend sollen die bisher bekannten Mechanismen beschrieben werden, welche es den Zellen erlauben, die DNA-Synthese arretierter Replikationsgabeln abseits des Replikationsursprungs zu reinitiiieren.

Die Replikation erfolgt in stationären Replikationskomplexen

Im Verlauf der Elongation werden durch die DNA-Polymerasen an einem 3'-Primerterminus die neu zu inkorporierenden Nukleotide angehängt. Da die Stränge

der DNA antiparallel sind und die Syntheserichtung der DNA-Polymerasen von 5' nach 3' verläuft, muß auch die Replikation des *leading* und des *lagging strand* antiparallel verlaufen. Wie bereits erwähnt (siehe Seite 10), sind in *E. coli* beide Polymerase III-Holoenzyme über die τ -Untereinheit miteinander verknüpft, so daß die Replikationsrichtung beider Enzymkomplexe gleich ist (KIM *et al.*, 1996). Es wurde aus diesem Grund postuliert, daß die Matrize des *lagging strand* eine Schleife ausbildet, durch welche der Strang um 180° gedreht ist, so daß eine gleichgerichtete Polymerisationsrichtung beider Polymerasen möglich ist (VOET & VOET, 1992). Dieses Modell wurde auch als *trombone model* der Replikation bezeichnet (FALASCHI, 2000).

Um die Synthese der neuen Stränge zu ermöglichen, müssen sich die DNA und die Polymerasen relativ zueinander bewegen, wobei lange nicht eindeutig geklärt war, ob sich die DNA oder die Polymerasen bewegen (COOK, 1999).

In *Bacillus subtilis* wurde mit Hilfe eines Fusionsproteins aus der katalytischen Untereinheit der replikativen Polymerase PolC und Gfp in langsam wachsenden Zellen gezeigt, daß ein distinkter Fluoreszenzpunkt auftritt, welcher nahezu während der gesamten Replikation stationär bleibt. Erst kurz vor Ende der Replikation lassen sich zwei dicht beieinanderliegende Punkte unterscheiden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß in *Bacillus subtilis* das Replisom ein stationärer Komplex ist, durch welchen die DNA quasi hindurchgezogen wird (LEMON & GROSSMAN, 1998).

Die Bewegung der DNA relativ zum stationären Replisom konnte ebenfalls gezeigt werden, indem ein sequenzspezifisches DNA-Bindeprotein mit Yfp (*yellow fluorescent protein*) fusioniert wurde. Durch die Bindung dieses Fusionsproteins an die DNA ließ sich beobachten, daß sich, im Gegensatz zum der Focus des Polymerase-Gfp-Fusionsproteins, zwei Foci des Yfp-Fusionsproteins in die entgegengesetzten Zellpole bewegten. Dies ist am einfachsten dadurch zu erklären, daß die replizierte DNA durch das stationäre Replisom gezogen und die replizierten Bereiche in die Zellpole geschoben werden (LEMON & GROSSMAN, 2000).

Dies konnte auch für humane Zellen bestätigt werden. In HeLa-Zellen wurde durch Immun-Fluoreszenz- und Immun-Elektronenmikroskopie nachgewiesen, daß im Zellkern distinkte Replikationskomplexe an eine Matrix gebunden sind (HOZÁK *et al.*, 1993). Mit Hilfe von Immun-Elektronenmikroskopie wurde gezeigt, daß etwa die gleiche Zahl von Replikationsfoci auch nach Entfernung von 90% des Chromatins noch im Zellkern vorhanden ist (HOZÁK *et al.*, 1993). Zusätzlich konnte in diesen Foci Polymerase α , welche zusammen mit der Primase für die Synthese der Primer zuständig ist (BAKER & BELL, 1998), nachgewiesen werden. Offensichtlich findet also auch in humanen Zellen die Replikation in sogenannten *replication factories* statt, welche an eine Matrix gebunden sind und durch die sich die DNA hindurchbewegt (HOZÁK *et al.*, 1993).

Dies wurde auch durch Experimente in anderen Säugerzellen gestützt, in welchen ein PCNA-GFP-Fusionsprotein exprimiert wurde. In diesen Zellen wurde die replizierte DNA durch Inkorporation von BrdU mit anschließender Antikörpermarkierung sichtbar gemacht. Es ließ sich zeigen, daß die PCNA-Foci mit den Foci der Inkorporation von

BrdU übereinstimmten und daß diese Foci sich während der Replikation nicht bewegen (LEONHARDT *et al.*, 2000).

Mögliche Strukturen des Replisoms

In *Saccharomyces cerevisiae* sind die Polymerasen Pol δ sowie Pol ϵ für die Replikation der DNA zuständig. In Hefe wurde untersucht, ob die Orientierung bezüglich der Replikation eines Gens Einfluß auf das Mutationsspektrum hat. Diese Experimente wurden sowohl in Pol δ *exo*⁻- als auch in Pol ϵ *exo*⁻-Mutanten durchgeführt. Hierbei ließen sich in beiden Mutanten in Abhängigkeit der Orientierung des Gens signifikant unterschiedliche Mutationsspektren nachweisen. Dies hat zu der Hypothese geführt, daß in Hefe jeweils eine der Polymerasen den *leading* und die andere den *lagging strand* synthetisiert (KARTHIKEYAN *et al.*, 2000). Diese Befunde werden zusätzlich dadurch unterstützt, daß für Pol δ eine Interaktion mit Rad27 nachgewiesen werden konnte. Bei Rad27 handelt es sich um eine 5'-*flap*-Endonuklease, für die nur eine Funktion bei der *lagging-strand*-Synthese plausibel ist (WAGA & STILLMAN, 1998). Diese Interaktion legt die Hypothese nahe, daß Pol δ für die Synthese des *lagging strand* zuständig ist (JIN *et al.*, 2001). Zusätzlich wurde durch *in-vitro*-Replikationsexperimente in zellfreien *Xenopus*-Extrakten nachgewiesen, daß Pol ϵ eine spezifische Rolle bei der Replikation zukommt (WAGA *et al.*, 2001). Allerdings sind die Evidenzen insbesondere in anderen Organismen als *Xenopus* keineswegs so klar, daß diese Aufgabenteilung als gesichert gelten kann. Es ist auch durchaus denkbar, daß Pol ϵ nur spezielle Aufgaben wie die Reifung von Okazaki-Fragmenten übernimmt (WAGA & STILLMAN, 1998).

Der genaue Aufbau des Replikationskomplexes insbesondere in Eukaryonten ist immer noch unbekannt. Wie bereits ausgeführt, sind die Proteinkomponenten bei der Replikation in Bakterien weitgehend bekannt, während in Eukaryonten z.B. die replikativen Helikasen noch immer nicht mit Sicherheit identifiziert wurden. Möglicherweise erfolgt die Entwindung durch die MCM-Proteine (*mini-chromosome maintenance*), wobei auch diese Hypothese nicht gesichert ist (LASKEY & MADINE, 2003).

Für die Polymerasen δ und ϵ aus *Saccharomyces cerevisiae* wurden Daten veröffentlicht, nach welchen beide Polymerasen jeweils Homodimere bilden (DUA *et al.*, 2000; BURGERS *et al.*, 1998). Der Nachweis für Pol ϵ erfolgte hierbei durch Expression und Reinigung des Hefe-Proteins aus Sf9-Insektenzellen (DUA *et al.*, 2000). Hingegen wurde es nach Reinigung aus Hefe nur als Monomer erhalten (CHILKOVA *et al.*, 2003). Es ist also nicht geklärt, ob die Polymerasen als ein Homo- oder Heterodimer während der Replikation in *Saccharomyces cerevisiae* vorliegen.

Aus diesen Befunden lassen sich im Licht eines stationären Replisoms unterschiedliche Hypothesen ableiten. Es wäre möglich, daß jeweils die *leading* und die *lagging strand* Polymerase einer Replikationsgabel gekoppelt sind (VOET & VOET, 1992). Durch SAWITZKE & AUSTIN wurde hingegen vorgeschlagen, daß jeweils eine Polymerase des *leading strand* mit der *lagging strand* Polymerase der anderen Replikationsgabel interagieren könnte. Dieses Modell hätte den Vorteil, daß bei einem stationären Replisom durch den Zusam-

menhalt der Replikationsgabeln besser erklärt werden kann, wie eine Trennung der Chromosomen erreicht wird. In Bakterien erscheint es plausibel, daß durch ein stationäres Replisom die *origins* quasi in die Zellpole geschoben werden (SAWITZKE & AUSTIN, 2001).

Durch FALASCHI wurde ein Modell entwickelt, nach welchem es zu einer Interaktion jeweils der beiden Polymerasen des *leading* und des *lagging strand* kommt. Dies würde zu den Daten passen, nach welchen sowohl Polymerase δ als auch Polymerase ϵ Homodimere bildet (DUA *et al.*, 2000; BURGERS *et al.*, 1998). Formal entstehen hierbei vier Schlaufen, welcher in ihrer Form einem Schmetterling ähneln, so daß das Modell als »Schmetterlingsmodell« der Replikation bezeichnet wurde. Ein Vorteil dieses Modells ist u.a., daß die Syntheserichtung der Polymerasen bei einer Kopplung beider *leading*- und *lagging-strand*-Polymerasen gleich ist (FALASCHI, 2000). Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß bei einer Kopplung der Synthese des *leading* und des *lagging strand* aufgrund der Antiparallelität der Stränge durch die Matrize für die Synthese des *lagging strand* eine Schleife ausgebildet werden muß, damit die Replikation unidirektional erfolgen kann. Nimmt man hingegen an, daß jeweils die *leading* und *lagging strand* Synthese gekoppelt sind, wäre eine gemeinsame Syntheserichtung der *lagging strand* Polymerasen ohne eine Biegung der Matrize des *lagging strand* um 180° möglich.

Arreste der Replikation

Der Elongationsprozeß der replikativen Polymerasen kann durch eine Reihe von Hindernissen aufgehalten werden. Wie bereits erwähnt (siehe Seite 12) gibt es spezielle Terminationsbereiche (*ter-sites*) auf dem Chromosom von *E. coli*, welche sich auf der dem *oriC* gegenüberliegenden Seite befinden und an welchen die Replikation angehalten wird (HYRIEN, 2000; ROTHSTEIN *et al.*, 2000).

Diese DNA-Protein-Komplexe sind allerdings nicht die einzigen Barrieren, auf welche die Replikationsgabeln auf dem Weg vom Replikationsursprung zu den Terminationsbereichen stoßen können. Das Fehlen wichtiger Faktoren wie z.B. Desoxyribonukleotide hat einen Stop der Replikation zur Folge. Zudem stößt das Replisom während der Elongation immer wieder auf DNA-Protein-Komplexe wie an DNA gebundene Repressoren, RNA-Polymerasen/DNA-Komplexe, gebundene Reparaturenzyme etc. oder Sekundärstrukturen wie G-Quadrupel-Strukturen, welche das Voranschreiten behindern können (HYRIEN, 2000; OAKLEY & HICKSON, 2002).

Neben diesen vergleichsweise großen Hindernissen können z.B. auch Läsionen in der DNA wie z.T. recht kleine Basenmodifikationen oder Einzelstrangbrüche die Replikation arretieren (COX, 2002). Die replikativen Polymerasen besitzen eine außerordentlich hohe Genauigkeit, welche, neben anderen Faktoren, auch darauf zurückzuführen ist, daß im aktiven Zentrum sowohl die Größe als auch die korrekte Position des neu zu bildenden Basenpaares stimmen muß, damit ein Nukleotid durch die Polymerase an das Primerende angefügt wird (KUNKEL & BEBENEK, 2000; KOOL, 2002). Die replikativen Polymerasen sind aus diesem Grund in vielen Fällen nicht in der Lage, über veränderte Basen im

template hinweg zu synthetisieren (COX, 2002). Kann die Replikation nicht reinitiiert werden, so führt dies zum Tod der betreffenden Zelle (KOGOMA, 1997).

Arreste des Replisoms sind nicht grundsätzlich für die Komplettierung des Zellzyklus hinderlich, sondern es gibt eine ganze Reihe von Beispielen, bei welchen ein Arrest der Replikation bewußt von einer Zelle herbeigeführt wird.

Als ein Beispiel für eine notwendige Barriere der Replikation wurden bereits die Terminationsbereiche genannt, wobei deren genaue Funktion bisher nicht eindeutig geklärt wurde. Eine Deletion des *tus*-Gens hat unter Normalbedingungen offensichtlich keine Konsequenz für *E. coli*-Zellen. Allerdings ist auffällig, daß zwischen dem Replikationsursprung und den Terminationsbereichen die Transkriptionsrichtung 90% aller Gene in Richtung der Replikation orientiert ist. Man vermutet aus diesem Grund, daß die Terminationsbereiche verhindern sollen, daß es zu einer frontalen Kollision der Replikation und der Transkription kommt, wenn eine der Replikationsgabeln die Elongation früher als die zweite Replikationsgabel beendet hat (HYRIEN, 2000). Unterstützt wird diese durch den Befund, daß in einem *in-vitro*-Experiment die frontale Kollision eines Transkriptionskomplexes mit dem Replikationsapparat des Bakteriophagen T4 zu einem längeren Arrest führt, während eine Kollision bei gleicher Syntheserichtung beider Komplexe nur zu einer kurzen Verzögerung führt (LIU *et al.*, 1995).

Ein ähnliches Phänomen findet man auch bei *Saccharomyces cerevisiae*. Hier wird die Replikation vor den Genen, welche für die ribosomale RNA codieren, polar blockiert. Die ribosomalen Gene sind in *Saccharomyces cerevisiae* wie in vielen anderen eukaryontischen Organismen in einigen hundert Wiederholungen vorhanden, wobei jede Wiederholung eine Transkriptionseinheit mit einer intergenischen Region bildet, auf welcher die regulatorischen Elemente für die Transkription vorhanden sind. Durch eine solche Transkriptionseinheit wird ein großer 35 S-rRNA-Vorläufer gebildet, welcher dann in die einzelnen rRNAs gespalten wird (HYRIEN, 2000).

Ähnlich wie auf den jeweiligen chromosomalen Hälften bei *E. coli* ist auch die Transkription der rDNA in *Saccharomyces cerevisiae* unidirektional. Vor den rDNA-Bereichen finden sich zwei Sequenzabschnitte, welche mit NTS1 und NTS2 bezeichnet werden und in welchen sich eine *replication fork barrier* (RFB) befindet. Diese erlaubt die Replikation nur in Richtung der 35 S-RNA-Transkription, aber nicht in umgekehrter Richtung. Ähnlich wie in *E. coli* könnten diese Barrieren die frontale Kollision von Replikation und Transkription in Bereichen verhindern, in welchen auch während der S-Phase massiv transkribiert wird (HYRIEN, 2000).

Interessanterweise ist diese Barriere gleichzeitig ein *hotspot* für homologe Rekombination. Diese erhöhte Rekombinationsfrequenz ist abhängig vom Rad52-Protein (ZOU & ROTHSTEIN, 1997) und ist vermutlich auf die Replikationsarreste in dieser Region zurückzuführen (OAKLEY & HICKSON, 2002).

In den folgenden Abschnitten soll zunächst ausgeführt werden, welche Strukturen bei Arresten der Replikation entstehen können. Um nach einem Arrest die DNA-Synthese

beenden zu können, muß eine Reinitiation der Replikation erfolgen. Welche Mechanismen hierbei denkbar sind, wird daran anschließend ausgeführt.

Unterschiedliche Barrieren führen zu unterschiedlichen Replikationsintermediaten

Durch eine Reihe biochemischer Experimente konnte gezeigt werden, daß sich die Replikationsintermediate, welche bei einem Arrest der Replikation entstehen, in Abhängigkeit der arretierenden Struktur unterscheiden (COX, 2001). Am auffälligsten sind die Unterschiede zwischen Arresten an kleinen DNA-Läsionen, welche vornehmlich die replikativen DNA-Polymerasen anhalten, und an Strukturen, durch welche die replikativen Helikasen blockiert werden.

Kleine Läsionen führen zu einer Entkopplung der *leading* und *lagging strand* Synthese

Arreste der Synthese des lagging strand

Im Falle des Arrestes einer replikativen Polymerase ist es von Bedeutung, auf welchem Strang die arretierende Läsion liegt. Für eine Läsion auf der Matrize des *lagging strand*, konnte durch *in-vitro*-Experimente gezeigt werden, daß sowohl im Falle eines Thymin-Dimers (CORDEIRO-STONE *et al.*, 1999) als auch einer abasische Stelle (HIGUCHI *et al.*, 2003) nicht das ganze Replisom arretiert, sondern daß nur die Synthese des begonnenen Okazaki-Fragments nicht beendet werden kann. Offenbar wird die Synthese an der Läsion abgebrochen und die Polymerase beginnt mit der Elongation des nächsten auf der *lagging strand* Matrize gebildeten Primers. Auf diese Weise verbleibt eine relativ kleine Lücke im *lagging strand* (SVOBODA *et al.*, 1995; CORDONNIER *et al.*, 1999). Dieser Bereich kann nach Abschluß der Replikation durch rekombinative Prozesse (RUPP *et al.*, 1971) oder auf Kosten der Genauigkeit durch den Einsatz spezialisierter Translasiationspolymerasen geschlossen werden (COX, 2002). Diese Befunde konnten mittlerweile in *E. coli* auch *in vivo* bestätigt werden (PAGÈS & FUCHS, 2003).

Arreste der Synthese des leading strand

Bei Arresten der *leading strand* Polymerase ist die Situation anders, da hier kein Primer hinter der Läsion für eine weitere Elongation zur Verfügung steht. Die Bildung neuer Primer abseits vom Replikationsursprung wird von der Zelle aktiv verhindert, um eine Überreplikation zu vermeiden (BOYE *et al.*, 2000; siehe Seite 10). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte im Falle einer arretierenden Läsion auf der *leading strand* Matrize gezeigt werden, daß es zu einem Verlust der Synchronisation der Replikation beider Stränge kommt. Es scheint so, daß nach einem Arrest der *leading strand* Polymerase der *lagging strand* noch um etwa 1–2 kb weiter verlängert wird (CORDEIRO-STONE *et al.*, 1999;

CORDONNIER *et al.*, 1999; HIGUCHI *et al.*, 2003; PAGÈS & FUCHS, 2003). Insbesondere nach dem »Schmetterlingsmodell« von FALASCHI (siehe Seite 15) ist dieser Prozeß leicht vorstellbar. Da die Helikasen nicht blockiert sind, können die parentalen Stränge weiter entwunden und die DNA-Synthese von den nicht betroffenen Polymerasen fortgeführt werden. In diesem Fall entsteht zwischen der Helikase und der arretierten Polymerase eine einzelsträngige DNA-Schleife. Dies könnte eine mögliche Struktur sein, welche der Zelle spezifisch einen Polymerasearrest anzeigt.

Im Falle einer massiven Schädigung der DNA kommt es in *E. coli* zu einer Induktion der SOS-Antwort durch eine Aktivierung der Coproteaseaktivität von RecA, wodurch der LexA-Repressor sich effektiver spaltet und die Transkription einer ganzen Reihe von Genen ermöglicht (siehe auch Seite 20). Die Aktivierung von RecA ist wiederum von einzelsträngiger DNA abhängig (GOODMAN & TIPPIN, 2000). Es wäre also möglich, daß häufige Arreste der Replikation an kleinen DNA-Schäden zu einer Akkumulation von aktiviertem RecA führen, welches schließlich die SOS-Antwort auslöst.

Arreste der replikativen Helikasen

Arreste an Protein-DNA-Komplexen

Strukturen wie DNA-Proteinkomplexe *etc.* sollten zu einer anderen Art von Arrest führen als ein Block durch DNA-Läsionen. Bei stabilen DNA-Protein-Komplexen, Sekundärstrukturen oder *interstrand crosslinks* kann davon ausgegangen werden, daß es primär zu einer Kollision zwischen der replikativen Helikase und dem Hindernis kommt. In diesem Fall kann die DNA nicht weiter entwunden werden, was zu einem schnellen Arrest des gesamten Replisoms führt.

Für die Vermeidung derartiger Arreste gibt es vermutlich eine Reihe akzessorischer Proteine. Ein Beispiel ist das Rep-Protein aus *E. coli*. Hierbei handelt es sich um eine nichtessentielle Helikase mit 3'→5'-Polarität, für welche *in vitro* gezeigt wurde, daß sie Proteine von der DNA entfernen kann (MICHEL, 2000). In *rep*⁻-Mutanten ist die Dauer der Replikation wesentlich verlängert (LANE & DENHARDT, 1975). Aus diesen Gründen wurde postuliert, daß Rep u.a. für die Entfernung von Proteinen und Sekundärstrukturen zuständig ist, um das Voranschreiten der Replikationsgabel zu erleichtern (MICHEL, 2000).

Fehlt die Rep-Helikase, so erfolgt die Reinitiation offenbar mit Hilfe rekombinativer Prozesse, da *rep*⁻ *recBC*⁻-Doppelmutanten einen synthetisch letalen Phänotyp zeigen (UZEST *et al.*, 1995) und in der Doppelmutante verstärkt Doppelstrangbrüche auftreten (MICHEL *et al.*, 1997). Nach Arresten der Replikation an Proteinkomplexen wird in Abhängigkeit von RuvAB, welches an *Holliday junctions* bindet und diese durch *branch migration* verschieben kann, eine *Holliday junction* ausgebildet, welche durch RuvC geschnitten wird. Das hierbei entstehende doppelsträngige DNA-Ende wird dann durch den RecBCD-Komplex, der durch eine kombinierte Exonuklease- und Helikaseaktivität einzelsträngige 3'-Enden erzeugt, prozessiert und für die Reinitiation genutzt. Fehlt der

RecBCD-Komplex, so kann offensichtlich keine Reinitiation der Replikation mehr erfolgen (SEIGNEUR *et al.*, 1998, 2000). Dies ist in Mutanten ähnlich, in welchen es vermehrt zu Arresten der Replikation aufgrund einer Destabilisierung der Replikationsgabeln durch Deletion von *hold*, einer Untereinheit des *clamp loader*, kommt (FLORES *et al.*, 2001).

Allerdings kann die synthetische Letalität durch die zusätzliche Deletion von *ruvAB* unterdrückt werden, was darauf hindeutet, daß in Abwesenheit von RuvAB eine Reinitiation möglich ist. Trotzdem erfolgt an Arresten jedoch bevorzugt die Bildung von *Holliday junctions* zum Zwecke der Reinitiation (SEIGNEUR *et al.*, 1998, 2000).

Die Bildung von *Holliday junctions* kann vermutlich durch eine ganze Reihe von Proteinen erfolgen. Hierzu gehören neben RuvAB und RecG (siehe Seite 21) auch RecA (ROBU *et al.*, 2001; COX, 2001). Es konnte gezeigt werden, daß in *dnaB_{ts} recBC*-Mutanten bei nichtpermissiver Temperatur vermehrt Arreste der Replikation stattfinden. Das Auftreten doppelsträngiger DNA war hierbei von RecA abhängig (SEIGNEUR *et al.*, 2000).

Arreste an replication fork barriers

Biochemisch wurden bisher insbesondere arretierte Replikationsgabeln am *ter*/Tus-Komplex in *E. coli* sowie in *Saccharomyces cerevisiae* an der Replikationsbarriere vor der rDNA beschrieben. Wie am erstgenannten Beispiel ausgeführt wird, ist es möglich, daß sich derartige, von der Zelle »absichtlich« herbeigeführte Arreste von spontanen Arresten an DNA-Protein-Komplexen unterscheiden.

Der Arrest an einem *ter*/Tus-Komplex wurde anhand einer in ein Plasmid eingesetzten *ter-site* untersucht. Mittels dieses Systems wurde gezeigt, daß der Arrest eines Replisoms an einem *ter*/Tus-Komplex *in vitro* zu einer Replikationsgabel führt, bei welcher der *leading strand* rund 50–70 Nukleotide länger als der *lagging strand* ist (HILL & MARIANS, 1990). Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, daß es in einem *E. coli*-Stamm mit zwei ektopischen *ter-sites* im Chromosom zu einer Akkumulation von Doppelstrangbrüchen kommt, wobei diese Doppelstrangbrüche nicht von RuvABC abhängig sind. Die experimentellen Befunde deuten darauf hin, daß die Replikationsgabeln intakt bleiben. Es erfolgt nach dem Arrest der Beginn der nächsten Replikationsrunde. Wenn dieser zweite Satz von Replikationsgabeln die arretierten Gabeln erreichen, entstehen lineare DNA-Fragmente und damit die beobachteten Doppelstrangbrüche (BIDNENKO *et al.*, 2002). Dies deutet also darauf hin, daß der Arrest der Replikation an einer natürlichen Terminationsstelle im Gegensatz zu den in *rep*- oder *dnaB_{ts}*-beobachteten Arresten nicht zur Ausbildung einer *Holliday junction* führt. Es scheint also so, daß an Komplexen, die einen Arrest der Replikation bewirken sollen, natürlicherweise eine Reinitiation der Replikation z.B. durch die Ausbildung einer *Holliday junction*, nicht stattfindet.

Dies steht allerdings im Kontrast zu den Befunden aus *Saccharomyces cerevisiae*, wo es an den bereits erwähnten Barrieren vor der rDNA zur Bildung von *Holliday junctions* kommt. Bezüglich der auftretenden Struktur konnte gezeigt werden, daß sich die Länge des *leading* und des *lagging strand* bei einer Replikationsgabel, welche an einer natürli-

chen Barriere vor den rDNA-*clustern* arretiert ist, kaum unterscheidet (GRUBER *et al.*, 2000). Durch diese nahezu gleichlangen Enden werden vermutlich *Holliday junctions* ausgebildet, da gezeigt wurde, daß die letzten im Bereich der rDNA vermehrt auftreten. Sofern die Bildung der *Holliday junctions* durch die Arrester der Replikation an der Replikationsbarriere zustande kommen (ZOU & ROTHSTEIN, 1997), unterscheiden sich diese Arrester von den Intermediaten, welche in *E. coli* am *ter*/Tus-Komplex entstehen.

Einzelstrangbrüche führen zu einem »Kollaps« der Replikation

Erreicht eine Replikationsgabel einen Einzelstrangbruch in der DNA, so wird dieser durch die Replikation in einen Doppelstrangbruch überführt (KUZMINOV, 2001). Die Polymerase erreicht das Ende des Stranges und verliert dann quasi das *template*, was ebenfalls zu einem Arrest der gesamten Replikation führt. Während bei Arresten an Läsionen bzw. DNA-Protein-Komplexen die Replikation z.B. durch Entfernung des Blocks oder durch den Einsatz von Transläsionspolymerasen fortgeführt werden könnte, ist dies bei einem Einzelstrangbruch nicht der Fall; es müssen rekombinative Mechanismen genutzt werden, um eine Ligation der Stränge und eine Reinitiation der Replikation zu ermöglichen. Aus diesem Grund wird der Arrest an einem Einzelstrangbruch im Gegensatz zu anderen Arten des Arrests auch manchmal als Kollaps der Replikation bezeichnet (siehe auch KUZMINOV, 1995; MICHEL, 2000).

Mechanismen zur Reinitiation arretierter Replikationsgabeln

Reinitiation der Replikation durch Transläsionssynthese

Eine Möglichkeit für die Reinitiation der Replikation ist der Einsatz spezialisierter DNA-Polymerasen, welche bisher in allen Organismen gefunden wurden. Diese Polymerasen haben in vielen Fällen eine im Vergleich zu den replikativen Polymerasen deutlich verringerte Genauigkeit auf ungeschädigten Matrizen, so daß ein verstärkter Einsatz zu einer erhöhten Mutationsrate führt (Cox, 2002).

In *E. coli* wurden bisher zwei Polymerasen charakterisiert, welche in der Lage sind, geschädigten Basen mit relativ hoher Frequenz zu überlesen. Hierbei handelt es sich um Polymerase IV, welche durch *dinB*-codiert wird, und Polymerase V (UmuD'₂C), welche auch als Mutasom bezeichnet wird (GOODMAN, 2002)

Der Einsatz von Pol V erfolgt hauptsächlich nach Auslösung der SOS-Antwort, welche z.B. bei einer massiven Schädigung der DNA ausgelöst wird und bei welcher es, neben verstärkter Transkription von Genen für Reparaturmechanismen wie die rekombinative oder die Nukleotidexcisionsreparatur, vermehrt zur Bildung von Pol V kommt (GOODMAN & TIPPIN, 2000).

In eukaryontischen Zellen wurde insbesondere in den letzten Jahren eine immer größere Zahl von Polymerasen gefunden, zu welchen in humanen Zellen u.a. die Poly-

merasen ζ , η , ι , κ , σ , μ und λ gehören. Diese werden vermutlich z.T. auch für die Reinitiation arretierter Replikationsgabeln eingesetzt. Ihnen kommen aber auch spezielle Funktionen, z.B. bei der Hypermuation in den variablen Bereichen der Immunglobuline zu, an welcher vermutlich die humanen Polymerasen η , ι und μ beteiligt sind (GOODMAN, 2002).

In *Saccharomyces cerevisiae* spielen insbesondere Rev1, Polymerase ζ (bestehend aus Rev3 und Rev7) sowie Polymerase η (Rad30) eine Rolle. Da insbesondere zu *REV3* und *RAD30* ein Reihe von Experimenten durchgeführt wurden, werden die Eigenschaften dieser Polymerasen ausführlich im Ergebnisteil dargestellt (siehe Seite 75).

Reinitiation nach Arrest der *leading strand* Polymerase

Die Modellvorstellung zur Überwindung eines Arrestes der Replikation an kleinen DNA-Läsionen sind in Abb. 1 schematisch dargestellt.

Eine Möglichkeit für eine fehlerfreie Reinitiation der Replikation im Falle des Arrestes von Polymerasen an kleinen Läsionen wurde bereits 1976 von HIGGINS *et al.* postuliert. Wie bereits ausgeführt (siehe Seite 17), entsteht im Falle des Arrests der *leading strand* Polymerase ein Replikationsintermediat, bei welchem der *lagging strand* etwa 1 kb über das Ende des *leading strand* hinaus verlängert ist. In diesem Fall kann es nach Entfernung des Replikationsapparates zu einem spontanen oder enzymatisch beschleunigten Zurücklaufen der Replikationsgabel kommen. Erfolgt dieses Zurücklaufen weit genug, kann der *leading* mit dem *lagging strand* hybridisieren. Hierbei entsteht eine Struktur, welche in der neueren Literatur oftmals als »*chicken foot*« bezeichnet wird und welche einer *Holliday junction* entspricht (OAKLEY & HICKSON, 2002). In diesem Fall kann das 3'-Ende des *leading strand* als Primer für eine weitere Elongation mit dem *lagging strand* als *template* dienen (»*polymerase strand switch*«). Sofern der Abbruch der Replikation direkt vor der Läsion erfolgt, wird auf diese Weise der *leading strand* über die Läsion hinaus elongiert. Durch die Auflösung der *Holliday junction* mittels *branch migration* in Richtung der Replikation steht hinter der Läsion ein 3'-Ende als Primer für die Reinitiation der Replikation zur Verfügung (HIGGINS *et al.*, 1976; COX, 2001; COX, 2002).

Die Auflösung dieser Struktur kann auch durch andere Mechanismen erfolgen. Sowohl vor als auch nach dem *polymerase strand switch* ist eine Degradation des Armes, welcher durch die Hybridisierung von *leading* und *lagging strand* gebildet wurde, durch Exonukleasen möglich (SEIGNEUR *et al.*, 1998). Handelt es sich allerdings bei dem Block um eine Läsion, so ist durch diesen Vorgang keine Überbrückung möglich, sondern die Polymerase wird bei dem Versuch der anschließenden Elongation wieder an der Läsion arretiert werden.

Die *Holliday junction* kann auch durch Resolvasen geschnitten werden. Auf diese Weise entsteht neben einem vollständigen Chromosom ein doppelsträngiges DNA-Ende. Dieses kann durch die Enzyme der Doppelstrangbruchreparatur prozessiert werden, wobei ein einzelsträngiger 3'-Überhang gebildet wird. Dieser kann mit Hilfe der homologen Rekombinationsenzyme unter Ausbildung eines *D-loop* (*displacement loop*) in das

intakte Schwesterchromosom eingeführt werden. Erfolgt die Invasion jenseits der Läsion, erhält man auch in diesem Fall ein 3'-Ende, welches verlängert werden kann, wodurch die Läsion fehlerfrei umgangen wurde. Durch entsprechende Auflösung des *D-loops* kann eine funktionelle Replikationsgabel wiederhergestellt werden (HYRIEN, 2000; MICHEL, 2000; MCGLYNN & LLOYD, 2002).

Zusätzlich ist es möglich, daß das neu gebildete, doppelsträngige DNA-Ende der *Holliday junction* bereits vor der Prozessierung durch Resolvasen durch die Enzyme der homologen Rekombination in die parentalen Stränge unter Ausbildung eines *D-loops* eingeführt werden könnte. Diese Annahme erscheint in verschiedener Hinsicht plausibel. Zum einen wird ein freies, doppelsträngiges DNA-Ende vermieden, welches eine potentielle Gefahr für die Zelle darstellt. Die *Holliday junction* würde erst dann aufgelöst werden, wenn das Ende bereits von den Enzymen der homologen Rekombination gebunden wurde (HYRIEN, 2000; MCGLYNN & LLOYD, 2002). Zum anderen wird eine weitere mögliche Gefahr verringert. Um die Überbrückung der Läsion zu ermöglichen, müßte die *Holliday junction* mit Hilfe von *branch migration* nahezu vollständig zurückgeschoben werden, bevor die Auflösung mit Resolvasen erfolgen dürfte. Nach der Prozessierung durch Resolvasen muß der verlängerte *leading strand* noch immer über die Abbruchstelle hinaus elongiert sein, da ansonsten eine Verlängerung unweigerlich wieder zu einem Arrest der Polymerase führt. Wird hingegen zunächst das doppelsträngige DNA-Ende durch die Enzyme der homologen Rekombinationsmaschinerie prozessiert, so ist die Gefahr verringert, daß durch ein frühes Schneiden der *junction* zusätzliche Stücke des neu synthetisierten Stranges abgeschnitten werden.

Reinitiation nach dem Kollaps einer Replikationsgabel an einem Einzelstrangbruch

Die Reinitiation der Replikation nach einem Kollaps der Replikationsgabel an einem Einzelstrangbruch ist schematisch im linken Teil von Abb. 2 dargestellt.

Wird von der Replikation ein Einzelstrangbruch der DNA erreicht, wird dieser in einen Doppelstrangbruch überführt. Es entsteht ein Teilfragment, welches in einem Doppelstrangbruch endet sowie ein vollständiges Chromosom mit einem *nick* oder *gap*. Prinzipiell kann hier die Reinitiation in gleicher Weise erfolgen, als wenn eine ausgebildete *Holliday junction* durch Resolvasen aufgelöst worden wäre. Der *nick* wird durch Polymerasen/Ligasen geschlossen und das doppelsträngige DNA-Ende durch die Enzyme der homologen Rekombination prozessiert, wobei ein einzelsträngiger 3'-Überhang entsteht. Dieser kann unter Ausbildung eines *D-loops* in das vollständige Chromosom eingeführt und hier das Reinitiationsprimosom assembliert werden. Durch die Auflösung des *D-loops* kann eine Replikationsgabel wieder hergestellt und die Replikation fortgesetzt werden (KUZMINOV, 1995; COX *et al.*, 2000).

Reinitiation nach einem Arrest an helicaseblockierenden Strukturen

Einige mögliche Wege zur Reinitiation der Replikation an einer helicaseblockierenden Struktur sind im rechten Teil von Abb. 2 schematisch dargestellt.

Im Vergleich zu den bereits beschriebenen Reinitiationsereignissen erscheinen die möglichen Ereignisse zur Reinitiation der Replikation nach einem Arrest an einer Sekundärstruktur der DNA oder an DNA-Protein-Komplexen noch am wenigsten verstanden. Es wurde gezeigt, daß es bei Abwesenheit der Rep-Helikase sowie bei einer Inaktivierung einer temperatursensitiven Form der replikativen Helikase DnaB zu einer Akkumulation von Doppelstrangbrüchen kommt (MICHEL *et al.*, 1997; SEIGNEUR *et al.*, 2000).

Hierbei scheint die Entstehung dieser Doppelstrangbrüche auf unterschiedlichen Mechanismen zu beruhen. In der *rep⁻*-Mutante war die Entstehung abhängig von RuvAB. Offenbar werden also an Arresten, welche durch das Fehlen der Rep-Helikase ausgelöst wurden und welche vermutlich auf DNA-Protein-Komplexe oder Sekundärstrukturen der DNA zurückgehen, durch RuvAB *Holliday junctions* gebildet, welche dann durch RuvC geschnitten werden (SEIGNEUR *et al.*, 1998). Die Bildung der *Holliday junctions* ist hierbei nicht von der Anwesenheit von RecA abhängig. Dieser Befund steht im Kontrast zu den auftretenden Doppelstrangbrüchen, welche durch die Inaktivierung der replikativen Helikase (*dnaB_{ts}*) entstehen, da für diese RecA notwendig ist (SEIGNEUR *et al.*, 2000).

Eine Akkumulation von Doppelstrangbrüchen findet man auch in Mutanten, in welchen die Replikationsgabel vermutlich destabilisiert ist und aus diesem Grund häufiger arretiert (FLORES *et al.*, 2001).

Die Gesamtheit dieser Befunde liefert gute Hinweise dafür, daß es im Falle von Arresten der Replikation an helikaseblockierenden Strukturen ebenfalls zur Ausbildung von *Holliday junctions* kommt. Interessant ist, daß hier, im Gegensatz zum Arrest der *leading strand* Polymerase an kleinen Läsionen, die *Holliday junction* nicht direkt für die Umgehung der Läsion z.B. im Sinne eines *polymerase strand switch* genutzt werden kann, da angenommen werden sollte, daß bei einem Arrest der Helikasen die Synthese beider Stränge vor der Läsion gestoppt wird. Ein weiterer Unterschied zu auftretenden DNA-Läsionen ist, daß derartige Strukturen nicht kovalent mit der DNA verknüpft sind. Theoretisch könnte die Replikation also so lange stoppen, bis ein an die DNA gebundenes Protein entfernt wurde (WHITBY *et al.*, 2002).

Dies ist aber offensichtlich in vielen Fällen nicht der Fall. Auch die Hypothese, daß für die Entfernung derartiger Komplexe das Replisom entfernt werden muß und es zu einem spontanen Zurücklaufen der Replikationsgabel (POSTOW *et al.*, 2001) und damit zur Bildung einer *Holliday junction* kommt, erscheint unwahrscheinlich, da die beobachteten Doppelstrangbrüche abhängig von RuvAB sind. Offensichtlich werden an derartigen Arresten aktiv *Holliday junctions* gebildet. Inwiefern die Bildung von *Holliday junctions* die Entfernung von DNA-Proteinkomplexen etc. begünstigt, ist dabei noch nicht geklärt.

Die Auflösung der *Holliday junctions* kann wie bereits beschrieben erfolgen (siehe Seite 21). Bemerkenswert ist im Vergleich zu den Arresten an DNA-Läsionen allerdings, daß hier die Degradation des vierten Arms der *Holliday junction* durch Exonukleasen ein produktives Ereignis darstellen kann, wenn entweder während dieses Ereignisses die Blockade entfernt wird, oder wenn der erneute Versuch der Replikation über diesen Be-

reich dazu führt, daß z.B. das Protein von der DNA entfernt wird (SEIGNEUR *et al.*, 1998; MICHEL, 2000).

Da die Ausbildung einer *Holliday junction* nicht *per se* zu einer Überbrückung der Läsion führen kann, stellt sich die Frage, welchen Vorteil die Bildung bezüglich der Entfernung von DNA-Protein-Komplexen besitzt. Eine denkbare Möglichkeit wäre, daß für die Bildung des Reinitiationsprimosoms Helikasen bzw. akzessorische Proteine eingesetzt werden, durch welche die entsprechenden Barrieren entfernt werden.

Assemblierung des Reinitiationsprimosoms

Für die Reinitiation der Replikation an den auftretenden Rekombinationsintermediaten steht in *E. coli* ein spezielles Reinitiationsprimosom zur Verfügung, zu welchem u.a. die bereits beschriebenen Proteine DnaB und DnaG gehören. Weitere Komponenten des Reinitiationsprimosoms sind PriA, PriB, PriC und DnaT (MARIANS, 2000; SANDLER & MARIANS, 2000).

PriA ist hierbei in der Lage, direkt an alle drei Stränge eines *D-loop* zu binden, so daß das eingeführte einzelsträngige 3'-Ende als Primer für die Reinitiation der Replikation dienen kann. Durch die Bindung von PriA können nacheinander PriB und DnaT rekrutiert werden. Dieser Komplex ist in der Lage, die replikative Helikase DnaB auch abseits des Replikationsursprungs auf die DNA zu laden. Das durch die Bindung von DnaB entstehende sogenannte Präprimosom wird durch die Bindung von der Primase DnaG zum Primosom, von welchem die Reinitiation erfolgt. Durch die Rekrutierung von einem PolIII-Holoenzym erfolgt durch die bereits beschriebene Interaktion der τ -Untereinheit mit DnaB die Stimulation der Helikaseaktivität (SANDLER & MARIANS, 2000).

PriA wird vermutlich auch dann für die Reinitiation benötigt, wenn kein Rekombinationsereignis stattgefunden und kein *D-loop* gebildet wurde. Interaktionen mit RecG legen nahe, daß PriA auch dann bei der Reinitiation eine Rolle spielt, wenn z.B. durch UV ausgelöste Läsionen RecG-abhängig umgangen wurden. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß für diese Reinitiationsprozesse die Helikasefunktion von PriA gebraucht wird, welche für eine Reinitiation an einem *D-loop* nicht von entscheidender Bedeutung ist (GREGG *et al.*, 2002; XU & MARIANS, 2003).

Sofern PriA an der Reinitiation sowohl an *D-loops* als auch an nichtrekombinativen Reinitiationsereignissen beteiligt ist, ist es um so bemerkenswerter, daß *priA*⁻-Mutanten lebensfähig sind. Offensichtlich ist die PriA-abhängige Reinitiation nicht die einzige Möglichkeit für eine Reinitiation der Replikation (SANDLER & MARIANS, 2000).

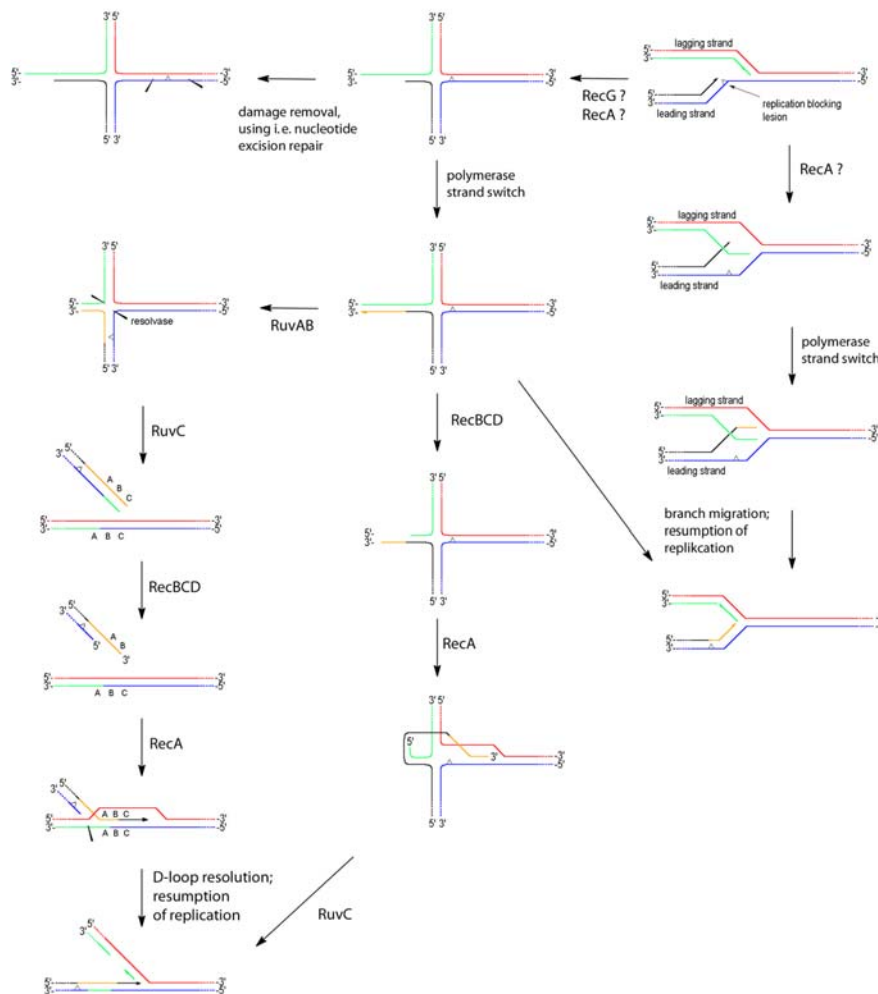


Abb. 1: Einige mögliche Wege für die fehlerfreie Reinitiation nach dem Arrest von Replikationsgabeln an kleinen Läsionen der DNA in *E. coli*. Die Details sind im Text erklärt. Die parentalen Stränge sind in rot und blau, die neu synthetisierten Stränge in schwarz (*leading strand*) und grün (*lagging strand*) bzw. orange im Falle eines *polymerase strand switch* dargestellt. Die am jeweiligen Schritt möglicherweise beteiligten Proteine wurden eingetragen. Endonukleolytische Schnitte sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Die Schnittrichtung zur Auflösung der *Holliday junction* wurde so gewählt, daß die Bildung chromosomaler Dimere vermieden wird (Abbildung modifiziert nach Hyrien, 2000; Michel, 2000; Cox, 2001; Cox, 2002; McGlynn & Lloyd, 2002).

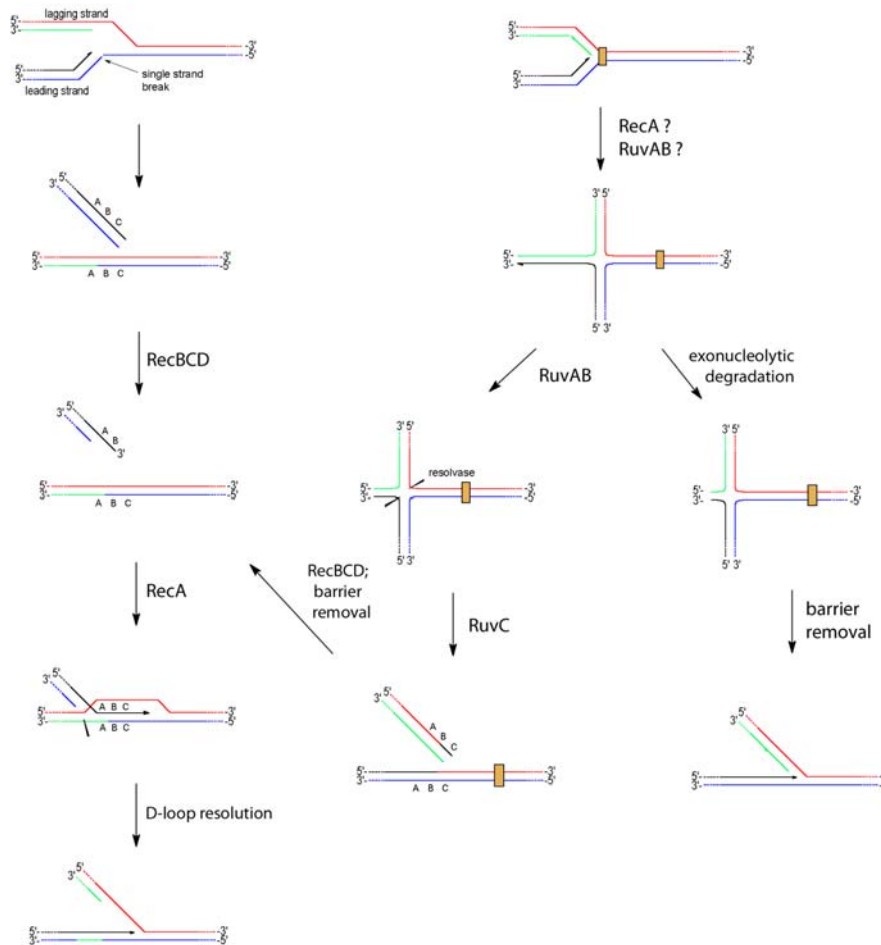


Abb. 2: Möglichkeiten zur Reinitiation der Replikation nach einem Arrest an einem Einzelstrangbruch (links) sowie an einem DNA-Protein-Komplex (rechts). Die Details sind im Text erklärt. Die parentalen Stränge sind in rot und blau, die neu synthetisierten Stränge in schwarz (*leading strand*) und grün (*lagging strand*) dargestellt. Die am jeweiligen Schritt möglicherweise beteiligten Proteine wurden eingetragen (Abbildung modifiziert nach Kuzminov, 1995; Michel, 2000; Cox *et al.*, 2000).

Das MPH1-Gen von Saccharomyces cerevisiae

Das *MPH1*-Gen (für *mutator phenotype*) aus *Saccharomyces cerevisiae* befindet sich auf dem rechten Arm von Chromosom IX und kann für ein Protein von 993 Aminosäuren codieren. Die Aminosäuresequenz weist die sieben konservierten Motive auf, die für die Proteine der DEAD/DExH-Box-Helikasenfamilie charakteristisch sind (SCHELLER *et al.*, 2000). Eine *mph1*-Deletionsmutante zeigt neben einer marginalen Sensitivität gegenüber UV eine deutlich erhöhte *CAN1*-Vorwärtsmutations- sowie *trp1-289*-Reversionsrate. Die Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien wie MMS, EMS, 4-NQO und Camptothecin ist erhöht. Neben diesen Sensitivitäten sowie dem beobachteten Mutatorphänotyp wurden bei einer Vielzahl weiterer Untersuchungen zu Störungen im Zellzyklus, des Wachstums auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen, der Zellmorphologie und des Cytoskeletts, der Mitochondrienfunktion, der Paarung und der Streßantwort keine auffälligen Phänotypen gefunden (ENTIAN *et al.*, 1999).

Weitere Untersuchungen erlaubten eine Eingrenzung des Wirkortes des Mph1-Proteins. Durch eine große Zahl von Epistasianalysen konnte eine Beteiligung des Mph1-Proteins an einem der bekannten Reparaturwege wie Nukleotidexcisionsreparatur, Basenexcisionsreparatur und *mismatch*-Reparatur mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden (SCHELLER *et al.*, 2000; SCHÜRER *et al.*, in Vorbereitung). Durch ein PCR-basiertes experimentelles System zur quantitativen Messung von DNA-Schäden konnte gezeigt werden, daß die Zugänglichkeit der DNA für Mutagene in *mph1*-Mutanten nicht deutlich erhöht ist, so daß vermutlich auch Strukturveränderungen z.B. des Chromatins und eine daraus resultierende verbesserte Zugänglichkeit der DNA für Mutagene nicht für die Erhöhung der Mutationsrate verantwortlich sind (SCHÜRER *et al.*, in Vorbereitung). Auch für eine Beteiligung des Mph1-Proteins an Prozessen wie dem RNA-*splicing*, der Translation oder dem nukleären Transport konnten keine Hinweise gewonnen werden (SCHELLER *et al.*, 2000).

Bei weiteren Untersuchungen zur näheren Eingrenzung der möglichen Funktion des Mph1-Proteins wurden genetische Interaktionen des *MPH1*-Gens u.a. mit *SGS1*, *MMS4* (SCHÜRER *et al.*, in Vorbereitung) und *SRS2* (E. PANICO, unveröffentlicht) gezeigt. Von allen Genen wird angenommen, daß sie u.a. an der Reinitiation arretierter Replikationsgabeln beteiligt sind. Diese Befunde haben zusammen mit weiteren Ergebnissen zu der Hypothese geführt, daß das Mph1-Protein ebenfalls an der Reinitiation arretierter Replikationsgabeln beteiligt ist. Anhand dieser Hypothese ließe sich der Mutatorphänotyp dadurch erklären, daß die Reinitiation von an Läsionen arretierten Replikationsgabeln in Abwesenheit von Mph1 vermehrt mittels der Translänionssynthese erfolgt.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich die Hypothese einer Beteiligung von Mph1 an einem Prozeß zur Reinitiation arretierter Replikationsgabeln bestätigen läßt und ob sich die Funktion des Proteins weiter eingrenzen läßt. Durch die zusätzliche

Untersuchung der Rolle von Proteinen, für welche genetische Interaktionen mit *MPH1* gezeigt wurden und welche vermutlich ebenfalls an Reinitiationsprozessen beteiligt sind, sollte versucht werden, zur Klärung der in Eukaryonten im Vergleich zu *E. coli* weniger gut verstanden Prozesse beizutragen.

MATERIAL

Chemikalien

<i>α mating factor</i>	Hergestellt im Institut
Adenin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
<i>Agar bacteriological (Agar No. 1)</i>	Oxoid, Wesel
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt
BactoPepton	Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spanien
Blei(II)citrat	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Borsäure	Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spanien
Bromphenolblau	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
BSA	USB, Cleveland Ohio, USA
Camptothecin	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen
L-Canavanin	Calbiochem, Schwalbach
Chloroform	Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spanien
DAPI (2,4-Diamidino-2-Penylindol)	AppliChem, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
dNTPs	Invitek, Berlin
1,4-Dithio-DL-threit(ol) (DTT)	AppliChem, Darmstadt
EDTA Dinatriumsalz	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
G418	Calbiochem, Schwalbach
Glucose	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glycerin	Serva, Heidelberg
Hefeextrakt	Oxoid, Wesel
Hydroxy 8-Hydroxychinolin	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
IPTG	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spanien
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Lachsspermien-DNA	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen
Leucin	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen
Lithiumacetat	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen
Lowicryl-K4M-Harz	Chemische Werke Lowi, Waldkraiburg

MATERIAL

Methylmethansulfonat (MMS)	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen
MOPS	AppliChem, Darmstadt
Natriumazid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumlaurylsulfat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
4-Nitrochinolin-1-oxid	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Phenylalanin	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Polivinylnaldehyd	Serva (Heidelberg)
Polyethylenglycol 4000	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen
Polylysin-Lösung	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
RNAse	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Sorbitol	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen
SYBR™Green I	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Tris-Base	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen
Trypton	Oxoid, Wesel
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen
Uracil	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Uranylacetat	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid)	AppliChem, Darmstadt
<i>Yeast Lytic Enzyme</i>	ICN Biomedicals, Costa Mesa, USA
<i>Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulfate</i>	DIFCO, Dreieich

Alle nicht explizit aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, bezogen.

Enzyme

<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i> (CIAP)	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
NEE-154 Glusulase	NEN™, Boston, USA
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen; New England Biolabs, Bad Schwalbach
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
T4-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Hergestellt im Institut

Vent-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Bad Schwalbach
Yeast Lytic Enzyme aus <i>Arthrobacter luteus</i> (8000 u · mg ⁻¹)	ICN Biomedicals

Antikörper

Anti-Sendai-Antikörper aus Maus	Hergestellt im Institut
Anti-Maus-Antikörper aus Ziege, konjugiert mit 10 nm-Goldpartikeln	Plano, W. Plannet GmbH, Wetzlar
Anti-Maus-Antikörper aus Ziege, konjugiert mit Fluorescein	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen

Kits

JETstar <i>plasmid purification system</i>	Genomed, Bad Oeynhausen
NucleoTrap® <i>Gel extraction</i>	Macherey-Nagel, Düren
QIAquick <i>Gel extraction</i>	QIAGEN GmbH, Hilden
ProLong® <i>Antifade Kit</i>	Molecular Probes, Eugene, Oregon USA

Nährmedien

Nährmedien für die Anzucht von *E. coli*

dYT	1 % (w/v) Hefeextrakt; 1,6 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) NaCl
SOB	0,5% (w/v) Hefeextrakt; 2% (w/v) Trypton; 2,5 mM (w/v) KCl; 0,05% (w/v) NaCl. Nach dem Autoklavieren werden MgCl ₂ sowie MgSO ₄ mit einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben
SOC	Wie SOB. Nach der Sterilisation werden zusätzlich sterilfiltrierte Glucose mit einer Endkonzentration von 2% (w/v) zugesetzt.
LB	5 g Hefeextrakt; 10 g Trypton; 10 g NaCl; für feste Medien wurde 15 g Agar zugesetzt
LB + Antibiotika	Für Selektionsmedien wurde die Lösung auf ca. 60°C abgekühlt und das gewünschte Antibiotikum mit folgenden End- konzentrationen zugesetzt. Ampicillin: 100 µg · ml ⁻¹ Kanamycin: 50 µg · ml ⁻¹ Spectinomycin: 50 µg · ml ⁻¹

Nährmedien für die Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

YPD	2 % (w/v) BactoPepton; 2 % (w/v) Glucose; 1 % (w/v) Hefeextrakt
YPD +G418	wie YPD; nach dem autoklavieren wurde die Lösung auf ca. 60°C abgekühlt und das G418 in Pulverform zugegeben (Endkonzentration 200 µg · ml ⁻¹)
SC-Medium (<i>synthetic complete</i>)	2 % (w/v) Glucose; 0,17 % <i>Yeast Nitrogen Base w/o</i> Ammoniumsulfat und Aminosäuren; 0,51 % Ammoniumsulfat. Dem Medium wurden 680 mg einer Mischung aus Aminosäuren und Nukleobasen zugesetzt, welche sich aus folgenden Komponenten zusammensetzt:

Tabelle 1: Zusammensetzung der Mischung aus Aminosäuren und Nukleobasen

Komponente	Konz. im Medium [mg/l]	Komponente	Konz. im Medium [mg/l]
Adenin	40	Phenylalanin	50
Arginin	30	Serin	100
Histidin	20	Threonin	150
Isoleucin	20	Tryptophan	30
Leucin	30	Tyrosin	30
Lysin	30	Uracil	20
Methionin	20	Valin	100

SD-Medien (<i>synthetic drop out</i>)	SD-Medien dienen der Selektion auf bestimmte Prototrophien. Sie setzen sich aus den gleichen Komponenten wie SC-Medium zusammen, wobei in der Mischung aus Aminosäuren und Nukleobasen selektiv einzelne oder mehrere Komponenten fehlen. Zugesetzt werden 680 – x mg der SC-Mischung, wobei x der Menge bzw. der Mengen der weggelassenen Anteile entspricht.
SD ^{-Arg} + Can	SD ^{-Arg} -Medium, welchem 40 mg · ml ⁻¹ L-Canavanin-Lösung zugesetzt wurde. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf ca. 60°C abgekühlt und das Canavanin aus einer 500fach konzentrierten Stocklösung zugesetzt.

Vektoren

Klonierungsvektoren

Vektor	Eigenschaften	Quelle
pFA6a-KanMX4	<i>colE1-ori</i> ; <i>amp^r</i> ; <i>kan^r</i> aus <i>E. coli</i> mit Promotor- und Terminatorsequenzen aus <i>Ashbya gossypii</i> .	WACH <i>et al.</i> , 1994 (modifizierter pSP72, Promega)
pBluescript II SK (-)	<i>colE1-ori</i> ; <i>f1-ori</i> ; <i>amp^r</i> ; <i>lacZ</i> -Gene, geeignet zur α -Komplementation für ein blau/weiß- <i>screening</i> .	Stratagene®

Hefevektoren

Vektor	Eigenschaften	Quelle
pRS316	<i>colE1-ori</i> ; <i>f1-ori</i> ; <i>amp^r</i> ; <i>lacZ</i> -Gene, geeignet zur α -Komplementation für ein blau/weiß- <i>screening</i> ; <i>URA3</i> -Gen <i>S. c.</i> ; <i>CEN6</i> -Centromerbereich <i>S. c.</i> ; <i>ARS6</i> -Replikationsursprung <i>S. c.</i>	SIKORSKI & HIETER, 1989 (modifizierter pBluescript von Stratagene®)
YIplac211	<i>pMB1-ori</i> ; <i>amp^r</i> ; <i>URA3</i> -Gen <i>S. c.</i> ;	GIETZ & SUGINO, 1988 (modifizierter pUC19)
pYGET	<i>colE1-ori</i> ; <i>f1-ori</i> ; <i>amp^r</i> ; <i>URA3</i> -Reste; <i>TRP1</i> -Gen <i>S. c.</i> ; 2 μ -Replikationsursprung <i>S. c.</i> ; Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase-Promotor für eine starke und konstitutive Expression in <i>S. c.</i>	C. CAPELLARO, persönliche Kommunikation (modifizierter pYES-Expressionsvektor von Invitrogen®)
pYES-MPH1-SEN-HIS	<i>colE1-ori</i> ; <i>f1-ori</i> ; <i>amp^r</i> ; <i>URA3</i> -Gen <i>S. c.</i> ; 2 μ -Replikationsursprung <i>S. c.</i> ; <i>GAL1</i> -Promotorsequenz für die induzierbare Expression in <i>S. c.</i> ; <i>MPH1</i> -Gen fusioniert mit einem Sendai-Epitop und einem <i>HIS</i> -tag.	A. SCHÜRER, persönliche Kommunikation (pYES-Expressionsvektor: Invitrogen®)

METHODEN

Hefestämme

- CEN.PK 2-1C [MATa, trp1-289, leu2-3,112, ura3-52, his3-D1, MAL2-8c, SUC2]
 (Quelle: P. KÖTTER)
- CEN.PK 2-1C *mph1* [*mph1*] (Quelle: ENTIAN *et al.*, 1999)
- CEN.PK 2-1C *rev3* [*rev3::NAT*] (Quelle: A. SCHÜRER)
- CEN.PK 2-1C *rev3 mph1* [*mph1 rev3::NAT*] (Quelle: A. SCHÜRER)
- CEN.PK 2-1C *rad52* [*rad52::HIS3*] (Quelle: A. SCHÜRER)
- CEN.PK 2-1C *rad52 mph1* [*mph1 rad52::HIS3*] (Quelle: A. SCHÜRER)
- CEN.PK 2-1C *rad30* [*rad30::HIS3*] (Quelle: A. SCHÜRER)
- CEN.PK 2-1C *rad30 mph1* [*mph1 rad30::HIS3*] (Quelle: A. SCHÜRER)
- CEN.PK 2-1C *mms4* [*mms4*] (Quelle: A. SCHÜRER)
- CEN.PK 2-1C *mms4 mph1* [*mph1 mms4*] (Quelle: A. SCHÜRER)
- CEN.PK 2-1C *sgs1* [*sgs1::HIS3*] (Quelle: A. SCHÜRER)
- CEN.PK 2-1C *sgs1 mph1* [*mph1 rev3::HIS3*] (Quelle: A. SCHÜRER)
- CEN.PK 2-1C *srs2* [*srs2::HIS3*] (Quelle: A. SCHÜRER)
- CEN.PK 2-1C *mph1/pRS313-MPH1-SEN-HIS* (Quelle: A. SCHÜRER)

Bestimmung von Mutationsraten und Mutationsfrequenzen

Bestimmung von spontanen Mutationsraten nach der Medianmethode Lea & Coulson, 1948)

Die Bestimmung der Mutationsrate nach der Medianmethode wurde zur quantitativen Analyse von Mutatorphänotypen verschiedener *Saccharomyce-cerevisiae*-Stämme verwandt. Zu diesem Zweck wurden mit jeweils 200 Zellen einer Übernachtskultur des zu untersuchenden Stammes eine ungerade Anzahl (N) von Parallelkulturen (5 ml YPD) angeimpft. Diese Kulturen wurden zunächst ohne Agitation für 24 h bei 30 °C inkubiert. Es hatte sich gezeigt, daß hierdurch das Anwachsverhalten verbessert wird (KRAMER, persönliche Kommunikation). Diese Verbesserung ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß die Zellen absinken und eine partielle Konditionierung des Mediums bewirken, in welchem günstigere Wachstumsbedingungen herrschen. Dann wurden die Kulturen weitere 24–36 h unter Rollen inkubiert.

Anschließend wurden Aliquots auf Platten ohne Arginin mit Canavanin ($SD^{-Arg} + Can$) ausplattiert, um die Vorwärtsmutationsrate auf Canavanin zu bestimmen. Zusätzlich wurden Zellen auf Platten ohne Arginin und ohne Canavanin (SD^{-Arg}) ausplattiert, um die Lebendzellzahl bestimmen zu können. Die Platten wurden für 48–72 h inkubiert und anschließend ausgezählt. Hieraus wurde die Gesamtanzahl von Mutanten (r) in den betreffenden Kulturen errechnet.

Das *CAN1*-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* codiert für eine Arginin-Permease, durch welche sowohl Arginin als auch das Strukturanalogen L-Canavanin (2-Amino-4-guandinoxybuttersäure) in die Zellen aufgenommen werden kann. Canavanin wird von den Enzymen des Arginin-Stoffwechsels anstelle von Arginin metabolisiert und wirkt aus diesem inhibitorisch. Zusätzlich wird es anstelle von Arginin in Proteine eingebaut und führt zu aberanten Proteinen. Eine Resistenz gegenüber L-Canavanin kann durch eine Vorwärtsmutation im *CAN1*-Gen erworben werden. In diesem Fall synthetisiert die Zelle das fehlende Arginin selbst und ist in der Lage, auf Medium mit L-Canavanin zu wachsen.

Die Gesamtzahl der Mutanten ist vom Zeitpunkt abhängig, an welchem eine durch das System detektierbare Mutation erfolgt. Erfolgt bereits in der ersten Teilung eine derartige Mutation, so resultiert hieraus eine sehr hohe Gesamtanzahl von Mutanten. Eine Mutation zu einem sehr späten Zeitpunkt resultiert hingegen in einer sehr niedrigen Gesamtanzahl von Mutanten. Bei mehreren Parallelkulturen erhält man normalerweise einen Großteil von Kulturen mit einer ähnlichen Gesamtanzahl von Mutanten. Zusätzlich findet man normalerweise einige wenige Kulturen, in welchen das erste Mutationsereignis sehr früh oder sehr spät stattgefunden hat, so daß sich eine sehr hohe oder niedrige Anzahl an Mutanten zeigt. Für die weitere Berechnung wird angenommen, daß die Anzahl der Mutanten in der Mediankultur eine gute Näherung für die Mutationswahrscheinlichkeit des betrachteten Stammes darstellt. Diese Methode zur Bestimmung der Mutationsrate wird als hinreichend genau angesehen, wenn alle oder fast alle Parallelkulturen Mutanten enthalten (LEA & COULSON, 1948).

Abschätzung der Mutationsraten

Der Entstehung von r_0 -Mutanten lagen m Mutationsereignisse zugrunde, wobei näherungsweise folgende Beziehung gilt:

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

Nach der Subtraktion von r_0 läßt sich m als einzige Nullstelle einer streng monoton steigenden Funktion betrachten, wobei r_0 als Konstante angesehen werden kann. Die Bestimmung kann aus diesem Grund durch Newtonsche Iteration erfolgen, da die Folge

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

gegen m konvergiert. Als Standardwert für m_i wird r_0 eingesetzt. Der Algorithmus wird bei $m_{i+1} - m_i \leq 10^{-8}$ abgebrochen.

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte i.a. nur von zwei Kulturen, wobei vorausgesetzt wurde, daß die Lebendzellzahl aller Kulturen mit hinreichender Genauigkeit gleich sind.

Die Standardabweichung für die errechnete Anzahl der Mutationsereignisse errechnet sich nach folgender Formel (LEA & COULSON, 1948):

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

Die Berechnung der Mutationsrate und der Standardabweichung erfolgte mit einem von S. SCHMIDT erstellten Programm (<http://www.rzuser.uni-heidelberg.de/~sschmid6>).

Bestimmung der Mutationsfrequenzen nach Mutagenbehandlung

Anzucht der Zellen und Mutagenbehandlung

Zur Bestimmung der Mutationsfrequenzen nach Behandlung mit Mutagenen wurden die zu untersuchenden Stämme über Nacht in YPD angezogen. Die Kulturen wurden mit Hilfe der Neubauer-Improved-Zählkammer ausgezählt und 10 ml YPD mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml⁻¹ angeimpft. Die Zellen wurden für 90 min bei 30°C gerollt und anschließend α mating factor zu einer Endkonzentration von 4 μ g \cdot ml⁻¹ zugesetzt. Die Zellen wurden für 60 min bei 30°C gerollt, anschließend erneut α mating factor zugesetzt und erneut für 60 min bei 30°C gerollt. Auf diese Weise wird vermieden, daß durch die von den Zellen sezernierte Bar1-Protease die Konzentration des zugesetzten α mating factor zu stark reduziert. Der Arrest des Zellzyklus wurde mikroskopisch bestätigt. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert (Hettich Rotanta/RPC, 4000 rpm, 20°C), zweimal mit Wasser gewaschen und in 10 ml YPD resuspendiert.

Für die Mutagenbehandlung wurden pro Stamm entsprechend der Anzahl an Mutagenkonzentrationen Kulturröhrchen mit 1 ml YPD vorbereitet. Anschließend wurden die entsprechenden Mengen des jeweiligen Mutagens zugesetzt und von den in 10 ml aufgenommenen Zellen jeweils 1 ml in jedes Röhrchen gegeben. Die Proben wurden anschließend so lange bei 30°C gerollt, bis sich mikroskopisch nachweisen ließ, daß der Großteil aller Zellen auch bei der höchsten Mutagenkonzentration deutlich sichtbare Knospen bildete, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Zellen die S-Phase abgeschlossen haben.

Die Kulturen wurden einmal mit Wasser gewaschen, in je 1 ml YPD aufgenommen und sofort auf Eis gestellt, um ein weiteres Voranschreiten des Zellzyklus so weit wie möglich zu verlangsamen. Dann wurden die jeweiligen Proben mit Wasser verdünnt und adäquate Verdünnungen auf SD^{-Arg}-Platten mit Canavanin (40 mg \cdot l⁻¹) zur Bestimmung der Revertanten sowie auf SD^{-Arg}-Platten zur Bestimmung der Lebendzellzahl plattiert. Die Platten wurden 2–3 Tage bei 30°C inkubiert und dann ausgezählt.

Lösungen

a mating factor: 2 mg des *a mating factor* wurden in 1 mg Ethanol gelöst und bei -20°C gelagert.

Auswertung

Die Anzahl der Mutanten, welche auf Medium mit Canavanin wachsen, setzt sich aus zwei Fraktionen zusammen. Einerseits entstehen in jeder Kultur, unabhängig von der Mutagenbehandlung, spontane Mutanten. Zusätzlich entstehen durch die Behandlung mit Mutagenen weitere Mutanten, welche im folgenden Text mit »induziert« bezeichnet werden. Dementsprechend setzt sich die Frequenz der Gesamtzahl beobachteter Mutanten wie folgt zusammen:

$$f_{\text{beobachtet}} = f_{\text{spontan}} + f_{\text{induziert}}$$

bzw.

$$f_{\text{induziert}} = f_{\text{beobachtet}} - f_{\text{spontan}}$$

Die Frequenz der spontan auftretenden Mutanten kann man aus einer Probe ohne Mutagenbehandlung ermitteln. Problematisch ist hierbei allerdings, daß durch die Mutagenbehandlung die Lebendzellzahl und damit auch die Zahl der spontan entstehenden Mutanten in der Probe verringert wird. Die Abnahme der Mutanten sollte hierbei mit der Abnahme der Gesamtzellzahl korrelieren. Somit ergibt sich die Zahl der spontanen Mutanten bei der Konzentration c_1 aus der Zahl der spontanen Mutanten ohne Mutagenbehandlung (c_0) unter Berücksichtigung der Abnahme der Gesamtzellzahl zwischen c_1 und c_0 :

$$f_{\text{spontan}}^{c_1} = f_{\text{spontan}}^{c_0} \cdot \frac{N_{c_1}}{N_{c_0}}$$

Zusätzlich zu den spontan entstandenen Mutanten stirbt allerdings auch ein Teil der Mutanten ab, welche durch die Behandlung mit Mutagen entstanden sind. Geht man auch hier wieder davon aus, daß auch diese Abnahme direkt mit der Abnahme der Lebendzellzahl korreliert, dann erhält man die Beziehung

$$f_{\text{induziert}}^{c_1} = f_{\text{tatsächlich induziert}}^{c_1} \cdot \frac{N_{c_1}}{N_{c_0}}$$

Mit diesen beiden Ausdrücken lassen sich nun $f_{\text{induziert}}$ und f_{spontan} in der Formel für die Gesamtzahl an auftretenden Mutanten substituieren:

$$f_{\text{gesamt}}^{c_1} = f_{\text{tatsächlich induziert}}^{c_1} \cdot \frac{N_{c_1}}{N_{c_0}} + f_{\text{spontan}}^{c_0} \cdot \frac{N_{c_1}}{N_{c_0}}$$

Löst man diese Gleichung nach $f_{\text{tatsächlich induziert}}^{c_1}$ auf und multipliziert mit $N_{c_1}^{-1}$, dann ergibt sich mit

$$\frac{f_{\text{gesamt}}^{c1}}{N_{c1}} - \frac{f_{\text{spontan}}^{c0}}{N_{c0}} = \frac{f_{\text{tatsächlich induziert}}^{c1}}{N_{c0}}$$

die Mutationsfrequenz pro Zelle bei einer bestimmten Mutagenkonzentration.

Bestimmung von Reversionsraten und Reversionsfrequenzen

Bestimmung der spontanen Reversionsrate nach der Medianmethode

Die Bestimmung der Reversionsrate des KanKanMX4-Moduls wurde prinzipiell in gleicher Weise wie die Bestimmung der Mutationsrate durchgeführt (siehe Seite 34). Die Anzucht erfolgte hierbei allerdings aufgrund des *URA3*-Markers des Plasmids pRS316-KanKanMX4 in 5 ml SD^{-Ura}-Medium. Die Zellen wurden YPD zur Bestimmung des Lebendtiters sowie auf YPD mit G418 (200 µg · ml⁻¹) plattiert wurde, da davon ausgegangen wurde, daß die für das Experiment relevanten Ereignisse bereits während der Anzucht in Selektivmedium erfolgten. Die Berechnung der Reversionsrate erfolgte analog zur Berechnung der Mutationsraten (siehe Seite 35).

Bestimmung der Reversionsfrequenzen nach Mutagenbehandlung

Die Bestimmung der Reversionsfrequenzen erfolgte analog zur Bestimmung der Mutationsfrequenzen (siehe Seite 36). Wie bei der Bestimmung der Reversionsrate erfolgte auch hier die Anzucht aufgrund des *URA3*-Markers des Plasmids pRS316-KanKanMX4 in SD^{-Ura}-Medium. Die Zellen wurden wie beschrieben angeimpft, mit *α mating factor* arretiert, gewaschen und in 10 ml SD^{-Ura} aufgenommen. Die Inkubation mit den Mutagenen erfolgte ebenfalls in Selektivmedium. Nach der Mutagenbehandlung wurden die Zellen gewaschen und in jeweils 1 ml Selektivmedium auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Proben verdünnt und plattiert.

Ähnlich wie bereits bei der Bestimmung der spontanen Reversionsrate wurde davon ausgegangen, daß die für das Experiment relevanten Ereignisse bereits im Selektivmedium stattgefunden haben. Die Zellen wurden daher auf YPD zur Bestimmung der Lebendzellzahl sowie auf YPD mit G418 (200 µg · ml⁻¹) plattiert. Die Berechnung der Reversionsfrequenz erfolgte analog zur Berechnung der Mutationsfrequenzen (siehe Seite 37).

Drop dilution assay zur Bestimmung von Mutagensensitivitäten

Für die Bestimmung der Sensitivitäten bestimmter Stämme gegenüber unterschiedlichen Mutagenen wurden die zu untersuchenden Stämme über Nacht angezogen. Die Zelldichte

wurde bestimmt und die Kulturen auf eine Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot ml⁻¹ verdünnt. Anschließend wurden die Kulturen bis zu einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml⁻¹ bei 30°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Platten mit den Mutagenen vorbereitet. Das Medium wurde autoklaviert und auf eine Temperatur unter 60°C abgekühlt. Dann wurden die entsprechenden Mutagenmengen zugesetzt und die Platten gegossen.

Die Kulturen wurden in drei Schritten jeweils 1:10 verdünnt und von jeder Verdünnung 10 µl auf die Platten mit den Mutagenen aufgetropft. Die Tropfen sollte dementsprechend 10^2 , 10^3 , 10^4 und 10^5 Zellen enthalten. Als Kontrolle wurden die gleichen Verdünnungen auf eine Platte ohne Mutagen getropft. Anschließend wurden die Platten 2–3 Tage bei 30°C inkubiert.

Molekularbiologische Methoden

Phenol-Chloroform-Extraktion

Um Proteine wie Restriktionsendonukleasen oder thermostabile Polymerasen aus DNA-haltigen Lösungen zu entfernen, wurden die Proben mit Phenol und Chloroform extrahiert. Für eine bessere Handhabung der Extraktion bieten sich Volumina ab 100 µl an; kleinere Probenvolumina wurden mit Wasser auf 100 bis 200 µl aufgefüllt.

Anschließend erfolgte die Zugabe von einem Probenvolumen Phenol (Tris-gepuffert). Die Ansätze wurden gründlich gemischt und anschließend zur Beschleunigung der Phasentrennung 3 min zentrifugiert (Hettich Mikro Rapid/K, 12000 rpm, 4°C). Die wässrige Oberphase wurde vorsichtig abgenommen, in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Chloroform versetzt. Die Proben wurden erneut gründlich gemischt und durch Zentrifugation die Trennung der Phasen beschleunigt. Die wässrige Oberphase wurde in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. An die Prozedur schloß sich eine Fällung der DNA mit Ethanol an (siehe Seite 39).

Lösungen

Phenol, TE-gesättigt: Lösung von 250 g festem Phenol in 7,5 ml NaOH (1 M), 3 ml Tris-HCl (1 M, pH 7,5) sowie 65 ml Wasser. Nach der Verflüssigung werden als Oxidationsinhibitor 250 mg 8-Hydroxychinolin zugegeben und die Lösung nach kräftigem Schütteln bei 4°C gelagert.

Ethanolpräzipitation von DNA aus wässrigen Lösungen

Die Zugabe von Ethanol zu DNA-Lösungen führt zu einer Fällung der Nukleinsäuren. Die Fällung kann durch die Zugabe von Kationen erleichtert werden, da in Salzlösungen die Dielektrizitätskonstante erniedrigt ist. Die hierdurch abgeschwächten Coulomb-Wechselwirkungen erleichtern die Aneinanderlagerung des negativen Phosphatrückgrats der DNA. Neben der Aufkonzentrierung der Nucleinsäuren kann durch diese Methode

eine zusätzliche Reinigung erfolgen. So können z.B. die aus der Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe Seite 39) resultierenden Spuren an Phenol und Chloroform entfernt werden (LOTTSPEICH & ZORBAS, 1998). Eine Entfernung proteinhaltiger Verunreinigungen wird allerdings i.a. nicht erreicht, da viele Proteine bei der Fällung der DNA ebenfalls gefällt werden (PHILIPPSEN *et al.*, 1991)

Für die Fällung eignet sich Ethanol recht gut, da es schnell verdampft und damit gut und rückstandslos zu entfernen ist. Allerdings benötigt man relativ große Volumina an Ethanol, da die Endkonzentration für eine Fällung bei etwa 70 Volumenprozent liegen muß. Die Fällung kann auch mit Isopropanol durchgeführt werden, wobei hier geringere Volumina notwendig sind. Allerdings läßt sich Isopropanol schwerer wieder entfernen (MÜLHARDT, 1999).

Die monovalenten Kationen werden bevorzugt durch Ammoniumacetat zur Verfügung gestellt (Endkonzentration 2–2,5 M). Einer der Vorteile von Ammoniumacetat liegt in einer geringeren Tendenz der Fällung von Oligonukleotiden bis etwa 30 Basenpaare sowie dNTPs (MÜLHARDT, 1999).

Zur Fällung wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Volumen 7 M Ammoniumacetat-Lösung und 3 Volumina 96 % Ethanol (-20°C) für 15–30 min auf Eis gefällt und danach bei 4°C abzentrifugiert (Hettich-Kühlzentrifuge, 12000 rpm, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, 10 min unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert und für 15 min bei 37°C getrocknet. Anschließend wurde die DNA in TE-Puffer gelöst.

Lösungen

TE-Puffer: Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,5 mM, pH 8,0 ; die Einstellung des pH-Wertes kann bei Tris-Puffern nicht mit einer normalen pH-Elektrode erfolgen. Es wurde pH-Papier verwandt.

Partialverdau von DNA-Fragmenten

Der Partialverdau von DNA- bzw. Vektorfragmenten erfolgte in 30 μl Ansätzen. Es wurden die Reaktionsansätze für die Spaltung mit DNA, aber ohne Restriktionsenzym, auf sechs Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, wobei in das erste Reaktionsgefäß 45 μl , in das letzte Reaktionsgefäß 15 μl und in die restlichen vier Reaktionsgefäße je 30 μl gegeben wurde. Anschließend wurde in das erste Reaktionsgefäß 15 μl des entsprechenden Restriktionsenzym gegeben, gut gemischt und 15 μl der Lösung in das nächste Cup überführt, erneut gemischt und wieder überführt. Die Reaktionsansätze enthalten also in etwa 10, 3,3, 1,1, 0,37, 0,123 und 0,041 Units der entsprechenden Restriktionsendonuklease.

Die Ansätze wurden für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend (sofern möglich) das Enzym 20 min bei 65°C inaktiviert. Die Ansätze wurden mit Hilfe eines 1%igen Agarosegels aufgetrennt. In denjenigen Ansätzen, in denen das Fragment der korrekten Größe in größeren Konzentrationen vorhanden war, wurde es aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe Seite 42).

Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von Nukleinsäuren kann in festen Trägermaterialien im elektrischen Feld erfolgen, wobei als Trägermaterialien i.a. entweder Polyacrylamid oder Agarose eingesetzt werden (LOTTSPREICH & ZORBAS, 1998).

Bei Agarose handelt es sich um ein gelierfähiges Polysaccharid, welches aus sich abwechselnden Einheiten von β -1,3-verknüpfter D-Galaktopyranose und α -1,4-verknüpfter 3,6-anhydro-L-galaktopyranose besteht (Römpp Chemie Lexikon, 1989), wobei Substituenten wie Sulfatester in unterschiedlicher Menge vorhanden sein können (REES, 1977). Sie kann durch Aufkochen gelöst werden. Beim Abkühlen werden dann zwischen den einzelnen Polysaccharid-Molekülen nichtkovalente Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen oder Coulombsche Wechselwirkungen ausgebildet, wobei es zur Bildung von Doppelhelices kommt. Hierbei kommt es insbesondere zur Aneinanderlagerung ähnlicher Kettensegmente unterschiedlicher Ketten. Allerdings finden sich auch in Polysaccharid-Ketten, ähnlich wie Prolin in einer α -Helix in Proteinen, immer wieder helixbrechende Strukturen, welche dafür sorgen, daß die Ketten abknicken. Derartige Unterbrechungen können u.a. durch modifizierte Zuckerreste oder Verzweigungen zustande kommen. Entscheidend ist hierbei, daß durch diese Unterbrechungen eine Kette mehrere Kettenassoziate bilden kann, an welchen jeweils andere Partner beteiligt sind. Auf diese Weise kommt es zur Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerkes (REES, 1977).

Die Porengröße ist in Agarosegelen vergleichsweise hoch. Sie liegt in einem 1%igen Gel bei etwa 150 nm, in einem 0,16%igen Gel hingegen bei 500 nm (LOTTSPREICH & ZORBAS, 1998). Aufgrund der unterschiedlichen Porengrößen muß die Agarosekonzentration für die Auftrennung doppelsträngiger DNA angepaßt werden. Für die meisten Anwendungen wurden 1%ige Agarosegele gewählt werden, welche DNA über einen Größenbereich von 0,5 bis 8 kb aufzutrennen vermögen (LOTTSPREICH & ZORBAS, 1998). Für kleinere Fragmente wurden 2%ige, für größere Fragmente 0,7%ige Gele gewählt.

Für die Herstellung der Agarose-Gele wurde je nach Verwendungszweck entweder TAE- oder TBE-Puffer eingesetzt. Die entsprechende Agarose-Menge wurde dem Puffer zugesetzt und die Lösung unter ständigem Rühren aufgekocht. Anschließend wurde die Lösung auf etwa 60°C abgekühlt und mit 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid versetzt. Die noch warme Lösung wurde in eine Gelschale gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Nach dem Erstarren der Agarose wurde der Probenkamm entfernt und das Gel mit dem entsprechenden Puffer überschichtet.

Für die Gelelektrophorese wurden die Proben mit mindestens 1/10 Vol Saccharosefarbmarker versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung (40–130 V für 30–180 min; max. 5 V/cm Feldstärke) durchgeführt. Anschließend konnten die aufgetrennten Nukleinsäuren auf dem UV-Durchlichtschirm sichtbar gemacht und mit einer CCD-Kamera photographiert werden. Zur Längen- und Konzentrationsbestimmung wurden passende DNA-Fragmentlängenstandards eingesetzt.

Lösungen

TBE-Puffer: Tris-Base 89 mM, Borsäure 89 mM, EDTA 2,5 mM. Für die Herstellung einer Stocklösung (5 ×) wurden 54 g Tris-Base, 27,5 g Borsäure und 4,6 g EDTA in 1 l Wasser gelöst.

TAE-Puffer: Tris-Acetat 40 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4. Für die Herstellung einer Stocklösung (50 ×) wurden 242 g Tris-Base, 57,1 ml Essigsäure sowie 100 ml EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0) mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Saccharosefarbmarker : 60 % (w/v) Saccharose, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylencyanol in 1 × TBE.

Ethidiumbromid: Vorratslösung mit 10 mg · ml⁻¹ in Wasser.

Isolation von DNA aus Agarosegelen

Isolation von DNA-Fragmenten mit dem NucleoTrap®-Extraction Kit (Macherey-Nagel)

Die Methode beruht auf dem Einsatz von Glasmilch. Hierbei handelt es sich um ein Silica-Material, welches in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen DNA spezifisch bindet. Die DNA kann mit Lösungen niedriger Ionenstärke (Wasser, TE-Puffer) wieder eluiert werden. Ein Problem ergibt sich allerdings bei der Aufreinigung sehr kleiner Fragmente (< 500 Bp), da diese z. T. irreversibel an das Material binden (MÜLHARDT, 1999).

Problematisch für Aufreinigung der DNA aus TBE-Agarosegelen ist, daß Borat-Reste mit den Aufreinigungsmethoden interferieren (MÜLHARDT, 1999). Aus diesem Grund wurden für die Aufreinigung ausschließlich TAE-Agarosegele verwendet. Die aufzureinigende DNA wurde mit Saccharosefarbmarker (siehe Seite 41) sowie ¼ einer zehnfachen SYBR™-Green-Färbelösung (verdünnt in TE-Puffer) versetzt. Dann wurden die Proben mittels eines Agarosegels ohne Zusatz von Ethidiumbromid aufgetrennt. Die gewünschte Bande wurde mit einem sauberen Skalpell auf einem UV-Durchlichttisch rasch ausgeschnitten, um die Exposition der DNA mit UV-Licht und die Zahl der damit verbundenen Schäden so gering wie möglich zu halten. Es wurde versucht, die Menge an Agarose so gering wie möglich zu halten. Gemäß Herstellerangaben ist SYBR™-Green für die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen gut geeignet, da es (im Gegensatz zu Ethidiumbromid) bei den anschließenden Aufreinigungsschritten nahezu vollständig aus der Probe herausgewaschen wird.

Die weitere Aufreinigung der DNA aus dem Agaroseblock erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Der Agaroseblock wurde durch Zusatz eines chaotropen Salzes bei 50°C aufgelöst. Die an der Glasmilch gebundene DNA wurde mehrfach gewaschen und schließlich durch den Elutionspuffer abgelöst. Da Reste der Glasmilch hemmend auf manche enzymatische Reaktionen wirken, wurde die nach Herstellerangaben fertige Probe noch einmal für 5 min zentrifugiert (Hettich Tischzentrifuge), der Überstand vorsichtig entfernt und in ein sauberes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, um eventuell noch vorhandene Glasmilch-Reste möglichst quantitativ aus der Lösung zu entfernen.

Lösungen

Saccharosefarbmarker: siehe Seite 42.

TAE-Puffer: siehe Seite 42.

SYBR™Green-Färbelösung: die 10000 × Färbelösung (in DMSO) wurde mit TE-Puffer 1000fach verdünnt und die 10 × Färbelösung max. 4 Tage bei Dunkelheit bei 4°C gelagert.

Zusammensetzungen der Lösungen des NucleoTrap®-Extraction Kit vom Hersteller nicht angegeben.

Reinigung von DNA-Fragmenten mit dem QIAquick-Extraction Kit (Qiagen)

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agaroseblöcken mit Hilfe des QIAquick-Kits wurden die DNA-Proben wie beschrieben (siehe Seite 42) mit SYBR™-Green-Färbelösung (verdünnt in TE-Puffer) versetzt und auf einem TAE-Agarosegel aufgetrennt. Die Banden von Interesse wurden mittels einer sauberen Skalpellklinge ausgeschnitten und die DNA aus dem Agaroseblock gemäß Herstellerangaben aufgereinigt.

Lösungen

Saccharosefarbmarker: siehe Seite 42.

TAE-Puffer: siehe Seite 42.

SYBR™Green-Färbelösung: siehe Seite 43.

Zusammensetzungen der Lösungen des QIAquick-Extraction Kit vom Hersteller nicht angegeben.

Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Ligasen sind in der Lage, die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe am Ende einer Nukleotidkette mit einer 5'-Phosphatgruppe einer anderen Nukleotidkette zu katalysieren. Im Falle der T4-DNA-Ligase erfolgt bei Anwesenheit von ATP zunächst eine Aktivierung des Enzyms durch eine Adenylylierung unter Abspaltung von Pyrophosphat, gefolgt von einer Übertragung der AMP-Einheit auf das 5'-Ende des einen Stranges. Hierdurch erfolgt eine Aktivierung des 5'-Phosphoratoms. Anschließend kann ein nucleophiler Angriff der 3'-OH-Gruppe auf dieses aktivierte Phosphoratom erfolgen, wobei der Strang geschlossen und AMP freigesetzt wird. Die einzelnen Teilreaktionen sind frei reversibel und werden erst durch die Hydrolyse des Pyrophosphates irreversibel (STRYER, 1994).

Ligation kohäsiver Enden

Für die Ligation kohäsiver Enden wurden normalerweise mindestens 100 ng Vektor-DNA sowie die äquimolare Menge an *insert*-DNA eingesetzt. Normalerweise wurden die Ligationen in 20 µl Gesamtvolumen angesetzt. Das entsprechende Volumen Wasser wurde hinzugegeben und die Proben für 5 min auf 45°C erhitzt. Danach wurde die Proben auf Eis abgeschreckt. Auf diese Weise können bereits hybridisierte Enden auf-

geschmolzen werden. Nach *SAMBROOK et al.* sind für die Ligation kohäsiver Enden 0,1 Weiss-Einheiten T4-DNA-Ligase ausreichend (*SAMBROOK et al.*, 1989). Die Ligase sowie der T4-DNA-Ligase-Puffer (vom Hersteller mitgeliefert) wurden zugegeben und die Proben entweder 1 h bei 37°C oder über Nacht bei 15°C inkubiert. Gemäß Herstellerangaben wurde die Ligase für 20 min bei 70°C inaktiviert, um eine höhere Ausbeute an Transformanten zu erhalten. Für eine Transformation sind in den meisten Fällen 1–2 µl des Ansatzes ausreichend. In Sonderfällen wurden bis zu 15 µl des Ansatzes eingesetzt.

Ligation von Enden ohne Überhänge

Für die Ligation von Enden ohne Überhänge ist der Einsatz wesentlich größerer DNA-Mengen sinnvoll. Zusätzlich sollten hier auch höhere Konzentrationen T4-DNA-Ligase eingesetzt werden (bis 50 Weiss units). Die Ligation wurde grundsätzlich über Nacht bei 15°C durchgeführt (*SAMBROOK et al.*, 1989; *MÜLHARDT*, 1999).

Transformation von *E. coli*-Zellen

Präparation chemisch-kompetenter DH5α-Zellen (nach Inoue et al., 1990)

Für die Präparation chemisch-kompetenter DH5α-Zellen wurde eine 3 ml Vorkultur des Stammes über Nacht in dYT-Medium angezogen. Mit rund 1 ml dieser Vorkultur wurden 300 ml SOC-Medium in einem Schikanekolben (3 l) angeimpft und bis zu einer optischen Dichte zwischen $OD_{600} = 0,4$ und 0,6 bei 37°C geschüttelt. Die Kultur wurde auf sechs Falcon-Röhrchen verteilt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (Hettich Rotanta/RPC, 15 min bei 4°C) und in 90 ml kaltem TFB-I-Puffer aufgenommen. Die Zellen können in diesem bis zu 1 h auf Eis inkubiert werden. Anschließend wurden sie erneut zentrifugiert und in 12 ml TFB-II-Puffer resuspendiert. Jeweils 200 µl der Zellen wurden möglichst zügig in kalte Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei –80°C gelagert.

Lösungen

TFB I-Puffer: 100 mM KCl, 50 mM $MnCl_2$, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM $CaCl_2$, 15% Glycerin, pH 5,8–6,2, eingestellt mit Essigsäure, Lagerung bei 4°C.

TFB II-Puffer: 10 mM MOPS, 10 mM KCl, 75 mM $CaCl_2$, 15% Glycerin, pH 7,0, Lagerung bei 4°C

Transformation von DH5α mit Hilfe eines Hitzeschocks (nach Inoue et al., 1990)

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Zu 200 µl kompetenter Zellen wurden jeweils bis zu 15 µl eines Ligationsansatzes gegeben und die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 50 s 42°C ausgesetzt und erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Zu den Ansätzen wurden je 800 µl dYT gegeben und die Zellen für 45 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden in der Regel 50 µl auf LB-Platten, welche das

gewünschte Antibiotikum enthielten, plattiert. Der Rest des Transformationsansatzes wurde zentrifugiert (Hettich Tischzentrifuge, 2 min), in 200 μ l Wasser aufgenommen und ebenfalls auf LB-Platten mit Antibiotikum plattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Erzeugung elektrokompetenter E. coli-Zellen für die Transformation der Zellen mit Plasmiden

Es wurden 4 ml dYT mit *E. coli*-Zellen des Stammes BMH71-18 angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde auf vier Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und 2 min bei 6000 rpm zentrifugiert (Hettich Mikro Rapid/K, 4°C). Die Überstände wurden verworfen und die Zellen in 2 ml eisgekühltem Wasser resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension erneute zentrifugiert, in 1 ml Wasser resuspendiert und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Diese Prozedur wurde noch zweimal wiederholt, wobei die Zellen in jeweils 500 μ l und schließlich in 100 μ l Wasser resuspendiert wurden.

Jeweils 65 μ l dieser Zellen werden mit maximal 1 μ l Vektor versetzt. Die Elektroporationsküvetten (Kondensatorplattenabstand 2 mm) wurden exzessiv mit Wasser gespült und die Zell-Vektor-Mischung hineinpipettiert. Die Elektroporation erfolgte im *Gene Pulser* (Biorad, München) mit folgenden Einstellungen: Spannung 2,5 kV, Kapazität 25 μ F, Widerstand 200 Ω , Zeitkonstante 3,8–4,5 ms. Anschließend wurde möglichst schnell 1 ml dYT in die Küvette gegeben und die Zellen für 45–60 min bei 37°C inkubiert.

Da die Ausbeute an Transformanten bei der Elektroporation recht hoch ist, wurden 50 μ l der Zellen für einen Vereinzelausstrich (z.B. Drei-Strich-Methode) auf Selektivmedium verwandt. Die Platten wurden für 12–16 h bei 37°C inkubiert.

Kolonie-PCR zum schnellen Nachweis geglückter Klonierungen

Für eine schnelle Überprüfung von Klonierungen können *E. coli*-Kolonien von potentiellen positiven Transformanten direkt für eine PCR eingesetzt werden. Pro Kolonie wurden 27 μ l Wasser und 3 μ l 10 \times *Taq*-DNA-Polymerasepuffer in ein PCR-Gefäß vorgelegt. Der *Taq*-Puffer enthält das Detergenz Triton-X-100, durch welches bei hohen Temperaturen ganze *E. coli*-Zellen aufgeschlossen und somit z.B. Plasmide für eine PCR zugänglich werden.

Anschließend wurden mit Hilfe einer gelben Pipetten-Spitze ein Teil einer zu untersuchenden *E. coli*-Kolonie abgenommen und an definierter Position auf eine Masterplatte überimpft. Der Rest der entsprechenden Kolonie wurde in die Lösung überführt. Die Lösung sollte hierbei nur leicht trübe werden, da eine zu große *template*-Menge die PCR hemmen kann. Die Zellen wurden für 5 min bei 98°C aufgeschlossen.

Dann wurde eine Mischung aus *Taq*-DNA-Polymerase (2 u pro Ansatz), Desoxyribonukleotiden (0,2 mM pro Nukleotid und Ansatz), beide benötigter Primer (0,5–1 M

pro Ansatz), *Taq*-DNA-Polymerasepuffer (10 ×) und Wasser zugegeben und ein für die Amplifikation des gewünschten Fragments adäquates PCR-Programm gestartet.

Lösungen

10 × *Taq*-DNA-Polymerasepuffer: KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM (pH 9,0), MgCl₂ 15 mM, 1 % Triton X-100.

Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Bei der Mini-Präparation von Plasmid-DNA werden *E. coli*-Zellen zunächst mit Hilfe von NaOH und SDS aufgeschlossen und durch den hohen pH-Wert die DNA denaturiert. Anschließend wird durch die Zugabe von Kaliumacetat die Lösung schlagartig neutralisiert. Durch die schnelle Neutralisation kann ein Großteil der kleinen Plasmide renaturieren. Die vorhandene chromosomale DNA renaturiert aufgrund der Größe weitaus weniger vollständig als die Plasmide. Es kommt hingegen zur partiellen Renaturierung nicht zusammengehöriger Chromosomen und somit zu einer Vernetzung der Chromosomen. Zusätzlich wird durch die Zugabe von Kaliumacetat in die SDS-haltige Lösung schwerlösliches Kaliumlaurylsulfat gebildet, welches zusammen mit einem Großteil der vorhandenen Proteine und der vernetzten chromosomalen DNA ausfällt (siehe auch Seite 49), während die vollständig renaturierten Plasmide in Lösung bleiben und durch eine Ethanol-fällung konzentriert und gereinigt werden können.

Für die Präparation kleinerer Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden 3 ml Kultur über Nacht bei 37°C angezogen. Hiervon wurden 800 µl abgenommen, mit 200 µl autoklaviertem Glycerin gründlich vermischt und bei -80°C als Stock-Kultur eingefroren.

Die restlichen 2 ml wurden für 10 min zentrifugiert (Hettich Rotanta/RPC, 4000 rpm, 20°C), der Überstand verworfen, das Pellet in 100 µl E1-Puffer (JetStar® Plasmid Kit, Genomed, Bad Oeynhausen) aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 200 µl E2-Puffer zugesetzt, gründlich gemischt und die Proben für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Zusatz von 150 µl E3-Puffer wurde die Probe gut gemischt und für 20 min zentrifugiert (Hettich Mikro Rapid/K, 12000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde in frische Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und erneut für 10 min zentrifugiert und wiederum in ein frisches Gefäß überführt.

Für die Fällung wurden 1,5 ml 96%iges Ethanol (eiskalt; etwa das dreifache Volumen) zugesetzt und bei Raumtemperatur für 10–15 min inkubiert. Durch erneute Zentrifugation (Hettich Mikro Rapid/K, 12000 rpm, 4°C, 12 min) wurde die DNA pelletiert. Das Ethanol wurde entfernt, das Pellet mit Ethanol (70%) gewaschen (5 min) und erneut für 12 min zentrifugiert. Das Ethanol wurde vorsichtig abgenommen, die DNA bei 37°C für 15 min getrocknet und anschließend in 200 µl TE-Puffer gründlich resuspendiert.

Lösungen

TE-Puffer: siehe Seite 40.

E1–E3: siehe Seite 47.

Präparation von Plasmid-DNA mit Hilfe von JETStar™-Säulen

Für die Präparation größerer Plasmidmengen wurden Kulturen in 50 ml dyt über Nacht angezogen und die DNA gemäß Herstellerangaben (JETStar™ *plasmid preparation kit*, Genomed, Bad Oeynhausen) präpariert. Für die Erhöhung der Reinheit z.B. für eine Sequenzierung wurde an die Isopropanolfällung eine Ethanol-fällung (siehe Seite 39) angeschlossen. Die DNA wurde in 250 – 300 µl TE-Puffer resuspendiert.

Lösungen

E1: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg · ml⁻¹ RNaseA.

E2: 200 mM NaOH; 1 % (v/w) SDS.

E3: 3,2 M Kaliumacetat-Essigsäure, pH 5,5.

E4: 600 mM NaCl; 100 mM Natriumacetat-Essigsäure, pH 5,0.

E5: 800 mM NaCl; 100 mM Natriumacetat-Essigsäure, pH 5,0.

E6: 1,25 M NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH 8,5.

TE-Puffer: siehe Seite 40.

Transformation von *Saccharomyces cerevisiae**Protokoll für die Transformation zur chromosomalen Integration linearer DNA-Fragmente*

Für die Erzeugung kompetenter *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen wurden jeweils 50 ml autoklaviertes YPD mit 1 ml einer Übernachtskultur des zu transformierenden Stammes angeimpft und für 2,5 bis 3 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Zelldichte sollte $1 \cdot 10^7$ Zellen · ml⁻¹ betragen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (Hettich Rotanta/RPC, 4000 rpm, 20°C), mit 20 ml Aktivkohlewasser gewaschen, erneut zentrifugiert und in 1,5 ml TE- Lithiumacetat-Puffer aufgenommen. Dieser wurde frisch vor jeder Transformation aus entsprechenden Stocklösungen hergestellt (1 ml 10 × TE sowie 1 ml 10 × Lithiumacetat mit Aktivkohlewasser auf 10 ml aufgefüllt).

Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (Hettich Tischzentrifuge, 5–10 s, Raumtemperatur) und das Zellpellet in 300 µl TE-Lithiumacetat-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden für 60 min bei 30°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert.

In sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden rund 1 µg DNA für die Transformation sowie 100 µg denaturierte Lachssperma-DNA gegeben. Zu dieser Mischung wurden 200 µl der Zellen zugesetzt, gut gemischt und erneut für 30 min bei 30°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen vorsichtig aufgeschüttelt und 1 ml TE-Puffer/Lithiumacetat/PEG-Lösung zugesetzt. Auch diese wurde frisch vor jeder Transfor-

mation aus den entsprechenden Vorratslösungen hergestellt (1 ml 10 × TE-Puffer sowie 1 ml 10 × Lithiumacetat-Lösung wurden mit einer 50%igen PEG-4000-Aktivkohlewasser-Lösung auf 10 ml aufgefüllt). Wichtig ist hierbei, daß vor der Zugabe der PEG-Lösung kein Zellpellet mehr vorhanden ist, da sich dieses nach der Zugabe von PEG nicht mehr resuspendieren läßt.

Die Zellsuspension wurde durch Umschütteln vorsichtig aber gründlich mit der PEG-Lösung vermischt und die Ansätze für 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen und für 45 min bei 42°C inkubiert. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen sehr kurz pelletiert (maximal 10 s), der Überstand entfernt und die Zellen vorsichtig in 1 ml 1 × TE-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und in 1 ml autoklaviertem YPD resuspendiert. Die Suspension wurde zu 9 ml YPD gegeben und die Zellen für 3 h bei 30°C gerollt. Dann wurden die Kulturen zentrifugiert (Hettich Rotanta/RPC, 4000 rpm, 20°C), in 300 µl 1 × TE-Puffer resuspendiert und jeweils 150 µl auf einer Selektivplatte plattiert. Die Anzucht erfolgte normalerweise 2–3 Tage bei 30°C.

Lösungen

Aktivkohle-behandeltes Wasser: für die Herstellung von mit Aktivkohle gereinigtem Wasser wurden 5 g Aktivkohle pro Liter *Aqua dest.* zugegeben und über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Wasser zunächst durch einen Papierfilter filtriert, sterilfiltriert und in bereits vorautoklavierten Flaschen (um Lösungsmittelreste zu entfernen) autoklaviert.

Lachssperma-DNA: zur Präparation von *carrier-DNA* wurde *DNA Sodium Salt form Salmon Testes* (Sigma, Deisenhofen) in TE-Puffer mit einer Konzentration von 5 mg · ml⁻¹ gelöst (über Nacht). Die Lösung wurde sonifiziert (Branson Sonifier 250, Schallabgabe 40 W, Pulsabgabe 30%, 20 s, etwa 20 Impulse) und je einmal mit Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert. Nach der sich anschließenden Ethanol-fällung wurde die DNA in TE-Puffer aufgenommen (5 mg · ml⁻¹), 20 min im Wasserbad gekocht und sofort bei –20°C eingefroren. Die DNA sollte zur Sicherheit in regelmäßigen Abständen denaturiert werden.

TE-Puffer (10 ×): Tris-HCl 100 mM; EDTA 10 mM, pH 7,5, in Aktivkohlewasser.

Lithiumacetat (10 ×): LiAcetat 1 M in Aktivkohlewasser, pH 7,5.

PEG-Lösung: 50% PEG 4000 (w/v) in Aktivkohlewasser, pH 7,5.

Protokoll für die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* mit Plasmiden

Die Vorbereitung der Zellen erfolgt wie beschrieben (siehe Seite 47). Da die Transformation der Zellen mit Plasmid-DNA wesentlich effizienter ist, kann die Inkubation der Zellen mit den Plasmiden und der Lachsspermien-DNA auf 10 min verkürzt werden. Der anschließende Inkubationsschritt mit der TE-Puffer/Lithiumacetat/PEG-Lösung sollte beibehalten werden. Allerdings kann der Hitzeschock bei 42°C auf 15 min verkürzt werden. Eine anschließende Kur der Zellen in Vollmedium kann entfallen; die Zellen können direkt mit TE-Puffer gewaschen und auf Selektivmedium plattiert werden.

Lösungen

Siehe Seite 48.

Anlage von Gefrierkulturen

Die Anlage von Gefrierkulturen erfolgte entweder durch Zusatz von DMSO oder Glycerin. Für die Anlage von DMSO-Kulturen wurden 1,86 ml einer über Nacht angezogenen Kultur (Kulturvolumen 5 ml) wurden mit 140 µl DMSO versetzt, gründlich gemischt und bei -80 °C eingefroren.

Für die Anlage von Glycerin-Kulturen wurden autoklaviertes Glycerin 1:2 mit einer über Nacht angezogenen Kultur (Kulturvolumen 5 ml) vermischt, gründlich gemischt und bei -80 °C eingezogen.

Präparation chromosomaler DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* (nach Philippsen *et al.*, 1991)

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* wurden Zellen einer 5 ml Übernachtskultur des entsprechenden Stammes sedimentiert (Hettich Rotanta/RPC, 2 min 12000 rpm, 20 °C) und die Zellen mit 1 ml Wasser gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 0,5 ml SCE-Puffer, der 50 mM DTT enthielt, resuspendiert. Durch die Zugabe von DTT werden Disulfidbrücken aufgeschlossen, wodurch eine Spheroblastierung erleichtert wird (PHILIPPSSEN *et al.*, 1991).

Zu den Zellen wurden 0,1 mg Zymolyase zugegeben. Für die Spheroblastierung wurden die Ansätze für etwa 1,5 h bei 30 °C inkubiert. Zur Kontrolle der Spheroblastierung wurde auf einem Objektträger 5 µl Suspension mit 5 µl SDS 10% (w/v) vermischt und unter dem Mikroskop betrachtet. Bei Abschluß der Spheroblastierung dürfen nur noch sehr wenig intakte Zellen (< 10%) zu erkennen sein (PHILIPPSSEN *et al.*, 1991).

Anschließend wurden die Spheroblasten abzentrifugiert (Hettich-Tischzentrifuge, 6000 rpm für 1 min bei Raumtemperatur) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 500 µl Zellysis-Puffer (Tris-HCl, 50 mM; EDTA, 50 mM; 1% SDS; pH 8,0) resuspendiert und für 30–60 min bei 60 °C inkubiert (PHILIPPSSEN *et al.*, 1991). Durch das SDS werden Proteinkomponenten sowie die Phospholipide der Membran gelöst, so daß es zu einer Auflösung der Spheroblasten kommt (LOTTSPREICH & ZORBAS, 1998).

Zur Entfernung eines Großteils der Proteinkomponenten wurden 170 µl einer Kaliumacetat-Lösung (5 M) zugesetzt. Durch die Zugabe einer Kaliumacetat-Lösung erfolgt eine Metathese-Reaktion, bei welcher Kaliumdodecylsulfat gebildet wird. Dies ist in Wasser schwer löslich und bildet zusammen mit den denaturierten Proteinen einen unlöslichen Niederschlag (LOTTSPREICH & ZORBAS, 1998), welcher durch eine anschließende Zentrifugation sedimentiert werden kann (Hettich MikroRapid/K, 30 minütige Zentrifugation bei 12000 rpm und 4 °C). Der Überstand, welcher chromoso-

male DNA, Plasmid-DNA und auch RNA enthält, kann weiter verarbeitet werden (PHILIPPSEN *et al.*, 1991).

Zur weiteren Verarbeitung reichte in vielen Fällen eine Fällung der DNA mit Ethanol oder Isopropanol mit anschließendem mehrmaligem Waschen aus. Im Gegensatz zur Fällung kleinerer DNA-Fragmente oder Plasmide ist die Zugabe von Natrium- oder Ammoniumacetat nicht unbedingt erforderlich, da bereits die Zugabe von zwei bis drei Volumina eiskaltem Ethanol (96%) zur Fällung der chromosomalen DNA ausreicht. Der Ansatz wurde mindestens 30 min auf Eis inkubiert (LOTTSPREICH & ZORBAS, 1998).

Die DNA wurde schließlich durch Zentrifugation sedimentiert (Hettich MikroRapid/K, 15 min bei 12000 rpm und 4°C). Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, da sich viele Salze in 70% Ethanol lösen, was auf die gefällte DNA näherungsweise nicht zutrifft. Das Nukleinsäurepellet wurde 15 min bei 37°C getrocknet. Die DNA darf nicht zu lange getrocknet werden, da sie ansonsten nur sehr schwer wieder zu lösen ist (LOTTSPREICH & ZORBAS, 1998).

Die DNA wurde normalerweise in 250 µl TE-Puffer (pH 8,0) gelöst. Das Volumen darf hierbei zum Lösen der DNA nicht zu klein gewählt werden, da gerade bei chromosomaler DNA oftmals Klumpen ungelöster DNA in der Lösung erhalten bleiben. Es hat sich ebenfalls gezeigt, daß sich das Pellet wesentlich effizienter löste, wenn die Probe nach Zugabe des TE-Puffers für 10 min bei 60°C inkubiert wurde. Anschließend wurde sie kurz geschüttelt und erneut für 10 min bei 60°C inkubiert.

Nach dem Lösen der Nukleinsäuren erfolgt die Zugabe von etwa 20 µg RNase A. Die Proben wurden dann entweder 1–2 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch den Zusatz von RNase soll die vorhandene RNA degradiert werden. Durch eine zweite Fällung können dann bei Bedarf die RNase sowie RNA-Bruchstücke entfernt werden (PHILIPPSEN *et al.*, 1991). Um mit der DNA eine PCR durchzuführen, ist eine zweite Fällung aber nicht unbedingt notwendig, da es zu keiner merklichen Beeinträchtigung durch die Ribonukleotide und die RNase kommt.

Lösungen

Zymolyase-Stocklösung: *Yeast Lytic Enzyme* wurde mit einer Endkonzentration von 5 mg · ml⁻¹ in Wasser gelöst und bei –20°C gelagert.

SCE-Puffer: Sorbitol 1,2 M, NaCl 40 mM, *tri*-Natriumcitrat 50 mM, EDTA (pH 5,6) 60 mM.

Zellysispuffer: Tris-HCl (pH 8,0) 50 mM, EDTA (pH 8,0) 50 mM, SDS 1%.

TE-Puffer: siehe Seite 40.

RNase A: Für die Herstellung einer RNase-Lösung wurde das Protein mit einer Endkonzentration von 5 mg · ml⁻¹ in Wasser gelöst. Sofern die RNase nicht DNase frei ist, können Verunreinigungen durch Kochen der Lösung für 15 min im Wasserbad und anschließendem abschrecken inaktiviert werden. Die Lösung wurde bei –20°C gelagert.

Chromosomale Integration des KanKanMX4-Moduls in Wildtyp und mph1-Deletionsmutante

Umklonierung des KanKanMX4-Moduls in den Integrationsvektor YIplac211

Für die Umklonierung des KanKanMX4-Moduls in den Integrationsvektor YIplac211 wurden sowohl der Integrationsvektor als auch der Vektor pRS316-KanKanMX4 (siehe Seite 71) mit *EcoRI* und *SalI* geschnitten. Das geschnittene Plasmid sowie das KanKanMX4-Modul wurden mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden Banden aus dem Gel mit Hilfe des Nucleotrap-Kits (siehe Seite 42) aufgereinigt.

Für die Ligation wurde etwa die fünffache molare Menge des KanMX4-Moduls mit einem Teil Vektor gemischt und ligiert und mit dem Ligationsansatz chemisch kompetente DH5 α -Zellen transformiert (siehe Seite 44). Transformanten mit dem Plasmid YIplac211-KanKanMX4 konnten mit Hilfe von Kolonie-PCR (siehe Seite 45) identifiziert werden. Ein geeigneter Klon wurde über Nacht in 50 ml dYT angezogen und die Plasmid-DNA mit Hilfe von JETStar™-Säulen aufgereinigt (siehe Seite 47).

Rund 1 μg des Integrationsplasmids wurde mit *EcoRV* linearisiert und dieser Ansatz direkt für die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt (siehe Seite 47). Das Integrationsplasmid wird über homologe Rekombination in das defekte *ura3-52*-Gen integriert. Es entsteht hierbei eine Duplikation mit einem funktionsfähigen *URA3*-Gen, dem zu integrierenden Abschnitt und einem funktionsunfähigen *ura3*-Allel. Die Selektion von Integrierten kann daher über SD^{-Ura}-Medium erfolgen.

Zusätzlich kann auch die Integration des KanKanMX-Moduls auf Medium mit G418 überprüft werden. Da das KanKanMX4-Modul etwa mit einer Rate von $1 \cdot 10^{-4}$ revertiert, sollten auf einer YPD-Platte mit G418 bei rund $1 \cdot 10^6$ plattierten Zellen etwa 100 Einzelkolonien entstehen. Es hat sich gezeigt, daß spontan immer wieder Mutanten entstehen, welche mit einer deutlich höheren Frequenz revertieren. Diese konnten durch die Selektion auf G418 aussortiert werden.

PCR-Amplifikation von recG aus E. coli

Für die Klonierung von *recG* aus *E. coli* sollte das Gen zunächst mit Hilfe von PCR amplifiziert werden (siehe ergänzend auch Seite 111). Problematisch ist die Länge des mit rund 2,1 kb relativ langen zu amplifizierenden Gens. Es besteht die Gefahr, daß durch die *Taq*-Polymerase, welche keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt, Mutationen eingeführt werden. Andererseits war eine Amplifikation mit Polymerasen mit einer 3'-5'-Exonukleaseaktivität nur in sehr geringen Ausbeuten möglich. Aus diesem Grund wurde für die Amplifikation, ausgehend von chromosomaler DNA von DH5 α , ein Gemisch aus *Taq*- (1 μl pro Ansatz) und *Vent*-Polymerase (0,1 μl pro Ansatz) gewählt. Als Puffer wurde *Taq*-

DNA-Polymerasepuffer gewählt. Auf diese Weise konnten mit einem Standard-PCR-Ansatz und einem Standard-PCR-Programm gute Ausbeuten des zu klonierenden Gens erhalten werden.

Klonierung des amplifizierten *recG*-Gens

Klonierung über die mittels der Primer eingeführten Schnittstellen

Um die Klonierung in den Zielvektor zu vereinfachen, wurden die Primer für die PCR-Amplifikation dergestalt definiert, daß passende Schnittstellen (*Bam*HI und *Xho*I) für die Klonierung in den Zielvektor an den Enden des Gens eingeführt wurden. Es wurden hinter den Schnittstellen jeweils 6 Basen eingeführt, um zu vermeiden, daß die Restriktionsendonukleasen aufgrund zu kurzer Enden das PCR-Produkt nicht schneiden können.

Für die Klonierung wurde das PCR-Produkt mit *Bam*HI und *Xho*I gespalten und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgereinigt, um insbesondere unspezifische Produkte zu entfernen. Im weiteren Verlauf zeigte sich, daß sich das PCR-Produkt nicht in den Zielvektor ligieren ließ. Da sich das geschnittene PCR-Produkt auch nicht zu Multimeren aufligieren ließ, liegt die Vermutung nahe, daß das PCR-Produkt – trotz der Überhänge nach den Schnittstellen – durch die Restriktionsenzyme nicht geschnitten wurde.

Erzeugung stumpfer Enden mit Hilfe von T4-DNA-Polymerase und anschließende Klonierung

Als Alternative wurde versucht, daß PCR-Produkt über stumpfe Enden in einen Vektor zu klonieren. Problematisch ist hierbei, daß Polymerasen ohne eine *proof-reading*-Funktion wie die Taq-Polymerase oftmals mehr oder weniger unspezifisch am Ende eine zusätzliche Base einfügen, so daß sich die Fragmente nicht einfach in einen Vektor mit stumpfen Enden ligieren lassen (MÜLHARDT, 1999). Diese Problematik kann man umgehen, indem mit Hilfe von T4-DNA-Polymerase, welche eine 3'→5' Exonukleaseaktivität besitzt, die überhängenden Enden entfernt werden.

Um zu vermeiden, daß durch die Exonukleaseaktivität zu viele Basen entfernt werden, wurde das PCR-Produkt mit T4-DNA-Polymerase sowie Desoxyribonukleotiden inkubiert, so daß entstehende 5'-Überhänge durch die Polymerasefunktion wieder aufgefüllt werden können. Die Reaktion wurde für 20 min bei 10°C durchgeführt und das Enzym durch einen Hitzeschritt (20 min bei 70°C) inaktiviert.

Da bei einer Klonierung über stumpfe Enden die Gefahr größer ist, daß unspezifische Fragmente in den Zielvektor kloniert werden, wurde das PCR-Produkt mit den stumpfen Enden über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt (siehe Seiten 41 & 42).

Der Zielvektor pBluescript SK II (-) wurde mit *Sma*I geschnitten, und das PCR-Produkt hineinligiert. Mit 10 µl des Ligationsansatzes wurden DH5α-Zellen mittels Hitzeschock (siehe Seite 44) transformiert.

Die Platten für die Anzucht wurden mit einem Gemisch aus 50 µl X-Gal und 50 µl IPTG bestrichen und anschließend die Transformationsansätze plattiert. Da der Zielvektor pBluescript SK II (-) eine Blau-Weiß-Selektion zuließ, konnte zwischen Vektoren mit *insert* und Religanten unterschieden werden. Von mehreren weißen Kolonien wurde Plasmid-DNA präpariert und die Anwesenheit des *recG*-Gens mittels einer Restriktionspaltung überprüft.

Lösungen

X-Gal: 4% (w/w) X-Gal, gelöst in Dimethylformamid (DMF).

IPTG: 1 M, gelöst in Wasser.

Umklonierung des recG-Gens in den Hefe-Expressionsvektor pYGET

Interessanter Weise ließ sich das *recG*-Gen über die mittels der Primer eingeführten Schnittstellen, welche sich im PCR-Produkt nicht schneiden ließen, nach der Ligation in den Vektor pBluescript SK II (-) problemlos ausschneiden. Die Erkennungssequenz für die Restriktionsenzyme waren demnach vorhanden und intakt.

Der Zielvektor pYGET konnte somit ebenfalls mit *Bam*HI und *Xho*I geschnitten und das *recG*-Gen hineinligiert werden. Mit dem Ligationsansatz wurden chemisch kompetente DH5α-Zellen transformiert. Von mehreren Transformanten wurde Plasmid-DNA präpariert und die Anwesenheit des *recG*-Gens mit Hilfe von Restriktionsspaltungen nachgewiesen. Vektoren mit *recG*-Gen konnten anschließend für die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt werden (siehe Seite 48).

Elektronenmikroskopie

Trägernetze (Grids)

Es wurden Grids der Typen G300 und G400 aus Nickel mit quadratischen Fenstern (Fa. Plano, W. Plannet GmbH, Wetzlar) verwendet. Alle Grids wurden zunächst, wie im folgenden beschrieben, mit Formvarfolie befilmt.

Herstellung von Kunststoffolie (modifiziert nach Mahl & Möldner, 1973)

Es wurde eine Lösung von 0,5% (w/v) Formvar (Polyvinylformaldehyd) in wasserfreiem Chloroform hergestellt. Die Lösung wurde durch ein Papierfilter in einen Tropftrichter gegeben. Ein entfetteter und staubfreier Glasobjektträger wurde in den Tropftrichter gestellt, wobei die Füllhöhe im Tropftrichter etwa so gewählt wurde, daß der Objektträger zu ca. 2/3 mit Formvarlösung bedeckt war. Die Formvarlösung wurde dann abgelassen, der Objektträger aus dem Tropftrichter entnommen und etwa 1 min zum Trocknen in ein staubfreies Becherglas gestellt, welches während der Trocknungszeit abgedeckt wurde. Durch diese Prozedur verbleibt nach dem Verdunsten des Chloroforms ein dünner Film

aus Formvar auf dem Objektträger haften. Die Dicke des Films kann durch die Ablaufgeschwindigkeit der Formvarlösung gesteuert werden.

Um den Film abzulösen wurde ein Becherglas (2 l) bis zum Rand mit destilliertem Wasser gefüllt und die Oberfläche des Wassers mit einem Filterpapier von schwimmenden Schmutzpartikeln befreit. Der Objektträger wurde ohne vorheriges Anritzen der Kanten senkrecht in das Wasser abgetaucht, wobei sich der Formvarfilm von dem Objektträger löste und auf der Wasseroberfläche schwamm. Schwimmende Formvarfilme wurden dann möglichst dicht mit Nickelgrids belegt, wobei die Arbeitsseite der Grids nach unten, zur Folie hin, orientiert war. Vollständig belegte Folien wurden mit einem Stück Parafilm-Deckpapier bedeckt, von der Wasseroberfläche abgenommen und mit den Grids nach oben zeigend zum trocknen auf ein Filterpapier gelegt. Anschließend wurden die Grids in einer Petrischale staubfrei verwahrt.

Anzucht und Einbettung der Zellen

Anzucht und Vorbereitung

Für die Einbettung wurden 5 ml einer über Nacht angezogenen Kultur abzentrifugiert (Hettich Rotanta/RPC, 4000 rpm, 20°C), mit 1 × PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS resuspendiert. Der Lösung wurden zum Zwecke der Fixierung 0,5% (v/v) Glutaraldehyd sowie 0,5% Formaldehyd (10%ige Stammlösung hergestellt aus Paraformaldehyd) zugesetzt und 90 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und in 150 µl PBS-Puffer aufgenommen. Den Proben wurden etwa 150 µl 1,5%iger Agar (in PBS) mit einer Temperatur von rund 50°C zugesetzt, zügig gemischt und auf Eis abgekühlt. Nach dem abkühlen wurde das Agar-Klötzchen in etwa 1 mm große Blöcke zerschnitten.

Lösungen

PBS: NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4.

Tiefemperatur-Einbettung von Zellsuspensionen in Lowicryl-K4M-Harz (nach Hoppert, 2003)

Für die Einbettung wurde den Agarwürfeln zunächst durch Behandlung mit Methanol das Wasser entzogen und dann das Methanol gegen flüssiges Harz ausgetauscht.

Zu diesem Zweck wurden die Agarblöcke in ein Schraubdeckelglas überführt. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit je 1 ml der in Tabelle 2 aufgeführten Lösungen, wobei nach jedem Schritt die Lösung so quantitativ wie möglich abgenommen und durch die folgende ersetzt wurde.

Tabelle 2: Inkubationsschritte und Temperaturangaben für den sukzessiven Austausch des Wassers in den einzubettenden Agarblöcken gegen Methanol bzw. anschließend gegen Lowicryl-K4M-Harz. Die Temperaturen sind möglichst tief gewählt, ohne daß die Proben einfrieren. Die Temperatur sollte bei dem Wechsel der Lösungen möglichst nicht ansteigen.

Schritt	Lösung	Inkubationszeit [min]	Temperatur [°C]
1	15 % (w/v) Methanol in Aqua dest.	15	0
2	30 % Methanol	30	0
3	50 % Methanol	30	-20
4	70 % Methanol	30	-35
5	95 % Methanol	30	-35
6	100 % Methanol	30	-35
7	100 % Methanol	30	-35
8	50 % Methanol/50 % Lowicryl-K4M-Harz	60	-35
9	33 % Methanol/66 % Lowicryl-K4M-Harz	120	-35
10	100 % Harz	1	-35
11	100 % Harz	Über Nacht	-35

Zur Vereinfachung der Prozedur wurde von Schritt 7 zu 8 das Methanol nicht entfernt, sondern zusätzlich 1 ml 100 % Lowicryl-K4M-Harz zugesetzt. Von Schritt 8 zu Schritt 9 wurde dann erneut in die Mischung 1 ml des 100 %igen Harzes zugesetzt. Es ist bei allen Schritten wichtig, daß die Temperatur beim Wechseln der Lösungen nicht ansteigt.

Die Agarblöckchen wurden dann in mit frischem Harz gefüllte Gelatine kapseln (BEEM-Kapseln, Plano, W. Plannet GmbH, Wetzlar) überführt. Die Polymerisation erfolgte zunächst 24 h bei -35°C und dann 24 h bei Raumtemperatur (UV-Lichtschrank RTP 010, Balzers Union, Liechtenstein), jeweils unter UV-Licht (366 nm). Die Inkubationen bei -35°C wurden in einer Tiefkühltruhe mit Kühlfalle (TPP 010, Balzers Union, Liechtenstein) durchgeführt.

Trimmen der Proben

Fertig auspolymerisierte Harzblöcke wurden in einer Diamantfräse (TM 60, Reichert, Wien, Österreich) angespitzt. Es wurde eine Pyramide geformt, deren Spitze waagrecht zur Längsachse des Harzblocks so abgeflacht wurde, daß eine quadratische Fläche von etwa 1 mm^2 entstand. Die im Harzblock eingebettete Probe wurde dabei teilweise freigelegt, so daß sie in dieser Fläche zum Vorschein kam.

Herstellung von Glasmessern

Für die Herstellung von Glasmessern wurden von 25 mm breiten und 6,5 mm dicken Tafelglasstreifen (LKB, Broma, Schweden) Quadrate mit Hilfe eines Messerbrechers (Knifemaker II, LKB, Broma, Schweden) abgebrochen. Aus diesen Glasquadraten konnten im Idealfall durch diagonales Anritzen (45° -Winkel) und Brechen zwei Messer gewonnen werden, deren Schnittfläche einen realen Winkel von 55° bei einem Gegenstück von ca. 0,5 mm besaßen.

Verwendbare Glasmesser wurden mit einem Kunststofftrog (Plano, W. Plannet GmbH, Wetzlar) versehen. Dieser wurde mit flüssigem Dentalwachs an die Messer geklebt und abgedichtet. Auf diese Weise fertiggestellte Glasmesser wurden bis zu ihrer Benutzung staubfrei verwahrt.

Herstellung von Ultradünnschnitten

Nach Einspannen eines Glasmessers und einer getrimmten Probe in das Ultramikrotom (FC 4, Reichert-Jung, Österreich) wurden Schnittfläche und Messerkante parallel zueinander ausgerichtet. Der Trog des Messers wurde mit filtriertem *Aqua bidest.* aufgefüllt. An der Messerkante ergab sich dabei eine konkave Oberfläche. Es wurden dann zunächst einige Semidünnschnitte angefertigt. Sobald diese regelmäßig auf die Wasseroberfläche abflottierten, wurde die Schnittdicke auf 70 nm eingestellt. Die entstehenden Ultradünnschnitte wurden anhand ihrer Interferenzfarbe beurteilt. Schnitte mit grauer Färbung wurden mit einer Wimper auf der Wasseroberfläche zusammengetrieben und mit einem mit Formvar beschichteten Nickelgrid von der Wasseroberfläche so abgenommen, daß die Schnitte auf der beschichteten Seite des Grids lagen. Überschüssiges Wasser wurde mit Filterpapier vom Grid abgesaugt. Grids mit Schnitten, an denen Immun-Gold-Markierungen durchgeführt werden sollten, wurden bis dahin mit den Schnitten nach unten weisend auf PBS schwimmend aufbewahrt. Sonstige Grids wurden sofort kontrastiert.

Lösungen

PBS: siehe Seite 54.

Immunelektronenmikroskopie

Immun-Gold-Markierungen an Ultradünnschnitten

Für die Immun-Gold-Markierung wurden jeweils spezifisch gegen das zu untersuchende Protein gerichtete Primärantikörper an den Schnitt gebunden. An diese wurden im nächsten Schritt Sekundärantikörper gebunden, welche gegen den F_c -Teil des Primärantikörpers gerichtet waren. Der Sekundärantikörper war mit kolloidalen Goldpartikeln gekoppelt. Diese können im elektronenmikroskopischen Bild als elektronendichte Punkte erkannt werden.

Für die Markierung (nach HOPPERT, 2003) wurden Ultradünnschnitte von in Lowicryl-K4M eingebetteten Zellen hergestellt. Diese wurden mit formvarbeschichteten Nickelgrids aufgenommen und bis zur Verwendung auf PBS-Tropfen flottierend aufbewahrt (max. 2 h). Die Flüssigkeit wurde mit Filterpapier möglichst komplett abgesaugt und die Grids anschließend für 3 h auf Tropfen einer Verdünnungsreihe des primären Antikörpers gelegt. Die Verdünnung des primären Antikörpers erfolgte in PBS. Um Austrocknung zu vermeiden, erfolgte die Inkubation in einer Petrischale mit einem feuchten Tuch.

Die Grids wurden zweimal für je 10 s mit PBS-Tween 20 mit einer Spritzflasche gewaschen, indem der Flüssigkeitsstrahl auf die Dünnschnitte gerichtet wurde (*»jetwash«*). Der Flüssigkeitsstrahl sollte hierbei nicht von der Rückseite auf die Proben treffen, da ansonsten die Gefahr besteht, daß die Dünnschnitte abgelöst werden.

Die Grids wurden zweimal hintereinander für je 5 min auf Tropfen mit PBS-Tween und anschließend für 5 min auf Tropfen mit PBS gelegt. Die Flüssigkeit wurde mit Filterpapier möglichst komplett abgesaugt und die Grids anschließend für 1 h auf 40 µl große Tropfen von goldgekoppeltem Sekundärantikörper gelegt (verdünnt 1:60 in PBS). Anschließend wurden die Proben erneut mit PBS-Tween gewaschen.

Die Grids wurden zweimal hintereinander für je 5 min auf Tropfen mit PBS-Tween, anschließend für 5 min auf Tropfen mit PBS und dann für 5 min auf Tropfen mit *Aqua bidest.* gelegt. Danach wurde die Flüssigkeit mit Filterpapier möglichst komplett abgesaugt. Die derart behandelten Proben wurden abschließend mit Uranylacetat und Reynolds-Bleicitrat kontrastiert.

Lösungen

PBS: siehe Seite 54.

PBS-Tween: PBS mit 0,05% Tween-20.

Kontrastierung mit Bleicitrat und Uranylacetat

Für Dünnschnitte ganzer Hefezellen hat sich gezeigt, daß eine Kontrastierung mit Bleicitrat nach REYNOLDS (REYNOLDS, 1963) und Uranylacetat die besten Ergebnisse lieferte.

Zur Herstellung von Bleicitrat-Kontrastierlösung nach REYNOLDS wurden 1,33 g Bleicitrat und 1,76 g Natriumcitrat in 30 ml Wasser 30 min geschüttelt. Anschließend wurden 8 ml NaOH-Lösung (1 M) und 12 ml Wasser zugesetzt. Die Lösung ist haltbarer als eine reine Bleicitratlösung, da die hohe Citrat-Ionenkonzentration zu einer Stabilisierung führt. Trotzdem muß sie nach 2–3 Tagen erneuert werden, da schwerlösliches Bleicarbonat auszufallen beginnt.

Für die Kontrastierung wurden die Nickelgrids für 3 min auf einen Tropfen Uranylacetat-Lösung (4%) gelegt, welche zuvor zentrifugiert worden war (Hettich Tischzentrifuge, 5 min), um Kristalle aus der Lösung zu entfernen. Da Uranylacetat lichtempfindlich ist, muß die Vorratslösung in Braunglasflaschen aufbewahrt werden. Anschließend erfolgte die Kontrastierung mit Bleicitrat-Lösung nach REYNOLDS.

Problematisch bei der Kontrastierung mit Bleicitrat ist das leicht in der Lösung ausfallende Bleicarbonat, welches als Präzipitat den Schnitt bedecken und damit für die elektronenmikroskopische Analyse unbrauchbar machen kann. Um diesen Effekt zu vermeiden wurden die Grids in einer CO₂-freien Atmosphäre inkubiert. Zu diesem Zweck wurden in einer Petrischale einige NaOH-Plätzchen mit etwas Wasser versetzt. Die Grids wurden in dieser Petrischale auf Tropfen der frisch angefertigten Bleicitrat-Lösung gelegt und für 3 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte gründlich mit Wasser gewaschen, welchem durch Abkochen das CO₂ ausgetrieben wurde. Die Proben wurden auf Filterpapier getrocknet und anschließend elektronenmikroskopisch untersucht.

Fluoreszenzmikroskopie

Anzucht und Präparation der Zellen

Anzucht und Vorbereitung

Der zu untersuchende Stamm wurde über Nacht angezogen. Zu dieser Kultur wurde Formaldehydlösung mit einer Endkonzentration von 4% gegeben (0,66 Volumen einer 10%igen Lösung). Die Probe wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (Hettich Rotanta/RPC, 4000 rpm, 20°C), in 1 × PBS mit 4% Formaldehyd resuspendiert und bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert.

Nach der Fixierung wurden die Zellen erneut zentrifugiert, zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und in 1 ml IFF-A resuspendiert. Zur Entfernung der Zellwand wurden 10 µl β-Mercaptoethanol, 110 µl Glusulase sowie 35 µl Zymolyase (5 mg · ml⁻¹) zugesetzt und die Kultur für 30 min bei 37°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert.

Anschließend wurden die Spheroblasten abzentrifugiert (Hettich micro rapid/k, 1500 rpm, 2 min), in 1 ml IFF-A vorsichtig resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 250–500 µl IFF-A aufgenommen. Die Zellen können in diesem Zustand für mehrere Tage im Kühlschrank gelagert werden.

Lösungen

IFF-A: 40 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5, 0,5 mM MgCl₂, 1,2 M Sorbitol.

IFF-B: 200 mM Tris-HCl, pH 9,0, 20 mM EDTA (pH 8,0), 1 M NaCl; direkt vor Gebrauch

Zugabe von 60 µl β-Mercaptoethanol/10 ml.

IFF-C: Phosphat/Citrat-Puffer, pH 5,8 (22,32 g KH₂PO₄ und 9,41 g *tri*-Natriumcitrat pro Liter Wasser); 1:2 mischen mit 2 M NaCl.

IFF-D: 180 g Sorbitol in 250 ml Phosphat/Citrat-Puffer pH 5,8 (22,32 g KH₂PO₄ und 9,41 g *tri*-Natriumcitrat pro Liter Wasser) lösen.

IFF-E: 10 mg KH₂PO₄ in 90 ml Wasser lösen, mit 0,1 N KOH auf pH 7,4 einstellen und auf 100 ml auffüllen. Dann Zusatz von 850 mg NaCl, 100 mg BSA und 100 mg NaN₃.

Immobilisierung der Spheroblasten auf multiwell slides

Für die Immobilisierung der Spheroblasten wurden 10 µl Polylysin-Lösung in die Vertiefungen der Objektträger gegeben und nach 10 min wieder abpipettiert. Anschließend wurde die Restflüssigkeit luftgetrocknet. Die Vertiefungen werden dreimal mit 10 µl Wasser gewaschen und anschließend erneut an der Luft getrocknet.

In die Vertiefungen wurden etwa 10 µl der vorbereiteten Zellsuspension pipettiert und nach 10 s wieder entfernt. Durch Verdunsten wurde die Restflüssigkeit entfernt. Anschließend wurde kontrolliert, ob genügend Spheroblasten in der Vertiefung lagen und ob sie eine ovale Form aufwiesen. Runde Spheroblasten deuten auf eine ungenügende Fixierung oder auf einen zu großen mechanischen Streß hin.

Anschließend wurden die Objektträger 6 min in kaltem Methanol und dann für 30 s in kaltem Aceton (beides -20°C) gebadet und an der Luft getrocknet. Danach erfolgte der Zusatz von $10\ \mu\text{l}$ des anti-Sendai-Antikörper aus Maus in den Verdünnungen 1:2, 1:10 und 1:100. Die Verdünnung des Antiserums erfolgte in IFF-E. Die Inkubation erfolgte für 1 h in einer Petrischale mit einem angefeuchteten Tuch, um die Austrocknung zu vermeiden. Nach der Inkubation wurde das Serum entfernt und die Vertiefungen zehnmal mit IFF-E gewaschen (bei den letzten drei Waschschrritten wurden die Tropfen erst nach etwa 10 s wieder entfernt).

Direkt anschließend wurden $10\ \mu\text{l}$ anti-Maus-Antikörper aus Ziege, konjugiert mit Fluorescin (Verdünnung: 1:1000), in die Vertiefungen gegeben und für 1 h inkubiert. Die Inkubation erfolgte zur Vermeidung von *photobleaching* bei Dunkelheit.

Nach dieser Inkubation wurden die Vertiefungen (bei verringerter Lichteinstrahlung) erneut mit $10\ \mu\text{l}$ IFF-E zehnmal gewaschen. In die Vertiefungen wurden $10\ \mu\text{l}$ DAPI-Lösung gegeben und die Proben für 1 min inkubiert. Die Lösung wurde entfernt, $12\ \mu\text{l}$ ProLong Antifade (Molecular Probes) zugesetzt und das Deckglas aufgelegt. Direkt anschließend wurden die Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Läßt man das ProLong Antifade eintrocknen, können die Objektträger nach Herstellerangaben problemlos über längere Zeiträume bei -20°C gelagert werden.

Lösungen

IFF-A – IFF-E: siehe Seite 58.

DAPI: $1\ \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ DAPI in Wasser.

Polylysin-Lösung: $1\ \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ Polylysin in Wasser.

ERGEBNISSE

Experimente zur Induzierten Mutagenese

Die Mutationsfrequenz läßt sich in *mph1*-Deletionsmutanten durch die Behandlung mit Mutagenen steigern

mph1-Deletionsmutanten zeigen eine deutlich erhöhte Mutationsrate im *CAN1*-Vorwärtsmutationssystem. Dieser Mutatorphänotyp ist abhängig von der Anwesenheit der Transläsionspolymerase ζ (SCHELLER *et al.*, 2000). Eine einfache Hypothese zur Erklärung dieses Befundes ist die Annahme, daß durch Mph1 Läsionen der DNA fehlerfrei prozessiert werden, die in Abwesenheit von Mph1 zumindest teilweise fehlerbehaftet durch die Transläsionssynthese überlesen werden und auf diese Weise zu dem beobachteten Mutatorphänotyp führen.

Gemäß dieser Hypothese sollte man erwarten, daß es in *mph1*-Deletionsmutanten zu einer Erhöhung der Mutationsfrequenzen kommt, wenn in der DNA Läsionen durch eine Behandlung mit Mutagenen induziert werden.

Um dies zu untersuchen, wurde die Mutationsfrequenz unterschiedlicher Stämme nach Behandlung mit einem Mutagen mit Hilfe des Canavanin-Vorwärtsmutationssystems bestimmt. Die Zellen wurden mit Hilfe des Pheromons *α -mating factor* in der G_1 -Phase des Zellzyklus arretiert. Nach Aufheben des Arrests wurden die Zellen in Medium mit unterschiedlichen, subletalen Dosen des Mutagens 4-Nitrochinolin-1-oxid resuspendiert. 4-Nitrochinolin-1-oxid wird durch den Zellmetabolismus aktiviert und mit den Nukleobasen kovalent verknüpft, so daß replikationsarretierende Addukte entstehen (TURESKY, 1994). Um zu gewährleisten, daß die Zellen eine vollständige S-Phase in Anwesenheit des Mutagens durchlaufen, wurden die Zellen für die Dauer eines Zellzyklus inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen gewaschen und auf SD^{-Arg-} und SD^{-Arg+} Canavanin-Platten zur Bestimmung des Lebendtiters sowie der Mutationsfrequenz durch Plattierung die Lebendzellzahl und die Zahl der canavaninresistenten Zellen bestimmt. Die Berechnung der Mutationsfrequenzen erfolgte wie beschrieben (siehe Seite 37).

Aus Abb. 3 läßt sich entnehmen, daß im Wildtyp durch die Behandlung mit 4-NQO die Mutationsfrequenz leicht erhöht werden kann. Diese Erhöhung kann durch die zusätzliche Deletion von *REV3* verringert werden. Offenbar wird also im Wildtyp ein Teil der auftretenden, durch 4-NQO hervorgerufenen Läsionen von Pol ζ überlesen, wobei vermehrt Mutationen entstehen.

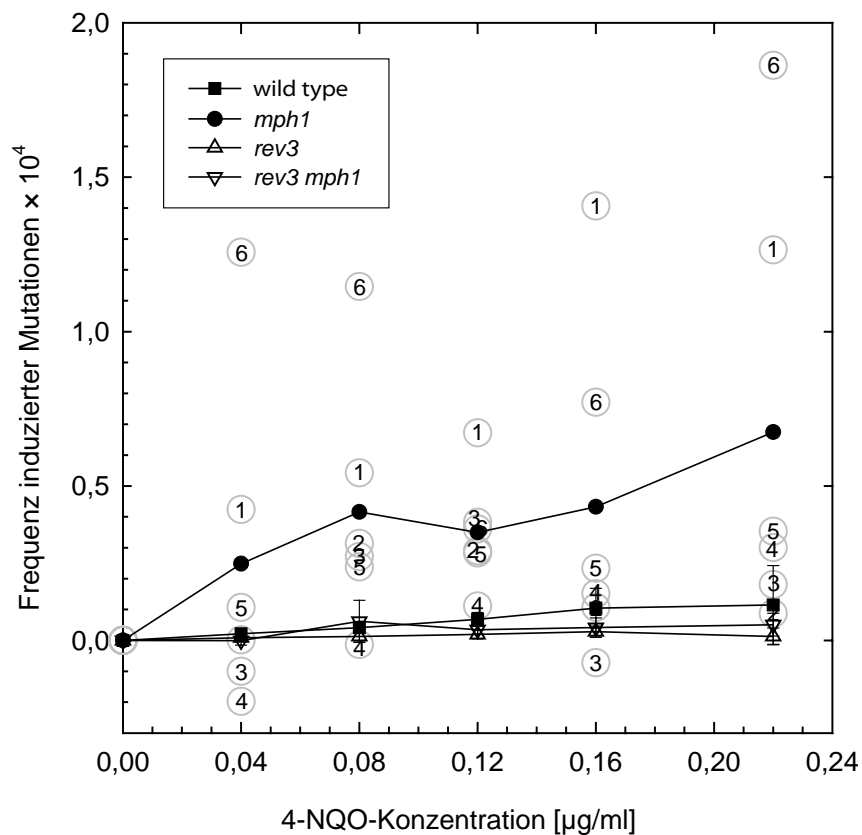


Abb. 3: Beeinflussung der Mutationsfrequenz durch Behandlung der Stämme CEN.PK 2-1C, CEN.PK 2-1C *mph1*, CEN.PK 2-1C *rev3* und CEN.PK 2-1C *rev3 mph1* mit 4-Nitrochinolin-1-oxid. Die Stämme wurden bei Erreichen einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml⁻¹ mit α -mating factor in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium mit den angegebenen Konzentrationen 4-Nitrochinolin-1-oxid resuspendiert und für die Dauer eines Zellzyklus bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und Verdünnungen auf SD^{-Arg}-Selektivmedium zur Bestimmung der Lebendzellzahl sowie auf Medium mit Canavanin zur Bestimmung der Mutationsfrequenz plattiert. Gezeigt sind Datensätze aus drei bis sechs Experimenten. Für die *mph1*-Mutante wurden die Datenpunkte aller sechs Experimente gezeigt. Bei allen anderen Stämmen entsprechen die Fehlerbalken der Standardabweichung.

In der *mph1*-Deletionsmutante ist die Erhöhung der Mutationsfrequenz erheblich stärker als im Wildtyp. Hier führt die Behandlung der Zellen mit 4-NQO zu deutlich mehr Mutationsereignissen. Ähnlich wie bereits für die Mutationsrate beobachtet ist diese Erhöhung der Mutationsfrequenz abhängig von Pol ζ. Die Mutationsfrequenzen der *mph1 rev3*-Doppelmutante unterscheiden sich nur sehr geringfügig von den Mutationsfrequenzen der *rev3*-Einzelmutante.

Diese Befunde unterstützen die Hypothese, daß Mph1 an der Prozessierung von DNA-Läsionen beteiligt ist, die in Abwesenheit von Mph1 zumindest zu einem nicht unerheblichen Teil durch die Transläsionspolymerase ζ prozessiert werden. Es ist also zu vermuten, daß es sich um kleinere DNA-Läsionen handelt, welche vermutlich eher zu einem

Arrest der replikativen Polymerasen führen, da Sekundärstrukturen, DNA-Protein-Komplexe etc. aller Wahrscheinlichkeit nach nicht durch die Translasionssynthese prozessiert werden.

Da die Mutationsrate in *mph1*-Deletionsmutanten auch unter Normalbedingungen (also ohne exogene Chemikalienzugabe) erhöht ist (SCHELLER *et al.*, 2000), muß Mph1 offenbar an der Prozessierung von Läsionen beteiligt sein, welche auch während des normalen Zellmetabolismus entstehen. Hierbei handelt es sich vor allem um Basenveränderungen, welche durch reaktive Sauerstoffspezies oder spontane Hydrolyse entstehen, oder um abasische Stellen, welche (insbesondere durch die spontane Hydrolyse an Purinen) mit hoher Rate auftreten (LINDAHL & WOOD, 1999; BERNSTEIN & BERNSTEIN, 1991). Diese einzelnen Formen werden z.T. auch ineinander umgewandelt. So werden veränderte Basen wie zu U desaminiertes C normalerweise durch die Basenexcisionsreparatur repariert. Hierbei wird die veränderte Base unter Verwendung einer speziellen Glycosylase aus der DNA unter Verbleib einer abasischen Stelle (AP-Stellen) herausgeschnitten. Diese AP-Stellen werden dann durch Endonukleasen geschnitten und können beseitigt werden (LINDAHL & WOOD, 1999; MARNETT & PLASTARAS, 2001). Aber auch Methylierungen insbesondere an Position N⁷ der Purine können zur Bildung von AP-Stellen führen. Es ist aus diesen Gründen anzunehmen, daß AP-Stellen eine der hauptsächlichen Schadensarten in Zellen repräsentieren.

In diesem Zusammenhang ist der Befund interessant, daß sich in einer *apn1 mph1*-Doppelmutante, in welcher zusätzlich zu Mph1 das Gen für eine der Endonukleasen zur Prozessierung von AP-Stellen deletiert wurde, eine im Vergleich zu den Einzelmutanten synergistische Erhöhung der Mutationsrate zeigen läßt (SCHÜRER *et al.*, in Vorbereitung). Dieser Effekt wird durch die Deletion eines Gens für eine weitere Endonuklease, *APN2*, noch verstärkt, wobei die Erhöhung der Mutationsraten auch hier wieder von Pol ζ abhängt. Hieraus läßt sich die Hypothese ableiten, daß Mph1 an der fehlerfreien Prozessierung u.a. von AP-Stellen beteiligt ist.

Untersuchungen zur Stabilität repetitiver Sequenzen in mph1-Deletionsmutanten

Arretierte Replikationsgabeln führen in *E. coli* zur Instabilität von direkten Sequenzduplikationen

Tandemartig angeordnete Sequenzwiederholungen finden sich in den Genomen sehr vieler Organismen. Die Länge derartiger Sequenzwiederholungen ist sehr unterschiedlich und reicht von wenigen Nukleotiden bis hin zu mehreren hundert Basenpaaren. Derartige Sequenzwiederholungen sind anfällig für Veränderungen wie Deletionen oder Erhöhung der Kopienzahl, wobei eine solche Änderung innerhalb eines Gens oder auch in der Nähe von Genen zu Änderungen der Expression, zur Veränderung des Genproduktes

oder zum Ausfall von Genen führen kann (ASHLEY & WARREN, 1995). Ein gutes Beispiel ist die myotonische Dystrophie. Bei dieser Erkrankung kommt es zu einer Verlängerung von polyCTG-Sequenzen in der 3' untranslatierten Region des DMPK-Gens (ASHLEY & WARREN, 1995). Zum besseren Verständnis von Erkrankungen, welche mit einer Instabilität von repetitiven Sequenzen einhergehen, wurden die Mechanismen, welche für derartige Veränderungen zuständig sein könnten, intensiv untersucht.

Eine Vielzahl genetischer Untersuchungen in *E. coli* deutet darauf hin, daß eine Reihe unterschiedlicher Prozesse an der Instabilität repetitiver Sequenzen beteiligt ist. Hierbei beruht der größere Teil aller Deletionsereignisse auf einem Mechanismus, welcher abhängig von RecA ist, so daß eine Beteiligung homologer Rekombination angenommen wird. Allerdings ist ein signifikanter Anteil unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit von RecA (LOVETT *et al.*, 1993).

Die Untersuchung einer größeren Zahl von Mutanten, in welchen Proteine des Replikationsapparates verändert oder inaktiviert wurden, deutet darauf hin, daß die Replikation sowohl bei den RecA-abhängigen als auch bei den RecA-unabhängigen Mechanismen eine Rolle spielt (LOVETT *et al.*, 1993; SAVESON & LOVETT, 1997; BIERNE *et al.*, 1997A). So konnte u.a. in *hold*-Deletionsmutanten eine verstärkte Deletion von Sequenzduplikationen nachgewiesen werden. *hold* codiert für die ψ -Untereinheit des Pol III-Holoenzym in *E. coli*. Es wird angenommen, daß es eine strukturelle Komponente des *clamp loader* (γ -Komplex) ist und daß in *hold*-Deletionsmutanten der γ -Komplex destabilisiert wird, wodurch vermehrt Replikationsgabeln arretieren (FLORES *et al.*, 2001).

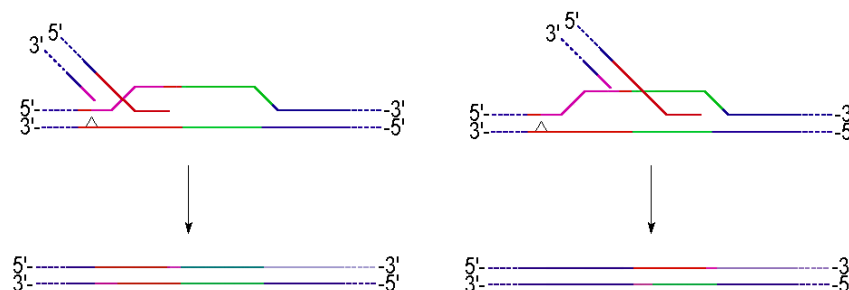


Abb. 4: Modell zur Erklärung der Instabilität von Sequenzduplikationen aufgrund rekombinativer Reinitiation arretierter Replikationsgabeln (vgl. auch Abb. 1). Die ursprünglichen Abschnitte gleicher Sequenz sind in rot und grün dargestellt, die nach dem Arrest auftretenden replizierten Bereiche in magenta und blaugrün. Erfolgt der Arrest des *leading strand* im ersten *repeat*, so kann es nach erfolgtem *polymerase strand switching*, Auflösung der *Holliday junction* durch Resolvasen sowie der Bildung eines 3'-Überhanges durch RecBCD zu einer RecA-vermittelten Stranginvasion kommen. Erfolgt diese Invasion versehentlich im hinteren *repeat*, so wird der vordere deletiert.

Die Instabilität der repetitiven Sequenzen beruht hierbei vermutlich darauf, daß die *Holliday junctions* nach dem *polymerase strand switching* aufgelöst werden. Das auf diese Weise entstehende doppelsträngige Ende kann durch RecBC degradiert und der 3'-

Einzelstrangüberhang RecA-vermittelt in das Chromosom eingeführt werden, um eine Reinitiation der Replikation zu ermöglichen. Hierbei ist es möglich, daß das doppelsträngige Ende versehentlich entweder im *repeat* vor oder auch nach dem Abschnitt, in welchem der Arrest erfolgt ist, eingeführt wird, so daß es sowohl zu einer Insertion einer zusätzlichen Kopie als auch zu einer Deletion einer Kopie kommen kann (FLORES *et al.*, 2001). Die Deletion einer Duplikation durch diesen Mechanismus ist schematisch in Abb. 4 dargestellt.

Entwicklung eines Systems zur Untersuchung der Stabilität von Sequenzduplikationen in *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Untersuchung zur Stabilität von Sequenzduplikationen in *Saccharomyces cerevisiae* wurde ein ähnliches, plasmidbasiertes System entwickelt, wie es in LOVETT *et al.* für *E. coli* beschrieben wurde (LOVETT *et al.*, 1993). Im Plasmid pFA6a-KanMX4 (siehe Abb. 5) befindet sich ein Kanamycin-Resistenzgen aus *E. coli* mit Promotor- und Terminatorsequenzen aus *Ashbya gossypii* (WACH *et al.*, 1994). Dieses Kanamycin-Gen vermittelt in *Saccharomyces cerevisiae* eine Resistenz gegen G418.

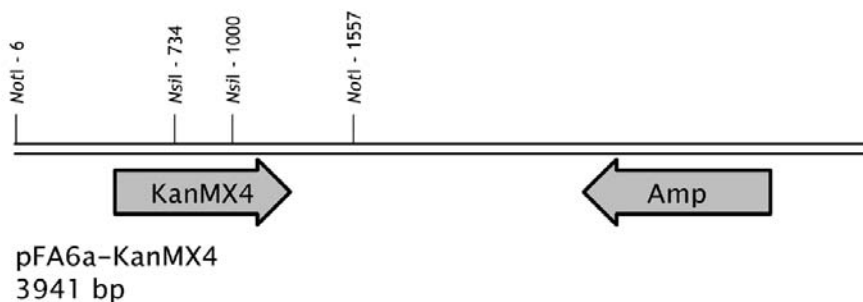


Abb. 5: Schematische Darstellung des Plasmids pFA-KanMX4 (Wach *et al.*, 1994), welches für als Grundlage für die Konstruktion des KanKanMX4-Moduls verwendet wurde. Die *NsiI*-Schnittstellen, welche die Sequenzduplikation von 266 Basenpaaren ermöglichten, sind eingezeichnet; ebenso die *NotI*-Schnittstellen für die Umklonierung in das *shuttle*-Plasmid pRS316. Für weitere Details siehe Text sowie Seite 33.

An den Positionen 275 und 541 nach dem Start-Codon des Kanamycin-Gens befindet sich jeweils eine *NsiI*-Schnittstelle. Für die Kreation der Duplikation wurde das Plasmid mit *NsiI* geschnitten und das Fragment mit einer Länge von 266 Basenpaaren aufgereinigt. Das Plasmid pFA6a-KanMX4 wurde durch einen Partialverdau mit *NsiI* linearisiert und das gereinigte 266 Basenpaarfragment hineinligiert. Auf diese Weise wurde das 266 Basenpaar lange *NsiI*-Fragment direkt dupliziert. Durch die Duplikation ist das Leseraster hinter der zweiten *NsiI*-Schnittstelle verschoben und endet an Position 588 in einem Stop-Codon. Zellen mit diesem Plasmid sind nicht mehr gegen G418 resistent. Erst durch spontane Deletionsereignisse wird die Sequenz des ursprünglichen Gens wieder

hergestellt (siehe Abb. 7), so daß das KanKanMX4-Konstrukt für die Bestimmung der Reversionsraten und Reversionsfrequenzen genutzt werden kann.

Aufgrund der Duplikation wurde das Plasmid mit pFA6a-KanKanMX4 bezeichnet. Für die Untersuchungen in Hefe wurde das KanKanMX4-Modul schließlich mit *NotI* vollständig aus dem Plasmid herausgetrennt und in das *shuttle*-Plasmid pRS316 (SIKORSKI & HIETER, 1989) ligiert. Bei diesem Plasmid handelt es sich um ein Centromer-Plasmid, so daß es in der Regel als nur eine Kopie pro haploidem Genom vorliegt.

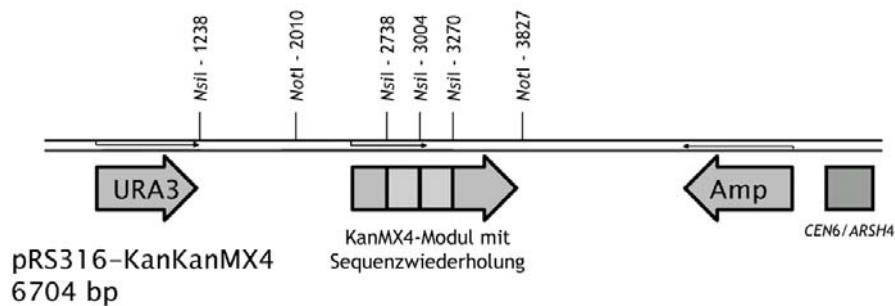


Abb. 6: Schematische Darstellung des Plasmids pRS316-KanKanMX4, welches für die Bestimmung der spontanen Reversionsraten sowie der Reversionsfrequenzen eingesetzt wurde. Die *NsiI*-Schnittstellen, welche im MX4-Modul die Sequenzduplikation von 266 Basenpaaren flankieren, sind eingezeichnet; ebenso die *NotI*-Schnittstellen, mit welchem das Konstrukt in den Vektor kloniert wurde. Die offenen Leserahmen sind zwischen den Einzelsträngen eingezeichnet. Der Leserahmen des *Kan*-Gens bricht direkt nach dem Beginn der Sequenzwiederholung ab. Für weitere Details siehe Text sowie Seite 33.

Mit dem resultierenden Plasmid pRS316-KanKanMX4 wurden sowohl die Reversionsraten als auch die Reversionsfrequenzen bestimmt.

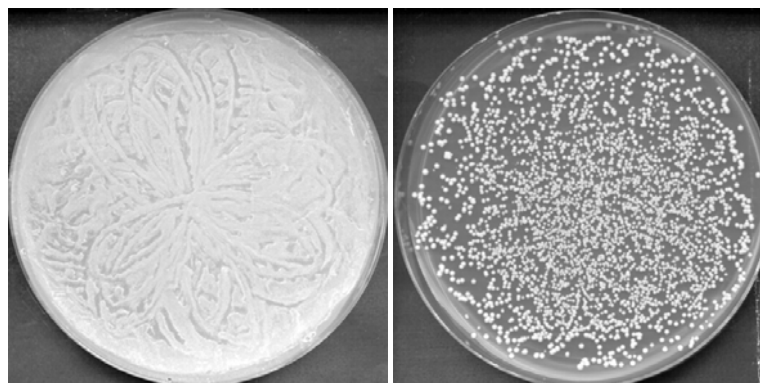


Abb. 7: Wachstum des Stammes CEN.PK 2-1C/pRS316-KanKanMX4 auf SD^{-Ura} (links) sowie auf Medium mit G418 (200 µg · ml⁻¹; rechte Seite). Nach der Plattierung gleicher Aliquots des Stammes auf beiden Platten zeigt sich auf Vollmedium ein Zellrasen, während auf der Platte mit G418 distinkte Kolonien zu erkennen sind. Diese gehen vermutlich auf spontane Reversionsereignisse des KanKanMX4-Moduls zu einem funktionellen *kan*^r-Gen während der Anzucht der Zellen zurück.

Bestimmung von Reversionsrate und Reversionsfrequenzen des KanKanMX4-Fragmentes in *mph1*-Deletionsmutanten

Die Reversionsrate des KanKanMX4-Moduls ist in mph1-Deletionsmutanten erniedrigt

Es wurden bereits Evidenzen für eine Beteiligung des Mph1-Proteins an der fehlerfreien Umgehung von DNA-Läsionen gezeigt (siehe auch Abb. 3). Eine mögliche Funktion des Proteins wäre eine Beteiligung an einem der beschriebenen Wege zur Reinitiation arretierter Replikationsgabeln. Nimmt man hierbei an, daß das Protein an einem Zweig der Reinitiation beteiligt ist, in dessen Verlauf es auch vermehrt zu Rekombinationsereignissen kommen kann, dann sollten diese in *mph1*-Deletionsmutanten weniger auftreten. Bei einer Beteiligung des Mph1-Proteins z.B. an der Bildung von *Holliday junctions* sollte man im Falle einer *mph1*-Deletionsmutante annehmen, daß hier weniger *Holliday junctions* entstehen und aus diesem Grund auch die Wahrscheinlichkeit der Auflösung durch Resolvasen verringert ist. Es sollten in diesem Fall in *mph1*-Deletionsmutanten weniger Doppelstrangbrüche auftreten.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Stabilität von Sequenzduplikationen untersucht. Die Bestimmung der Reversionsrate des KanKanMX4-Moduls wurde analog zur Bestimmung der Mutationsrate nach der Medianmethode durchgeführt (LEA & COULSON, 1948). Die Zellen wurden in Selektivmedium angezogen und auf Vollmediumsplatten mit G418 plattiert. Die Bestimmung des Lebendtiters erfolgte auf Vollmediumsplatten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Spontane Reversionsraten der Stämme CEN.PK 2-1C und CEN.PK 2-1C *mph1*, ermittelt mit dem KanKanMX4-Konstrukt gemäß der Medianmethode (Lea und Coulson, 1948).

	Spontane Reversionsrate	Faktor
CEN.PK 2-1C	$1,2 \cdot 10^{-4} \pm 0,1 \cdot 10^{-4}$	1
CEN.PK 2-1C <i>mph1</i>	$6,5 \cdot 10^{-5} \pm 0,6 \cdot 10^{-5}$	0,5

In *mph1*-Deletionsmutante ist ein Verminderung der spontanen Reversionsrate zu beobachten. Problematisch ist bei diesem Experiment, daß der Unterschied zwar signifikant, aber nicht sehr groß ist. Andererseits wurde in einem vergleichbaren Versuchssystem in *E. coli*-Mutanten, in welchen die Reinitiation arretierter Replikationsgabeln gestört ist, ein ähnlich starker Rückgang beobachtet (MICHEL, persönliche Kommunikation).

Prinzipiell unterstützt diese beobachtete Verringerung der Reversionsrate die Hypothese, daß Mph1 an einem Weg der Reinitiation arretierter Replikationsgabeln beteiligt ist, durch welchen vermehrt Rekombinationsereignisse stattfinden. Bei Ausfall von Mph1 kann dieser Weg nicht mehr genutzt werden und es werden andere Wege wie die Transläsionssynthese für die Reinitiation herangezogen, so daß in *mph1*-Deletionsmutanten die Mutationsrate erhöht und die Reversionsrate erniedrigt ist.

Die Reversionsfrequenz nach Behandlung mit 4-NQO ist in mph1-Deletionsmutanten deutlich erniedrigt

Durch ARNAUDEAU *et al.* konnte gezeigt werden, daß in Hamsterzellen durch Zugabe von Mutagenen, welche mit der Replikation interferieren, die Reversionsfrequenz einer Duplikation stark erhöht wurde (ARNAUDEAU *et al.*, 2001). Man sollte annehmen, daß auch in *Saccharomyces cerevisiae* durch die Behandlung der Zellen mit Mutagenen, welche replikationsarretierende Läsionen hervorrufen, vermehrt Replikationsarreste auftreten. Resultieren diese verstärkt in *Holliday junctions*, dann sollten vermehrt doppelsträngige DNA-Enden entstehen. In diesem Fall sollte im vorliegenden Versuchssystem ein dosisabhängiger Anstieg der Reversionsfrequenz mit erhöhter Mutagenkonzentration beobachtet werden können. Sofern Mph1 an einem Prozeß zur Reinitiation arretierter Replikationsgabeln beteiligt ist, sollten in *mph1*-Deletionsmutanten hingegen weniger doppelsträngige DNA-Enden auftreten. Dies sollte zu deutlich verringerten Reversionsfrequenzen nach Chemikalienbehandlung führen, sofern Mph1 vor bzw. an der Einfädelung des 3'-Endes beteiligt ist (vergleiche Abb. 4).

Um die Reversionsfrequenzen von Wildtyp und *mph1*-Deletionsmutante zu untersuchen, wurden die Kulturen mit Hilfe von α -mating factor in G₁ des Zellzyklus arretiert. Nach dem Ende des Arrestes wurden die Kulturen unter Zusatz unterschiedlicher, niedriger Mengen 4-Nitrochinolin-1-oxid für 90 min in Selektivmedium inkubiert. Die Mutagenkonzentrationen wurden derart gewählt, daß zwischen 80 und 90% der Zellen nach 90 min Knospen ausbilden. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und auf Vollmedium zur Bestimmung des Lebendtiters sowie auf Medium mit G418 zur Bestimmung der Reversionsereignisse plattiert. Die Berechnung der Reversionsfrequenzen erfolgte wie beschrieben (siehe Seite 38). Die Reversionsfrequenzen in Abhängigkeit von der Mutagenkonzentration sind die Abb. 8 dargestellt.

Wie in Hamsterzellen (ARNAUDEAU *et al.*, 2001) führt die Behandlung mit einem Mutagen auch in *Saccharomyces cerevisiae* zu einer Erhöhung der Reversionsfrequenz. Für den Wildtyp zeigt sich eine eindeutige Korrelation zwischen der Reversionsfrequenz und der 4-NQO-Konzentration. Warum die Frequenz bei der höchsten 4-NQO-Konzentration im Falle des Wildtyps bei nahezu allen Experimenten erniedrigt ist, ist nicht eindeutig geklärt. Eine mögliche Erklärung wäre ein zusätzlicher Prozeß wie z.B. die Auslösung eines *checkpoints*, welche erst ab einer bestimmten Schadensdichte erfolgt. Durch den *checkpoint* würden dann andere Wege zur Reinitiation oder auch Reparatur genutzt, welche nicht zu Reversionsereignissen führen.

Dies ist im Falle der *mph1*-Deletionsmutante anders. Hier zeigt sich nur eine sehr moderate Erhöhung der Reversionsfrequenz und dies auch nur bei höheren Chemikalienkonzentrationen. Wie bereits bei der spontanen Reversionsrate (siehe Seite 66) sind deutlich weniger Reversionsereignisse zu verzeichnen.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Hypothese, daß Mph1 an einem rekombinativen Prozeß zur Reinitiation arretierter Replikationsgabeln beteiligt ist. In Abwesenheit von Mph1 kann dieser Weg nur noch partiell genutzt werden, so daß weniger doppel-

strängige DNA-Enden und somit weniger Reversionsereignisse entstehen. Statt dessen wird mindestens ein Teil der Reinitiationen durch die Translänionssynthese ermöglicht.

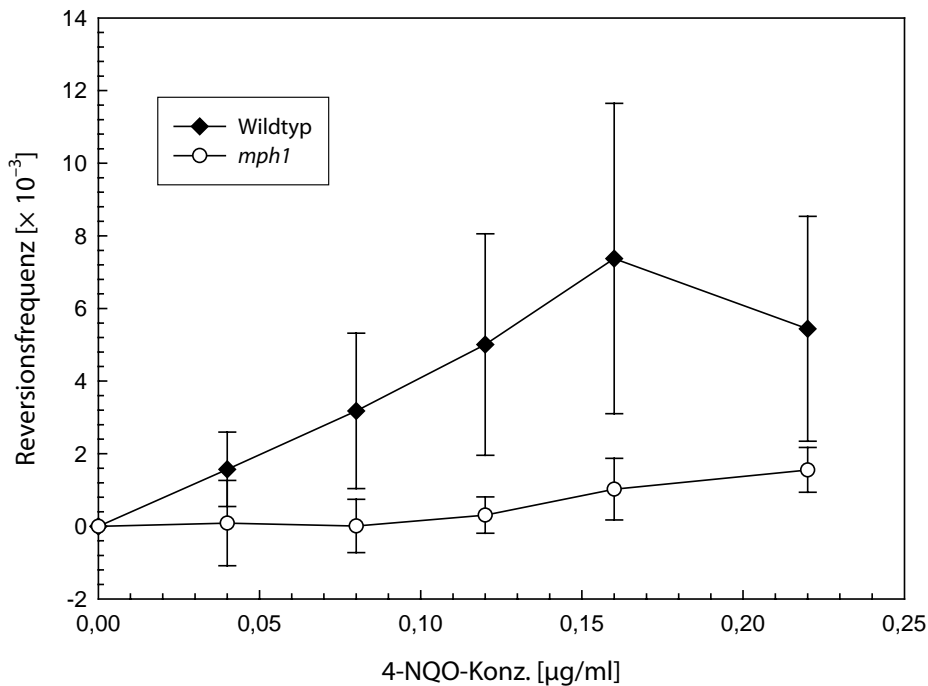


Abb. 8: Beeinflussung der Reversionsfrequenz des KanKanMX4-Moduls in den Stämmen CEN.PK 2-1C und CEN.PK 2-1C *mph1* nach Behandlung mit 4-Nitrochinolin-1-oxid. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml $^{-1}$ mit α -mating factor in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium resuspendiert, welches die angegebenen Konzentrationen 4-Nitrochinolin-1-oxid enthielt und für die Dauer eines Zellzyklus bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und Verdünnungen auf Vollmedium zur Bestimmung der Lebendzellzahl sowie auf Medium mit G418 zur Bestimmung der Reversionsfrequenz plattiert. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei bis sechs Datensätzen.

Die Reversionsfrequenz nach Behandlung mit Camptothecin ist in mph1-Deletionsmutanten nur leicht erniedrigt

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß zumindest ein Teil der durch Mph1 prozessierten Läsionen dergestalt sein muß, daß sie durch die Translänionssynthese überlesen werden können. Zu dieser Annahme paßt, daß die Behandlung der Zellen mit 4-NQO in *mph1*-Mutanten einen im Vergleich zum Wildtyp deutlichen Effekt bezüglich der Reversions- bzw. Mutationsfrequenzen zeigt. Mutagene, welche zu Schäden führen, die nicht mit Hilfe der Translänionssynthese prozessiert werden, sollten dann jedoch zu einem deutlich weniger ausgeprägten Effekt führen.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die Reversionsfrequenzen nach Behandlung der Zellen mit Camptothecin bestimmt. Camptothecin ist ein Molekül, welches DNA-Topoisomerasen I hemmt (POMMIER *et al.*, 1998).

Die durch DNA-Topoisomerase I katalysierte Reaktion läßt sich in mehrere Schritte unterteilen. Zunächst bindet ein Monomer an die DNA und es kommt zu einer partiellen Entwindung des Doppelstranges. Im einzelsträngigen Bereich findet eine Transesterifikation statt, bei welcher die Hydroxylgruppe eines Tyrosins kovalent mit einem 3'-Phosphat reagiert. Es entsteht hierbei ein freier 5'-Hydroxylterminus der DNA. Die den *nick* flankierenden Enden können nun rotieren und auf diese Weise eine Entspannung der DNA erreichen. Anschließend wird das 5'-Hydroxylende wieder mit dem 3'-Phosphatende verknüpft, so daß die kovalente Bindung zum Enzym aufgelöst und der *nick* in der DNA geschlossen wird (WANG, 2002).

Camptothecin stabilisiert den Zustand, in welchem die Topoisomerase kovalent mit der DNA verknüpft ist, so daß die Religation nicht stattfinden kann (WANG, 2002). In *Saccharomyces cerevisiae* muß dieser Komplex degradiert werden, wobei an Degradation mehrere Proteasen beteiligt sind. Der Abbau des Tyrosyl-DNA-Phosphodiesters hierbei durch das TdpI-Protein (*Tyrosyl-DNA phosphodiesterase-1*) erfolgt (DEBETHUNE *et al.*, 2002), wobei vorübergehend Einzelstrangbrüche in der DNA verbleiben.

Erreicht eine Replikationsgabel einen DNA-Topoisomerasekomplex, so sind unterschiedliche Intermediärstrukturen der Replikation denkbar. Durch *in-vivo*-Experimente konnte gezeigt werden, daß es im Falle eines Komplexes auf der *leading strand* Matrize zu einem glatten Doppelstrangbruch kommt. Es entsteht vermutlich ein sogenanntes *run-off*-Produkt, bei welchem gegenüber der letzten Base noch ein Nukleotid inkorporiert wird (STRUMBERG *et al.*, 2000).

Prinzipiell kann dieses doppelsträngige DNA-Ende ebenfalls von den Enzymen der Doppelstrangbruch-Reparatur prozessiert und das entstehende 3'-Ende unter Ausbildung eines *D-loops* in das vollständige Schwesterchromatid eingeführt werden (COX *et al.*, 2000). In diesem Fall sind allerdings alle Schritte zur Bildung einer *Holliday junction* (siehe Abb. 2) formal nicht notwendig. Nimmt man an, daß Mph1 an einem Prozeß vor der Prozessierung doppelsträngiger DNA-Enden beteiligt ist, dann sollte die Reversionsfrequenz durch die Behandlung mit Camptothecin, welches auch Einzelstrangbrüche hervorruft, in *mph1*-Mutanten deutlich weniger als im Falle von 4-Nitrochinolin-1-oxid erniedrigt werden.

Anders ist dies bei einem Komplex auf der Matrize des *lagging strand*. Hier konnten keine doppelsträngigen DNA-Enden nachgewiesen werden. Eine mögliche Deutung ist, daß die kovalenten Topoisomerase-DNA-Komplexe eine Barriere für die replikativen Helikasen sind und auf diese Weise auch die Replikation des *lagging strand* zum Erliegen bringen (STRUMBERG *et al.*, 2000).

Camptothecin führt also offenbar sowohl zu kollabierten Replikationsgabeln, sofern sich der Komplex auf der Matrize des *leading strand* befindet, als auch zu Polymerase-arresten der den *lagging strand* bildenden Polymerasen. Nach Behandlung der Zellen mit

Camptothecin sollten also in *mph1*-Mutanten im Vergleich zu 4-NQO, welches sowohl auf dem *leading* als auch auf dem *lagging strand* die Polymerasen zu inhibieren vermag, eine geringere Erhöhung der Reversionsfrequenz zu beobachten sein, sofern Mph1 an einen enzymatischen Prozeß vor der Bildung des doppelsträngigen DNA-Endes beteiligt ist.

Die Durchführung der Experimente sowie der Auswertung erfolgte analog zur Behandlung mit 4-NQO (siehe Seite 67). Die Daten sind in Abb. 9 dargestellt.

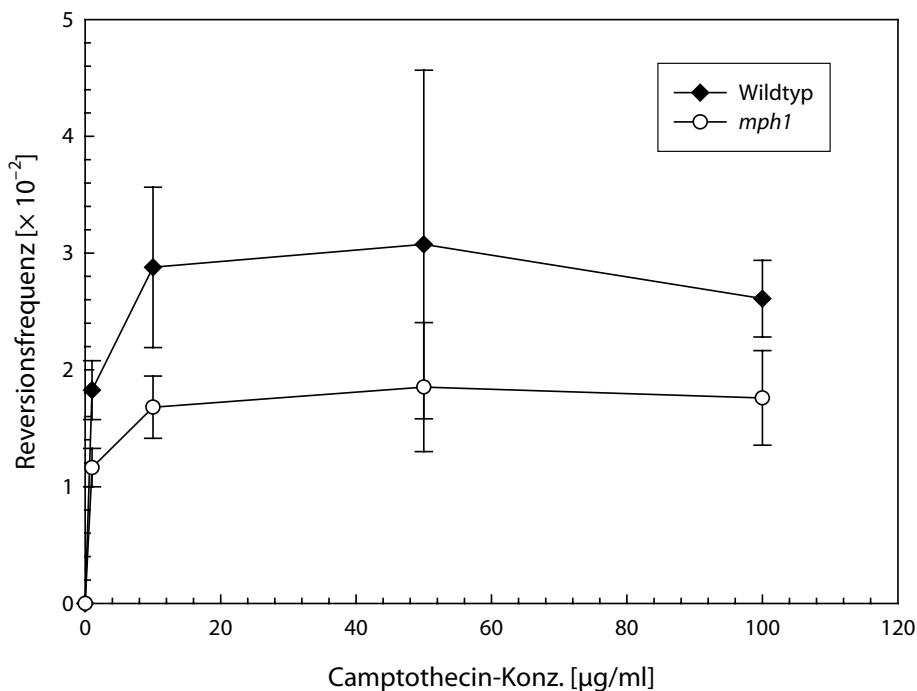


Abb. 9: Beeinflussung der Reversionsfrequenz des KanKanMX4-Moduls in den Stämmen CEN.PK 2-1C und CEN.PK 2-1C *mph1* nach Behandlung mit Camptothecin. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml $^{-1}$ mit α -mating factor in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium resuspendiert, welches die angegebenen Konzentrationen Camptothecin enthielt und für die Dauer eines Zellzyklus bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und Verdünnungen auf Vollmedium zur Bestimmung der Lebendzellzahl sowie auf Medium mit G418 zur Bestimmung der Reversionsfrequenz plattiert. Gezeigt sind die Mittelwerte dreier Datensätze.

Wie bereits im Fall von 4-Nitrochinolin-1-oxid führt auch die Behandlung der Zellen mit Camptothecin zu einer kräftigen Erhöhung der Reversionsfrequenzen im Falle des Wildtyps. Daß bei 50 und 100 μg keine weitere Erhöhung zu beobachten ist, mag daran liegen, daß Camptothecin in Wasser nur begrenzt löslich ist und dementsprechend bei diesen Konzentrationen eine Sättigung vorlag (www.chemfinder.com).

Im Falle der *mph1*-Deletionsmutante zeigt sich ebenfalls eine deutliche Erhöhung, wobei diese aber geringer als die des Wildtyps ist. Dieses Ergebnis unterstützt in erster

Näherung die Eingangs aufgestellte Hypothese, daß Mph1 vor der Generierung doppelsträngiger DNA-Enden agiert und dementsprechend *nicks*, welche während der Replikation in doppelsträngige DNA-Enden überführt werden, einen deutlich geringeren Einfluß auf die Reversionsfrequenz der *mph1*-Mutante haben als DNA-Läsionen, welche die replikativen Polymerasen blockieren.

Die Reversionsfrequenz eines chromosomal integrierten KanKanMX4-Moduls ist nach Behandlung mit 4-NQO in mph1-Deletionsmutanten deutlich erniedrigt

Obwohl es sich bei dem Plasmid pRS316-KanKanMX4 um ein Centromer-Plasmid handelt, kann nicht ausgeschlossen werden, daß es in einer Kultur einen Anteil von Zellen gibt, welche zwei oder mehr Kopien des Plasmids enthalten und in welchen es zu einer Deletion einer Duplikation aufgrund von Rekombinationsereignissen kommt, welche nicht durch einen Arrest der Replikation induziert wurden. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde das KanKanMX4-Modul mit *NotI* aus dem Plasmid pFA6a-KanKanMX4 herausgeschnitten und in das mit *NotI* linearisierte Integrationsplasmid YIplac211 ligiert. Das Integrationsplasmid wurde mit *EcoRV* linearisiert und Wildtyp und *mph1*-Deletionsmutante mit dem linearen Konstrukt transformiert. Die Integration des Plasmids erfolgt im *ura3-52*-Gen und Transformanten mit integriertem Konstrukt können auf SD^{-Ura}-Medium selektiert werden.

Die Durchführung der Experimente erfolgte wie beschrieben (siehe Seite 67). Die Reversionsfrequenzen von Wildtyp und *mph1*-Deletionsmutante sind in Abb. 10 gezeigt.

Wie bereits bei den plasmidbasierten Experimenten zeigt sich, daß sich die Reversionsfrequenz im Wildtyp in Abhängigkeit von der Mutagenkonzentration steigern läßt. Die Reversionsfrequenz in der *mph1*-Deletionsmutante läßt sich hingegen wie zuvor kaum steigern. Interessanterweise sind die Frequenzen bei der chromosomalen Integration etwa vierfach geringer als in den plasmidbasierten Experimenten. Dieser Effekt wurde auch in *E. coli* beobachtet (LOVETT *et al.*, 1993). Hier wurde die Hypothese aufgestellt, daß diese Diskrepanz durch die höhere Kopienzahl des vom Plasmid pBR322 abgeleiteten Systems zurückzuführen ist.

Ein Einfluß der Kopienzahl erscheint in Anbetracht der Verwendung eines Centromer-Plasmids als eher unwahrscheinlich, wobei die Diskrepanzen auch nicht so groß sind wie im *E. coli*-System. Allerdings kann angenommen werden, daß die Replikation von Plasmiden z.B. aufgrund der Größe durchaus anders ist als die Replikation der Chromosomen. In der Arbeit von LOVETT *et al.* wurde postuliert, daß auch bestimmte Sequenzkontexte eine Änderung der Reversionsfrequenzen zur Folge haben (LOVETT *et al.*, 1993).

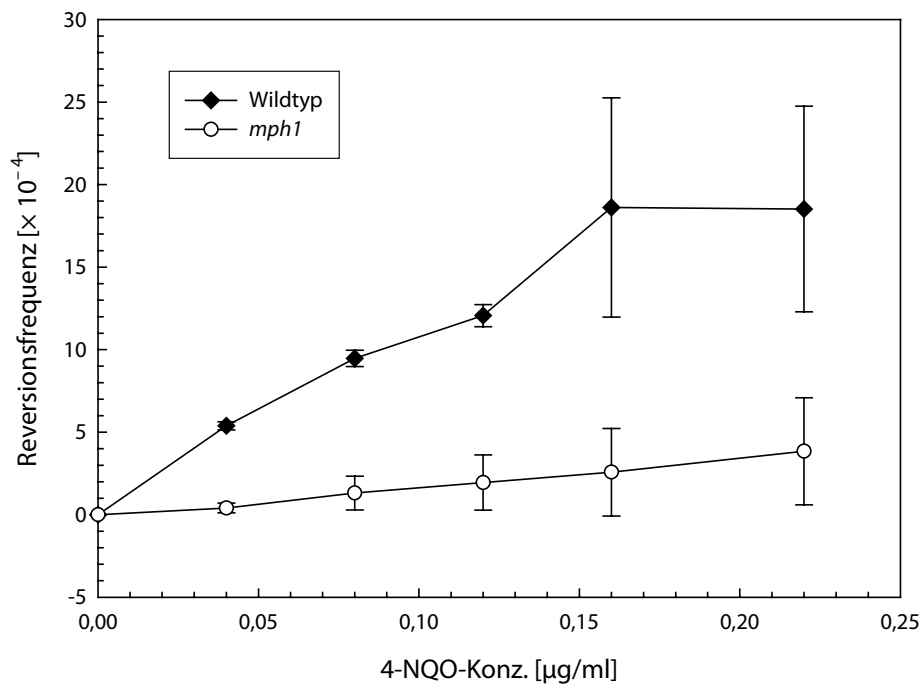


Abb. 10: Beeinflussung der Reversionsfrequenz durch Behandlung der Stämme CEN.PK 2-1C und CEN.PK 2-1C *mph1*, bei welchen das KanKanMX4-Modul chromosomal integriert wurde, mit 4-Nitrochinolin-1-oxid. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen·ml⁻¹ mit α -mating factor in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium resuspendiert, welches die angegebenen Konzentrationen 4-Nitrochinolin-1-oxid enthielt und für die Dauer eines Zellzyklus bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und Verdünnungen auf Vollmedium zur Bestimmung der Lebendzellzahl sowie auf Medium mit G418 zur Bestimmung der Reversionsfrequenz plattiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Datensätzen.

Die Reversionsfrequenz eines chromosomal integriertem KanKanMX4-Moduls ist nach Behandlung mit Camptothecin in mph1-Deletionsmutanten nur leicht erniedrigt

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede zwischen der Behandlung mit 4-Nitrochinolin-1-oxid und Camptothecin auch für die chromosomale Integration zu beobachten sind, wurden die Experimente ebenfalls mit Camptothecin durchgeführt. Hierbei ergaben sich die in Abb. 11 gezeigten Ergebnisse.

Auch hier zeigt sich die gleiche Tendenz wie bei den plasmidbasierten Experimenten. Der Wildtyp zeigt eine kräftige Erhöhung der Reversionsfrequenz, während die *mph1*-Deletionsmutante eine deutliche, aber weniger stark ausgeprägte Erhöhung erkennen lässt.

Auch bei diesen Experimenten liegen die Reversionsfrequenzen (vermutlich aus den gleichen Gründen wie bei 4-NQO) unter den Reversionsfrequenzen des plasmidbasierten Systems.

Obwohl die chromosomale Integration des KanKanMX4-Konstruktes etwas niedrigere Reversionsfrequenzen liefert, sind die Aussagen des plasmidbasierten Systems so ähnlich, daß im Folgenden aufgrund der einfacheren experimentellen Handhabbarkeit das plasmidbasierte System verwandt wurde.

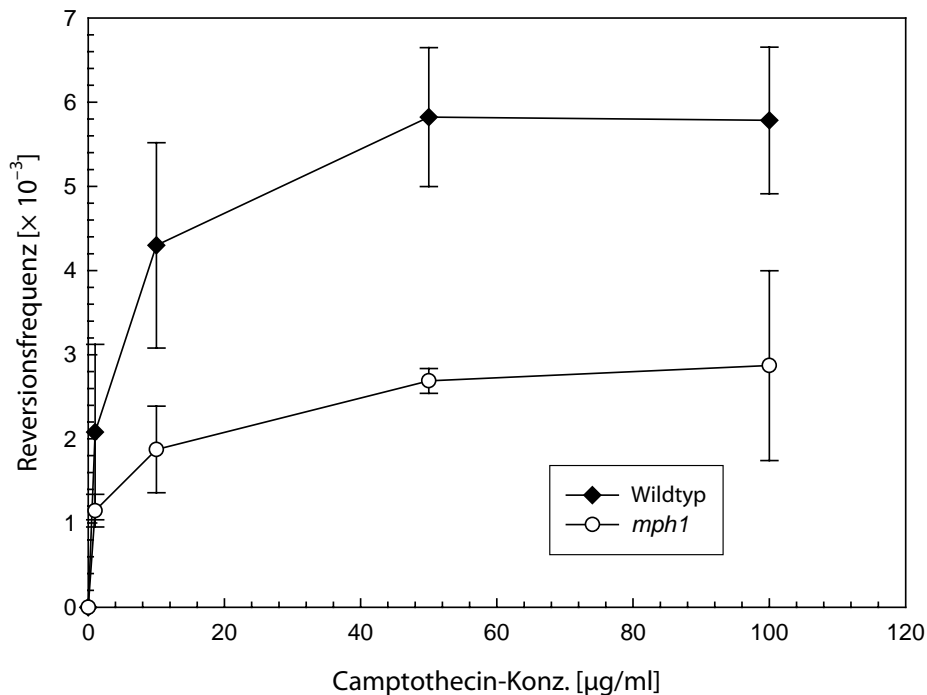


Abb. 11: Beeinflussung der Reversionsfrequenz durch Behandlung der Stämme CEN.PK 2-1C und CEN.PK 2-1C *mph1*, bei welchen das KanKanMX4-Modul chromosomal integriert wurde, mit Camptothecin. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml $^{-1}$ mit α -mating factor in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium resuspendiert, welches die angegebenen Konzentrationen Camptothecin enthielt und für die Dauer eines Zellzyklus bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und Verdünnungen auf Vollmedium zur Bestimmung der Lebendzellzahl sowie auf Medium mit G418 zur Bestimmung der Reversionsfrequenz plattiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Datensätzen.

Untersuchungen zur Beteiligung der homologen Rekombination an den Reversionsereignissen in *Saccharomyces cerevisiae*

In *E. coli* ist das RecA-Protein eines der Schlüsselproteine für die homologe Rekombination. In *recA*⁻-Stämmen sind rekombinante Zellen nach bakterieller Konjugation nicht mehr nachweisbar (KOWALCZYKOWSKI *et al.*, 1994).

Für das plasmidbasierte System zur Bestimmung der Stabilität von Sequenzwiederholungen in *E. coli* (siehe Seite 64) wurde gezeigt, daß ein großer Anteil aller Ereignisse von RecA abhängt. Allerdings wurde ebenfalls nachgewiesen, daß ein signifikanter Anteil

an Revertanten auch bei Abwesenheit von RecA gebildet wird. Erklärt wurde dieses Phänomen durch die Annahme, daß diese Reversionsereignisse auf *primer template slippage* zurückzuführen sind (LOVETT *et al.*, 1993).

Um diesen Sachverhalt in *Saccharomyces cerevisiae* zu untersuchen, wurde die spontane Reversionsrate in einer *rad52*-Deletionsmutante bestimmt. Rad52 gilt in *Saccharomyces cerevisiae* als ein essentielles Protein für fast alle Rekombinationsprozesse (AGUILERA, 2001). In *rad52*-Deletionsmutanten sollte daher die homologe Rekombination nahezu vollständig ausgeschaltet sein.

Die Bestimmung der Reversionsrate des KanKanMX4-Moduls in *rad52*-Deletionsmutanten wurde analog zur Bestimmung der Mutationsrate nach der Medianmethode durchgeführt (LEA & COULSON, 1948). Die Zellen wurden in Selektivmedium angezogen und auf Vollmediumsplatten mit G418 plattiert. Die Bestimmung des Lebendtiters erfolgte auf Vollmediumsplatten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Spontane Reversionsraten der Stämme CEN.PK 2-1C, CEN.PK 2-1C *rad52* und CEN.PK 2-1C *rad52 mph1*, ermittelt mit dem KanKanMX4-Konstrukt gemäß der Medianmethode (Lea & Coulson, 1948).

	Spontane Reversionsrate	Faktor
CEN.PK 2-1C	$1,2 \cdot 10^{-4} \pm 0,11 \cdot 10^{-4}$	1
CEN.PK 2-1C <i>rad52</i>	$2,3 \cdot 10^{-6} \pm 0,3 \cdot 10^{-6}$	0,024
CEN.PK 2-1C <i>rad52 mph1</i>	$1,2 \cdot 10^{-6} \pm 0,2 \cdot 10^{-6}$	0,016

Aus Tabelle 4 geht hervor, daß die Deletion von *RAD52* die Reversionsrate etwa um den Faktor 40 erniedrigt. Dieser Befund deutet darauf hin, daß die meisten Reversionsereignisse auf eine direkte oder indirekte Prozessierung durch Rad52 zurückgehen, welches nach allen bisherigen Evidenzen für ein *primer template slippage* nicht erforderlich sein sollte. Daher kann man plausiblerweise annehmen, daß der größte Teil der beobachteten Reversionsereignisse homologe Rekombinationsereignisse erfordert. Diese erfolgen vermutlich ausgehend von Doppelstrangbrüchen, da für Rad52 biochemisch nachgewiesen wurde, daß es doppelsträngige DNA-Enden bindet (VAN DYCK *et al.*, 1999).

Zusätzlich zeigt sich allerdings in der *rad52 mph1*-Doppelmutante eine weitere Erniedrigung der Reversionsrate um den Faktor 63, wobei diese Erniedrigung formal synergistisch ist. Dies würde bedeuten, daß, zumindest bezüglich der Reversionsereignisse, Rad52 und Mph1 in unterschiedlichen, überlappenden Prozessen beteiligt sind.

Für diese weitere Erniedrigung der spontanen Reversionsrate in *mph1 rad52*-Doppelmutanten sind mehrere Möglichkeiten denkbar. Prinzipiell sollte eine zusätzliche Erniedrigung durch einen Prozeß ausgelöst werden, an welchem Mph1, nicht aber Rad52 beteiligt ist. Dies können unterschiedliche Prozesse sein.

Eine Möglichkeit ist, daß es sich um einen Prozeß handelt, in dessen Verlauf keine doppelsträngigen DNA-Enden gebildet werden. Es wäre z.B. formal denkbar, daß Mph1 auch an der Vermeidung des *primer template slippage* beteiligt ist.

Andererseits deutet die erhöhte Mutationsrate darauf hin, daß in Abwesenheit von Mph1 die Mph1-Substrate durch die Transläsionssynthese prozessiert werden. Wäre die Aufgabe von Mph1 ausschließlich die Vermeidung von *primer template slippage*, so wäre es erstaunlich, daß in der Abwesenheit von Mph1 eine Transläsionspolymerase rekrutiert wird.

Ein weiterer Prozeß, bei welchem es nicht unbedingt zur Bildung von Doppelstrangbrüchen kommen muß, ist die Auflösung einer gebildeten *Holliday junction* durch *branch migration* (vergleiche Abb. 1). Kommt es nach der Ausbildung einer *Holliday junction* zu einem *polymerase strand switch*, so kann durch eine Verschiebung der *junction* in Richtung der Replikation die arretierende Läsion fehlerfrei überbrückt werden. Kommt es aber während dieser Auflösung der *Holliday junction* zu einer Fehlhybridisierung des *leading* bzw. des *lagging strand* im Bereich einer Sequenzwiederholung, können auch durch diesen Prozeß Reversionsereignisse ausgelöst werden. Hierbei würden keine Doppelstrangbrüche entstehen, welche durch Rad52 prozessiert werden müßten. In *mph1*-Deletionsmutanten könnte die Reinitiation allerdings durchaus durch den Einsatz von Polymerase ζ erfolgen.

Sofern diese Hypothese zutrifft, müßte man allerdings annehmen, daß nicht nur doppelsträngige DNA-Enden zu Änderungen der Reversionsraten bzw. Reversionsfrequenzen beitragen, sondern auch die beschriebenen Fehlhybridisierungen bei der Auflösung von *Holliday junctions*.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit sind rekombinative Prozesse, an denen Rad52 nicht beteiligt ist. Diese Hypothese wird durch den Befund unterstützt, daß in *sgs1*-Deletionsmutanten (siehe auch Seite 94) die mitotische Rekombinationsrate sowohl bei homeologen (MYUNG *et al.*, 2001) als auch bei homologen Substraten erhöht ist (WATT *et al.*, 1996; MYUNG *et al.*, 2001). Diese erhöhte Rate homologer mitotischer Rekombination ist dabei jedoch nur teilweise von der Anwesenheit von Rad52 abhängig (WATT *et al.*, 1996). Es ist also durchaus möglich, daß es rekombinative Prozesse gibt, welche nicht von Rad52 abhängig sind. Durch die Annahme, daß Mph1 an einem solchen Prozeß beteiligt ist, ließe sich die beobachtete synergistische Interaktion der Doppelmutante ebenfalls erklären.

Untersuchungen zum Zusammenspiel von Transläsionssynthese und fehlerfreier Umgehung replikationsarretierender Läsionen

In nahezu allen Organismen findet man Polymerasen, welche zur sogenannten Y-Klasse gehören. Die Mitglieder dieser Polymerasenfamilie besitzen im Vergleich zu den replikativen Polymerasen eine geringere Genauigkeit und sind in der Lage, DNA-Läsionen zu überlesen (OHMORI *et al.*, 2001), wobei dies sowohl fehlerfrei als auch fehlerbehaftet erfolgen kann (FRIEDBERG *et al.*, 2000). Aus der geringeren Genauigkeit ergibt sich die Notwendigkeit im Interesse einer möglichst genauen Replikation, daß der Einsatz derartiger Polymerasen genau reguliert sein muß, wobei bisher über die genauen Regulationsmechanismen noch wenig bekannt ist.

In *E. coli* gibt es mittlerweile recht eindeutige Hinweise, daß es eine Hierarchie der Schadenstoleranzmechanismen gibt. Es wurde durch Hybridisierung eines zirkulären Einzelstranges, welcher eine Läsion enthielt, mit einem linearen Einzelstrang ein Plasmid generiert, welches gegenüber der Läsion eine Lücke enthielt. Durch Transformation von *E. coli* mit diesem Plasmid sowie Cotransformation mit einem ungeschädigten Plasmid wurde gezeigt, daß für die Reparatur des einzelsträngigen DNA-Bereiches gegenüber einer Läsion die rekombinative Reparatur deutlich über die Transläsionssynthese dominiert. Zusätzlich konnte *in vitro* gezeigt werden, daß dieser Effekt u.a. darauf beruht, daß die Transläsionssynthese aktiv durch die rekombinative Reparatur verhindert wird. Die Transläsionssynthese wurde hingegen durch eine hohe PolV-Konzentration stimuliert. Offenbar wird in *E. coli* die Transläsionssynthese erst im Zuge der SOS-Antwort oder aber bei Schäden eingesetzt, welche durch die rekombinative Reparatur nicht umgangen werden können (BERDICHEVSKY *et al.*, 2002) und scheint somit in *E. coli* tatsächlich als eine der letzten Möglichkeiten eingesetzt zu werden.

In Eukaryonten wurden mittlerweile eine große Zahl unterschiedlicher Polymerasen beschrieben, welche z.T. an sehr spezialisierten Prozessen im Zellmetabolismus beteiligt sind (GOODMAN, 2002). Dies deutet darauf hin, daß es in eukaryontischen Zellen noch weitaus diffizilere Regulationsmechanismen für den Einsatz der Transläsionssynthese geben mag.

Ein Beispiel für eine Polymerase, für welche angenommen werden kann, daß sie nicht nur als letzte Möglichkeit von den Zellen eingesetzt werden kann, ist Pol η , welche in humanen Zellen durch das XPV-Gen codiert wird. Patienten mit einem XP-V-Phänotyp (für *Xeroderma pigmentosum variant*) zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber UV-Licht sowie eine hohe Inzidenz für Hauttumore. In *Saccharomyces cerevisiae* wird Polymerase η durch *RAD30* codiert und gehört in die *RAD6*-Epistasisgruppe (GOODMAN, 2002).

In vitro konnte nachgewiesen werden, daß Polymerase η in der Lage ist, fehlerfrei insbesondere über Thymin-Dimere hinweg zu synthetisieren (JOHNSON *et al.*, 1999; WASHINGTON *et al.*, 2000). In XP-V-Zelllinien führt die Bestrahlung mit UV in Abhängigkeit von DNA-Replikation zur Bildung von Doppelstrangbrüchen, während in Wildtypzelllinien keine Doppelstrangbrüche nach UV-Bestrahlung zu beobachten sind. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, daß in Wildtypzellen die an UV-Schäden arretierte Replikation durch Pol η fehlerfrei reinitiiert werden kann. In XP-V-Zellen kommt es hingegen durch die Replikationsarreste vermehrt zur Bildung von Doppelstrangbrüchen (LIMOLI *et al.*, 2000). Worauf diese Doppelstrangbrüche beruhen, wurde bisher nicht geklärt. Eine mögliche Erklärung wäre hier, daß bei Arresten der replikativen Polymerasen an UV-Schäden die Möglichkeit einer fehlerfreien Umgehung durch Polymerase η fehlt. Es muß daher verstärkt auf Mechanismen zurückgegriffen werden, welche die arretierte Replikation mit Hilfe von *Holliday junctions* reinitiierten, was zur vermehrten Bildung von Doppelstrangbrüchen führt.

Diese Befunde deuten darauf hin, daß Polymerase η in humanen Zellen nicht, wie in *E. coli* beschrieben, einer der letzten Auswege nach einem Polymerasearrest ist. Vielmehr

ist anzunehmen, daß Polymerase η gezielt für die fehlerfreie Umgehung von UV-Schäden eingesetzt werden kann. Diese Hypothese konnte zusätzlich durch die Befunde unterstützt werden, nach welchen im Kern humaner Zellen Polymerase η an Bereiche rekrutiert wird, welche lokal begrenzt mit UV bestrahlt wurden (KANNOUCHE *et al.*, 2001).

Die Reversionsfrequenzen nach Behandlung von rev3-Deletionsmutanten mit 4-Nitrochinolin-1-oxid sind deutlich erhöht

Geht man davon aus, daß der Translasionssynthese in eukaryontischen Zellen eine andere Rolle als in *E. coli* zukommt, dann sollte man erwarten, daß es in Deletionsmutanten, in welchen die Translasionssynthese gestört ist, zur vermehrten Bildung von Doppelstrangbrüchen kommt. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurden die spontanen Reversionsraten sowie die Reversionsfrequenzen des KanMX4-Moduls in unterschiedlichen, für die Translasionssynthese defizienten *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen untersucht.

Zunächst wurde der Einfluß von UV-ähnlichen Schäden auf *rev3*- sowie *rev3 mph1*-Deletionsmutanten untersucht. 4-Nitrochinolin-1-oxid wird häufig als UV-Mimetikum bezeichnet (FRIEDBERG *et al.*, 1995). Dies ist darauf zurückzuführen, daß durch 4-Nitrochinolin-1-oxid Addukte gebildet werden, welche, ähnlich wie Thymin-Dimere sowie (6-4)-Photoprodukte der DNA nach UV-Bestrahlung, über die Nukleotidexcisionsreparatur repariert werden (FRIEDBERG *et al.*, 1995).

Nimmt man an, daß die von Polymerase ζ abhängige Translasionssynthese teilweise vor alternativen Mechanismen eingesetzt wird, wie das für Polymerase η im Falle von UV-Schäden in humanen Zellen gezeigt werden konnte, dann sollte man erwarten, daß sich die Reversionsfrequenz durch Behandlung von *rev3*-Mutanten mit 4-NQO deutlich stärker als im Falle des Wildtyps erhöhen läßt. Im Falle der *mph1 rev3*-Doppelmutante sollte aufgrund der Reversionsdefizienz der *mph1*-Deletionsmutante erwartet werden, daß die Reversionsfrequenz zwischen den Frequenzen der jeweiligen Einzelmutanten liegt.

Die Durchführung der Experimente erfolgte wie beschrieben (siehe Seite 67). Die Ergebnisse lassen sich Abb. 12 entnehmen.

Aus Abb. 12 läßt sich entnehmen, daß in der *rev3*-Deletionsmutante die Reversionsfrequenzen bei steigender Mutagenkonzentration deutlich über den Reversionsfrequenzen des Wildtyps liegen. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit den von LIMOLI *et al.* publizierten Daten. Offenbar wird also auch in *Saccharomyces cerevisiae* auch bei einer leicht erhöhten Schadensdichte vermehrt die Translasionssynthese für die Prozessierung arretierter Replikationsgabeln genutzt.

Überraschend ist die kräftige Erhöhung der Reversionsfrequenzen im Falle der *mph1 rev3*-Doppelmutante, welche sich bis hin zu einer 4-NQO-Konzentration von $0,12 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ kaum von denen der *rev3*-Einzelmutante unterscheidet und dann zwischen den Frequenzen des Wildtyps und der *rev3*-Einzelmutante liegt.

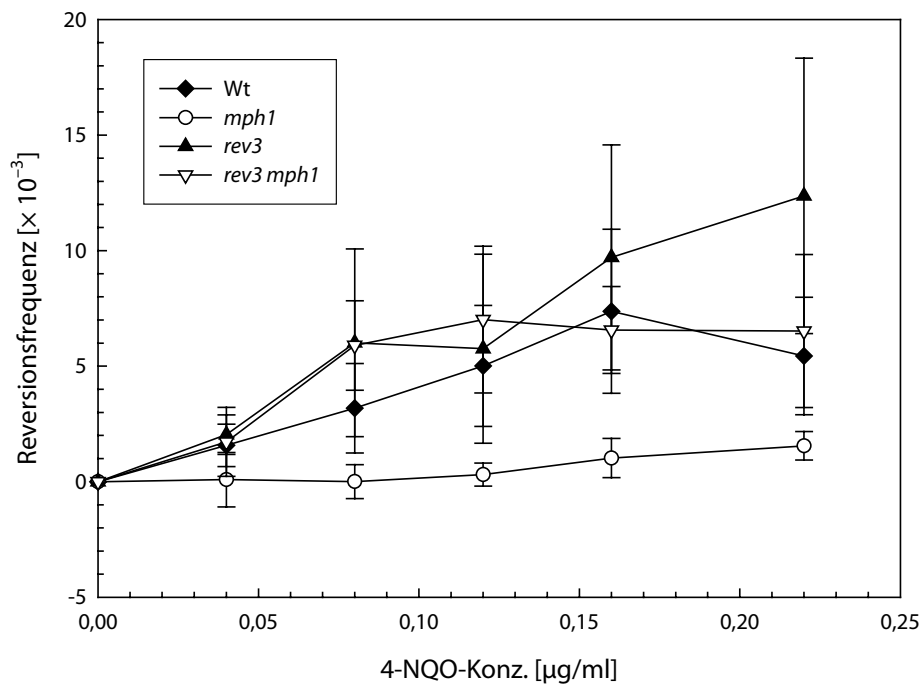


Abb. 12: Beeinflussung der Reversionsfrequenz des KanMX4-Moduls in den Stämmen CEN.PK 2-1C *rev3* und CEN.PK 2-1C *rev3 mph1* nach Behandlung mit 4-Nitrochinolin-1-oxid. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml $^{-1}$ mit α -mating factor in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium resuspendiert, welches die angegebenen Konzentrationen 4-Nitrochinolin-1-oxid enthielt und für die Dauer eines Zellzyklus bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und Verdünnungen auf Vollmedium zur Bestimmung der Lebendzellzahl sowie auf Medium mit G418 zur Bestimmung der Reversionsfrequenz plattiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei bis fünf Datensätzen. Daten für Wildtyp und *mph1*-Deletionsmutante wurden Abb. 8 entnommen.

Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt wäre die Annahme eines zusätzlichen Reparaturweges, welcher zu erhöhten Reversionsfrequenzen führt und welcher durch Rev3 supprimiert würde. Durch den Ausfall von Rev3 würden dann auch in der *rev3 mph1*-Doppelmutante vermehrt Läsionen mittels dieses bisher nicht näher charakterisierten Weges prozessiert werden, wodurch es zu einer Erhöhung der Reversionsfrequenzen käme.

Die Reversionsfrequenzen nach Behandlung von rev3-Deletionsmutanten mit Camptothecin sind nur leicht verändert

Nimmt man an, daß in *rev3*-Deletionsmutanten spezifisch diejenigen Läsionen zu Doppelstrangbrüchen führen, welche sonst durch die Transläsionspolymerase ζ überlesen werden, dann sollten sich die Reversionsfrequenzen bei Schäden, welche nicht überlesen werden können, nicht stark von den Frequenzen des Wildtyps unterscheiden. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die Experimente unter Verwendung von

Camptothecin wiederholt. Da durch Camptothecin ein erheblicher Anteil an Einzelstrangbrüchen hervorgerufen wird, welche replikationsabhängig in Doppelstrangbrüche überführt werden (siehe Seite 68), sollte nur eine geringfügige Änderung der Reversionsfrequenzen von Einzel- sowie Doppelmutante beobachtet werden.

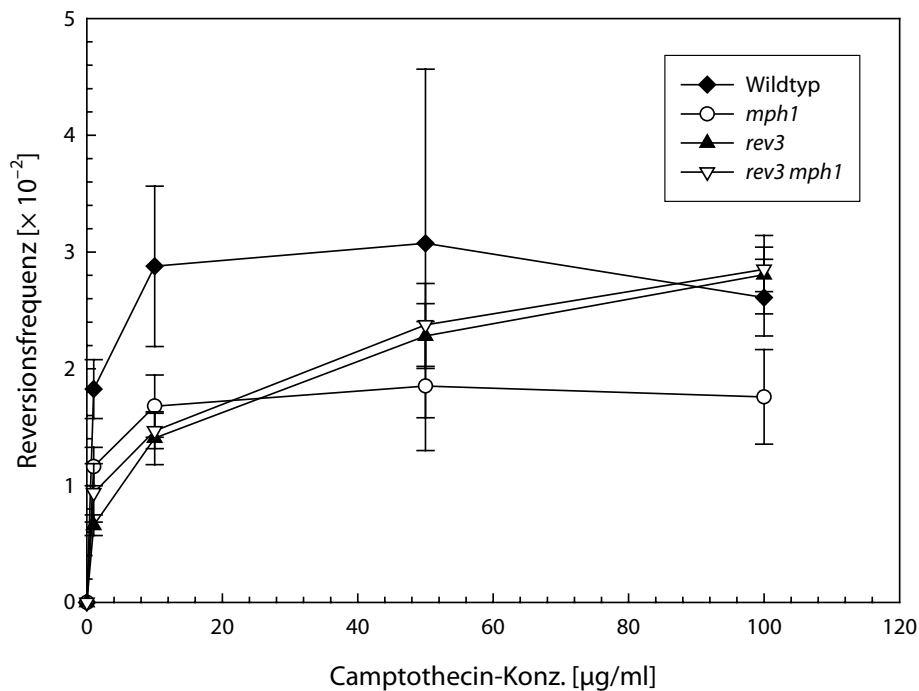


Abb. 13: Beeinflussung der Reversionsfrequenz des KanMX4-Moduls in den Stämmen CEN.PK 2-1C *rev3* und CEN.PK 2-1C *rev3 mph1* nach Behandlung mit Camptothecin. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml $^{-1}$ mit α -mating factor in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium resuspendiert, welches die angegebenen Konzentrationen Camptothecin enthielt und für die Dauer eines Zellzyklus bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und Verdünnungen auf Vollmedium zur Bestimmung der Lebendzellzahl sowie auf Medium mit G418 zur Bestimmung der Reversionsfrequenz plattiert. Gezeigt sind die Mittelwerte dreier Datensätze. Daten für Wildtyp und *mph1*-Deletionsmutante wurden Abb. 9 entnommen.

Aus Abb. 13 geht hervor, daß die Reversionsfrequenz der *rev3*-Deletionsmutante durch die Behandlung mit Camptothecin durchaus beeinflusst wird, allerdings bei hohen Konzentrationen das Niveau des Wildtyps erreicht. Zusätzlich zeigt sich nicht, wie im Falle der Behandlung mit 4-NQO, eine Erhöhung der Reversionsfrequenz, sondern eine leichte Absenkung. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, nach welcher der größere Teil der auftretenden Läsionen nicht durch Transläsionssynthese überlesen werden kann.

Eine Erklärungsmöglichkeit für die leichte Absenkung der Reversionsfrequenz besteht darin, daß für Rev3 eine Rolle in der homologen Rekombination beschrieben wurde

(HOLBECK & STRATHERN, 1997; SONODA *et al.*, 2003). Allerdings ist durch die Annahme einer generellen Rolle von Rev3 in der homologen Rekombination nicht so ohne weiteres erklärbar, warum bezüglich der Reversionsfrequenzen bei hohen Camptothecin-Konzentrationen das Niveau des Wildtyps erreicht wird.

Interessanterweise ähnelt auch in diesem Experiment das Verhalten der *rev3 mph1*-Doppelmutante dem Verhalten der *rev3*-Einzelmutante. Bei niedrigen Camptothecin-Konzentrationen entsprechen die Reversionsfrequenzen der Doppelmutante etwa denen der *mph1*-Einzelmutante um dann allerdings bei hohen Konzentrationen das Niveau des Wildtyps zu erreichen.

Eine mögliche Interpretation dieser Daten ist, daß bei Abwesenheit von Rev3 der Mph1-Weg zur Prozessierung von Läsionen kaum mehr benutzt wird, so daß sowohl die Reversionsfrequenzen als auch die Mutationsraten (SCHELLER *et al.*, 2000) der Doppelmutante denen der *rev3*-Einzelmutante entsprechen.

Die spontanen Reversionsraten zeigen in rev3-Deletionsmutanten nur geringfügige Änderungen

In *E. coli* wurde nachgewiesen, daß eine hohe PolV-Konzentration die Transläsionssynthese stimuliert (BERDICHEVSKY *et al.*, 2002). Es kann aus diesem Grund angenommen werden, daß es insbesondere nach der Auslösung der SOS-Antwort in *E. coli* zum verstärkten Einsatz der Transläsionssynthese kommt, da durch die SOS-Antwort die Expression u.a. von PolV gesteigert wird (GOODMAN, 2000). Es wäre also auch in Hefe möglich, daß die Transläsionssynthese z.B. durch einen *checkpoint* aktiviert wird. In diesem Fall sollte man erwarten, daß die Zellen unter normalen Wachstumsbedingungen keine ausgeprägte Verstärkung der spontanen Reversionsrate zeigen.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die spontanen Reversionsraten der Stämme CEN.PK 2-1C, CEN.PK 2-1C *rev3* sowie CEN.PK 2-1C *rev3 mph1* bestimmt. Die Bestimmung wurde analog zur Bestimmung der Mutationsrate nach der Medianmethode durchgeführt (LEA und COULSON, 1948). Die Zellen wurden in Selektivmedium angezogen und auf Vollmediumsplatten mit G418 plattiert. Die Messung des Lebendtiters erfolgte auf Vollmediumsplatten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Spontane Reversionsraten der Stämme CEN.PK 2-1C, CEN.PK 2-1C *rev3* und CEN.PK 2-1C *rev3 mph1*, ermittelt mit dem KanKanMX4-Konstrukt gemäß der Medianmethode (Lea und Coulson, 1948).

	Spontane Reversionsrate	Faktor
CEN.PK 2-1C	$1,03 \cdot 10^{-4} \pm 0,09 \cdot 10^{-4}$	1
CEN.PK 2-1C <i>rev3</i>	$1,24 \cdot 10^{-4} \pm 0,11 \cdot 10^{-4}$	1,2
CEN.PK 2-1C <i>rev3 mph1</i>	$1,13 \cdot 10^{-4} \pm 0,10 \cdot 10^{-4}$	1,1

Im Vergleich zum Wildtyp zeigt die *rev3*-Einzelmutante nur eine sehr schwache Erhöhung der Reversionsrate, und auch die Doppelmutante zeigt nur eine leichte Veränderung gegenüber dem Wildtyp bzw. der Doppelmutante. Diese Ergebnisse unter-

stützen die Hypothese, daß der Translasionssynthese unter normalen Stoffwechselbedingungen nur eine untergeordnete Rolle zukommt und sie erst bei einem erhöhten Anfall von DNA-Läsionen vermehrt zur Prozessierung arretierter Replikationsgabeln herangezogen wird.

Interessant ist allerdings, daß die Reversionsrate der Doppelmutante ähnlich wie bei den Reversionsfrequenzen eher der *rev3*- als der *mph1*-Mutante entspricht. Auch dies deutet darauf hin, daß, wie auf Seite 78 diskutiert, bei Ausfall von Rev3 der Mph1-abhängige Weg kaum noch genutzt wird.

Die Deletion von RAD30 führt zu keiner Suppression des Mutatorphänotyps der mph1-Deletionsmutante

In *Saccharomyces cerevisiae* wurde neben Pol ζ Pol η als eine weitere Translasionpolymerase identifiziert. Durch biochemische Experimente konnte gezeigt werden, daß Pol η in der Lage ist, über Thymin-Dimere hinweg zu synthetisieren, wobei mit hoher Präferenz gegenüber der Läsion zwei Adenine eingebaut werden (JOHNSON *et al.*, 1999). Neben Thymin-Dimeren können durch Pol η auch eine Reihe weiterer Läsionen wie u.a. O⁶-Methylguanin überlesen werden (HARACSKA *et al.*, 2000). Allerdings können nicht alle kleinen DNA-Läsionen durch Polymerase η überlesen werden. Durch biochemische Experimente wurde nachgewiesen, daß ein Thyminglycol in der Matrize *in vitro* nur mit sehr geringer Effizienz überlesen wird (JOHNSON *et al.*, 2003).

Die Möglichkeit, über eine Reihe von ungewöhnlichen DNA-Strukturen hinweg synthetisieren zu können, ist vermutlich durch eine wesentlich »offenere« Struktur des aktiven Zentrums gegeben, welche anhand der Kristallstruktur gezeigt werden konnte (TRINCAO *et al.*, 2001). Vermutlich ist dies relaxierte aktive Zentrum der Grund für die geringere Genauigkeit auf ungeschädigten Matrizen (JOHNSON *et al.*, 2000; MATSUDA *et al.*, 2000).

In *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, daß ein (6-4)TT-Photoprodukt durch Pol η zu 60% fehlerbehaftet überlesen wird. Interessanterweise war die fehlerbehaftete Translasionssynthese in *rad30*-Deletionsmutanten signifikant verringert, während sich der prozentuale Anteil der fehlerfreien Translasionssynthese des (6-4)TT-Photoprodukts nur wenig veränderte. Aus diesen Daten schlossen die Autoren, daß Pol η zu einer fehlerbehafteten Translasionssynthese eines (6-4)TT-Photoprodukts führt, während eine weitere Polymerase über die Läsion fehlerfrei hinweg synthetisiert (BRESSON & FUCHS, 2002). In *in-vitro*-Systemen zeigte Pol η die Tendenz, ein G gegenüber dem zweiten T von (6-4)TT-Photoprodukten zu inkorporieren. Die Elongation dieses fehlgepaarten Primerendes war ineffizient. Im Kontrast hierzu erwies sich Pol ζ relativ effizient im Verlängern derartiger Primerenden. Diese Daten unterstützen die Hypothese, daß Läsionen durch die sequentielle Aktivität von mindestens zwei unterschiedlichen Polymerasen überlesen werden. So wäre eine aufeinanderfolgende Prozessierung durch Pol η und Pol ζ möglich (PRAKASH & PRAKASH, 2002).

Der Mutatorphänotyp der *mph1*-Deletionsmutante läßt sich durch die Deletion von *REV3* supprimieren (SCHELLER *et al.*, 2000). Geht man davon aus, daß zumindest einige auftretende Mutationen durch die aufeinanderfolgende Aktion von Pol η und Pol ζ zustande kommen, dann sollte auch in *rad30 mph1*-Doppelmutanten die erhöhte Mutationsrate partiell supprimiert werden.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die Mutationsraten der *rad30*- sowie der *rad30 mph1*-Deletionsmutante gemäß der Medianmethode bestimmt (LEA & COULSON, 1948). Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6: Mutationsraten der Stämme CEN.PK 2-1C, CEN.PK 2-1C *mph1*, CEN.PK 2-1C *rad30* und CEN.PK 2-1C *rad30 mph1*, ermittelt mit dem *CAN1*-Vorwärtsmutationssystem nach der Medianmethode (Lea und Coulson, 1948).

	Spontane Mutationsrate	Faktor
CEN.PK 2-1C	$4,46 \cdot 10^{-7} \pm 0,64 \cdot 10^{-7}$	1
CEN.PK 2-1C <i>mph1</i>	$26,0 \cdot 10^{-7} \pm 3,1 \cdot 10^{-7}$	5,8
CEN.PK 2-1C <i>rad30</i>	$3,65 \cdot 10^{-7} \pm 0,54 \cdot 10^{-7}$	0,8
CEN.PK 2-1C <i>rad30 mph1</i>	$24,9 \cdot 10^{-7} \pm 2,9 \cdot 10^{-7}$	5,6

Aus den Daten geht hervor, daß die zusätzliche Deletion von *RAD30* den Mutatorphänotyp der *mph1*-Deletionsmutante nicht supprimieren kann. Rad30 spielt folglich bei der Umgehung derjenigen Läsionen, welche durch Mph1 prozessiert werden, keine Rolle. Auch eine sequentielle Aktivität von Polymerase η und Polymerase ζ an diesen Schäden kann ausgeschlossen werden.

Die fehlende Suppression des Mutatorphänotyps könnte damit zusammenhängen, daß durch Mph1 spezifisch Polymerase η für eine fehlerfreie Umgehung von Schäden rekrutiert wird. In der Abwesenheit von Mph1 werden dann verstärkt andere Mechanismen zum Überlesen von Läsionen eingesetzt, welche vermehrt zu Mutationen führen und an welchen Polymerase ζ beteiligt ist. Gegen diese Hypothese spricht allerdings, daß die Mutationsrate der *rad30*-Einzelmutante nicht erhöht ist, sofern man nicht zusätzlich annimmt, daß durch Mph1 anderen Mechanismen als der Transläsionssynthese der Zugang zu Läsionen verwehrt wird. Einfacher erscheint die Annahme, daß Mph1 und Polymerase η ein voneinander differierendes Substratspektrum besitzen.

In rad30-Deletionsmutanten läßt sich die Mutationsfrequenz durch Behandlung mit 4-Nitrochinolin-1-oxid erhöhen

Die von BRESSON & FUCHS sowie von PRAKASH & PRAKASH vorgestellten Ergebnisse beziehen sich zu einem erheblichen Teil auf Schäden wie sie durch UV ausgelöst werden (BRESSON & FUCHS, 2002; PRAKASH & PRAKASH, 2002). Anhand der Mutationsfrequenzen konnte gezeigt werden, daß Mph1 an der fehlerfreien Umgehung von durch 4-NQO ausgelösten Läsionen beteiligt ist (siehe Seite 60). Um eine mögliche sequentielle Aktivität von Polymerase η und Polymerase ζ bei der Umgehung UV-ähnlichen Schäden zu über-

prüfen, sollte untersucht werden, ob sich die Mutationsfrequenz durch Behandlung mit 4-NQO in *rad30*-Zellen steigern läßt.

Die Durchführung dieser Experimente erfolgte wie beschrieben (siehe Seite 67); die Ergebnisse sind in Abb. 14 gezeigt.

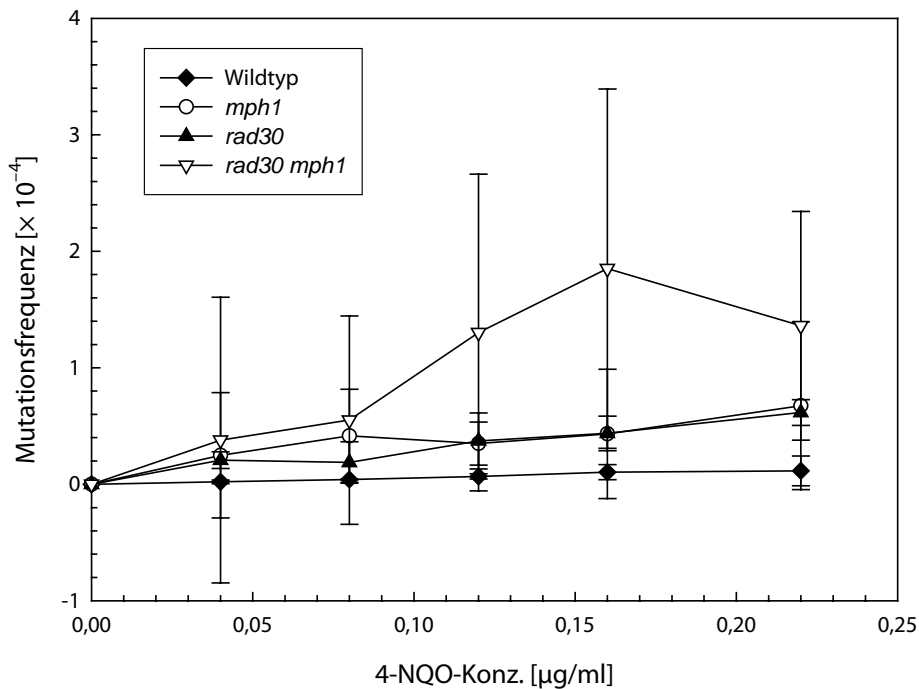


Abb. 14: Beeinflussung der Mutationsfrequenz Stämme CEN.PK 2-1C *rad30* und CEN.PK 2-1C *rad30 mph1* durch Behandlung mit 4-Nitrochinolin-1-oxid. Die Stämme wurden bei Erreichen einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml⁻¹ mit α -mating factor in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium mit den angegebenen Konzentrationen 4-Nitrochinolin-1-oxid resuspendiert und für die Dauer eines Zellzyklus bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden gründlich gewaschen, verdünnt und adäquate Verdünnungen auf SD^{-Arg}-Selektivmedium zur Bestimmung der Lebendzellzahl sowie auf Medium mit Canavanin zur Bestimmung der Mutationsfrequenz plattiert. Gezeigt sind Datensätze aus drei bis sechs Experimenten. Daten für Wildtyp und *mph1*-Deletionsmutante wie in Abb. 3.

Aus Abb. 14 geht hervor, daß sich auch bezüglich der durch 4-NQO hervorgerufenen Schäden die Hypothese von einer aufeinander folgenden Prozessierung von Läsionen durch Pol η und Pol ζ nicht halten läßt, da die Mutationsfrequenz in *rad30*-Deletionsmutanten im Gegensatz zu *rev3*-Deletionsmutanten erhöht werden kann. Dies läßt den Schluß zu, daß Pol η in Wildtyp-Zellen entweder in der Lage ist, auftretenden Läsionen fehlerfrei zu überlesen, oder daß Pol η andere, fehlerbehaftete Transläsionssynthese hemmt, sofern die Läsion durch Pol η fehlerfrei überlesen werden kann.

Durch die zusätzliche Deletion von *MPH1* wird die Mutationsfrequenz noch weiter in die Höhe getrieben. Offenbar ist Mph1 also nicht an einem Rad30-abhängigen Weg be-

teilt. Die Abweichungen der einzelnen Experimente sind relativ hoch, so daß keine klare Aussage darüber gemacht werden kann, ob es sich um einen synergistischen Effekt handelt, oder nicht. Auch eine epistatische Interaktion von *mph1* mit *rad30* kann aufgrund der starken Schwankungen der einzelnen Experimente nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden. Der größte Teil der Datenpunkte der Doppelmutante liegt allerdings über denen der Einzelmутanten, so daß davon ausgegangen werden kann, daß es sich um einen additiven oder synergistischen Effekt handelt.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Ergebnisse der spontanen Mutationsraten darauf hindeuten, daß Pol η für die unter normalen Bedingungen auftretenden Läsionen nicht zuständig ist. Dies ist offensichtlich bei den durch 4-NQO induzierten Läsionen anders, da diese bei Abwesenheit von Pol η die Mutationsfrequenz erhöhen. Hier scheinen also Läsionen induziert zu werden, welche durch Pol η fehlerfrei überlesen werden können und in Abwesenheit von Rad30 fehlerbehaftet überlesen werden.

Die Reversionsfrequenzen des KanKanMX4-Moduls sind nach Behandlung mit 4-NQO in rad30-Deletionsmutanten gegenüber dem Wildtyp deutlich erniedrigt

Wie bereits beschrieben (siehe Seite 75) lassen sich in XP-V-Zelllinien nach Bestrahlung mit UV eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöhte Zahl von Doppelstrangbrüchen nachweisen. Die Ursache dieser Doppelstrangbrüche könnte dadurch erklärt werden, daß Pol η fehlerfrei Thymin-Dimere zu überlesen vermag. In der Abwesenheit von Pol η kommt es vermehrt zu einem Arrest replikativer Polymerasen und dabei zur vermehrten Bildung von Doppelstrangbrüchen (LIMOLI *et al.*, 2000). Geht man von dem Modell aus, daß es im Falle einer arretierten *leading strand* Polymerase zur Bildung einer *Holliday junction* kommt, dann ist leicht vorstellbar, daß diese vermehrt durch Resolvasen geschnitten und somit in doppelsträngige DNA-Enden überführt wird.

Allerdings konnte in *Saccharomyces cerevisiae* bisher kein Enzym sicher identifiziert werden, welches die Aktivität einer Resolvase bei der Rekombination im Kern ausübt.

Um zu untersuchen, ob es auch in *Saccharomyces cerevisiae* bei Abwesenheit von Pol η zur vermehrten Bildung doppelsträngiger DNA-Enden kommt, wurde erneut das KanKanMX4-Modul herangezogen. Sofern auch in Hefe die Abwesenheit von Pol η zur Bildung doppelsträngiger DNA-Enden führt, sollte man erwarten, daß die Deletion von *RAD30* die Reversionsfrequenzen des KanKanMX4-Moduls erhöht (ähnliche wie in *rev3*-Deletionsmutanten; Vergleich Seite 77). Die Durchführung der Experimente erfolgte wie beschrieben (siehe Seite 67).

Abb. 15 zeigt, daß das Verhalten der *rad30*-Deletionsmutante signifikant von dem Verhalten der *rev3*-Deletionsmutante abweicht. Statt einer Verstärkung der Reversionsfrequenzen wie bei der *rev3*-Deletionsmutante ist eine deutliche Erniedrigung der Reversionsfrequenzen zu erkennen. Überraschenderweise treten bei Ausfall von Pol η offenbar deutlich weniger doppelsträngige DNA-Enden auf. Gleichzeitig zeigen die Experimente zur induzierten Mutagenese, daß bei Ausfall von Pol η vermehrt Mutationen auftreten. Dies deutet also darauf hin, daß bei Ausfall von Pol η in diesem speziellen Ver-

suchssystem die normalerweise durch Pol η fehlerfrei prozessierten Läsionen nicht rekombinativ sondern mit Hilfe von Pol ζ umgangen werden, wobei diese Befunde im Gegensatz zu den Befunden aus humanen Zellen nach UV-Bestrahlung stehen (LIMOLI *et al.*, 2000).

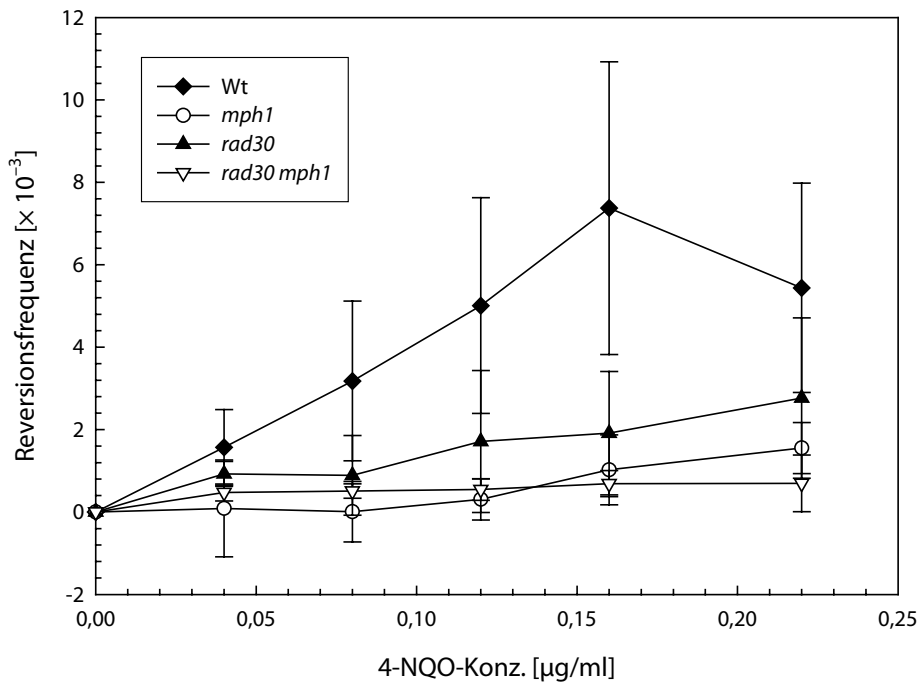


Abb. 15: Beeinflussung der Reversionsfrequenz des KanKanMX4-Moduls in den Stämmen CEN.PK 2-1C *rad30* und CEN.PK 2-1C *rad30 mph1* nach Behandlung mit 4-Nitrochinolin-1-oxid. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen $\cdot \text{ml}^{-1}$ mit α -mating factor in der G_1 -Phase des Zellzyklus arretiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium resuspendiert, welches die angegebenen Konzentrationen 4-Nitrochinolin-1-oxid enthielt und für die Dauer eines Zellzyklus bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und Verdünnungen auf Vollmedium zur Bestimmung der Lebendzellzahl sowie auf Medium mit G418 zur Bestimmung der Reversionsfrequenz plattiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Datensätzen. Daten von Wildtyp und *mph1*-Deletionsmutante wurden Abb. 8 entnommen

Allerdings erfolgt die Detektion doppelsträngiger DNA-Enden, anders als bei LIMOLI *et al.*, welche zum Nachweis einen Enzymkomplex herangezogen haben, der an doppelsträngige DNA-Enden bindet (LIMOLI *et al.*, 2000), nur indirekt. Es ist also denkbar, daß doppelsträngige DNA-Enden entstehen, welche aber im KanKanMX4-System nicht zu einem Reversionsereignis führen.

Weiterhin darf auch hier bei der Interpretation dieser Daten nicht außer acht gelassen werden, daß durch 4-NQO andere Schäden als durch UV hervorgerufen werden. Für Pol η wurde biochemisch gezeigt, daß die fehlerfreie Prozessierung insbesondere von Thymin-Dimeren möglich ist (PRAKASH & PRAKASH, 2002). Im Kontrast hierzu kann durch Pol η gegenüber eines Thyminglycols zwar eine Base inkorporiert werden, jedoch

erfolgte die Inkorporation und eine anschließende Elongation nur sehr langsam (JOHNSON *et al.*, 2003). Es ist also durchaus denkbar, daß die durch 4-NQO hervorgerufenen Läsionen nur teilweise ein geeignetes Substrat für Pol η darstellen. Allerdings ist gerade in diesem Zusammenhang bemerkenswert, daß es zu einer Absenkung der Reversionsfrequenzen bei Behandlung mit 4-NQO kommt.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für diese Befunde ist, daß Pol η neben der Polymerasefunktion zusätzlich eine regulatorische Funktion zukommt. In *Schizosaccharomyces pombe* konnte gezeigt werden, daß eine verstärkte Transkription des *dinB*⁺ nach Behandlung mit MMS nur nachgewiesen werden kann, wenn ein funktionsfähiges *rad17*⁺-Gen vorhanden ist, welches einerseits für die *checkpoint*-Kontrolle zuständig ist, zusätzlich aber offenbar auch durch die DNA-Bindedomäne Kontakt zwischen dem geschädigten DNA-Bereich und Pol η herstellt (KAI *et al.*, 2003). Es ist also durchaus denkbar, daß beim Fehlen von Rad30 auch regulatorische Probleme auftreten, welche zu einem verstärkten Einsatz von Pol ζ führen.

Die Reversion des KanKanMX4-Moduls ist in rad30-Deletionsmutanten nach Behandlung mit Camptothecin nur wenig verändert

Wie bereits gezeigt hat die Deletion der katalytisch aktiven Untereinheit der Translasiopolymerase ζ nur einen geringen Einfluß auf die Reversionsfrequenz des KanKanMX4-Moduls nach Behandlung der Zellen mit Camptothecin. Sofern Rad30 ebenfalls hauptsächlich an der Translasiionsynthese beteiligt ist, sollte man für *rad30*-Deletionsmutanten einen ähnlichen Phänotyp erwarten.

Die Durchführung der Experimente erfolgte wie beschrieben (siehe Seite 68).

In gewisser Weise zeigt Abb. 16 ein ähnliches Verhalten der *rad30*- sowie *rad30 mph1*-Deletionsmutante wie die entsprechenden *rev3*-Deletionsmutanten (siehe Abb. 13). Sowohl die Einzel- als auch die Doppelmutante zeigen bei geringen Camptothecin-Konzentrationen eine deutliche Erniedrigung der Reversionsfrequenz. Allerdings ist in diesem Fall die Reversionsfrequenz der Doppelmutante gegenüber der Einzelmutante erniedrigt. Die zusätzliche Deletion des *MPH1*-Gens zeigt also in diesem Fall – im Gegensatz zur *rev3 mph1*-Deletionsmutante – einen deutlichen Effekt. Zusätzlich ist die Reversionsfrequenz der Einzelmutante bei hohen Camptothecin-Konzentrationen sogar höher als die des Wildtyps, während die Reversionsfrequenz der Doppelmutante in etwa das Niveau des Wildtyps erreicht und somit höher liegt als die der *mph1*-Einzelmutante.

Bereits bei der Interpretation der Reversionsfrequenzen nach 4-NQO-Behandlung wurde darüber spekuliert, daß Rad30 zusätzlich zur Polymeraseaktivität auch eine regulatorische Funktion besitzen könnte. Diese mag u.U. auch in diesem Fall für die auftretenden Effekt verantwortlich sein.

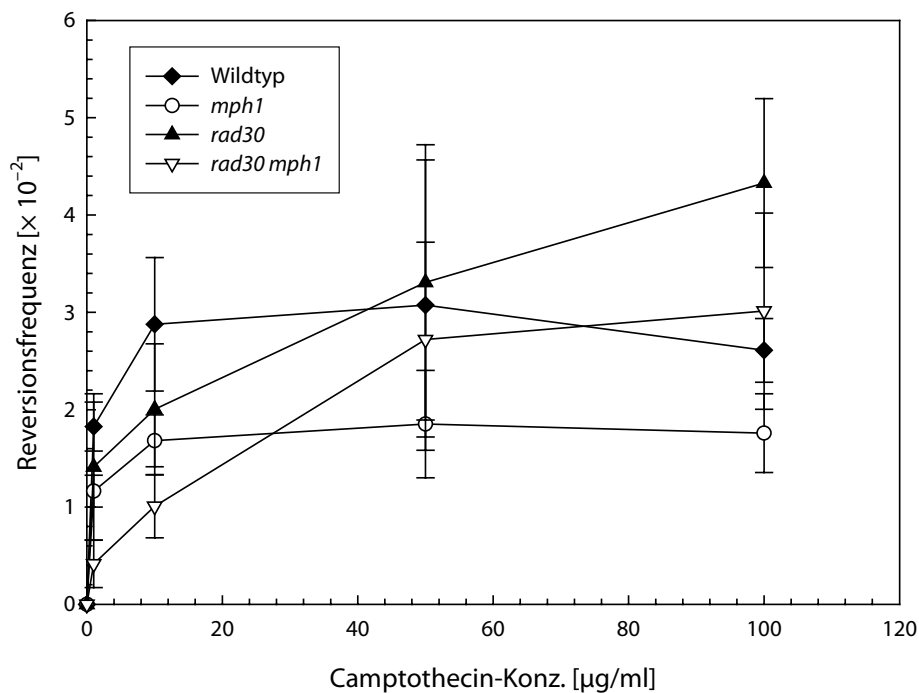


Abb. 16: Beeinflussung der Reversionsfrequenz des KanMX4-Moduls in den Stämmen CEN.PK 2-1C *rad30* und CEN.PK 2-1C *rad30 mph1* nach Behandlung mit Camptothecin. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml $^{-1}$ mit α -mating factor in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium resuspendiert, welches die angegebenen Konzentrationen Camptothecin enthielt und für die Dauer eines Zellzyklus bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und Verdünnungen auf Vollmedium zur Bestimmung der Lebendzellzahl sowie auf Medium mit G418 zur Bestimmung der Reversionsfrequenz plattiert. Gezeigt sind die Mittelwerte dreier Datensätze. Daten für Wildtyp und *mph1*-Deletionsmutante wurden Abb. 9 entnommen.

Untersuchungen zum Zusammenspiel unterschiedlicher Wege zur Prozessierung arretierter Replikationsgabeln

Durch Mms4 werden *in vitro* Replikationsintermediate geschnitten

Biochemische und genetische Untersuchungen deuten darauf hin, daß die Genprodukte der Gene *MMS4* sowie *MUS81* an rekombinativen Prozessen beteiligt sein könnten, durch welche arretierte Replikationsgabeln reinitiiert werden (KALIRAMAN *et al.*, 2001).

Es konnte gezeigt werden, daß Mms4 einen Komplex mit Mus81 bildet und daß dieser Komplex eine endonukleolytische Aktivität besitzt. Der Komplex ist *in vitro* in der Lage, effizient bestimmte Y-Strukturen zu schneiden, während *Holliday junctions* mit deutlich geringerer Effizienz geschnitten werden. Einzel- und doppelsträngige DNA wird hingegen

nicht geschnitten. Das beste Substrat ist eine 3'-flap-Struktur, also eine Y-Form, bei welcher ein Arm des Y doppelsträngig und der andere einzelsträngig ist, so daß sich ein 5'-Ende am Einzelstrang-Doppelstrang-Übergang des Y befindet (KALIRAMAN *et al.*, 2001).

Diese Befunde konnten auch für die vermutlich homologen Proteine aus *Schizosaccharomyces pombe* (Eme1 und Mus81) bestätigt werden. Zusätzlich wurde mit diesem Proteinkomplex gezeigt, daß ein Y, welches so gestaltet wurde, daß es vermutlich einer voranschreitenden Replikationsgabel entspricht, bei welchem also der *leading strand* mit dem freien 3'-Ende dicht am Y ist, ein schlechtes Substrat darstellt. Der Komplex schneidet also zumindest *in vitro* keine Strukturen, die einer funktionstüchtigen Replikationsgabel entsprechen. Weiterhin werden *Holliday junctions* auch dann mit geringer Effizienz geschnitten, wenn der vierte Arm nur wenige Basenpaare lang ist (WHITBY *et al.*, 2002).

Für die Aktivität des Komplexes in *Saccharomyces cerevisiae* spielt auch der Abstand des 5'-Endes zur Gabelung des Y eine Rolle. *In vitro* wurden Substrate insbesondere dann gut durch den Mms4-Mus81-Komplex geschnitten, wenn sich das freie 5'-Ende bis maximal vier Nukleotide von der Gabel entfernt befand. Ist das 5'-Ende deutlich weiter als fünf Nukleotide entfernt, stellen die Strukturen nur noch schlechte Substrate dar. Hingegen werden auch Strukturen geschnitten, bei welchen sowohl das 5'-Ende als auch das 3'-Ende bis an die Verzweigung reichen (BASTIN-SHANOWER *et al.*, 2003).

Neben den biochemischen Befunden konnten sowohl in *mms4*⁻ als auch in *eme1*⁻-Deletionsmutanten interessante genetische Interaktionen nachgewiesen werden. Doppelmutanten mit *sgs1* (*S. c.*) bzw. *rqh1*⁻ (*S. p.*) sind synthetisch letal. Diese synthetische Letalität kann durch die zusätzliche Deletion der Gene *RAD51*, *52*, *54*, *55* und *57* bzw. deren Homologe aus *Schizosaccharomyces pombe* wieder aufgehoben werden (DOE *et al.*, 2002; BASTIN-SHANOWER *et al.*, 2003; FABRE *et al.*, 2002). Auch die Expression der *Holliday-junction*-Resolvase RusA aus *E. coli* führt zu einer Suppression der synthetischen Letalität einer *rqh1*⁻ *mus81*⁻-Doppelmutante in *Schizosaccharomyces pombe* (DOE *et al.*, 2002).

Bezüglich der genauen Funktion des Mms4-Mus81-Komplexes wurden unterschiedliche Modelle entwickelt. Eine Möglichkeit ist, daß der Komplex direkt an der Auflösung von Replikationsintermediaten beteiligt ist (WHITBY *et al.*, 2002). Im Falle eines Arrestes würde durch einen Schnitt der Replikationsgabel am Verzweigungspunkt ein doppelsträngiges DNA-Ende entstehen. Dieses könnte prinzipiell für die Reinitiation genutzt werden, indem ein einzelsträngiger 3'-Überhang gebildet wird, indem das 5'-Ende resektiert wird. Da sich auf diesem Strang die Läsion befindet, würde diese im Zuge der Degradation entfernt werden. Das entstandene 3'-Ende kann dann rekombinativ in das verbliebene Chromosom unter Ausbildung eines *D-loops* eingeführt werden. Gemäß dieses Modells ist es allerdings nicht ganz einfach zu erklären, warum durch den Komplex präferentiell die Matrize des *leading strand* geschnitten wird (WHITBY *et al.*, 2002; BASTIN-SHANOWER *et al.*, 2003). Zusätzlich ist auffallend, daß der Schnittpunkt in Abhängigkeit vom freien 5'-Ende sehr dicht am Verzweigungspunkt der parentalen Stränge

liegt. Um die Replikationsgabel hier schneiden zu können, müßte man davon ausgehen, daß zumindest Teile des Replisoms entfernt werden, bevor der Bereich für den Mms4-Mus81-Komplex überhaupt zugänglich ist.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß der Komplex an der Prozessierung von Intermediaten beteiligt ist, welche beim Schließen einzelsträngiger DNA-Bereiche gegenüber von Läsionen entstehen. Eine postulierte Funktion von Sgs1 ist die Vermeidung einzelsträngiger DNA-Bereiche auf dem *lagging strand* während der Replikation. In *sgs1*-Deletionsmutanten müßten diese einzelsträngigen DNA-Bereiche mit Hilfe rekombinativer Prozesse aufgefüllt werden. Dies kann erreicht werden, indem das 3'-Ende des unvollendeten Okazaki-Fragments in das Schwesterchromatid eingeführt und mit Hilfe von Replikation verlängert wird. Ist das Ende ausreichend verlängert worden, kann z.B. durch *branch migration* die Lücke geschlossen werden. Wurde das 3'-Ende jedoch weiter als der einzelsträngige DNA-Bereich verlängert, entsteht durch die Reinvansion des verlängerten Stranges eine 3'-*flap*-Struktur, welche gerade das ideale Substrat für den Mms4-Mus81-Komplex darstellt (FABRE *et al.*, 2002).

Interessanterweise ist der Phänotyp einer *mms4*-Mutante vergleichsweise ähnlich zu dem einer *mph1*-Mutante. Auch *mms4*-Mutanten zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber MMS und 4-NQO, wobei der Phänotyp der *mph1 mms4*-Doppelmutante bezüglich der Sensitivitäten im Vergleich zu den Einzelmутanten synergistisch ist (A. SCHÜRER, unveröffentlicht). Dies kann dergestalt interpretiert werden, daß Mph1 und Mms4 in unterschiedlichen Wegen an Reinitiationsprozessen beteiligt sind, welche allerdings partiell überlappende Substrate prozessieren. Aus diesem Grund soll die Interaktion von Mms4 mit Mph1 näher untersucht werden.

Die Deletion von MMS4 führt nur zu einer moderaten Erhöhung der Mutationsraten

Geht man davon aus, daß Mms4 an der Reinitiation arretierter Replikationsgabeln beteiligt ist, welche an kleinen DNA-Läsionen arretiert sind, dann sollte man auch für die *mms4*-Deletionsmutante eine Erhöhung der Mutationsrate erwarten. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die spontanen Mutationsraten gemäß der Medianmethode bestimmt (LEA & COULSON, 1948).

Tabelle 7: Spontane Mutationsraten der Stämme CEN.PK 2-1C, CEN.PK 2-1C *mms4* und CEN.PK 2-1C *mms4 mph1*, ermittelt mit Hilfe des Canavanin-Vorwärtsmutationssystemes gemäß der Medianmethode (Lea und Coulson, 1948).

	Spontane Mutationsrate	Faktor
CEN.PK 2-1C	$2,93 \cdot 10^{-7} \pm 0,4 \cdot 10^{-7}$	1
CEN.PK 2-1C <i>mph1</i>	$15,4 \cdot 10^{-7} \pm 1,7 \cdot 10^{-7}$	5,3
CEN.PK 2-1C <i>mms4</i>	$3,31 \cdot 10^{-7} \pm 0,5 \cdot 10^{-7}$	1,1
CEN.PK 2-1C <i>mms4 mph1</i>	$23,2 \cdot 10^{-7} \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$	7,9

Die ermittelten Daten (siehe Tabelle 7) zeigen, daß die normalerweise von Mms4 prozessierten Läsionen in *mms4*-Deletionsmutanten entweder nicht mit Hilfe der Transläsions-

synthese prozessiert werden, da die *mms4*-Mutante keinen Mutatorphänotyp aufweist, oder daß ein fehlerfreies Überlesen der Läsionen erfolgt.

Eine Erklärung für einen fehlenden Einsatz der Transläsionssynthese wäre, daß durch den Mms4-Mus81-Komplex Läsionen umgangen werden, die so voluminös oder strukturell dergestalt sind, daß sie nicht durch Transläsionspolymerasen überlesen werden können. Diese Hypothese wird durch den Befund gestützt, daß die *mms4*-Mutante eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber Camptothecin besitzt, welches u.a. voluminöse Läsionen verursacht (SCHÜRER *et al.*, unveröffentlicht).

Andererseits ist die Interaktion von *mph1* mit *mph1* synergistisch. Offenbar werden also in Abwesenheit von Mms4 Läsionen durch Mph1 prozessiert und erst der Ausfall beider Systeme führt zu einer verstärkten fehlerbehafteten Prozessierung. Dies deutet darauf hin, daß zumindest ein Teil der durch den Mms4-Mus81-Komplex prozessierten Läsionen nicht so voluminös ist, daß keine fehlerbehaftete Transläsionssynthese erfolgen könnte.

In mms4-Deletionsmutanten ist die Reversionsfrequenz des KanKanMX4-Moduls nach Behandlung mit 4-NQO erniedrigt

Die bisher z.B. aus den Mutationsfrequenzen gewonnenen Daten deuten darauf hin, daß durch 4-NQO kleinere Schäden der DNA hervorgerufen werden, da sie durch die Transläsionssynthese überlesen werden können. Es wurde bereits ausgeführt, daß kleine Läsionen der DNA vermutlich zu einem Arrest der replikativen Polymerasen führen (siehe Seite 17). Für Camptothecin wird hingegen angenommen, daß es u.a. zur Stabilisierung kovalenter DNA-Protein-Komplexe führt (siehe Seite 68), welche vermutlich zu einer Blockade der replikativen Helikasen führen. Geht man davon aus, daß Mph1 an der Prozessierung der erstgenannten Arreste beteiligt ist, während der Mms4-Mus81-Komplex für eine Reinitiation der Replikation an Schäden sorgt, welche zu einem Arrest der Helikasen geführt haben, dann sollte sich die Reversionsfrequenz nach Behandlung mit 4-NQO in *mms4*-Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp nur wenig verändern.

Die Reversionsfrequenzen nach Behandlung mit 4-NQO wurden wie beschrieben gemessen (siehe Seite 67).

Abb. 17 läßt sich entnehmen, daß die Reversionsfrequenz in *mms4*-Deletionsmutanten nach Behandlung mit 4-NQO im Vergleich zum Wildtyp erniedrigt ist. Diese Verringerung ist allerdings nicht so stark ausgeprägt wie im Falle der *mph1*-Deletionsmutante. Offenbar haben die durch 4-NQO hervorgerufenen Läsionen auf die Reversionsfrequenz der *mms4*-Deletionsmutante einen geringeren Einfluß als im Fall der *mph1*-Deletionsmutante.

Daß es trotzdem zu einer Verringerung der Reversionsfrequenz kommt, könnte u.a. darauf zurückzuführen sein, daß es an kleineren Läsionen zu Sekundärereignissen kommt. So können z.B. durch DNA-Läsionen RNA-Polymerasen arretiert werden, welche ihrerseits die replikativen Helikasen blockieren können (MCGLYNN & LLOYD, 2000). Die Behandlung mit 4-NQO vermag also durchaus beide Arten von Schäden hervorzurufen.

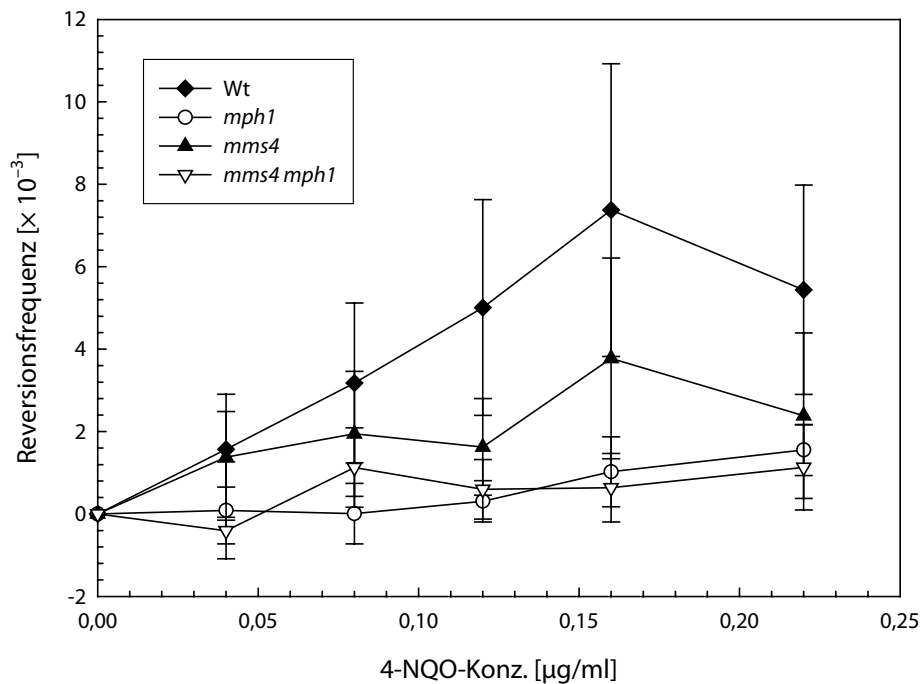


Abb. 17: Beeinflussung der Reversionsfrequenz des KanKanMX4-Moduls in den Stämmen CEN.PK 2-1C *mms4* und CEN.PK 2-1C *mms4 mph1* nach Behandlung mit 4-Nitrochinolin-1-oxid. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml $^{-1}$ mit α -mating factor in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium resuspendiert, welches die angegebenen Konzentrationen 4-Nitrochinolin-1-oxid enthielt und für die Dauer eines Zellzyklus bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und Verdünnungen auf Vollmedium zur Bestimmung der Lebendzellzahl sowie auf Medium mit G418 zur Bestimmung der Reversionsfrequenz plattiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei bis fünf Experimenten. Daten für Wildtyp und *mph1*-Deletionsmutante wurden Abb. 8 entnommen.

Die Reversionsfrequenz ist in mms4-Deletionsmutanten nach Behandlung mit Camptothecin stark erniedrigt

Geht man davon aus, daß der Mms4-Mus81-Komplex an der Reinitiation der Replikation nach Helikasearresten beteiligt ist, dann sollte man annehmen, daß die Reversionsfrequenzen nach Behandlung mit Chemikalien, welche Läsionen auslösen, die vermehrt zu Helikasearresten führen, deutlich stärker erniedrigt sind als bei Chemikalien, welche eher replikationsarretierend wirken.

Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden die Reversionsfrequenzen des KanKanMX4-Moduls nach Behandlung mit Camptothecin bestimmt. Es wurde bereits dargestellt, daß durch Camptothecin einerseits Einzelstrangbrüche entstehen, welche replikationsabhängig in Doppelstrangbrüche überführt werden. Zusätzlich kann es zu einem Arrest der Replikationsgabel insbesondere des *lagging strand* kommen (siehe Seite

68), wobei angenommen werden kann, daß dieser Arrest auf eine Behinderung der replikativen Helikase am kovalenten Topoisomerase-DNA-Komplex zurückzuführen ist.

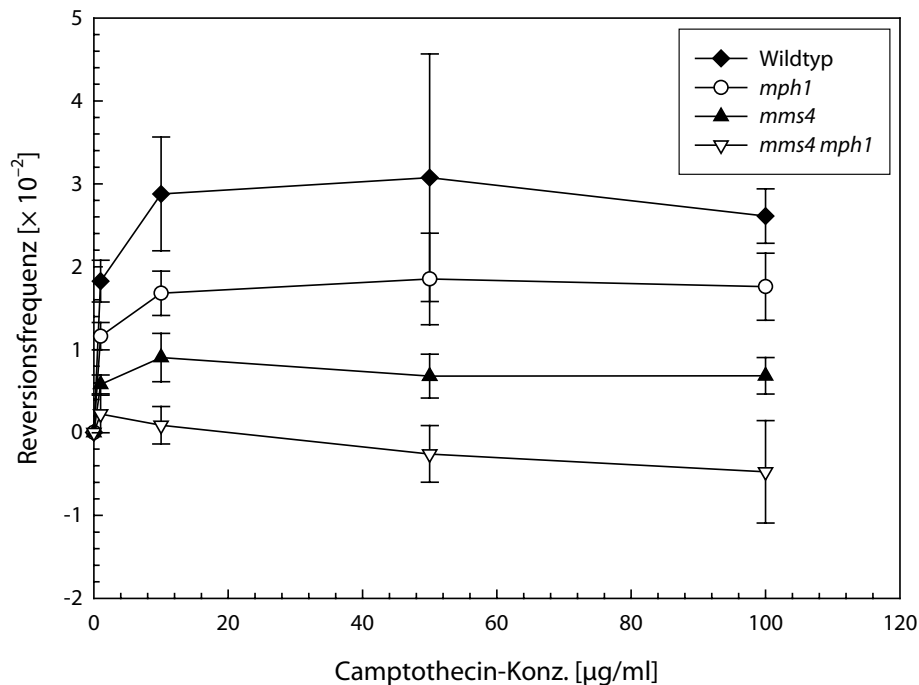


Abb. 18: Beeinflussung der Reversionsfrequenz des KanKanMX4-Moduls in den Stämmen CEN.PK 2-1C *mms4* und CEN.PK 2-1C *mms4 mph1* nach Behandlung mit Camptothecin. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml $^{-1}$ mit α -mating factor in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium resuspendiert, welches die angegebenen Konzentrationen Camptothecin enthielt und für die Dauer eines Zellzyklus bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und Verdünnungen auf Vollmedium zur Bestimmung der Lebendzellzahl sowie auf Medium mit G418 zur Bestimmung der Reversionsfrequenz plattiert. Gezeigt sind die Daten aus drei Experimenten. Daten für Wildtyp und *mph1*-Deletionsmutante wurden Abb. 9 entnommen.

Abb. 18 läßt sich entnehmen, daß die Reversionsfrequenzen der *mms4*-Deletionsmutante sowohl im Vergleich zum Wildtyp als auch zur *mph1*-Deletionsmutante deutlich erniedrigt sind. Offenbar entstehen also in der *mms4*-Deletionsmutante deutlich weniger Reversionsereignisse. Prinzipiell passen die biochemischen Befunde zu den Ergebnissen, nach welchen durch den Mms4-Mus81-Komplex Gabelstrukturen geschnitten werden, wobei Strangenden entstehen, die zur Rekombination genutzt werden können (siehe Abb. 2 & Abb. 36). Diesbezüglich ist es nicht verwunderlich, wenn in *mms4*-Deletionsmutanten weniger DNA-Enden und damit weniger Reversionsereignisse zu beobachten sind.

Gerade in diesem Zusammenhang ist interessant, daß in der *mms4 mph1*-Doppelmutante die Reversionsfrequenzen noch deutlich niedriger als in der *mms4*-Einzelmutante sind. Hier werden offenbar fast keine doppelsträngigen DNA-Enden mehr ge-

bildet. Dieser Befund steht allerdings im Widerspruch zu der Hypothese, daß die durch Camptothecin gebildeten Einzelstrangbrüche in Abhängigkeit der Replikation in Doppelstrangbrüche überführt werden, da man zumindest diese als Reversionsereignis messen können müßte, was allerdings offensichtlich nicht der Fall ist. Dieser Befund läßt sich entweder dergestalt erklären, daß durch Behandlung mit Camptothecin keine doppelsträngigen DNA-Enden entstehen, oder aber, daß doppelsträngige DNA-Enden nicht grundsätzlich zu Reversionsereignissen führen müssen. In diesem Fall würde ein besonderes Ereignis zu den Reversionsereignissen führen, welches sich in Abwesenheit von Mms4 und Mph1 nahezu vollständig unterdrücken ließe.

Die starke Absenkung der Reversionsfrequenz in *mms4*-Deletionsmutanten nach Behandlung mit Camptothecin steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu der von FABRE *et al.* aufgestellten Hypothese. Nach dieser Hypothese ist der Mms4-Mus81-Komplex insbesondere an der Prozessierung von Rekombinationsintermediaten beteiligt, welche beim Auffüllen einzelsträngiger DNA-Bereiche entstehen (FABRE *et al.*, 2002; siehe Seite 87). Gemäß dieser Hypothese sollte man allerdings davon ausgehen, daß die Stranginvasion bereits vor der Prozessierung durch Mms4-Mus81 erfolgt ist, wobei angenommen wird, daß durch die Invasion des Stranges im falschen Sequenzabschnitt das Reversionsereignis ausgelöst wird. Durch die Hypothese läßt sich nur schwer erklären, warum es bei Abwesenheit des Komplexes weniger oft zu einer Invasion des Stranges im falschen Sequenzabschnitt kommt.

Eine Möglichkeit der Interpretation der Daten wäre, daß der Mms4-Mus81-Komplex an mehreren unterschiedlichen Schritten beteiligt ist. So widerlegen die gewonnenen Daten prinzipiell nicht die Hypothese, daß durch den Komplex eine Prozessierung von Helikasearresten erfolgt. Allerdings müßte man in Anbetracht der Substratspezifität des Komplexes annehmen, daß an Helikasearresten Strukturen aktiv gebildet werden, welche durch den Komplex prozessiert werden können, oder daß es durch die Bindung zusätzlicher Faktoren zu einer Stimulierung der Aktivität auch an anders gestalteten Substraten kommt.

Die mms4-Deletionsmutante zeigt eine erhöhte spontane Reversionsrate

Nimmt man eine Beteiligung des Mms4-Mus81-Komplexes an der Prozessierung von Helikasearresten an, dann sollte man erwarten, daß die spontane Reversionsrate in *mms4*-Deletionsmutanten – ähnlich wie in *mph1*-Deletionsmutanten – erniedrigt ist, da auftretende Helikasearreste über andere Wege prozessiert werden müssen. Gemäß den Daten der Reversionsfrequenzen führen diese anderen Wege aber offenbar nicht verstärkt zu Reversionsereignissen, so daß auch die spontane Reversionsrate erniedrigt sein sollte. Um dies zu überprüfen, wurde diese gemäß der Medianmethode bestimmt (LEA & COULSON, 1948).

Interessanterweise geht aus Tabelle 8 hervor, daß sich im Gegensatz zur aufgestellten Hypothese sowie im Gegensatz zu den Reversionsfrequenzen genau der umgekehrte Effekt zeigt: in *mms4*-Deletionsmutanten ist die spontane Reversionsrate im Vergleich

zum Wildtyp erhöht und auch die Reversionsrate der Doppelmutante ist im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht.

Für dieses Ergebnis kann es unterschiedliche Gründe geben. So ist es durchaus denkbar, daß die spontan im Organismus auftretenden Läsionen anderer Natur sind als die durch 4-NQO und Camptothecin induzierten Schäden. Es wäre also möglich, daß diese Schäden Mms4-abhängig prozessiert werden und bei Abwesenheit von Mms4 ein alternativer Weg genutzt werden muß, der seinerseits zu mehr Reversionsereignissen führt.

Tabelle 8: Spontane Reversionsraten der Stämme CEN.PK 2-1C, CEN.PK 2-1C *mms4* und CEN.PK 2-1C *mms4 mph1*, ermittelt mit dem KanKanMX4-Konstrukt gemäß der Medianmethode (Lea und Coulson, 1948).

	Spontane Reversionsrate	Faktor
CEN.PK 2-1C	$6,87 \cdot 10^{-5} \pm 0,69 \cdot 10^{-5}$	1
CEN.PK 2-1C <i>mms4</i>	$1,70 \cdot 10^{-4} \pm 0,16 \cdot 10^{-4}$	2,7
CEN.PK 2-1C <i>mms4 mph1</i>	$1,40 \cdot 10^{-4} \pm 0,14 \cdot 10^{-4}$	2,0

Andererseits muß bei dem Ergebnis berücksichtigt werden, daß die spezifische Substratbindung durch den Komplex erfolgt und daß die endonukleolytische Aktivität durch Mus81 vermittelt wird. Es wäre also denkbar, daß das Fehlen von Mms4 zu einer ungerichteten Spaltung der DNA durch Mus81 führt, die allerdings auch durch die Induktion von Läsionen nicht gesteigert werden kann und aus diesem Grund die Reversionsfrequenzen im Falle der Behandlung mit 4-NQO bzw. Camptothecin verringert. Diese Hypothese wird allerdings dadurch geschwächt, daß die endonukleolytische Aktivität von Mus81 ohne Mms4 *in vitro* extrem niedrig ist. Erst die Komplexbildung mit Mms4 sorgt offenbar für eine Aktivierung dieser Aktivität (KALIRAMAN *et al.*, 2001).

Untersuchungen zur Reversion des KanKanMX4-Moduls in *sgs1*-Deletionsmutanten

Die sogenannte RecQ-Familie der Helikasen ist benannt nach dem RecQ-Protein aus *E. coli*, welche in RecF-abhängigen Rekombinationsprozessen eine Rolle spielt. Proteine aus der Familie der RecQ-DNA-Helikasen besitzen eine zentrale Region von 350 bis 400 Aminosäuren. Diese Sequenzabschnitte enthalten sieben Motive, welche sich in der Proteinsequenz zahlreicher DNA- und RNA-Helikasen finden. Mittlerweile konnte für einige Mitglieder der RecQ-Familie auch biochemisch gezeigt werden, daß sie in der Lage sind, DNA in 3'→5'-Richtung zu entwinden (OAKLEY & HICKSON, 2002).

In *E. coli* führt die Deletion von *recQ* zu einer erhöhten illegitimen Rekombinationsrate (HANADA *et al.*, 1997), wohingegen die homologe Rekombination erniedrigt ist (KOWALCZYKOWSKI *et al.*, 1994). Es konnte *in vitro* gezeigt werden, daß RecQ synthetische Holliday junctions zu entwinden vermag (HARMON & KOWALCZYKOWSKI, 1998). Es wird vermutet, daß RecQ eine ähnliche Rolle im RecF-Weg der Rekombination wie der RecBCD-Komplex spielen könnte. Durch die Entwindung in 3'→5'-Richtung könnte ein 3'-Überhang entstehen, welcher vom RecA-Protein für die homologe Rekombination

genutzt werden könnte. Dies kann im Zusammenspiel mit RecJ erfolgen, welches ebenfalls zum RecF-Weg der Rekombination gehört und eine 5'→3' gerichtete exonukleolytische Aktivität mit einzelsträngiger DNA als Substrat besitzt (KOWALCZYKOWSKI *et al.*, 1994).

In vitro konnte gezeigt werden, daß RecQ mit Topoisomerase III einen Komplex bildet, von welchem gezeigt wurde, daß er Catenane bilden kann. Dieser Befund legt den Schluß nahe, daß der RecQ-TopoIII-Komplex an der Umwandlung von Catenanen, wie sie z.B. durch Rekombinationsereignisse zwischen Schwesterchromatiden entstehen können, beteiligt ist. Interessanterweise war die Catenanbildung auch möglich, wenn die Topoisomerase III von *E. coli* durch Top3 von *Saccharomyces cerevisiae* ersetzt wurde. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß das RecQ-homologe Protein aus Hefe, Sgs1, im Komplex mit TopoIII zumindest bezüglich der Catenierung bzw. Decatenierung von DNA die gleiche Funktion besitzt (HARMON *et al.*, 1999).

Sgs1 aus *Saccharomyces cerevisiae* interagiert sowohl genetisch als auch physikalisch mit Top3 (GANGLOFF *et al.*, 1994; FRICKE *et al.*, 2001; ONODERA *et al.*, 2002). Sowohl *top3*- als auch *sgs1*-Deletionsmutanten zeichnen sich durch eine erhöhte Instabilität der rDNA-Bereiche aus, wobei diese Instabilität in *sgs1 top3*-Doppelmutanten nicht nachweisbar ist. Auch der Wachstumsdefekt von *top3*-Mutanten wird durch die zusätzliche Deletion von *SGS1* supprimiert (GANGLOFF *et al.*, 1994).

Wie bereits erwähnt (siehe Seite 73) zeigen *sgs1*-Deletionsmutanten zusätzlich zu der beobachteten Instabilität der rDNA-Bereiche eine erhöhte mitotische Rekombinationsrate sowohl bei homeologen (MYUNG *et al.*, 2001) als auch bei homologen Substraten (WATT *et al.*, 1996; MYUNG *et al.*, 2001). Die erhöhte Rate homologer mitotischer Rekombination ist dabei nur teilweise von der Anwesenheit von Rad52 abhängig (WATT *et al.*, 1996). Offenbar ist Sgs1 also in der Lage, mitotische Rekombinationsereignisse zu unterdrücken (MYUNG *et al.*, 2001). Im Einklang mit einer Beteiligung von Sgs1 an rekombinativen Prozessen steht die physikalische Interaktion von Sgs1 mit Rad51 (WU *et al.*, 2001).

Rekombinantes Sgs1 bindet bevorzugt an doppelsträngige Substrate mit einem einzelsträngigen 3'-Überhang und entwindet dies, während ein gleiches Substrat mit einem 5'-Überhang nicht gebunden wird. Interessanterweise wird auch ein RNA-DNA-Hybrid gebunden und entwunden, sofern der einzelsträngige 3'-Überhang ein DNA-Strang ist. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß durch Sgs1 auch *Holliday junctions* gebunden und entwunden werden (BENNETT *et al.*, 1999).

Neben den Hinweisen für eine direkte Rolle von Sgs1 im DNA-Metabolismus gibt es auch Hinweise auf eine Beteiligung am S-Phasen-*checkpoint*. Nach Behandlung mit MMS zeigen *sgs1*-Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp keine Verlängerung der S-Phase. Dies deutet darauf hin, daß Sgs1 im Falle von vermehrt auftretenden Schäden während der S-Phase den *checkpoint* anschaltet bzw. an diesem Prozeß beteiligt ist. Eine Beteiligung am G₁- bzw. am G₂-*checkpoint* ließ sich hingegen nicht nachweisen.

Bezüglich der Sensitivität gegenüber Hydroxyharnstoff ist *POL2* (Pol ε) epistatisch zu *SGS1* (FREI & GASSER, 2000). Durch Hydroxyharnstoff wird die Ribonukleotiddiphos-

phatreduktase gehemmt, so daß die Desoxyribonukleotide aus Ribonukleotidvorläufern nicht mehr gebildet werden können (FRIEDBERG *et al.*, 1995) und die Replikation aufgrund fehlender Nukleotide arretiert. Da bereits für Pol 2 eine Beteiligung am S-Phasen-*checkpoint* gezeigt werden konnte, indem es zu einer Aktivierung von Rad53 führt (NAVAS *et al.*, 1996), liegt die Vermutung nahe, daß Sgs1 ebenfalls an dieser Signalgebung beteiligt ist. Diese Hypothese wurde durch die Befunde unterstützt, daß in *sgs1 rad24*-Doppelmutanten fast keine Phosphorylierung von Rad53 nachgewiesen werden kann, während sich in den jeweiligen Einzelmutanten eine Phosphorylierung nachweisen läßt. Zusätzlich konnte eine Colokalisation von Sgs1 und Rad53 in Replikationsfoci gezeigt werden (FREI & GASSER, 2000). Die Gesamtheit der Befunde legen der Vermutung nahe, daß Sgs1 insbesondere während der S-Phase mehrere Funktionen zukommen.

Im humanen Zellen gehören mindestens fünf Proteine zur Familie der RecQ-Helikasen. Das Fehlen von drei dieser Proteine führt zu schweren Erbkrankheiten: Mutationen in den Genen *BLM* und *WRN* führen zu den Erkrankungen Bloom- und Werner-Syndrom; in Patienten mit dem Rothmund-Thomson-Syndrom ist das *RECQL4*-Gen mutiert (COBB *et al.*, 2002).

Wie bereits für Sgs1 und Rad51 aus *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen wurde, interagieren auch das humane Blm- sowie das humane Rad51-Protein. Durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen konnte gezeigt werden, daß es insbesondere nach Bestrahlung der Zellen mit γ -Strahlung zu einer Kolokalisation von Blm und hRad51 im Zellkern von humanen Fibroblasten kommt (WU *et al.*, 2001).

Sowohl für das Blm- als auch das Wrn-Protein konnte gezeigt werden, daß sie *in vitro* in der Lage sind, synthetische *Holliday junctions* aufzulösen sowie *branch migration* über eine Distanz von mehreren Kilobasen zu katalysieren (KAROW *et al.*, 2000; MOHAGHEGH *et al.*, 2001). Interessant ist hierbei, daß durch Blm, ähnlich wie im Falle von Sgs1, einzelsträngige DNA entsteht, während durch Wrn sogenannte *2 way junctions* entstehen (MOHAGHEGH *et al.*, 2001; BENNETT *et al.*, 1999).

Aufgrund dieser Befunde wurde für das Blm-Protein die Hypothese entwickelt, daß es an der Entfernung von *Holliday junctions* durch *branch migration* vor der Auflösung durch Resolvasen beteiligt ist. In Abwesenheit von Blm besäßen die auftretenden *Holliday junctions* eine längere Halbwertszeit, was zu häufigeren Schnitten durch Resolvasen führen sollte. Die dabei entstehenden doppelsträngigen DNA-Enden stellen dann ein Substrat für die homologe Rekombination dar. Durch die Entfernung der *Holliday junctions* werden diese Substrate und somit gleichzeitig die Zahl der Rekombinationsereignisse verringert (KAROW *et al.*, 2000).

Mit Hilfe von Mutationsraten konnte gezeigt werden, daß der Mutatorphänotyp der *mph1*-Deletionsmutante durch die zusätzliche Deletion von *SGS1* supprimiert wird (SCHÜRER *et al.*, unveröffentlicht). Es soll versucht werden, mit Hilfe des KanKanMX4-Versuchssystem diese genetische Interaktion näher zu untersuchen.

Die sgs1-Deletionsmutante zeigt eine erhöhte spontane Reversionsrate

Wie bereits erwähnt, ist Sgs1 aus *Saccharomyces cerevisiae* in der Lage, synthetische *Holliday junctions* aufzulösen (BENNETT *et al.*, 1999). Für *mph1*-Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, daß sowohl die Reversionsfrequenzen nach Mutagenbehandlung als auch die spontane Reversionsrate erniedrigt ist. Dieser Befund kann dergestalt gedeutet werden, daß Mph1 z.B. an der Bildung von *Holliday junctions* beteiligt ist. In *mph1*-Deletionsmutanten wäre die verringerte Bildung von *Holliday junctions* die Folge, welche zu einer verstärkten Prozessierung der auslösenden Läsion mit Hilfe der Translasyonssynthese führt. Auf diese Weise ließe sich die erhöhte Mutationsrate sowie die erniedrigte Reversionsrate erklären.

Wird nun zusätzlich *SGS1* deletiert, so können auftretende *Holliday junctions* nicht mehr aufgelöst werden. Dies sollte zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit führen, daß die *Holliday junctions* durch Resolvasen geschnitten werden. In Doppelmutanten würden durch das fehlende Mph1 weniger *Holliday junctions* gebildet, diese aber auch nicht mehr durch Sgs1 aufgelöst, womit sich die verringerte Mutationsrate der Doppelmutante im Vergleich zur *mph1*-Einzelmutante erklären ließe.

Ausgehend von dieser Hypothese sollte man erwarten, daß in *sgs1*-Einzelmutanten durch die erhöhte Stabilität der *Holliday junctions* verstärkt eine Auflösung durch Resolvasen erfolgt, wodurch doppelsträngige DNA-Enden entstehen. Diese vermehrt auftretenden DNA-Enden sollten zu einer Erhöhung der spontanen Reversionsrate des KanKanMX4-Konstruktes führen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die spontane Reversionsrate des KanKanMX4-Moduls in *sgs1*- sowie *sgs1 mph1*-Deletionsmutanten gemäß der Medianmethode bestimmt (LEA & COULSON, 1948). Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Tabelle 9: Spontane Reversionsraten der Stämme CEN.PK 2-1C, CEN.PK 2-1C *sgs1* und CEN.PK 2-1C *sgs1 mph1*, ermittelt mit dem KanKanMX4-Konstrukt gemäß der Medianmethode (Lea und Coulson, 1948).

	Spontane Reversionsrate	Faktor
CEN.PK 2-1C	$9,96 \cdot 10^{-5} \pm 0,6 \cdot 10^{-5}$	1
CEN.PK 2-1C <i>sgs1</i>	$3,28 \cdot 10^{-4} \pm 0,3 \cdot 10^{-4}$	3,83
CEN.PK 2-1C <i>sgs1 mph1</i>	$1,79 \cdot 10^{-4} \pm 0,1 \cdot 10^{-4}$	1,79

Die spontane Reversionsrate ist in *sgs1*-Deletionsmutanten signifikant gegenüber der Reversionsrate des Wildtyps erhöht. Nimmt man an, daß für diese Erhöhung rekombinative Prozesse verantwortlich sind, so ist die beobachtete Erhöhung im Einklang mit den Befunden, daß sich in *sgs1*-Deletionsmutanten ein Hyperrekombinationsphänotyp nachweisen läßt (GANGLOFF *et al.*, 1994; MYUNG *et al.*, 2001; SHOR *et al.*, 2002). Diese Befunde unterstützen die Hypothese, daß in *sgs1*-Deletionsmutanten *Holliday junctions* stabilisiert sind und damit vermehrt durch Resolvasen geschnitten werden.

Die Reversionsrate der *sgs1 mph1*-Doppelmutante liegt zwischen den Reversionsraten des Wildtyps und der *sgs1*-Einzelmutante. Eine solche Absenkung würde man erwarten,

wenn Mph1 z.B. an der Bildung von *Holliday junctions* beteiligt wäre. In der *sgs1*-Einzelmutante würden diese durch Mph1 gebildet, aber nicht aufgelöst, so daß vermehrt doppelsträngige DNA-Enden entstehen. Wird nun *MPH1* deletiert, werden deutlich weniger *Holliday junctions* gebildet. Die z.B. spontan auftretenden *junctions* müssen allerdings nach wie vor mittels eines rekombinativen Weges aufgelöst werden, so daß die Reversionsrate über das Niveau der *mph1*-Einzelmutante erhöht ist.

Die gemessenen Daten stehen also nicht im Widerspruch zu der aufgestellten Hypothese, daß Mph1 und Sgs1 Gegenspieler bei der Bildung bzw. Auflösung von *Holliday junctions* sein könnten.

Die Reversionsfrequenz des KanKanMX4-Moduls ist in sgs1-Deletionsmutanten nach Behandlung mit 4-NQO erniedrigt

Geht man von der Hypothese aus, daß Sgs1 Rekombinationsereignisse unterdrückt, indem es gebildete *Holliday junctions* auflöst, dann sollten in einer *sgs1*-Deletionsmutante aufgrund von DNA-Läsionen vermehrt Rekombinationsereignisse auftreten. Nach dieser Hypothese sollte man also erwarten, daß die Reversionsfrequenz des KanKanMX4-Moduls nach Behandlung mit 4-NQO über das Niveau des Wildtyps erhöht ist.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die Reversionsfrequenzen des KanKanXM4-Moduls in *sgs1*- sowie *sgs1 mph1*-Deletionsmutanten nach Behandlung mit 4-NQO gemessen. Die experimentelle Durchführung erfolgte wie beschrieben (siehe Seite 67).

Aus Abb. 19 geht klar hervor, daß die Reversionsfrequenzen der *sgs1*-Einzelmutante im Vergleich zu den Reversionsfrequenzen des Wildtyps deutlich erniedrigt sind. Geht man (wie bereits erwähnt) davon aus, daß die gemessenen Reversionen auf Rekombinationsereignisse zurückgehen, dann ist offenbar die Rekombinationsfrequenz nach Induktion von DNA-Läsionen signifikant erniedrigt. Dieser Befund steht eindeutig im Widerspruch zu der aufgestellten Hypothese, daß es bei Abwesenheit von Sgs1 zu einer Stabilisierung von *Holliday junctions* und damit vermehrt zu ihrer rekombinativen Auflösung kommt.

Es wurde bereits ausgeführt, daß Mph1 an einer fehlerfreien Umgehung von arretierenden Läsionen durch die Bildung einer *Holliday junction* mit anschließendem *polymerase strand switch* beteiligt sein könnte (siehe Seite 73). In Abwesenheit von Mph1 würde dann verstärkt eine fehlerhaftes Überlesen durch die Transläsionssynthese zum Zweck der Reinitiation der Replikation erfolgen.

Unter diesem Gesichtspunkt sollte man erwarten, daß eine weitere Erniedrigung der Reversionsfrequenz zu einer weiteren Erniedrigung der Mutationsrate führt. Dies ist jedoch nicht der Fall. Ein möglicher Schluß aus diesem Befund ist die Annahme, daß es keine direkte Korrelation zwischen der Mutationsrate und der Reversionsrate bzw. den Reversionsfrequenzen gibt, oder daß eine mögliche Korrelation durch eine Reihe unterschiedlicher Faktoren beeinflusst werden kann.

Bemerkenswert ist, daß die Erniedrigung der Frequenz von Rekombinationsereignissen auch in anderen experimentellen Systemen bestätigt wurde. Es wurde bereits

darauf hingewiesen, daß für *sgs1*-Deletionsmutanten erhöhte Rekombinationsraten bestimmt wurden (GANGLOFF *et al.*, 1994; MYUNG *et al.*, 2001; SHOR *et al.*, 2002) und daß diese Erhöhung auch für die spontane Reversionsrate des KanKanMX4-Moduls gilt (siehe Seite 97). Nach Behandlung mit UV (GANGLOFF *et al.*, 2000) und MMS (ONODA *et al.*, 2001) hingegen ist in *sgs1*-Deletionsmutanten die heterolallelische Reversionsfrequenz erniedrigt, wobei dieser Befund den oben gezeigten Daten entspricht, daß die Reversionsfrequenzen nach Behandlung mit 4-NQO erniedrigt sind. Es muß deutlich darauf hingewiesen werden, daß sich heteroallelische Rekombinationsraten bzw. Reversionsfrequenzen nicht zwingend mit den hier gemessenen Reversionsraten und Reversionsfrequenzen vergleichen lassen, da sich die Mechanismen durchaus unterscheiden können. Trotzdem ist die Übereinstimmung dieser Daten bemerkenswert.

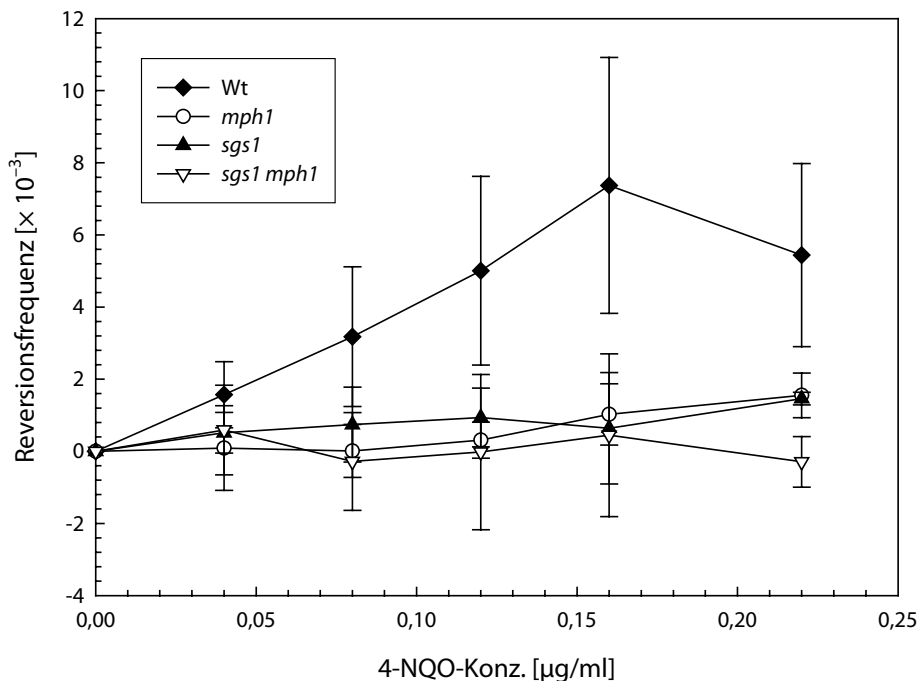


Abb. 19: Beeinflussung der Reversionsfrequenz des KanKanMX4-Moduls in den Stämmen CEN.PK 2-1C *sgs1* und CEN.PK 2-1C *sgs1 mph1* nach Behandlung mit 4-Nitrochinolin-1-oxid. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml $^{-1}$ mit α -mating factor in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium resuspendiert, welches die angegebenen Konzentrationen 4-Nitrochinolin-1-oxid enthielt und für die Dauer eines Zellzyklus bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und Verdünnungen auf Vollmedium zur Bestimmung der Lebendzellzahl sowie auf Medium mit G418 zur Bestimmung der Reversionsfrequenz plattiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Datensätzen. Die Daten von Wildtyp und *mph1*-Deletionsmutante wurden Abb. 8 entnommen.

Diese Daten unterstützen die Hypothese von FABRE *et al.*, nach welcher es sich bei Sgs1 um ein multifunktionelles Enzym handelt, welches sowohl eine positive als auch eine negative Rolle in rekombinativen Prozessen spielt (FABRE *et al.*, 2002).

Die Reversionsfrequenz des KanKanMX4-Moduls ist in sgs1-Deletionsmutanten nach Behandlung mit Camptothecin erhöht.

Auffallend bei den durchgeführten Experimenten ist, daß die Messungen der Rekombinations- bzw. Reversionsfrequenzen in allen Fällen entweder gänzlich ohne oder aber mit genotoxischen Agenzien durchgeführt wurden, von welchen angenommen wird, daß sie zum größten Teil Basenmodifikationen auslösen. Aus diesem Grund soll untersucht werden, in welcher Weise sich die Reversionsfrequenz nach Behandlung mit Camptothecin verändert (für näheres über die durch Camptothecin ausgelösten Läsionen siehe Seite 68). Auf diese Weise kann der Einfluß eine SGS1-Deletion auf die Prozessierung großer DNA-Protein-Komplexe sowie Einzelstrangbrüche, welche im Zuge der Replikation in Doppelstrangbrüche überführt werden, untersucht werden.

Die Experimente zur Bestimmung der Reversionsfrequenzen nach Behandlung mit Camptothecin wurden wie beschrieben durchgeführt (siehe Seite 68).

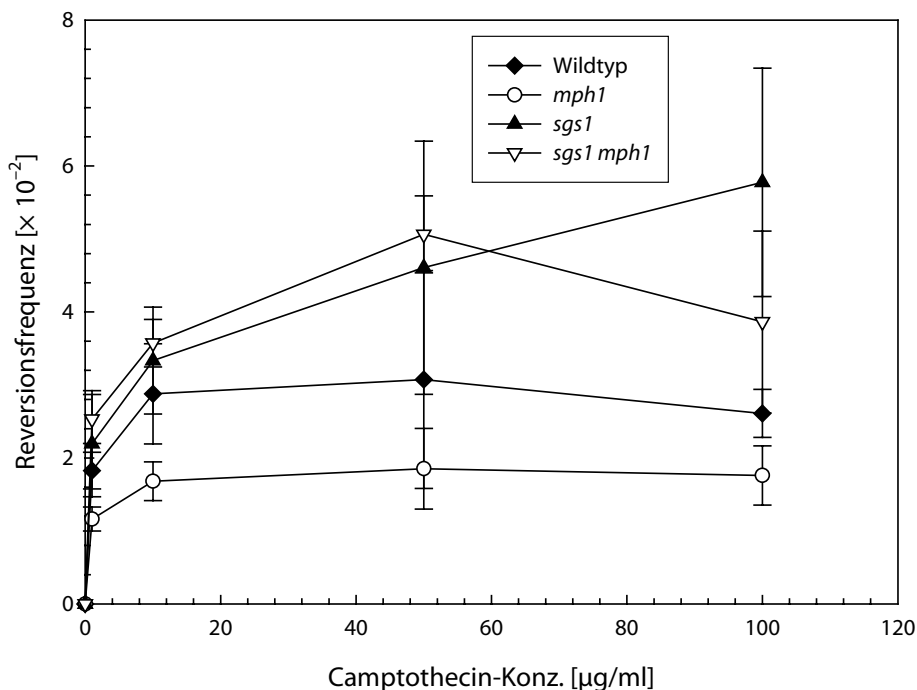


Abb. 20: Beeinflussung der Reversionsfrequenz des KanKanMX4-Moduls in den Stämmen CEN.PK 2-1C *sgs1* und CEN.PK 2-1C *sgs1 mph1* nach Behandlung mit Camptothecin. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml $^{-1}$ mit α -mating factor in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium resuspendiert, welches die angegebenen Konzentrationen Camptothecin enthielt und für die Dauer eines Zellzyklus bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und Verdünnungen auf Vollmedium zur Bestimmung der Lebendzellzahl sowie auf Medium mit G418 zur Bestimmung der Reversionsfrequenz plattiert. Gezeigt sind die Mittelwerte dreier Datensätze. Die Daten von Wildtyp und *mph1*-Deletionsmutante wurden Abb. 9 entnommen.

Im Gegensatz zur Veränderung der Reversionsfrequenzen nach Behandlung mit 4-NQO zeigt die *sgs1*-Deletionsmutante nach Behandlung mit Camptothecin im Vergleich zum Wildtyp deutliche erhöhte Reversionsfrequenzen, wie sich Abb. 20 entnehmen läßt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß es im Gegensatz zur Behandlung mit 4-NQO durch Sgs1 zu einer Unterdrückung rekombinativer Ereignisse im Falle von Einzelstrangbrüchen und Arresten an DNA-Proteinkomplexen kommt. Fehlt Sgs1, so erfolgt die Reinitiation an derartigen Läsionen vermehrt durch rekombinative Mechanismen.

Interessanterweise könnte dieser Befund auch eine Erklärung für die Unterschiede zwischen der Reversions- bzw. Rekombinationsrate in unbehandelten sowie mutagen-behandelten Kulturen sein. Geht man davon aus, daß es im normalen Zellmetabolismus hauptsächlich zu Arresten an DNA-Protein-Komplexen bzw. Sekundärstrukturen oder an Einzelstrangbrüchen kommt, welche z.B. durch Inzisionen im Zuge der Basenexcisions-reparatur entstehen, dann wäre es durchaus denkbar, daß die Reversionsrate in unbehandelten Zellen erhöht ist. Bei Behandlung mit Agenzien, welche zu kleinen DNA-Läsionen und somit vermehrt zu einem Arrest der replikativen Polymerasen führen, überwiegt dann hingegen die fehlende stimulierende Funktion, so daß hier die primär auftretenden kleinen DNA-Läsionen zu keiner weiteren Erhöhung der Reversions- bzw. Rekombinationsfrequenzen führen.

Interessant ist weiterhin, daß auch die Reversionsfrequenzen der *sgs1 mph1*-Doppelmutante deutlich über den Frequenzen des Wildtyps liegen, wobei die Frequenzen, mit Ausnahme des letzten Datenpunktes, nahezu gleich sind. Über weite Konzentrationsbereiche kann also angenommen werden, daß die An- bzw. Abwesenheit von *MPH1* keinen Einfluß auf die durch das Fehlen von Sgs1 ausgelösten Reversionsereignisse hat.

Dieser Befund paßt einerseits zu der Hypothese, daß Mph1 hauptsächlich an der Prozessierung kleinerer DNA-Läsionen beteiligt sein könnte, welche zu einem Arrest der replikativen Polymerasen führen und welche bei Behandlung mit Camptothecin nur eine untergeordnete Rolle spielen sollten. Andererseits ist in der *mph1*-Einzelmutante eine Verringerung der Reversionsfrequenzen gegenüber dem Wildtyp zu beobachten, welche sich bei der *sgs1 mph1*-Doppelmutante gegenüber der *sgs1*-Einzelmutante wenn überhaupt nur bei der höchsten Camptothecin-Konzentration zeigen läßt. Es erscheint zunächst also eher wahrscheinlich, daß die An- oder Abwesenheit von Mph1 in *sgs1*-Deletionsmutanten kaum noch einen Effekt hat. Hierbei stellt sich natürlich die Frage, ob die Suppression des Mutatorphänotyps der *mph1*-Deletionsmutanten durch die zusätzliche Deletion von *SGS1* auf einen ähnlichen Mechanismus zurückgeht, ob also in *sgs1*-Mutanten ein Weg ausgeschaltet wird, auf den die An- bzw. Abwesenheit von Mph1 keinen Einfluß mehr hat.

Die Mutationsfrequenzen sind in sgs1-Mutanten deutlich erhöht

Auffällig am Phänotyp der *sgs1*-Deletionsmutante ist, daß bei Behandlung der Zellen mit 4-NQO die Reversionsfrequenzen erniedrigt sind. Zusätzlich deuten die Mutationsraten darauf hin, daß in Abwesenheit von Sgs1 keine fehlerbehaftete Transläsionssynthese statt-

findet, während die Daten von FREI & GASSER belegen, daß bei Behandlung mit MMS die S-Phase nicht verlängert ist, sondern erst ein Arrest am G₂/M-Übergang erfolgt (FREI & GASSER, 2000). Wenn aber sowohl weniger rekombinative Mechanismen als auch weniger Transläsionssynthese in geschädigten Zellen auftritt, stellt sich die Frage, wie die Zellen die S-Phase durchlaufen können bzw. welche Mechanismen für die Umgehung der ganz offensichtlich auftretenden Läsionen genutzt werden können.

Um auszuschließen, daß, wie im Falle spontan auftretender Läsionen, auch bei Behandlung der Zellen mit Mutagenen in Abwesenheit von Sgs1 keine fehlerbehaftete Transläsionssynthese erfolgt, wurden die Mutationsfrequenzen von *sgs1*- sowie *sgs1 mph1*-Mutanten nach Behandlung mit 4-NQO bestimmt. Die Durchführung der Experimente erfolgte wie beschrieben (siehe Seite 67).

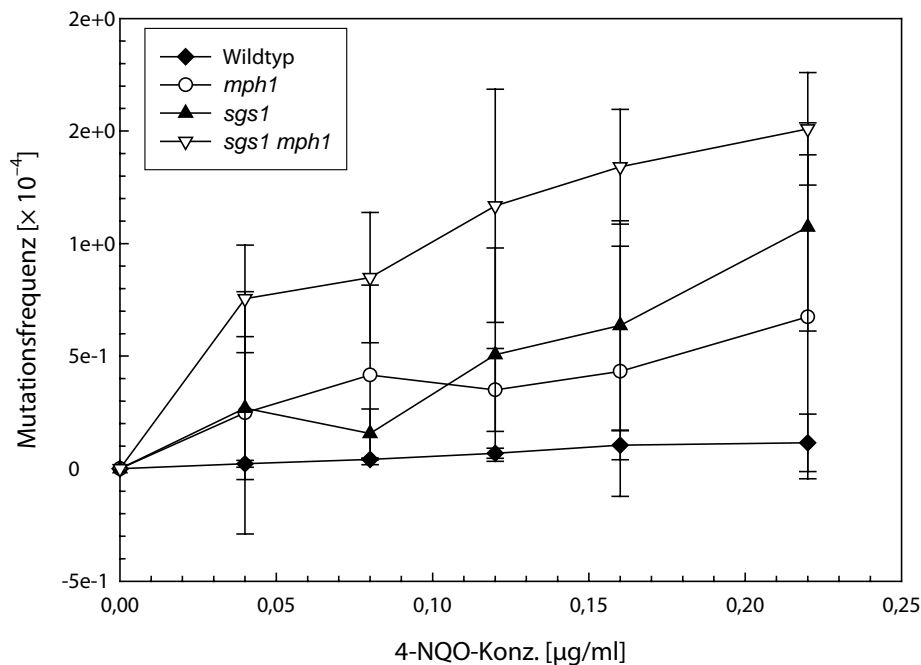


Abb. 21: Beeinflussung der Mutationsfrequenz durch Behandlung der Stämme CEN.PK 2-1C *sgs1* sowie CEN.PK 2-1C *sgs1 mph1* mit 4-Nitrochinolin-1-oxid. Die Stämme wurden bei Erreichen einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml⁻¹ mit α -mating factor in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium mit den angegebenen Konzentrationen 4-Nitrochinolin-1-oxid resuspendiert und für die Dauer eines Zellzyklus bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und Verdünnungen auf SD^{-Arg}-Selektivmedium zur Bestimmung der Lebendzellzahl sowie auf Medium mit Canavanin zur Bestimmung der Mutationsfrequenz plattiert. Gezeigt sind Datensätze aus drei Experimenten. Die Daten für Wildtyp und *mph1*-Deletionsmutante wurden Abb. 3 entnommen.

Bemerkenswerterweise stehen die in Abb. 21 gezeigten Ergebnisse im scharfen Kontrast zu den Daten der Mutationsrate. Ganz offensichtlich wird bei Behandlung der Zellen mit 4-NQO in *sgs1*-Mutanten vermehrt die Transläsionssynthese während der Replikation

eingesetzt. Es ist leicht vorstellbar, daß dies schneller erfolgt als alternative, fehlerfreie Reparaturmechanismen, so daß sich auch der Befund einer im Vergleich zum Wildtyp schneller ablaufenden S-Phase nach Mutagenbehandlung einordnen läßt (FREI & GASSER, 2000).

Bei spontan im Organismus auftretenden Läsionen wird aber zumindest bei Abwesenheit von Mph1 durch Sgs1 gerade die Transläsionssynthese ermöglicht, da *sgs1 mph1*-Doppelmutanten keinen Mutatorphänotyp mehr zeigen. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund wäre, daß Sgs1 u.a. eine regulatorische Funktion zukommt, welche dafür sorgt, daß bei kleinen Schadensdichten, die für spontan auftretende Schäden angenommen werden können, die Transläsionssynthese aktiviert wird. Bei hohen Schadensdichten würde hingegen die Transläsionssynthese unterdrückt werden, um z.B. die Zahl der auftretenden Mutationen in Grenzen zu halten. Bei Ausfall von Sgs1 würde dann die Aktivierung, aber auch die Repression wegfallen, so daß unter Normalbedingungen weniger Transläsionssynthese erfolgt, während sie bei höheren Schadensdichten nicht mehr inaktiviert wird.

Diese hypothetische Funktion von Sgs1 läßt sich auch ohne größere Probleme mit einer von FREI & GASSER postulierten Rolle im Zellzyklus verbinden, da die Rekrutierung von zur Transläsionssynthese alternativer Mechanismen offensichtlich mehr Zeit benötigt, so daß der S-Phase-*checkpoint* aktiviert werden muß.

Untersuchungen zur Reversion des KanKanMX4-Moduls in *srs2*-Deletionsmutanten

Die Deletion des *SRS2*-Gens von *Saccharomyces cerevisiae* führt zu einer Vielzahl unterschiedlicher Effekte. Zusätzlich wurden eine größere Zahl genetischer Interaktionen von *srs2* u.a. mit Proteinen der homologen Rekombination, der Replikation und der postreplikativen Reparatur beschrieben. *In vitro* wurden bisher zwei biochemische Funktionen des Srs2-Proteins gezeigt: es besitzt eine 3'→5'-Helikaseaktivität und es ist in der Lage, Rad51-Filamente aufzulösen. Insbesondere durch die letztgenannte Aktivität lassen sich einige der im folgenden beschriebenen Phänotypen erklären. Allerdings reichen die Befunde nicht aus, um den Großteil der beobachteten Effekte sowie die beobachteten Interaktionen mit anderen Genen zu erklären.

Srs2 aus *Saccharomyces cerevisiae* gehört wie Sgs1 zu den DNA-Helikasen. Biochemische Experimente haben gezeigt, daß Srs2 in Anwesenheit von Mg²⁺ und ATP bzw. dATP eine Helikaseaktivität besitzt. Die Polarität dieser Aktivität ist, bezogen auf den durch das Enzym gebundenen Strang, von 3' nach 5' (RONG und KLEIN, 1993). Substrat ist eine DNA mit einem einzelsträngigen 3'-Überhang. Substrate mit 5'-Überhängen oder doppelsträngigen DNA-Enden werden offenbar nicht entwunden (VEAUTE *et al.*, 2003).

Während Sgs1 in die Familie der RecQ-Helikasen eingeordnet wird, besitzen die Helikase-Motive von Srs2 Ähnlichkeit mit den bakteriellen Helikasen UvrD und Rep (ABOUSSEKHRA *et al.*, 1989). Im Gegensatz zu Sgs1 wurden bisher allerdings keine orthologen Proteine in Säugern gefunden (GANGLOFF *et al.*, 2000; FABRE *et al.*, 2002).

Wie in *sgs1*-Deletionsmutanten läßt sich auch in *srs2*-Deletionsmutanten sowohl in *Saccharomyces cerevisiae* (RONG *et al.*, 1991) als auch in *Schizosaccharomyces pombe* ein Hyperrekombinations-Phänotyp nachweisen (WANG *et al.*, 2001). Mit Hilfe von UV-Sensitivitäten konnte nachgewiesen werden, daß die zusätzliche Deletion von *SRS2* die Sensitivitäten von *rad6*- (LAWRENCE & CHRISTENSEN, 1979) *rad5*-, *ubc13*- und *mms2*-Deletionsmutanten zu supprimieren vermag, während sich mit *rad30*-Deletionsmutanten keine epistatische Interaktion nachweisen läßt. Diese Daten haben zur Hypothese geführt, daß *Srs2* im fehlerfreien Ast der postreplikativen Reparatur beteiligt ist (ULRICH, 2001).

Bei Kreuzungen von *sgs1*- mit *srs2*-Mutanten zeigen die Doppelmutanten nach Sporulation und Dissektion der Tetraden entweder eine synthetische Letalität (LEE *et al.*, 1999) oder ein im Vergleich zum Wildtyp deutlich verlangsamtes Wachstum (GANGLOFF *et al.*, 2000; McVEY *et al.*, 2001). Die langsam wachsenden Doppelmutanten haben eine stark verkürzte Lebenszeit. Mutationen in Genen, welche für essentielle Proteine des NHEJ (*nonhomologous end-joining*) codieren, führen zu keiner signifikanten Veränderung des Phänotyps der *sgs1 srs2*-Doppelmutante, (McVEY *et al.*, 2001).

Die synthetische Letalität der Doppelmutante konnte aber durch die zusätzliche Deletion von *Rad 51, 55 und 57* supprimiert werden (GANGLOFF *et al.*, 2000; KLEIN, 2001). Gleiches gilt auch für eine *srs2 top3*-Doppelmutante (KLEIN, 2001).

Diese Befunde zeigen Ähnlichkeit mit den Phänotypen einer *sgs1 mms4*-Doppelmutante, die ebenfalls synthetisch letal ist, aber durch die zusätzliche Deletion der Gene *RAD51, 52, 54, 55 und 57* gerettet werden kann, welche alle an Rekombinationsmechanismen beteiligt sind (siehe Seite 87 sowie 94). *Rad51* ist hierbei das zu *E. coli*-*RecA* homologe Protein, während *Rad52* doppelsträngige DNA-Enden bindet und an der Bildung des *Rad51*-DNA-Filamentes beteiligt ist. *Rad55* & *Rad57* bilden ein Dimer und sind vermutlich ebenfalls an der Ausbildung des *Rad51*-Filamentes beteiligt, besitzen aber auch, wie *RecA*, eine eigene Strangaustauschaktivität (FRIEDBERG *et al.*, 1995; SUGAWARA *et al.*, 2003). Für *Rad54* wird angenommen, daß es an der Auflösung des *Rad51*-Filamentes beteiligt ist. Es gibt aber auch Evidenzen, daß durch *Rad54* die replikative Verlängerung eines eingeführten 3'-Endes ermöglicht wird (SUGAWARA *et al.*, 2003).

Für *Rad27* wird angenommen, daß es an der Reifung der Okazaki-Fragmente beteiligt ist, da es 5'-*flap*-Strukturen schneidet (KAO *et al.*, 2002). *rad27*-Deletionsmutanten sind in Kombination mit Deletionen von Genen letal, welche in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt sind (DEBRAUWÈRE *et al.*, 2001). Es ist bemerkenswert, daß auch eine *srs2 rad27*-Doppelmutante nicht lebensfähig ist. Durch die zusätzliche Deletion von *RAD51* konnte die Letalität nicht supprimiert werden, wobei dies allerdings vermutlich auf die synthetische Letalität von *rad27 rad51*-Deletionsmutanten zurückzuführen ist (KLEIN, 2001).

Interessanterweise ist auch eine *srs2 rad54*-Doppelmutante synthetisch letal, wobei auch dieser Phänotyp durch die zusätzliche Deletion von *RAD51, 52, 55 und 57* wieder aufgehoben werden kann (KLEIN, 2001).

In *Schizosaccharomyces pombe* konnte gezeigt werden, daß *srs2⁻ rqh1⁻*-Deletionsmutanten extrem langsam wachsen und vermehrt am G₂-M-Übergang arretieren, was für eine Verlängerung des Zellzyklus durch den G₂/M-*checkpoint* spricht. Diese Hypothese konnte durch die zusätzliche Deletion des *checkpoint*-Gens *spRAD9* bestätigt werden, da durch diese Deletion das langsame Wachstum der Doppelmutante supprimiert wird (MAFTAH *et al.*, 2002). Die *srs2⁻ rqh1⁻*-Doppelmutante zeigte allerdings nach Behandlung mit UV und Hydroxyharnstoff eine höhere Überlebensrate als eine *rqh1⁻*-Einzelmutante. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, daß die synthetische Letalität bzw. der Wachstumsdefekt nicht darauf zurückzuführen ist, daß arretierte Replikationsgabeln schlechter prozessiert werden können, sondern daß ein Substrat gebildet wird, welches zur Aktivierung des G₂/M-*checkpoints* führt (MAFTAH *et al.*, 2002).

Neuere biochemische Daten zeigen, daß Srs2 offenbar in der Lage ist, Nukleoproteinfilamente mit Proteinen der RecA/Rad51-Klasse aufzulösen (VEAUTE *et al.*, 2003; KREJCI *et al.*, 2003). Diese Aktivität ist möglicherweise auf die Translokation von Srs2 auf einzelsträngiger DNA zurückzuführen. Diese Hypothese wurde durch die Befunde unterstützt, daß durch Srs2 keine Rad51-Proteinfilamente mit doppelsträngiger DNA aufgelöst werden (VEAUTE *et al.*, 2003).

Neben der Möglichkeit, daß durch Srs2 Rad51-Nukleoproteinfilamente aufgelöst werden, konnte biochemisch gezeigt werden, daß auch die Rad51/Rad54-abhängige Ausbildung von *D-loops* durch Srs2 verringert werden kann. Hingegen ist Srs2 nicht in der Lage, ausgebildete *D-loops* wieder aufzulösen (KREJCI *et al.*, 2003).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß Srs2 sowohl mit an eine Säulenmatrix gekoppelten Rad51-Protein interagiert, als auch *in vivo* in einem *two-hybrid-assay* Interaktion mit Rad51 zeigt (KREJCI *et al.*, 2003). Dieser Befund ist u.a. deshalb interessant, weil eine Reihe von Phänotypen der *srs2*-Deletionsmutante durch die zusätzliche Deletion von *RAD51* supprimiert werden (FABRE *et al.*, 2002; KLEIN, 2001).

Durch LIBERI *et al.* wurde nachgewiesen, daß Srs2 nach Behandlung von Zellen mit Mutagenen phosphoryliert wird. Hierbei wurde nach Behandlung mit 4-NQO nur dann eine Phosphorylierung nachgewiesen, wenn die Zellen bereits mit der S-Phase begonnen hatten. Wurden die Zellen hingegen auch nach der Behandlung mit 4-NQO durch α *mating factor* arretiert, ließ sich zwar eine Phosphorylierung von Rad53, nicht aber von Srs2 nachweisen. Diese Phosphorylierung ließ sich u.a. nach Deletion von *RAD52*, *RAD30* und *SGS1* noch immer nachweisen, während die Deletion der *checkpoint*-Gene *MEC1*, *RAD53* und *DUN1* zu einer starken Abnahme führten. Dies deutet darauf hin, daß für die Phosphorylierung von Srs2 ein funktionsfähiger *checkpoint* notwendig ist. Sowohl die Befunde, daß es in G₁-Zellen nach 4-NQO-Behandlung zu einer Phosphorylierung von Rad53, nicht aber Srs2 kommt, sowie jene, wonach in Δ *dun1*-Zellen die Phosphorylierung von Srs2 gestört ist, wobei Dun1 stromabwärts von Rad53 eingeordnet wird, deuten darauf hin, daß Srs2 kein direktes Substrat für Rad53 ist (LIBERI *et al.*, 2000).

Interessanter Weise zeigt sich in *srs2*-Mutanten eine deutliche Diskrepanz zwischen der Überlebensfähigkeit nach Induktion eines Doppelstrangbruches, ausgelöst durch die

HO-Endonuklease, und der Reparatur dieses Doppelstrangbruches. Durch VAZE *et al.* konnte gezeigt werden, daß in *srs2*-Mutanten die Reparatur eines Doppelstrangbruches offenbar möglich ist. Auch Einzelstrangbrüche der DNA wurden nach der Reparatur nicht mehr nachgewiesen. Trotzdem liegt die Überlebensfähigkeit der Zellen unter 2%. Die nähere Untersuchung dieses Effektes zeigte, daß die Zellen offenbar permanent am G₂/M-Übergang arretieren. In Mutanten, in welchen die *checkpoint*-Antwort gestört ist, oder in welchen die *checkpoint*-Antwort durch die Behandlung mit Koffein unterbunden wurde, überlebten signifikant mehr Zellen nach Induktion des Schnittes durch die HO-Endonuklease (VAZE *et al.*, 2002).

Diese Funktion zur Inaktivierung des *checkpoint*-Signals konnte ebenfalls für das *single strand annealing* sowie die interchromosomale Genkonversion gezeigt werden, wobei auch bezüglich des letzten Vorgangs Hinweise dafür vorliegen, daß der Reparaturprozeß als solcher abgeschlossen wird, der *checkpoint* aber dennoch aktiviert bleibt (VAZE *et al.*, 2002).

rad5- und *rad18*-Deletionsmutanten zeigen in Bezug auf interchromosomale Genkonversion nach Behandlung mit UV einen Hyperrekombinationsphänotyp. Hingegen zeigen *srs2*-Deletionsmutanten eine Erniedrigung der ektopischen Rekombinationsfrequenzen sowie der Rate an Schwesterchromatidaustauschen (SCEs). Zusätzlich wird der Hyperrekombinationsphänotyp, der sich in *rad5*- sowie *rad18*-Deletionsmutanten nachweisen läßt, in *rad5 srs2*- bzw. *rad18 srs2*-Deletionsmutanten supprimiert (FRIEDL *et al.*, 2001).

Durch Überexpression von SRS2 sowie SGS1 in *srs2*- sowie *sgs1*-Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, daß Sgs1 in der Lage ist, die Sensitivität der *srs2*-Deletionsmutante gegenüber MMS und Hydroxyharnstoff bei Überexpression zu supprimieren. Andersherum ist die Suppression des *sgs1*-Phänotyps durch die Überexpression von Srs2 nicht möglich. Diese Befunde deuten darauf hin, daß es eine funktionelle Überlappung beider Proteine gibt, bei welcher ein Teil der Funktion, welche zur MMS-Sensitivität führt, durch Überexpression von Sgs1 abgefangen werden kann, während dies nicht für die Überexpression von Srs2 bei Abwesenheit von Sgs1 gilt. Allerdings entsprach die Lebensspanne von *srs2*-Deletionsmutanten, in welchen SGS1 überexprimiert wurde, etwa der Lebensspanne von *srs2*-Deletionsmutanten. Die vermehrte Anwesenheit von Sgs1 führt also nicht zu einer Verlängerung der verkürzten Lebensspanne von *srs2*-Deletionsmutanten, während die MMS-Sensitivität supprimiert werden kann (MANKOURI *et al.*, 2002). Allerdings muß bezüglich der Lebensspanne angemerkt werden, daß die Überexpression von SRS2 offenbar zu einem gewissen Grad toxisch für die Zellen ist (KAYTOR *et al.*, 1995).

Die Reversionsfrequenz des KanKanMX4-Moduls ist in srs2-Deletionsmutanten nach Behandlung mit 4-NQO erniedrigt

Bezüglich des Sgs1-Proteins wurde die Hypothese aufgestellt, daß es an gebildete *Holliday junctions* zu binden vermag und diese in Richtung der Replikationsgabel durch *branch migration* auflöst. Auf diese Weise könnte eine Rolle an der fehlerfreien Reinitiation arre-

tierter Replikationsgabeln möglich sein. Diese Hypothese konnte durch die Ergebnisse der Reversionsfrequenzen nach Behandlung der Zellen mit 4-NQO nicht bestätigt werden (siehe Seite 98).

Allerdings konnte gezeigt werden, daß es eine partielle funktionelle Überlappung beider Proteine zu geben scheint (MANKOURI *et al.*, 2002). Es wäre also denkbar, daß nicht Sgs1 sondern Srs2 eine Rolle bei der Auflösung von *Holliday junctions* zukommt. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die Reversionsfrequenzen von *srs2*-Deletionsmutanten nach Behandlung mit 4-NQO bestimmt. Eine Bestimmung der Reversionsfrequenzen der *srs2 mph1*-Doppelmutante war nicht möglich, da die Doppelmutante vermutlich synthetisch letal ist (E. PANICO, unveröffentlicht). Die experimentelle Durchführung erfolgte wie beschrieben (siehe Seite 67).

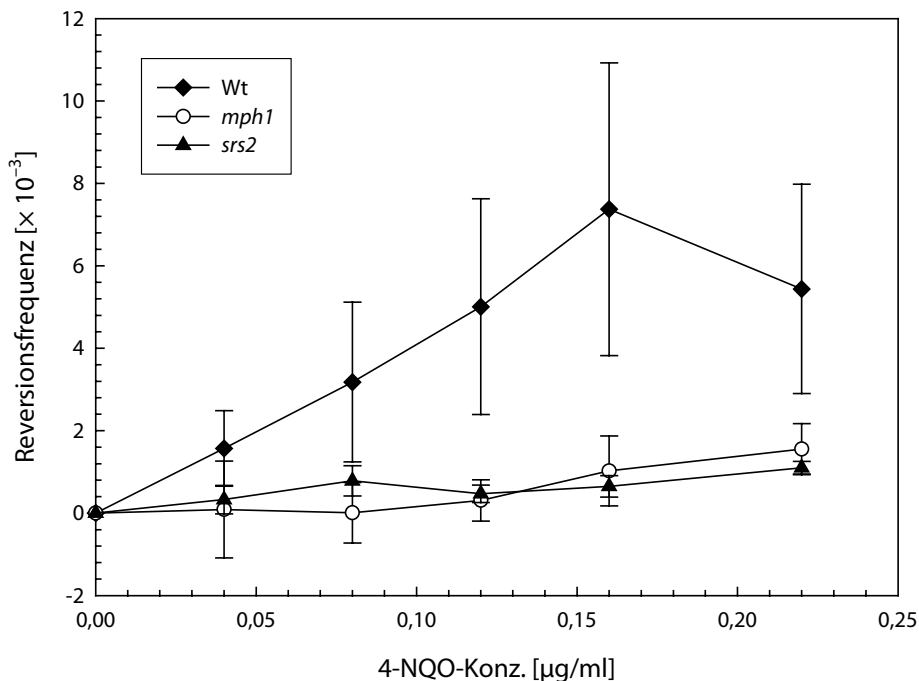


Abb. 22: Beeinflussung der Reversionsfrequenz des KanMX4-Moduls in den Stämmen CEN.PK 2-1C *srs2* und CEN.PK 2-1C *srs2 mph1* nach Behandlung mit 4-Nitrochinolin-1-oxid. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml $^{-1}$ mit α -mating factor in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium resuspendiert, welches die angegebenen Konzentrationen 4-Nitrochinolin-1-oxid enthielt und für die Dauer eines Zellzyklus bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und Verdünnungen auf Vollmedium zur Bestimmung der Lebendzellzahl sowie auf Medium mit G418 zur Bestimmung der Reversionsfrequenz plattiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus vier Datensätzen. Die Daten von Wildtyp und *mph1*-Deletionsmutante wurden Abb. 8 entnommen.

Abb. 22 läßt sich entnehmen, daß die Behandlung der *srs2*-Deletionsmutante mit 4-NQO – ähnlich wie bereits bei der *sgs1*-Deletionsmutante – zu einer Erniedrigung der Reversionsfrequenzen führt. Nimmt man eine Beteiligung von Srs2 an der Auflösung von

Holliday junctions ohne die Beteiligung von Resolvasen mittels *branch migration* an, dann sollte die Lebensdauer gebildeter *Holliday junctions* in *srs2*-Deletionsmutanten erhöht sein, wodurch die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, daß eine Auflösung mittels Resolvasen erfolgt. Somit wäre in *srs2*-Deletionsmutanten gemäß dieser Hypothese eine stärkere Erhöhung der Reversionsfrequenz als im Wildtyp nach Behandlung mit Mutagenen zu erwarten gewesen.

Die Daten der Reversionsfrequenzen zeigen, daß diese Hypothese in ihrer Simplizität nicht zutreffend ist. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß Srs2 diese Funktion besitzt und daß es durch zusätzliche Funktionen wie die Beteiligung am *checkpoint* oder an der homologen Rekombination zu Nebeneffekten kommt, welche zu einer Veränderung des Ergebnisses führen.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß durch FRIEDL *et al.* gezeigt wurde, daß in *srs2*-Deletionsmutanten die ektopischen Rekombinationsfrequenzen erniedrigt sind (FRIEDL *et al.*, 2001). Ähnlich wie schon bei den Ergebnissen der *sgs1*-Mutante läßt sich auch hier nicht ohne weiteres beantworten, ob sich diese Ergebnisse direkt mit den Reversionsfrequenzen vergleichen lassen. Trotzdem ist interessant, daß auch die verringerten Reversionsfrequenzen auf eine verringerte Zahl von Rekombinationsereignissen zurückgeht und daß sich die Ergebnisse in diesem Punkt offenbar gegenseitig stützen.

Dieser Befund ist u.a. deshalb von Bedeutung, da die neueren biochemischen Befunde darauf hindeuten, daß durch Srs2 Rad51-Filamente aufgelöst werden könnten und Srs2 somit als ein Protein wirken könnte, welches homologe Rekombination unterdrückt (VEAUTE *et al.*, 2003; KREJCI *et al.*, 2003). Dann sollte allerdings angenommen werden, daß es in *srs2*-Deletionsmutanten vermehrt zu Rad51-abhängigen Rekombinationsereignissen kommt. Diese Hypothese steht im Gegensatz zu den vorliegenden Daten, da sowohl die Arbeit von FRIEDL *et al.* als auch die Reversionsfrequenzen eher auf eine Verringerung der Rekombinationsereignisse deuten (FRIEDL *et al.*, 2001). Allerdings kann nicht völlig ausgeschlossen werden, daß für die Reversionsereignisse Rad51 nicht gebraucht wird, obwohl die Absenkung der spontanen Reversionsrate in *rad52*-Mutanten stark dagegen spricht. Es wäre also möglich, daß die Verringerung der Reversionsfrequenzen auf einen Rad51-unabhängigen Mechanismus zurückgeht, an dem Srs2 ebenfalls beteiligt ist.

Weiterhin ist auch denkbar, daß Srs2 eine regulatorische Funktion besitzt, durch welche kontrolliert werden kann, wann z.B. ein Arrest der Replikation mit Hilfe der homologen Rekombination prozessiert wird (KLEIN, 2001 sowie dortige Referenzen). Der Ausfall des Gens könnte dann u.U. dazu führen, daß Replikationsarreste weniger selektiv durch andere Wege prozessiert werden. Eine solche »Umverteilung« könnte dann dazu führen, daß Arreste, welche sonst dergestalt prozessiert würden, daß es vermehrt zu Reversionsereignissen kommt, durch andere Wege prozessiert werden, bei denen weniger Reversionsereignisse auftreten.

Die Reversionsfrequenz des KanKanMX4-Moduls ist in srs2-Deletionsmutanten auch nach Behandlung mit Camptothecin erniedrigt

In *sgs1*-Deletionsmutanten hat die Behandlung der Zellen mit Camptothecin einen im Vergleich zu 4-NQO gerade entgegengesetzten Effekt. Während die Reversionsfrequenzen nach Behandlung mit 4-NQO erniedrigt sind, sind sie nach Behandlung mit Camptothecin sogar über das Niveau des Wildtyps erhöht (siehe Seite 100).

Aus der partiellen funktionellen Überlappung beider Proteine (MANKOURI *et al.*, 2002) ergibt sich die Frage, ob sich die Funktionen beider Proteine so ähnlich sind, daß auch im Falle der *srs2*-Deletionsmutante die Reversionsfrequenzen nach Behandlung der Zellen mit Camptothecin erhöht sind. Um dies zu untersuchen, wurden die Zellen wie beschrieben angezogen, mit Camptothecin behandelt und schließlich die Reversionsfrequenzen bestimmt (siehe Seite 68).

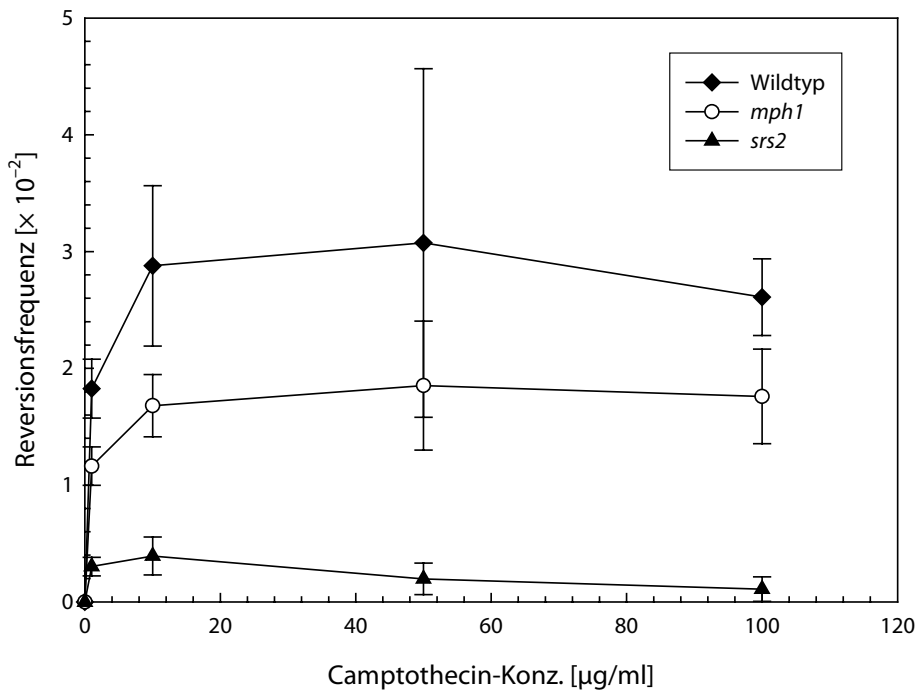


Abb. 23: Beeinflussung der Reversionsfrequenz des KanKanMX4-Moduls in den Stämmen CEN.PK 2-1C *srs2* und CEN.PK 2-1C *srs2 mph1* nach Behandlung mit Camptothecin. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml⁻¹ mit α -mating factor in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium resuspendiert, welches die angegebenen Konzentrationen 4-Nitrochinolin-1-oxid enthielt und für die Dauer eines Zellzyklus bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und Verdünnungen auf Vollmedium zur Bestimmung der Lebendzellzahl sowie auf Medium mit G418 zur Bestimmung der Reversionsfrequenz plattiert. Die Daten stammen aus drei unterschiedlichen Experimenten. Die Daten von Wildtyp und *mph1*-Deletionsmutante wurden Abb. 9 entnommen.

Aus Abb. 23 läßt sich entnehmen, daß sich die *srs2*-Deletionsmutante bezüglich der Reversionsfrequenzen nach Behandlung mit Camptothecin anders als die *sgs1*-Deletionsmutante verhält. Während in der *sgs1*-Deletionsmutante die Reversionsfrequenzen nach Behandlung mit Camptothecin deutlich über das Niveau des Wildtyps erhöht sind, zeigen *srs2*-Deletionsmutanten eine drastische Verringerung der Reversionsfrequenzen.

Diese Befunde korrelieren auch mit der Sensitivität der beiden Stämme gegenüber den verwendeten Chemikalien. Beide Deletionsmutanten zeigen eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber der Behandlung mit 4-NQO. Allerdings ist die *sgs1*-Deletionsmutante nur wenig sensitiv gegenüber Camptothecin, während *srs2*-Deletionsmutanten eine deutlich höhere Sensitivität besitzen (A. SCHÜRER, unveröffentlicht).

Offenbar führt die Deletion des *SRS2*-Gens dazu, daß weniger Reversionsereignisse stattfinden. Bei der Interpretation dieser Daten muß allerdings vermutlich folgendes berücksichtigt werden. Nach VAZE *et al.* liegt die Überlebensfähigkeit der *srs2*-Deletionsmutante nach Einführung eines Doppelstrangbruches bei weniger als 2% (VAZE *et al.*, 2002). Nach diesem Ergebnis ist zu vermuten, daß diejenigen Zellen, in welchen Doppelstrangbrüche durch die Behandlung mit Camptothecin induziert wurden, nur zu einem sehr geringen Teil weiter wachsen und deshalb in den vorliegenden Experimenten kaum eine Rolle spielen. In diesem Fall muß man davon ausgehen, daß Srs2 an einem weiteren Prozeß beteiligt ist, welcher offenbar vermehrt zu Reversionsereignissen führt, da diese in der Deletionsmutante verringert auftreten. Wenn Srs2 durch die Entfernung von Rad51-Filamenten antirekombinativ wirkt, dann ist nicht einfach zu erklären, warum die Reversionsfrequenz bei Abwesenheit von Srs2 erniedrigt sind, da hier mehr Rad51-Filamente gebildet werden und mehr Rekombination stattfinden sollte.

Auch hier ließe sich allerdings argumentieren, daß Srs2 an der Entscheidung beteiligt ist, wann ein Arrest der Replikation rekombinativ aufgelöst wird. In Abwesenheit werden dann vermehrt auch rekombinativ aufzulösende Arreste auf andere Art und Weise prozessiert, so daß weniger Reversionsereignisse in der *srs2*-Deletionsmutante erfolgen.

srs2-Deletionsmutanten zeigen eine erniedrigte spontane Reversionsrate

Die bisher gewonnenen Daten zeigen, daß Srs2 bei Läsionen, welche durch 4-NQO und Camptothecin ausgelöst wurden, die Reversionsfrequenzen erhöht. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen, nach denen angenommen wird, daß Srs2 Rad51-Filamente entfernt und somit eher antirekombinativ wirkt (siehe Seiten 106 & 109).

Um zu untersuchen, welche Rolle Srs2 bei natürlicherweise in Hefen auftretenden Läsionen spielt, wurde die spontane Reversionsrate von *srs2*-Deletionsmutanten gemäß der Medianmethode bestimmt (LEA & COULSON, 1948). Die Durchführung erfolgte wie beschrieben (siehe Seite 66).

Aus Tabelle 10 kann man entnehmen, daß auch die spontane Reversionsrate in der *srs2*-Einzelmutante gegenüber der Reversionsrate des Wildtyps erniedrigt ist. Auch unter normalen Wachstumsbedingungen ist bei Abwesenheit von Srs2 die Reversionsrate also erniedrigt.

Tabelle 10: Spontane Reversionsraten der Stämme CEN.PK 2-1C, CEN.PK 2-1C *sgs1* und CEN.PK 2-1C *sgs1 mph1*, ermittelt mit dem KanKanMX4-Konstrukt gemäß der Medianmethode (Lea und Coulson, 1948).

	Spontane Reversionsrate	Faktor
CEN.PK 2-1C	$9,96 \cdot 10^{-5} \pm 0,6 \cdot 10^{-5}$	1
CEN.PK 2-1C <i>srs2</i>	$3,71 \cdot 10^{-5} \pm 0,4 \cdot 10^{-6}$	0,4

Die einfachsten Erklärungen für das Auftreten von Reversionsereignissen sind rekombinative Reinitiationsereignisse, homologe Rekombinationsereignisse sowie auftretendes *primer template slippage*, welches allerdings vermutlich nur eine untergeordnete Rolle spielt, da der größere Teil der spontanen Reversionsereignisse abhängig von Rad52 ist (siehe Seite 73). Dies kann entweder darauf hindeuten, daß Srs2 Rekombinationsereignisse in irgendeiner Form stimuliert. Die Entfernung der Rad51-Filamente kann dann wohl am ehesten dergestalt gedeutet werden, daß Srs2 in bestimmten Fällen in der Lage ist, Rekombination zu stimulieren, aber auch hemmend wirken kann, wenn Rekombination eine Gefahr für die Zelle darstellen könnte. Diese Überlegung ist im Einklang mit der Hypothese, daß Srs2 eine regulatorische Funktion innerhalb von Rekombinationsereignissen besitzt (KLEIN, 2001 sowie Referenzen darin; siehe Seite 106).

Effekt einer heterologen Expression von E. coli recG in Saccharomyces cerevisiae

Die Rolle von RecG bei der Reinitiation arretierter Replikationsgabeln: Experimentelle Befunde in *E. coli*

Das RecG-Protein aus *E. coli* ist ein Protein mit Motiven, welche bei vielen RNA- und DNA-Helikasen konserviert sind (LLOYD & SHARPLES, 1991). Es besitzt eine DNA-abhängige ATPase-Aktivität und bindet an synthetische *Holliday junctions*, jedoch nur mit geringer Effizienz an doppelsträngige DNA (LLOYD & SHARPLES, 1993). Die Fähigkeit von RecG, doppelsträngige DNA in 5'→3'-Richtung zu entwinden, ist zumindest *in vitro* nur schwach ausgeprägt. Hingegen wird die Helikase-Aktivität durch gegabelte DNA-Strukturen stark stimuliert und es konnte nachgewiesen werden, daß RecG spezifisch am Verzweigungspunkt bindet (WHITBY *et al.*, 1994). Ebenfalls konnte gezeigt werden, daß RecG spezifisch an synthetische *Holliday junctions* bindet und diese bei Anwesenheit von Magnesium unter ATP-Verbrauch zu entwinden vermag (LLOYD & SHARPLES, 1993; WHITBY & LLOYD, 1998). Die Bindung erfolgt bei *Holliday junctions* ohne homologe Bereiche, welche nicht entwunden werden können, direkt am Kreuzungspunkt (WHITBY & LLOYD, 1998).

Eine Reihe weiterer Substrate werden ebenfalls durch RecG gebunden, wobei allen Substraten gemein ist, daß sie eine Gabelstruktur besitzen, wobei Moleküle mit einer Blase, welche also zwei Gabelstrukturen aufweisen, durch zwei RecG-Moleküle gebunden werden (WHITBY & LLOYD, 1998; MCGLYNN & LLOYD, 2000).

Es konnte *in vitro* gezeigt werden, daß durch RecG spezifisch Y-Strukturen mit drei doppelsträngigen Armen unter Ausbildung von *Holliday junctions* entwunden werden, welche dann durch RuvC geschnitten werden können. Durch RuvAB kann hingegen keine Umwandlung eines Replikationsintermediates in eine *Holliday junction* erfolgen (MCGLYNN & LLOYD, 2000). Diese Stimulation von RuvC durch RecG erfolgt allerdings nur, wenn hydrolysierbares ATP vorhanden ist. Dies widerspricht der Hypothese, daß RecG nur zu einer Stabilisierung spontan gebildeter *Holliday junctions* führt, und deutet darauf hin, daß die Bildung der *Holliday junction* aktiv durch RecG erfolgt (MCGLYNN & LLOYD, 2001). Durch genetische Experimente ließ sich zusätzlich nachweisen, daß RecG offenbar auch *in vivo* für die Ausbildung von *Holliday junctions* benötigt wird (MCGLYNN & LLOYD, 2000; BOLT & LLOYD, 2002).

Die Deletion von *ruvABC* führt in *E. coli* zu einer deutlich erhöhten Sensitivität gegenüber UV-Bestrahlung. Diese Sensitivität wird durch die zusätzliche Expression von *rusA* partiell supprimiert, welches für eine weitere *Holliday-junction*-Resolvase codiert. Eine *recG*-Deletionsmutante zeigt eine leichte Sensitivität gegenüber UV, welche durch die Expression von *rusA* nicht supprimiert werden kann. Allerdings ist die UV-Sensitivität einer *rusA*⁺ Δ *ruvABC* *recG*-Deletionsmutante synergistisch. Offenbar beruht die Suppression der UV-Sensitivität durch *rusA* auf der Anwesenheit von RecG. Diesen Effekt könnte man mit der Hypothese erklären, daß in der Abwesenheit von RuvABC *Holliday junctions* durch RecG gebildet werden, welche dann durch die Resolvase RusA aufgelöst werden können (BOLT & LLOYD, 2002).

Gleichzeitig sind die UV-Sensitivitäten eines *rusA*⁺ Δ *recB* sowie eines *rusA*⁺ Δ *recB* *ruvABC*-Stammes gleich, während eine *rusA*⁺ Δ *recB* *recG*-Deletionsmutante eine deutlich erhöhte Sensitivität zeigt, die durch die zusätzliche Deletion von *ruvABC* nochmals verstärkt wird. Auch in Abwesenheit der RuvABC-RecB-abhängigen Rekombination ist also RecG offenbar in der Lage, die Überlebensfähigkeit der Zellen zumindest partiell zu gewährleisten (BOLT & LLOYD, 2002).

In vitro wird die Möglichkeit von RecG, aus Replikationsintermediaten *Holliday junctions* zu formen, durch RuvA gehemmt (MANDAL *et al.*, 1993). Da RuvA im Zuge der SOS-Antwort induziert wird und RecG nicht, kann angenommen werden, daß RecG nur eine untergeordnete Rolle bezüglich *Holliday junctions* in Zellen zukommt, welche RuvAB exprimieren. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß *recG*-Deletionsmutanten nur eine geringe Sensitivität gegenüber UV-Bestrahlung besitzen. *In vitro* wurde gezeigt, daß RuvABC aus Substraten, die durch RecG prozessiert werden, keine *Holliday junctions* bildet (MCGLYNN & LLOYD, 2000). In Abwesenheit von RecG werden also entweder verstärkt andere Prozesse für die Prozessierung von Läsionen eingesetzt, oder die Bildung von *Holliday junctions* wird verstärkt von anderen Proteinen wie z.B. RecA übernommen (ROBU *et al.*, 2001; BOLT & LLOYD, 2002).

Eine Besonderheit bei der Ausbildung von *Holliday junctions* ausgehend von einem Replikationsintermediat ist, daß zwei Stränge gleichzeitig entwunden werden müssen, während durch viele andere Helikasen nur ein Strang entwunden wird. Zusätzlich

müssen, um eine *Holliday junction* bilden zu können, der *leading* und der *lagging strand* miteinander hybridisiert werden. *In vitro* ist RecG in der Lage, sowohl den *leading* als auch den *lagging strand* zu entwinden, wobei die Entwindungsrate des *lagging strand* deutlich höher ist als die des *leading strand*. Auch die Bindung von RecG an ein künstliches Replikationsintermediat mit einem *lagging strand* ist deutlich gegenüber einem Intermediat mit einem *leading strand* begünstigt. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß bei Replikationsintermediaten mit *leading* und *lagging strand* die Entwindung des *lagging strand* gehemmt wird (MCGLYNN & LLOYD, 2001). Wie bereits ausgeführt, wird bei einem Arrest der *leading strand* Polymerase der *lagging strand* deutlich über das Ende des *leading strand* hinaus verlängert. Dies entspricht formal also dem Substrat, bei welchem an der Gabel nur ein *lagging strand* vorhanden ist und welches gerade von RecG gebunden wird (siehe Seite 17 sowie Abb. 1). In diesem Fall könnte durch RecG eine *Holliday junction* gebildet werden und durch das *polymerase strand switching* die Läsion fehlerfrei umgangen oder die Läsion über die normalen Reparatursysteme entfernt werden (MCGLYNN & LLOYD, 2002).

Wie RecG aus einer Gabelstruktur eine *Holliday junction* bilden kann, konnte anhand der Kristallstruktur des RecG aus *Thermotoga maritima* plausibel gemacht werden. Diese zeigt, daß RecG aus drei Domänen besteht, und daß die noch nicht entwundenen parentalen Stränge durch die Domänen 2 und 3 gebunden werden, während die Gabelstruktur durch Domäne 1 gebunden wird. Die einzelsträngigen DNA-Bereiche binden in Furchen auf der Oberfläche von Domäne 1, welche zu schmal für einen Doppelstrang sind. Zusätzlich werden beide Einzelstränge abgeknickt, wodurch die *stacking*-Interaktionen der Basen untereinander verloren gehen. Zur Stabilisierung dieser Struktur kommt es zu den in Abb. 24 gezeigten Interaktionen der herausstehenden Basen mit den Aminosäuren Phe204 im Falle des *leading strand* sowie Tyr208 im Falle des *lagging strand* (SINGLETON *et al.*, 2001).

Die Funktion von RecG bei der Bildung von *Holliday junctions* stellt man sich wie in Abb. 25 gezeigt vor. RecG wandert unter ATP-Hydrolyse entgegen der Replikationsrichtung entlang der DNA und zieht hierbei die parentalen Stränge durch die Furchen von Domäne 1. Direkt über dem Verzweigungspunkt der parentalen Stränge befindet sich die sogenannte *wedge domain*, wobei aus der Kristallstruktur hervorgeht, daß der neu synthetisierte *lagging strand*, welcher nicht in der Furche von Domäne 1 gebunden zu werden vermag, direkt auf diese Struktur zugeführt wird. Es wird daher postuliert, daß es zu einer Entwindung des *lagging strand* kommt und dieser in entgegengesetzter Richtung wie die parentalen Stränge abgeknickt wird. Der Protein-DNA-Cokristall enthielt zwar keinen *leading strand*, aber es kann für letzteren ein ähnlicher Vorgang angenommen werden, so daß es zu der postulierten Hybridisierung beider neu gebildeter Stränge und damit zur Ausbildung einer *Holliday junction* kommt (SINGLETON *et al.*, 2001).

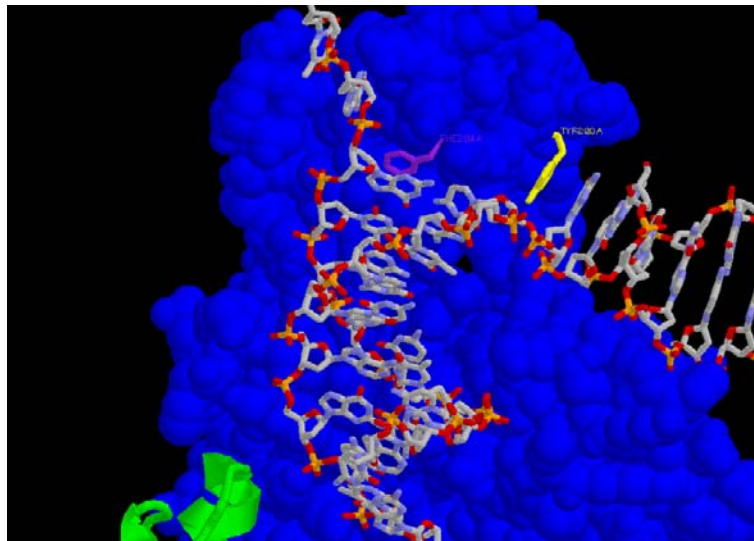


Abb. 24: Stabilisierung der abgeknickten parentalen Stränge durch die Aminosäuren Phe204 (*leading strand*) sowie Tyr208 (*lagging strand*) bei der Bindung von Replikationsintermediaten durch RecG. Die einzelsträngigen Bereiche befinden sich in schmalen Furchen, in welchen nur einzelsträngige DNA gebunden werden kann. Der *lagging strand* ist gegen die am oberen Bildrand sichtbare *wedge domain* ausgerichtet. Bewegt sich das Protein entgegen der Richtung der Replikation wird der *lagging strand* quasi „abgeschält“ (Abbildung erstellt mit RasMol V2.6).

Bei der Suche nach Suppressoren des Phänotyps der *recG*-Deletionsmutante wurden Mutanten gefunden, in welchen einzelne Aminosäuren in der Helikasedomäne von PriA verändert waren (AL-DEIB *et al.*, 1996). Diese Befunde deuten darauf hin, daß RecG eine direkte Rolle bei der Reinitiation arretierter Replikationsgabeln haben könnte

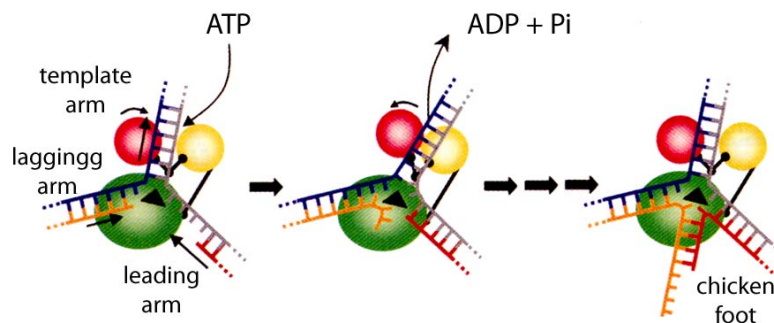


Abb. 25: Hypothetischer Mechanismus für die Bildung einer *Holliday junction* durch RecG. Es erfolgt zunächst eine Bindung von RecG an eine arretierte Replikationsgabel, bei welcher der *leading strand* über das Ende des *lagging strand* hinaus verlängert wurde. Die einzelsträngigen DNA-Bereiche binden in den schmalen Furchen von Domäne 1 (grün dargestellt). Durch Translokation des Proteins entlang der DNA (oder umgekehrt der DNA durch das Protein) werden die neu synthetisierten Stränge quasi „abgeschält“ und aufgrund sterischer Hinderung der *wedge domain* entgegen der hybridisierten parentalen Stränge abgeknickt. Auf diese Weise kann eine *Holliday junction* (»chicken foot«) ausgebildet werden (modifiziert nach Singleton *et al.*, 2001).

Durch heterologe Expression von *recG* in Wildtyp und *mph1*-Deletionsmutante läßt sich ein dominant negativer Effekt, aber keine Komplementation zeigen

Die Expression von recG führt zu einer Erniedrigung der spontanen Mutationsrate im Wildtyp und der mph1-Deletionsmutante

Eine mögliche Hypothese zur Erklärung der Phänotypen der *mph1*-Deletionsmutante wäre eine Beteiligung von Mph1 an der Bildung von *Holliday junctions*. Dann sollte die Deletion des *MPH1*-Gens zu einer verringerten Bildung von *Holliday junctions* führen, wodurch im Falle replikationsarretierender Läsionen ein *polymerase strand switch* oder aber die Entfernung der Läsion durch die klassischen Reparaturprozesse nur vermindert möglich ist, so daß vermehrt die Transläsionssynthese für die Prozessierung der arretierten Replikationsgabeln herangezogen wird. Dies führt zu dem beobachteten Mutatorphänotyp.

Gleichzeitig führt eine verringerte Bildung von *Holliday junctions* in *mph1*-Deletionsmutanten zu einer verringerten Wahrscheinlichkeit, daß diese durch Resolvasen geschnitten werden und es zu einer rekombinativen Prozessierung der entstehenden doppelsträngigen DNA-Enden kommt. Auf diese Weise ließen sich also auch die beobachtete, niedrigere Reversionsrate sowie die verringerten Reversionsfrequenzen nach Behandlung mit Mutagenen erklären (siehe Seite 66).

Um zu untersuchen, ob Mph1 eine zu RecG homologe Funktionalität besitzt, wurde das *recG*-Gen mit Hilfe sequenzspezifischer Primer von chromosomaler *E. coli*-DNA amplifiziert. Eine Problematik dieses Komplementations-Experiments besteht darin, daß es in *E. coli* kein Kernlokalisierungssignal (NLS) gibt, welches allerdings in *Saccharomyces cerevisiae* für den Kernimport erforderlich ist. Dieses muß also für einen Komplementationsversuch an das Protein angefügt werden.

Eine der am besten charakterisierten Kernlokalisierungssignale ist die NLS des SV 40 T Antigens mit der Sequenz PKKKRKV (KALDERON *et al.*, 1984). Diese Sequenz wird durch das Importin α von *Saccharomyces cerevisiae* erkannt, so daß ein Transport in den Kern möglich ist (CONTI *et al.*, 1998).

Durch MAHDI *et al.* wurde bereits nachgewiesen, daß die Fusion eines HIS-tags an den N-Terminus des RecG-Proteins zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber UV führt. Offenbar hat die Fusion eines HIS-tags einen negativen Einfluß auf die Aktivität des Enzyms (MAHDI *et al.*, 1997). Zusätzlich erscheint in der veröffentlichten Kristallstruktur der C-Terminus besser zugänglich, so daß die Erkennung der NLS hier besser erfolgen könnte. Aus diesen Gründen wurde die NLS am C-Terminus angefügt, wobei bei der Definition der benötigten Basen die *Codon Usage Table* der *Saccharomyces cerevisiae*-Datenbank aus Stanford berücksichtigt wurde (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>). Hieraus ergab sich folgende Sequenz:

CCA AAG AAG AAG AGA AAG GTT
P K K K R K V

Die Primer wurden dergestalt gewählt, daß vor dem Start-Codon des *recG*-Gens eine *Bam*HI-Schnittstelle eingeführt wurde. Am Ende wurde das Kernlokalisationsignal, zwei Stop-Codons sowie eine Schnittstelle für *Xho*I eingeführt. Die Wahl der Restriktions-schnittstellen ergab sich aus den für eine Klonierung geeigneten Positionen im Zielvektor pYGET. In diesem Vektor steht das Gen unter der Kontrolle des starken, konstitutiven Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase-Promotors.

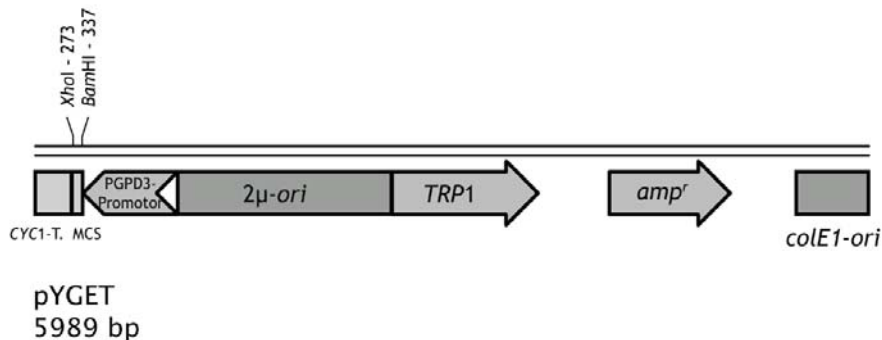


Abb. 26: Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pYGET (C. Capellaro, persönliche Kommunikation), welches für die Expression des *recG*-Gens aus *E. coli* eingesetzt wurde. PGPD3-Promotor: starker, konstitutiver Promotor der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae*. CYC1-T.: Cytochrom C1-Terminator aus *Saccharomyces cerevisiae*. 2µ-ori: Replikationsursprung aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Schnittstellen für die Klonierung des *recG*-Gens sind angegeben. Für weitere Details siehe Text sowie Seite 33.

Die Mutationsraten der Stämme CEN.PK 2-1C/pYGET-*recG*⁺ sowie CEN.PK 2-1C *mph1*/pYGET-*recG*⁺ wurden mit Hilfe des Canavanin-Vorwärtsmutationssystem gemäß der Medianmethode bestimmt (LEA & COULSON, 1948). Als Kontrolle wurden der Wildtyp und die *mph1*-Deletionsmutante mit dem leeren Expressionsvektor transformiert und die spontane Mutationsrate bestimmt.

Tabelle 11: Spontane Mutationsraten der Stämme CEN.PK 2-1C/pYGET und CEN.PK 2-1C *mph1*/pYGET sowie CEN.PK 2-1C/pYGET-*recG* und CEN.PK 2-1C *mph1*/pYGET-*recG*, bestimmt nach der Medianmethode (Lea und Coulson, 1948).

	Spontane Mutationsrate	Faktor
CEN.PK 2-1C pYGET	$2,51 \cdot 10^{-7} \pm 0,46 \cdot 10^{-7}$	1
CEN.PK 2-1C <i>mph1</i> /pYGET	$18,4 \cdot 10^{-7} \pm 2,58 \cdot 10^{-7}$	7,4
CEN.PK 2-1C/pYGET- <i>recG</i>	$1,74 \cdot 10^{-7} \pm 0,33 \cdot 10^{-7}$	0,7 (1)
CEN.PK 2-1C <i>mph1</i> /pYGET- <i>recG</i>	$13,3 \cdot 10^{-7} \pm 1,96 \cdot 10^{-7}$	5,3 (7,7)

Wie in Tabelle 11 zusammengefaßt, weist die *mph1*-Deletionsmutante ein in diesem Experiment siebenfache Erhöhung der Mutationsrate gegenüber dem Wildtyp auf. Dies entspricht den Daten der bisherigen Messungen (SCHELLER *et al.*, 2000; SCHÜRER *et al.*, in Vorbereitung).

Bei Expression des *recG*-Gens zeigt sich eine leichte Verringerung der spontanen Mutationsrate sowohl im Falle des Wildtyps als auch im Falle der *mph1*-Deletionsmutante. Allerdings führt die Expression von *recG* offenbar nicht zur Suppression des Mutatorphänotyps der *mph1*-Deletionsmutante. Ob die beobachtete Absenkung der Mutationsraten bei Expression des *recG*-Gens signifikant ist, kann den vorliegenden Daten nicht eindeutig entnommen werden.

Andererseits ist aufgrund der fehlenden Komplementation eine homologe Funktion des RecG-Proteins nicht ausgeschlossen. So ist denkbar, daß das RecG-Protein nicht in einem benötigten Komplex integriert ist. In einer genomweiten Studie zum Auffinden nativer Proteinkomplexe in Hefe wurden u.a. Interaktionen von Msh6 mit den Proteinen Msh2, Msh3, Msh6, Rad16, Rad52, Sgs1, Top3 und Mph1 gefunden (GAVIN *et al.*, 2002). Es erscheint also naheliegend, daß das Mph1-Protein in einen größeren Komplex integriert ist. Wenn aber dem RecG-Protein die benötigten Interaktionsstellen fehlen, dann kann es vermutlich Replikationsintermediate binden, ist dann aber nicht in der Lage, weitere Faktoren zu rekrutieren.

Weiterhin wurde nicht nachgewiesen, daß das modifizierte RecG-Protein auch tatsächlich in den Kern importiert wird.

Die Reversionsfrequenzen des KanKanMX4-Moduls sind nach Behandlung der Zellen mit 4-NQO sowohl im Wildtyp als auch in der mph1-Deletionsmutante erniedrigt

Nimmt man an, daß die verringerten Reversionsfrequenzen nach Mutagenbehandlung in der *mph1*-Deletionsmutante darauf zurückzuführen sind, daß weniger *Holliday junctions* gebildet und damit auch weniger durch Resolvasen geschnitten werden, dann sollte durch die Expression des *recG*-Gens der umgekehrte Effekt erreicht werden. Die vermehrte Bildung von *Holliday junctions* sollte zu einer Erhöhung der Reversionsfrequenzen führen.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die Reversionsfrequenzen der Stämme CEN.PK 2-1C/pYGET-*recG*⁺ sowie CEN.PK 2-1C *mph1*/pYGET-*recG*⁺ nach Behandlung mit 4-NQO wie bereits beschrieben bestimmt (siehe Seite 67).

Wie man anhand Abb. 27 sehen kann, führt die Expression von *recG* keineswegs zu einer Erhöhung der Reversionsfrequenzen sondern im Gegenteil zu einer signifikanten Erniedrigung. Im Wildtyp führt die Expression zu einer Erniedrigung, die nur wenig über dem Niveau der *mph1*-Einzelmutante liegt. Die *recG*-exprimierende *mph1*-Mutante ist etwas uneinheitlicher. Bei niedrigen und mittleren 4-NQO-Konzentrationen entsprechen die Reversionsfrequenzen etwa denen des *recG*-exprimierenden Wildtyps, während die Frequenzen bei hohen Konzentrationen deutlich niedriger sind. Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß die Expression von *recG* in *Saccharomyces cerevisiae* zu einer Stabilisierung repetitiver Sequenzen führt.

Interessanterweise wurde diese Stabilisierung repetitiver Sequenzen für *E. coli* durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigt. Es konnte gezeigt werden, daß die Stabilität von Sequenzduplikationen in ähnlichen wie dem hier verwendeten System in

recG-Deletionsmutanten erniedrigt ist (BIERNE *et al.*, 1997A; SAVESON & LOVETT, 1999). Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppen sind also in Übereinstimmung mit den oben gezeigten Daten.

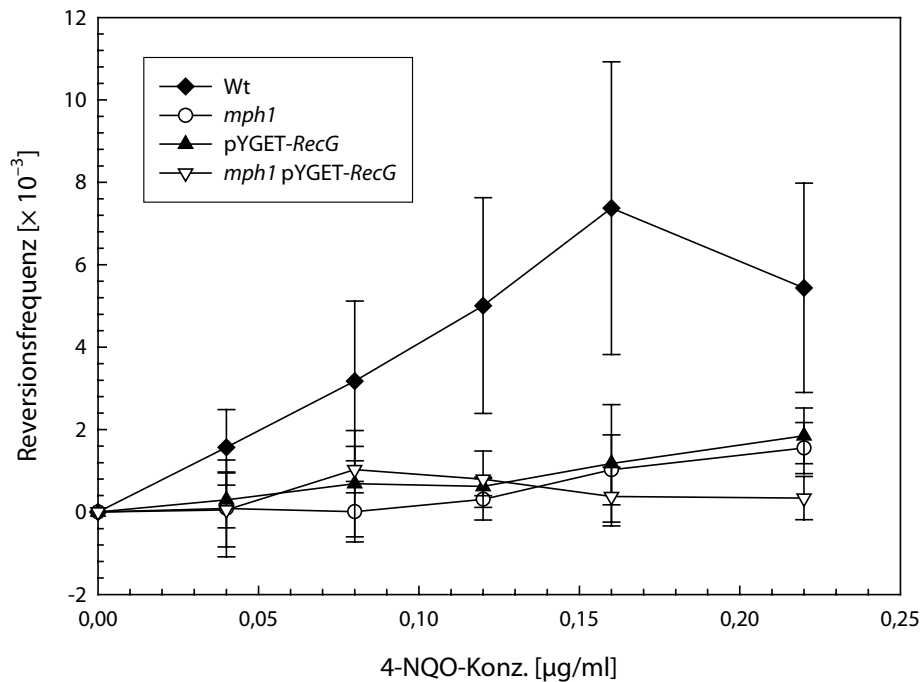


Abb. 27: Beeinflussung der Reversionsfrequenz des KanMX4-Moduls der Stämme CEN.PK 2-1C/pYGET-*recG*⁺ sowie CEN.PK 2-1C *mph1*/pYGET-*recG*⁺ nach Behandlung mit 4-Nitrochinolin-1-oxid. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml⁻¹ mit α -mating factor in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium resuspendiert, welches die angegebenen Konzentrationen 4-Nitrochinolin-1-oxid enthielt und für die Dauer eines Zellzyklus bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und Verdünnungen auf Vollmedium zur Bestimmung der Lebendzellzahl sowie auf Medium mit G418 zur Bestimmung der Reversionsfrequenz plattiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Datensätzen. Die Daten für Wildtyp und *mph1*-Deletionsmutante wurden Abb. 8 entnommen.

Die deutliche Absenkung der Reversionsfrequenz steht allerdings zunächst im Widerspruch zu der Hypothese, daß RecG für die Ausbildung von *Holliday junctions* benötigt wird, da man bei dem vermehrten Auftreten dieser Strukturen eine Erhöhung der Reversionsfrequenzen erwarten sollte. Eine mögliche Erklärung für die deutliche Absenkung der Reversionsfrequenzen besteht in der Annahme, daß RecG zwar die Bildung von *Holliday junctions* begünstigt, an diese allerdings gebunden bleibt und damit z.B. in *Saccharomyces cerevisiae* eine Auflösung durch Resolvasen verhindert, welche aufgrund des gebundenen RecG nicht mit dem Protein interagieren können.

Eine andere Möglichkeit zur Erklärung dieser Effekte ist die Hypothese, daß RecG nicht an der Bildung, sondern an der Auflösung von *Holliday junctions* beteiligt ist (Cox, 2001). Biochemische Experimente haben ergeben, daß RecA effizient die Regression von replikationsgabelähnlichen Strukturen ermöglicht (ROBU *et al.*, 2001). Nimmt man eine Beteiligung von RecA an der Ausbildung von *Holliday junctions* an, so könnte die Funktion von RecG darin bestehen, die gebildeten *Holliday junctions* – z.B. nach erfolgtem *polymerase strand switch* – wieder in Richtung der Replikation zu verschieben (Cox, 2001). In diesem Fall sollte man annehmen, daß die Lebensdauer von *Holliday junctions* erniedrigt ist und damit eine geringere Wahrscheinlichkeit besteht, daß sie durch Resolvasen geschnitten werden. Mit dieser Annahme ließen sich die beobachteten erhöhten Stabilitäten von Sequenzduplikationen sowohl in *E. coli* als auch in *Saccharomyces cerevisiae* in Einklang bringen.

Durch Expression von recG in Wildtyp und mph1-Deletionsmutante erfolgt keine Änderung der Reversionsfrequenzen des KanKanMX4-Moduls nach Behandlung der Zellen mit Camptothecin

Wie bereits beschrieben wurde biochemisch nachgewiesen, daß RecG die höchste Präferenz für Gabelstrukturen der DNA besitzt, bei welchen ein *lagging* aber kein *leading strand* vorhanden ist (MCGLYNN & LLOYD, 2001). Diese Substratpräferenz kann dergestalt gedeutet werden, daß RecG verstärkt an Strukturen bindet, bei welchen der *lagging strand* über den *leading strand* hinaus elongiert ist. Dieses Substrat tritt insbesondere dann auf, wenn die Polymerase des *leading strand* arretiert wurde (MCGLYNN & LLOYD, 2002; siehe Seite 17).

Wie bereits erwähnt führt Camptothecin hauptsächlich zu Läsionen, welche Helikase-arreste zur Folge haben sowie zu Einzelstrangbrüchen der DNA (siehe Seite 68). Geht man davon aus, daß RecG in *Saccharomyces cerevisiae* spezifisch an Strukturen bindet, bei welchen die *leading-strand*-Polymerase arretiert wurde und hier zur beobachteten Verringerung der Reversionsfrequenz nach Behandlung mit 4-NQO führt, dann würde man erwarten, daß der Einfluß auf die Reversionsfrequenz nach Behandlung mit Camptothecin deutlich geringer ist, da hier weniger häufig spezifisch der *leading strand* arretiert wird.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurden die Stämme CEN.PK 2-1C/pYGET-*recG*⁺ sowie CEN.PK 2-1C *mph1*/pYGET-*recG*⁺ wie beschreiben mit Camptothecin behandelt und anschließend die Reversionsfrequenzen des KanKanMX4-Moduls bestimmt (siehe Seite 68).

In Abb. 28 läßt sich erkennen, daß die Expression von *recG* auf die Reversionsfrequenzen nach Camptothecin-Behandlung sowohl im Wildtyp als auch in der *mph1*-Deletionsmutante nur einen geringen Einfluß zeigt. In beiden Fällen sind die Reversionsfrequenzen im Vergleich zu den Stämmen ohne *recG*-Expression nur leicht vermindert. Auffällig ist, daß bei beiden Stämmen bei hohen Camptothecin-Konzentrationen die Reversionsfrequenzen über den Frequenzen der Stämme ohne den Expres-

sionsvektor liegen. Aufgrund der relativ starken Streuung der Ergebnisse läßt sich allerdings nicht ohne weiteres klären, ob dieser Effekt beachtenswert ist oder im Bereich der Meßgenauigkeit liegt.

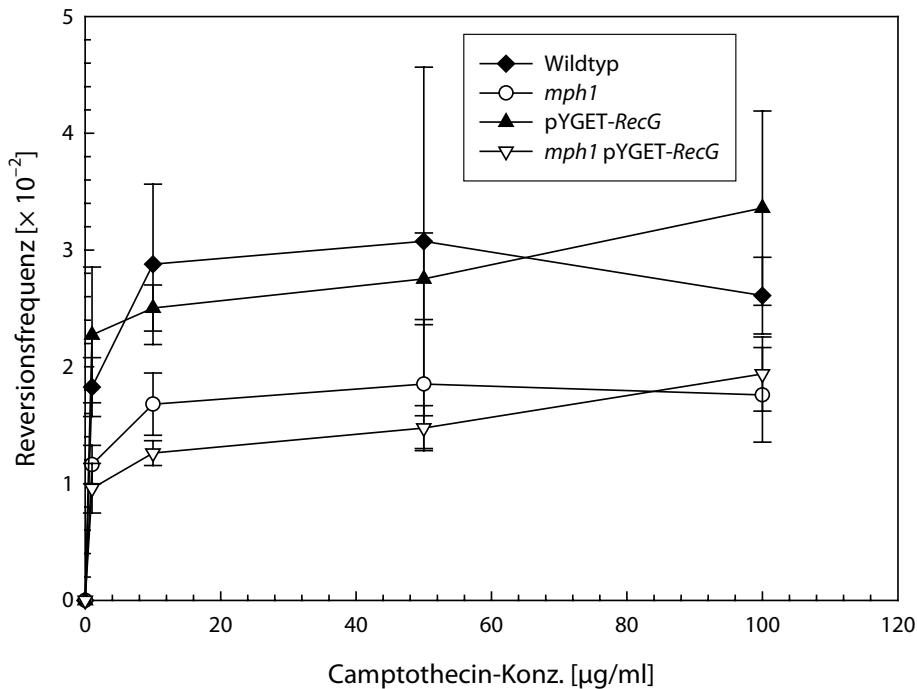


Abb. 28: Beeinflussung der Reversionsfrequenz des KanMX4-Moduls der Stämme CEN.PK 2-1C, CEN.PK 2-1C *mph1*, CEN.PK 2-1C pYGET-*recG* sowie CEN.PK 2-1C *mph1* pYGET-*recG* nach Behandlung mit Camptothecin. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml⁻¹ mit α -*mating factor* in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium resuspendiert, welches die angegebenen Konzentrationen Camptothecin enthielt und für die Dauer eines Zellzyklus bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und Verdünnungen auf Vollmedium zur Bestimmung der Lebendzellzahl sowie auf Medium mit G418 zur Bestimmung der Reversionsfrequenz plattiert. Gezeigt sind die Mittelwerte dreier Datensätze. Die Daten für Wildtyp und *mph1*-Deletionsmutante wurden Abb. 9 entnommen.

Offensichtlich scheinen aber die Daten die Hypothese zu untermauern, daß RecG an der Prozessierung von Läsionen, welche durch Camptothecin hervorgerufen werden, nicht beteiligt ist. Weiterhin wird auch hier der Phänotyp der *mph1*-Deletionsmutante nicht komplementiert. Mph1 ist demnach in einem Prozeß involviert, durch welchen ein Substrat prozessiert wird, welches in *mph1*-Mutanten nicht durch das Eingreifen von RecG in gleicher Weise umgesetzt werden kann.

Die Expression von RecG führt zu einer Erhöhung der Sensitivität gegenüber Camptothecin im Wildtyp und zu einer Verringerung der Sensitivität gegenüber 4-NQO in mph1-Mutanten

Sowohl für die Mutationsrate als auch für die Reversionsfrequenzen des KanKanMX4-Moduls nach Behandlung mit 4-NQO wurde gezeigt, daß die Expression von *recG* einen Effekt zeigt. Im Falle der Mutationsrate führt die Expression von *recG* zu einer Erniedrigung der Mutationsrate sowohl im Wildtyp als auch in der *mph1*-Deletionsmutante. Weiterhin werden durch die Expression von *recG* die Reversionsfrequenzen nach Behandlung mit 4-NQO deutlich erniedrigt, während die Behandlung mit Camptothecin nur einen sehr geringen Effekt zeigt.

Eine Möglichkeit zur Erklärung dieser Befunde wäre die Hypothese, daß durch RecG auch in *Saccharomyces cerevisiae* Läsionen fehlerfrei prozessiert werden können. Wenn dies der Fall ist, dann sollte man auch erwarten, daß die Expression von *recG* in *Saccharomyces cerevisiae* die Sensitivität von Wildtyp und *mph1*-Mutante insbesondere gegenüber Mutagenen erniedrigt, welche kleine Läsionen induzieren.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die Sensitivitäten der Stämme gegenüber MMS, 4-NQO und Camptothecin durch einen *drop dilution assay* (siehe Seite 38) untersucht. Bei dieser Untersuchung wurden Tropfen der Stämme mit unterschiedlichen Zellzahlen auf Platten mit den entsprechenden Mutagenen aufgetropft. Ist die Sensitivität eines Stammes gegenüber der verwandten Chemikalie erhöht, gelingt es weniger Zellen, Kolonien zu bilden. Dies läßt sich direkt mit den Sensitivitäten der Kontrollstämme vergleichen.

Aus Abb. 29 geht hervor, daß die Expression von *recG* auf den Wildtyp bezüglich der Sensitivität gegenüber MMS keinen großen Einfluß hat. Allerdings läßt sich die Sensitivität der *mph1*-Mutante durch die Expression von *recG* partiell komplementieren. Dennoch läßt sich durch RecG nicht die Funktion von Mph1 ersetzen, wie die Daten der Mutationsraten und der Reversionsfrequenzen zeigen. Insbesondere in Abwesenheit von Mph1 führt RecG aber offensichtlich zu einer Prozessierung von Läsionen über einen alternativen Weg, welcher zu einer erhöhten Resistenz der *recG*-exprimierenden *mph1*-Mutante führt.

Interessant ist der Befund, daß die Expression von *recG* die Sensitivität gegenüber Camptothecin deutlich erhöht. Da die Expression von *recG* in der *mph1*-Mutante diesen Effekt nicht zeigt, kommt die erhöhte Sensitivität offenbar dadurch zustande, daß durch Camptothecin verursachte Läsionen von Mph1 und RecG zusammen zu einem toxischen Substrat prozessiert werden, während die Anwesenheit jedes einzelnen Proteins allein nur einen moderaten Effekt zeigt. Dieser Befund läßt den Schluß zu, daß eines der beiden Proteine ein Substrat für das andere Protein erzeugt, welches dieses weiter prozessiert oder dessen reguläre Prozessierung verhindert. Im Falle von 4-NQO verursachten Läsionen hat die sequenzielle Prozessierung offenbar kaum einen negativen Einfluß auf das Überleben der Zelle. Durch Camptothecin werden allerdings Strukturen generiert, welche dann zu einem für die Zelle toxischen Produkt umgewandelt werden.

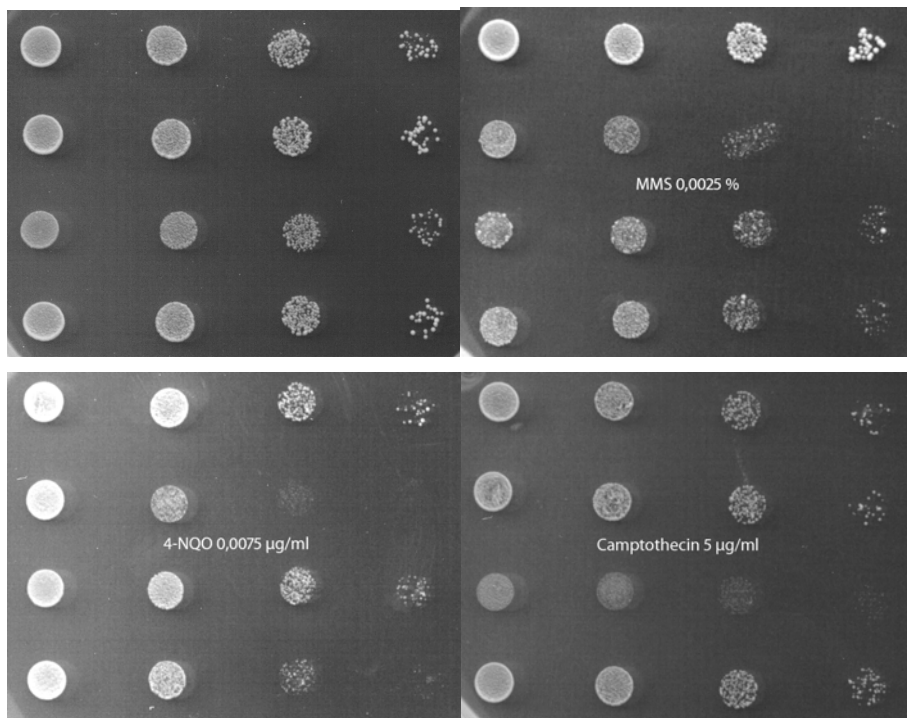


Abb. 29: Sensitivitäten der Stämme CEN.PK 2-1C/pYGET (jeweils oberste Reihe), CEN.PK 2-1C *mph1*/pYGET (jeweils 2. Reihe von oben), CEN.PK 2-1C/pYGET-*recG* (jeweils 3. Reihe von oben) und CEN.PK 2-1C *mph1*/pYGET-*recG* (jeweils 4. Reihe von oben) gegenüber MMS, 4-NQO und Camptothecin. Tropfen mit 10^2 , 10^3 , 10^4 und 10^5 Zellen wurden auf eine Platte ohne Mutagen (oben links) sowie auf Platten mit 0,0025% MMS (oben rechts), $0,0075 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 4-NQO (unten links) sowie $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Camptothecin (unten rechts) getropft und die Platten für 2–3 Tage bei 30°C inkubiert.

Das klonierte *recG*-Gen enthält eine Mutation

Die Sequenzierung des klonierten *recG*-Gens zeigte, daß in der Aminosäuresequenz an Position 601 im Vergleich zur publizierten Wildtypsequenz ein Alanin gegen ein Valin ausgetauscht ist. Es ist allerdings nicht klar, ob es sich bei diesem Austausch nicht um eine natürliche Variation des für die Amplifikation verwandten *DH5 α* -Stammhintergrunds handelt, oder ob durch die Amplifikation eine Mutation eingeführt wurde.

Nach dem kristallisierten Enzym aus *Thermotoga maritima* befinden sich die entscheidenden Elemente zur Bindung der DNA sowie zur potentiellen Erzeugung der *Holliday junction* in Domäne 1, während die ATPase-Aktivität am Übergang von Domäne 1 zu Domäne 2 zu finden ist. Diese vermutlich essentiellen Funktionen sind von der Mutation nicht betroffen. Allerdings finden sich in der betroffenen Domäne 3 Motive, welche charakteristisch für SF2-Helikasen sind, so daß eine Beeinträchtigung der Funktion nicht ausgeschlossen werden kann.

Das in Abb. 30 gezeigte multiple Sequenzalignment mit Aminosäuresequenzen von vermutlich zu RecG homologen Proteinen aus anderen prokaryontischen Organismen zeigt, daß an den entsprechenden Positionen zwar vermehrt kleine Aminosäuren

auftreten, daß die Position allerdings nicht streng konserviert ist. Neben Alanin und Glycin finden sich an der Position in *Haemophilus influenza* und *Deinococcus radiodurans* auch Serin und Threonin, welche ein größeres Volumen als Alanin und Glycin haben. Zusammen mit den beobachteten Befunden, daß RecG offenbar in *Saccharomyces cerevisiae* eine spezifische Funktion zeigt, die sowohl mit den biochemischen als auch mit den genetischen Daten aus *E. coli* in Einklang ist, führt die Aminosäuresubstitution vermutlich nicht zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Funktion des Proteins.



Abb. 30: Ausschnitt eines multiplen Sequenzvergleiches von ausgewählten putativen RecG-Orthologen aus mehreren prokaryontischen Organismen. Die Sequenzveränderung des veränderten Proteins aus *E. coli* (A605V) ist mit einem Stern markiert. Die Abkürzungen stehen für folgende Organismen: Pae: *Pseudomonas aeruginosa*; Ppu: *Pseudomonas putida*; Eco m: *Escherichia coli* modifiziert; Sty: *Salmonella typhimurium*; Pmu: *Pasteurella multocida*; Hin: *Haemophilus influenza*; Fnu: *Fusobacterium nucleatum* subsp.; Bth: *Bacteroides thetaiotaomicron*; Dra: *Deinococcus radiodurans*. Der Vergleich der vollständigen Sequenzen findet sich im Anhang (siehe Seite 182).

Intrazelluläre Lokalisation des Mph1-Proteins

Bereits im Zuge der ersten Charakterisierung des Mph1-Proteins konnte mit Hilfe eines Gfp-Fusionsproteins gezeigt werden, daß das Mph1-Protein im Kern der Zelle lokalisiert ist (SCHELLER *et al.*, 2000). Diese Lokalisation wurde mit einem Stamm durchgeführt, bei welchem das Mph1-Gfp-Fusionsprotein überexprimiert wurde.

Es sollte versucht werden, die Lokalisation in einem Stamm nachzuweisen, bei welchem das *MPH1-GFP*-Gen unter der Kontrolle des natürlichen *MPH1*-Promotors stand. Bei diesen Untersuchungen mit Hilfe konfokaler Mikroskopie wurden Zellen beobachtet, bei denen die Verteilung der Fluoreszenzsignale darauf hindeuteten, daß das Protein auch in den Mitochondrien lokalisiert sein könnte (Daten nicht gezeigt). Diese Hypothese wurde zusätzlich durch eine Studie zum Auffinden nativer Proteinkomplexe in Hefe gestützt, in welcher von einer Interaktion von Mph1 mit einem mitochondrialen Protein berichtet wurde (GAVIN *et al.*, 2002).

Da Mitochondrien über ein eigenes Genom verfügen, muß gewährleistet werden, daß sowohl die Integrität der nukleären als auch der mitochondrialen Chromosomen gewahrt wird. Für humane Zellen konnte gezeigt werden, daß das Protein Ogg1, welches 8-oxo-Guanin aus der DNA entfernt, sowohl in den Nucleus als auch in die Mitochondrien

transportiert wird. Aufgrund des Sauerstoffmetabolismus in den Mitochondrien wird angenommen, daß das Ogg1-Protein zum Schutz der genomischen Integrität gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies in beiden Organellen eingesetzt wird (NISHIOKA *et al.*, 1999). Ließe sich eine Lokalisation von Mph1 im Nukleus und in den Mitochondrien nachweisen, so könnte dies ein Hinweis sein, daß das Mph1-Protein auch an der Erhaltung der genomischen Integrität der mitochondrialen Chromosomen beteiligt ist. Dies würde bedeuten, daß Mph1 eine wesentlich umfassendere Rolle als bisher angenommen spielt.

Bestimmung der Lokalisation des Mph1-Sen-Proteins mit Hilfe von Immuno-Elektronenmikroskopie

Durch immuno-elektronenmikroskopische Aufnahmen läßt sich eine mitochondriale Lokalisation nicht bestätigen

Um die Hypothese einer mitochondrialen Lokalisation des Mph1-Proteins näher zu untersuchen, sollte das Mph1-Proteins mit Hilfe von immuno-elektronenmikroskopischen Untersuchungen lokalisiert werden.

Für die Immuno-Lokalisation wurde der Stamm CEN.PK 2-1C *mph1/pRS313-MPH1-SEN*, in welchem an das *MPH1*-Gen ein Sendai-Epitop fusioniert wurde und unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors steht (Quelle: A. SCHÜRER), in Selektivmedium mit Galactose zur Induktion des *GAL1*-Promotors angezogen. Die Probe wurden in Lowicryl-Harz eingebettet (siehe Seite 54). Dann wurden mit dem Ultramikrotom Dünnschnitte angefertigt und nacheinander mit den Antikörpern anti-Sendai aus Maus und anti-Maus aus Ziege, konjugiert mit 15 nm Goldpartikeln, inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit Bleicitrat nach REYNOLDS und Uranylacetat kontrastiert (siehe auch Seite 57) und im Transmissionselektronenmikroskop untersucht.

Aus Abb. 31 läßt sich erkennen, daß sich mit Hilfe der Immuno-Elektronenmikroskopie die Kernlokalisierung bestätigen läßt. Es ist deutlich eine große Zahl von Goldpartikeln im Nukleus zu erkennen, während sich im umgebenden cytoplasmatischen Raum nur vereinzelt Goldpartikel finden lassen. Allerdings findet sich in dem ebenfalls in Abb. 31 gezeigten Mitochondrium keine deutlich erhöhte Anzahl von Goldpartikeln. Auch in einer Reihe anderer Zellen ließ sich innerhalb der Mitochondrien keine deutliche erhöhte Zahl an Goldpartikeln nachweisen (siehe Abb. 32).

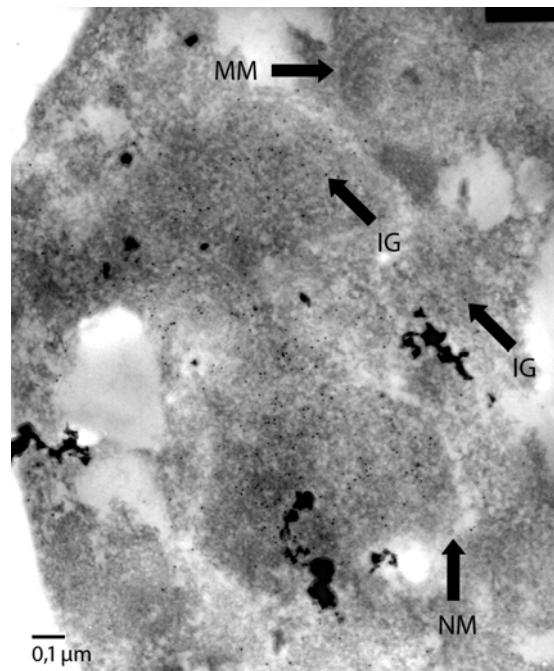


Abb. 31: Immuno-elektronenmikroskopischer Nachweis der Kernlokalisierung des Mph1-Protein. Der Stamm CEN.PK 2-1C *mph1/pRS313-GAL1-MPH1-SEN* wurde in Selektivmedium mit Galactose zur Induktion des *GAL1*-Promotors angezogen. Die Zellen wurden Lowicryl-Harz eingebettet und mit dem Ultramikrotom geschnitten. Die Schnitte wurden nacheinander mit den Antikörpern anti-Sendai aus Maus (Verdünnung: 1:10) und anti-Maus aus Ziege, konjugiert mit 15 nm Goldpartikeln (Verdünnung: 1:60), inkubiert. Ultradünnschnitte wurden mit Bleicitrat nach Reynolds und Uranylacetat (4%) kontrastiert. Die Kernmembran (NM) und ein Mitochondrium (MM) sowie einige ausgewählte Goldpartikel (IG) wurden markiert.

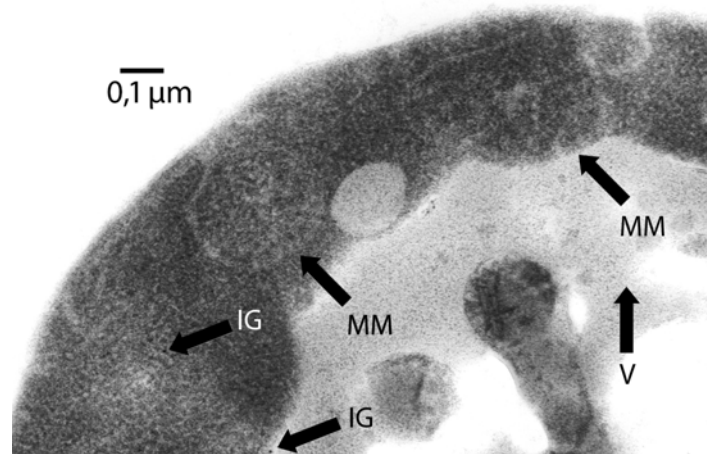


Abb. 32: Elektronenmikroskopische Darstellung von Mitochondrien des Stammes CEN.PK 2-1C *mph1/pRS313-GAL1-MPH1-SEN* (siehe Abb. 31). Zwischen der Vakuole (V) und der Außenwand sind deutlich zwei Mitochondrien (MM) zu erkennen, in welchen sich keine Goldpartikel erkennen lassen. Im Cytoplasma wurden zwei unspezifisch gebundene Goldpartikel (IG) markiert.

Aus den Abbildungen geht hervor, daß sich in dem gewählten Versuchssystem eine mitochondriale Lokalisation des Mph1-Proteins offenbar nicht nachweisen läßt. Allerdings schließt dies eine mitochondriale Lokalisation nicht endgültig aus. Ist die Konzentration des Proteins in den Mitochondrien deutlich geringer als im Kern, so ist möglicherweise selbst bei einer Überexpression die Proteinkonzentration unter der Nachweisgrenze.

Bestimmung der Lokalisation des Mph1-Sen-Proteins mit Hilfe von Immunfluoreszenzmikroskopie

Das Mph1-Protein läßt sich mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nicht in den Mitochondrien nachweisen

Für die Bestätigung des Befundes der immuno-elektronenmikroskopischen Untersuchung wurde untersucht, ob die Kernlokalisation des Mph1-Sen-Fusionsproteins mit Hilfe von Immunfluoreszenzmikroskopie nachweisbar ist und ob es möglich ist, mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie eine mitochondriale Lokalisation nachzuweisen.

Für die Immunmarkierung wurde der Stamm CEN.PK 2-1C *mph1/ pRS313-GAL1-MPH1-SEN* in Medium mit Galactose zur Induktion des *GAL1*-Promotors angezogen. Die Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert, die Zellwand enzymatisch entfernt und die so permeabilisierten Zellen mit dem primären anti-Sendai-Antikörper aus Maus sowie dem sekundären FITC-konjugierten anti-Maus-Antikörper aus Ziege inkubiert. Die DNA wurde durch Inkubation der permeabilisierten Zellen mit DAPI-Lösung ($1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) markiert. Dann wurden die einzelnen Proben mit ProLong-Antifade überschichtet und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Für die in Abb. 33 gezeigte Überlagerung der Bilder wurden die Fluoreszenzsignale der DAPI-Färbung mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogramms rot eingefärbt. Aus den in der Überlagerung entstehenden gelben Bereichen läßt sich eine übereinstimmende Lokalisation von Kern/Mitochondrien und mit dem Antikörper markiertem Protein ersehen.

Wie bereits bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen läßt sich die Kernlokalisation des Mph1-Proteins eindeutig bestätigen (Abb. 33). Allerdings ergab auch die Immunfluoreszenz keine Hinweise auf eine mitochondriale Lokalisation. Die Mitochondrien erscheinen in der DAPI-Färbung als distinkte kleine Punkte neben der großflächigen Färbung der nukleären DNA. In mehreren in Abb. 33 gezeigten, mit DAPI gefärbten Zellen lassen sich diese Punkte gut erkennen, während man in den Immunfluoreszenzaufnahmen an den entsprechenden Stellen keine Signale erkennt. Diese Bilder unterstützen also die bereits mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie gewonnenen Daten, daß das Mph1-Protein im Kern, nicht aber in den Mitochondrien lokalisiert ist.

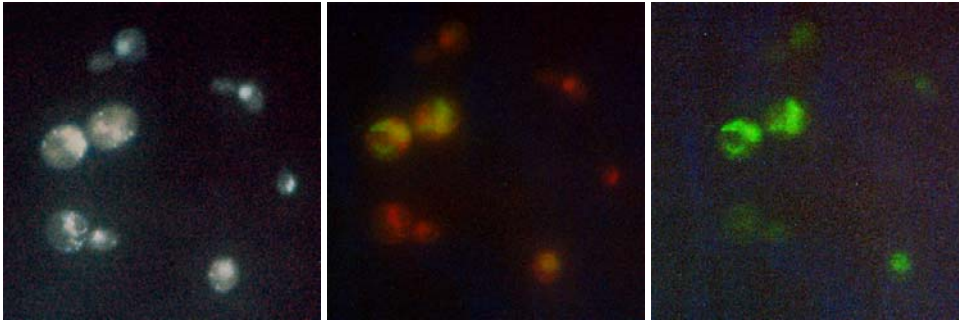


Abb. 33: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Mph1-Proteins nach Antikörpermarkierung sowie der Kern- und der mitochondrialen DNA mit Hilfe von DAPI. Der Stamm CEN.PK 2-1C *mph1/pRS313-GAL1-MPH1-SEN* wurde in Selektivmedium mit Galactose zur Induktion des *GAL1*-Promotors angezogen. Die Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert und die Zellwand entfernt. Die Markierung erfolgte mit anti-Sendai-Antikörpern aus Maus (Verdünnung: 1:10) und anti-Maus-Antikörpern aus Ziege, konjugiert mit FITC (Verdünnung: 1:1000). Die Färbung von Kern- und mitochondrialer DNA wurde durch Inkubation der Zellen mit DAPI ($1\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) erreicht. Die DAPI-Aufnahmen wurden mit dem Zeiss-Filtersatz 487902, die FITC-Aufnahmen mit dem Filtersatz 487909 gemacht. Für die Überlagerung wurde die DAPI-Aufnahme rot eingefärbt, um Übereinstimmungen der Fluoreszenzsignale beider Bilder gelb hervortreten zu lassen.

Untersuchung der Lokalisation von Mph1 in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß der fehlende Nachweis einer mitochondrialen Lokalisation an der mangelnden Konzentration des Proteins in den Mitochondrien liegen kann. Da das Protein offenbar an der fehlerfreien Umgehung von DNA-Läsionen beteiligt ist, wäre es denkbar, daß es nicht permanent in den Mitochondrien vorhanden ist, sondern nur während der mitochondrialen Replikation dorthin transportiert wird. Um zu untersuchen, ob sich das Protein in bestimmten Phasen des Zellzyklus in den Mitochondrien nachweisen läßt, wurde der Stamm CEN.PK 2-1C *mph1/pRS313-GAL1-MPH1-SEN* in Medium mit Galactose zur Induktion des *GAL1*-Promotors angezogen. Die Zellen wurden mit Hilfe von α -mating factor in G_1 des Zellzyklus arretiert. Nach Entfernung des α -mating factor wurde nach 30, 60 und 90 min Proben entnommen und diese wie beschrieben für die Immunofluoreszenz aufgearbeitet (siehe Seite 58).

Die Untersuchung zeigt, daß sich zu den gewählten Zeitpunkten keine Lokalisation des Mph1-Proteins in den Mitochondrien nachweisen läßt (in Abb. 34 wurden die Proben 30 min nach Entfernung des α -mating factors entnommen; weitere Daten sind nicht gezeigt).

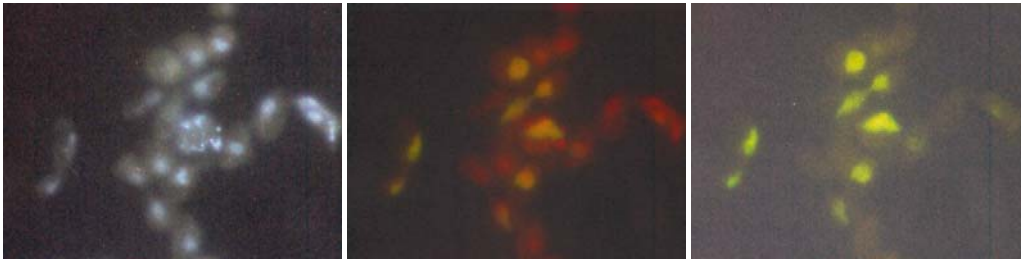


Abb. 34: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Mph1-Proteins 30 min nach Ende des Zellzyklusarrestes durch α -mating factor. Der Stamm CEN.PK 2-1C *mph1*/pRS313-GAL1-MPH1-SEN wurde in Selektivmedium mit Galactose zur Induktion des GAL1-Promotors angezogen. Die Kultur wurde mit Hilfe von α -mating factor in G₁ des Zellzyklus arretiert. Der α -mating factor wurde entfernt und nach 30 min eine Probe entnommen. Die Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert und die Zellwand entfernt. Die Markierung erfolgte mit anti-Sendai-Antikörpern aus Maus (Verdünnung: 1:10) und anti-Maus-Antikörpern aus Ziege, konjugiert mit FITC (Verdünnung: 1:1000). Die Färbung von Kern- und mitochondrialer DNA wurde durch Inkubation der Zellen mit DAPI (1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) erreicht. Die DAPI-Aufnahmen wurden mit dem Zeiss-Filtersatz 487902, die FITC-Aufnahmen mit dem Filtersatz 487909 gemacht. Für die Überlagerung wurde die DAPI-Aufnahme rot eingefärbt, um Übereinstimmungen der Fluoreszenzsignale beider Bilder gelb hervortreten zu lassen.

Untersuchung der Lokalisation von Mph1 in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus nach Behandlung mit 4-NQO

Um zu untersuchen, ob sich Mph1 u.U. nur bei einer erhöhten Schadensdichte in den Mitochondrien aufhält, wurde eine Kultur des Stammes CEN.PK 2-1C *mph1* pRS313-GAL1-MPH1-Sen mit $1\cdot 10^7$ Zellen $\cdot\text{ml}^{-1}$ angeimpft und nach 1 h Inkubation bei 30°C mittels α -mating factor im Zellzyklus arretiert. Anschließend wurde der α -mating factor entfernt und die Zellen in Medium mit $0,16\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 4-NQO resuspendiert und bei 30°C inkubiert. Nach 30, 60 und 90 min wurden Proben entnommen und in gleicher Weise wie beschrieben prozessiert.

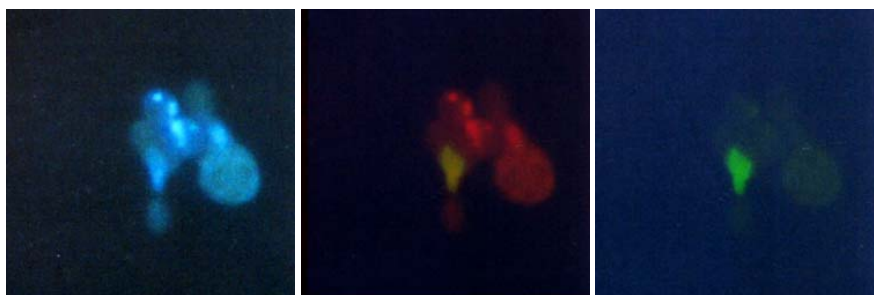


Abb. 35: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Mph1-Proteins nach 90 minütiger Inkubation einer synchronisierten Kultur mit 4-NQO (siehe auch Abb. 33). Die Zellen wurden nach dem Ende des α -Faktorarrestes für 90 min in Medium mit $0,16\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 4-NQO angezogen und anschließend die Immunmarkierung durchgeführt.

Aus Abb. 35 geht hervor, daß sich auch nach 90 minütiger Behandlung der Zellen mit 4-NQO keine Lokalisation in den Mitochondrien nachweisen läßt (Daten nach 30 und

60 min sind nicht gezeigt). Offenbar führt also auch eine erhöhte Schadensdichte nicht zu einer Lokalisation des Mph1-Proteins in den Mitochondrien.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß kein Hinweis für eine Lokalisation des Mph1-Proteins in den Mitochondrien gefunden wurde. Damit erscheint eine Beteiligung des Mph1-Proteins an mitochondrialen Reinitiationsprozessen unwahrscheinlich.

DISKUSSION

Möglichkeiten für den Nachweis von Arresten des Replisoms

Biochemischer Nachweis von arretierten Replikationsgabeln

Nachweis von Doppelstrangbrüchen

Die durch MICHEL *et al.* gezeigten Daten deuten darauf hin, daß arretierte Replikationsgabeln über das Auftreten von Doppelstrangbrüchen nachgewiesen werden können (MICHEL *et al.*, 1997). Diese Hypothese stützt sich hauptsächlich auf folgende Befunde:

Durch UZEST *et al.* wurde gezeigt, daß *rep recBC*-Mutanten nicht lebensfähig sind. Zusammen mit weiteren Daten wurde hieraus die Hypothese abgeleitet, daß es in *rep*-Mutanten häufiger zu einem Arrest der Replikation kommt. Im Zuge eines solchen Arrestes entstehen doppelsträngige DNA-Enden, welche entweder degradiert, oder durch homologe Rekombination prozessiert werden müssen (UZEST *et al.*, 1995). Diese Hypothese konnte durch die Befunde gestützt werden, nach denen es in *rep recB_{ts} recC_{ts}*-Mutanten bei nichtpermissiver Temperatur zu einer Akkumulation von Doppelstrangbrüchen kommt (MICHEL *et al.*, 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß eine ektopische *ter-site* (siehe auch Seite 19) im Chromosom von *E. coli* vermehrt zur Bildung von Doppelstrangbrüchen führt (BIDNENKO *et al.*, 2002). Diese Daten untermauern die Hypothese, daß durch stabile DNA-Protein-Komplexe, welche zu einem Arrest der Replikation führen, vermehrt Doppelstrangbrüche entstehen.

Problematisch an diesem experimentellen System ist, daß für den Nachweis von Doppelstrangbrüchen in *E. coli* artifizielle Bedingungen geschaffen werden müssen, indem z.B. Proteine der homologen Rekombination ausgeschaltet werden und dann die Menge auftretender Doppelstrangbrüche nach der Deletion zusätzlicher Gene (wie z.B. *rep*) bestimmt wird. Es ist nicht ohne weiteres möglich, direkt den Einfluß bestimmter Mutationen in einem ansonsten Wildtyphintergrund zu untersuchen.

Nachweis von Holliday junctions

Neben dem Nachweis auftretender Doppelstrangbrüche, welche u.a. durch die Auflösung von *Holliday junctions* durch Resolvasen entstehen, ist es ebenfalls möglich, *Holliday junctions*, die gemäß dem in der Einleitung dargelegten Modell (siehe Seite 17) als Intermediat auftreten, direkt nachzuweisen. Dies ist z.B. durch 2D-Gelelektrophorese möglich. In *Saccharomyces cerevisiae* konnte durch dieses Verfahren gezeigt werden, daß in rDNA-

Bereichen während der S-Phase *Holliday junctions* gebildet werden und daß die Bildung abhängig von Rad52 ist, nicht aber von Rad51, Rad55 und Rad57 (ZOU & ROTHSTEIN, 1997).

Als eine weitere Möglichkeit können mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugation nach Dichtemarkierung der DNA Replikationsintermediate isoliert werden. Mittels diese Methode konnte durch HIGGINS *et al.* die Bildung von *Holliday junctions* in humanen Zellen gezeigt werden (HIGGINS *et al.*, 1976). Zu diesem Zweck wurden humane Zellen in normalem Medium angezogen. Anschließend wurden die Zellen 2 h mit Bromdeoxyuridin (BrdU) inkubiert. Dem Medium wurde für 1 h MMS zugesetzt und anschließend die Zellen für 1 h in Medium mit BrdU aber ohne MMS postinkubiert. Die DNA wurde geschert und auf einem neutralen Cäsiumchlorid-Gradienten aufgetrennt. Man sollte erwarten, daß die Replikationsintermediate eine intermediäre Dichte besitzen. Aus den entsprechenden Fraktionen wurde DNA präpariert. Mit Hilfe von Elektronenmikroskopie konnten *Holliday junctions* in der derart präparierten DNA nachgewiesen werden (HIGGINS *et al.*, 1976).

Durch eine ähnliche experimentelle Prozedur konnten auch in befruchteten Eizellen von *Drosophila melanogaster* *Holliday junctions* nach Behandlung mit Mutagenen nachgewiesen werden (INMAN, 1984).

Derartige Strukturen konnten bisher in Wildtypzellen von *Saccharomyces cerevisiae* nach Behandlung mit Hydroxyharnstoff nicht direkt nachgewiesen werden. In ebenso behandelten *rad53*-Deletionsmutanten wurden hingegen eine Reihe ungewöhnlicher Strukturen elektronenmikroskopisch detektiert, unter denen sich auch *Holliday junctions* befanden. Offenbar sorgt also die Auslösung des *checkpoints* durch Rad53 in Wildtypzellen dafür, daß die Entstehung von ungewöhnlichen Replikationsintermediaten vermieden wird (SOGO *et al.*, 2002).

Die Problematik sowohl bei dem Nachweis von Doppelstrangbrüchen als auch bei dem direkten Nachweis von Replikationsintermediaten, welche an Arresten der Replikation entstehen, besteht darin, daß artifizielle Bedingungen gewählt werden müssen, um derartige Strukturen überhaupt zu finden. Es wäre ein Vorteil, wenn ein experimentelles System auch unter normalen Wachstumsbedingungen einen Einblick in die Mechanismen zur Umgehung von DNA-Läsionen leisten könnte.

Indirekte Systeme zum Nachweis von Reinitiationsintermediaten

In E. coli führen Mutationen von Genen, welche eine Instabilität der Replikationsgabeln bewirken, vermehrt zur Deletion von Sequenzduplikationen

Es sprechen viele Befunde dafür, daß der Nachweis von Replikationsarresten auch indirekt auf genetischem Wege erfolgen kann. So konnte durch LOVETT *et al.* gezeigt werden, daß die Deletion bestimmter Gene einen Einfluß auf die Stabilität direkter Sequenzwiederholungen hat. Dies gilt sowohl für plasmidlokalisierte als auch für

chromosomal lokalisierte Sequenzwiederholungen. Diese Ereignisse sind nur partiell vom Vorhandensein von RecA abhängig (LOVETT *et al.*, 1993).

Durch SAVESON & LOVETT wurde anhand dieses Systems gezeigt, daß die Inaktivierung der replikativen Helikase DnaB in *E. coli* zu einer deutlich erhöhten Rate von Deletionsereignissen führt. Es wurde spekuliert, daß in diesen Mutanten häufiger Replikationsgabeln arretieren. Die hierbei vermehrt entstehenden Doppelstrangbrüche wären dann für die verstärkt auftretenden Deletionen verantwortlich (SAVESON & LOVETT, 1999). Ein ähnlicher Effekt ließ sich bei der Deletion von *hold* beobachten, welches eine Komponente des *clamp loaders* ist. Auch hier wurde die Hypothese aufgestellt, daß es durch das Fehlen von Hold zu einer Destabilisierung des Replisoms und damit häufiger zu Arresten der Replikation kommt. Diese würden dann vermehrt zu doppelsträngigen DNA-Enden und somit vermehrt zu Deletionen der Sequenzwiederholungen führen (FLORES *et al.*, 2001)

Durch BIERNE *et al.* wurde die Hypothese aufgestellt, daß, sofern doppelsträngige DNA-Enden für die Instabilität von Sequenzwiederholungen zuständig sind, die Deletion von *recD* eine massive Erhöhung der Deletionsfrequenz von Duplikation zur Folge haben sollte, da hier die Halbwertszeit auftretender linearer DNA durch die fehlende Exonukleaseaktivität des RecBCD-Komplexes deutlich erhöht sein sollte. Genau dieser Effekt konnte in *recD*-Deletionsmutanten nachgewiesen werden (BIERNE *et al.*, 1997b).

Geht man davon aus, daß die Deletionsereignisse auf einer Stranginvasion des durch den RecBCD-Komplex hervorgerufenen einzelsträngigen 3'-Endes beruhen, dann sollte die Deletion von *recA* zu einer massiven Erniedrigung der Deletionsereignisse führen, da das RecA-Protein für die homologiebasierte Invasion des einzelsträngigen 3'-Endes sorgt (COX *et al.*, 2000; MICHEL *et al.*, 2001). Interessant ist, daß sowohl von LOVETT *et al.* als auch von BIERNE *et al.* gezeigt wurde, daß die Deletion von *recA* sowohl im Falle von plasmidbasierten Systemen als auch bei chromosomal lokalisierten Sequenzwiederholungen nur zu einer moderaten Erniedrigung der Deletionsraten führt. Aus diesen Daten wurde gefolgert, daß es offenbar neben der *recA*-abhängigen Rekombination weitere Prozesse gibt, welche für die Deletionsereignisse eine wichtige Rolle spielen (LOVETT *et al.*, 1993; BIERNE *et al.*, 1997b).

Eine vorgeschlagene Möglichkeit ist hierbei das sogenannte *primer template slippage*, bei welchem ein Primer kurzzeitig vom *template* gelöst wird und an der falschen Position wieder mit diesem hybridisiert, wobei eine Schleife ausbildet wird, welche aus den übersprungenen Basen besteht (LOVETT *et al.*, 1993; BIERNE *et al.*, 1997b; MICHEL, 2000).

*In Eukaryonten führt die Behandlung mit Mutagenen
zu einer Erhöhung der Frequenzen von Deletionsereignissen*

Wenn der Arrest der Replikationsgabel zur Bildung doppelsträngiger DNA-Enden und damit zur Deletion von Sequenzwiederholungen führt, dann sollte die Behandlung mit Chemikalien, welche replikationsarretierende Läsionen zur Folge haben, zu einer erhöhten Frequenz von Deletionsereignissen führen.

Diese Hypothese konnte durch Experimente in Hamsterzellen gestützt werden. Für die Messungen wurde eine *hprt*⁻-Mutante gewählt, bei welcher im *hprt*-Gen Exon 7 sowie ein Teil von Exon 6 spontan dupliziert war. Hier konnten Deletionen der Duplikation durch Selektion auf den *HPRT*⁺-Phänotyp identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, daß sich die Frequenz von Deletionsereignissen durch die Behandlung mit Camptothecin steigern läßt (ARNAUDEAU *et al.*, 2001).

Dieser Effekt wurde auch bei dem in dieser Arbeit verwendeten experimentellen System in *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen. Sowohl die Behandlung der Zellen mit Camptothecin als auch mit 4-NQO führte zu einer Erhöhung der Deletion von Sequenzwiederholungen. Dies galt sowohl für Duplikationen, welche sich auf einem Plasmid befanden, wie auch für chromosomal lokalisierte Duplikationen.

Eignet sich die Messung der Deletionen von Sequenzduplikationen für die Bestimmung von Replikationsarresten?

Prinzipiell lassen sich die in Sequenzduplikationen auftretenden Deletionsereignisse auf drei unterschiedliche Mechanismen zurückführen.

- 1) Deletionen können durch sogenanntes *primer template slippage* entstehen. Diese Hypothese wird durch die Befunde unterstützt, daß nur ein Teil der Deletionsereignisse in *E. coli* auf die Anwesenheit von RecA zurückgeht.
- 2) Deletionen können durch die Reparatur von nicht replikationsinduzierten Doppelstrangbrüchen entstehen. Entsteht in der Nähe einer Sequenzwiederholung ein Doppelstrangbruch, so wird das Ende durch die Enzyme der Doppelstrangbruchreparatur prozessiert. Hierdurch entsteht ein einzelsträngiges 3'-Ende, das in das intakte Chromosom eingeführt werden kann. In *E. coli* ist die Reparatur von Doppelstrangbrüchen auf diesem Weg nur möglich, wenn nach der Replikation ein zweites Chromosom in der Zelle vorliegt (KUZMINOV, 1995).
- 3) Deletionsereignisse können durch arretierte Replikationsgabeln ausgelöst werden, wobei hier zwei Mechanismen denkbar sind:
 - a) Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß eine Läsion auf dem *lagging strand template* nicht zu einem Arrest der Replikationsgabel führt, sondern daß lediglich ein Okazaki-Fragment nicht geschlossen werden kann (siehe Seite 17). Die entstehende Lücke kann entweder mittels Transläsionssynthese oder über rekombinative Prozesse geschlossen werden. Es ist also denkbar, daß es im Zuge der rekombinativen Prozesse ebenfalls zu Deletionen kommt.
 - b) Es kann zu einem Arrest der *leading strand* Polymerase kommen, welcher in der Bildung einer *Holliday junction* resultieren kann. Wird diese geschnitten, entsteht ein doppelsträngiges DNA-Ende, welches wie beschrieben durch die Enzyme der Doppelstrangbruchreparatur prozessiert werden kann, um eine Reinitiation zu ermöglichen.

Um zu untersuchen, welcher Anteil an Deletionsereignissen in *Saccharomyces cerevisiae* auf homologe Rekombination zurückzuführen ist, wurde die spontane Reversionsrate des

verwendeten KanKanMX4-Moduls in *rad52*-Deletionsmutanten untersucht. Da das Rad52-Protein eines der Schlüsselenzyme der Rekombination ist (AGUILERA, 2001), sollte man erwarten, daß sich aus der Rate der Reversionsereignisse in *rad52*-Mutanten ableiten läßt, welchen Einfluß rekombinative Prozesse auf die spontane Reversionsrate haben.

In einer *rad52*-Deletionsmutante wurde eine 40fache Erniedrigung der spontanen Reversionsrate gemessen. Dies ist ein guter Hinweis dafür, daß die Rad52-abhängige Rekombination eine prominente Rolle bei der Entstehung von Reversionsereignissen in *Saccharomyces cerevisiae* spielt. Allerdings ist die spontane Reversionsrate einer *rad52 mph1*-Doppelmutante noch stärker erniedrigt; diese genetische Interaktion ist formal synergistisch. Dieser Befund könnte dergestalt erklärt werden, daß Mph1 an einem alternativen Prozeß beteiligt ist, wobei beide Prozesse partiell überlappende Substratspektren besitzen. Es könnte sich also um den in *E. coli* unabhängig von RecA ablaufenden Prozeß handeln, für welchen postuliert wurde, daß es sich um *primer template slippage* handelt (LOVETT *et al.*, 1993; BIERNE *et al.*, 1997b).

Natürlich kann eine Beteiligung von Mph1 an einem Prozeß, welcher vermehrt zu *primer template slippage* Ereignissen führt, nicht ausgeschlossen werden. Gegen diese Hypothese sprechen allerdings mehrere Befunde.

So konnte in *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt wurde, daß die mitotische Rekombinationsrate in *sgs1*-Deletionsmutanten sowohl bei homeologen (MYUNG *et al.*, 2001) als auch bei homologen Substraten erhöht ist (WATT *et al.*, 1996; MYUNG *et al.*, 2001). Diese erhöhte Rate mitotischer Rekombination ist dabei jedoch nur teilweise von Rad52 abhängig (WATT *et al.*, 1996). Offenbar gibt es also in Hefe zu Rad52 alternative Wege, welche ebenfalls rekombinativ sind.

Weiterhin konnten sowohl für die spontanen Mutationsraten als auch für die Sensitivitäten gegenüber Mutagenen epistatische Interaktionen von *rad51* und *rad55* mit *mph1* gezeigt werden (SCHÜRER *et al.*, in Vorbereitung). Diese Befunde deuten eher auf eine Beteiligung von Mph1 an einem rekombinativen Prozeß hin.

Neben diesen Befunden deuten die Daten der Mutationsraten sowie der induzierten Mutagenese darauf hin, daß Mph1 vornehmlich an der fehlerfreien Umgehung kleiner DNA-Läsionen beteiligt ist und daß diese in Abwesenheit von Mph1 gezielt durch die Transläsionssynthese überlesen werden. Es ist also vergleichsweise schwer vorstellbar, warum es bei einem Arrest der Polymerasen an kleinen DNA-Läsionen im Wildtyp durch die Aktivität von Mph1 zur fehlerfreien Umgehung der Läsionen vermehrt zu *primer template slippages* kommen sollte, während in *mph1*-Mutanten die letztgenannten durch den Einsatz der Transläsionssynthese vermieden werden. Vielmehr erscheint es u.a. aufgrund der Epistasie von *mph1* zu *rad51* und *rad55* plausibel, daß Mph1 an einem weiteren rekombinativen Wegen zur Umgehung von DNA-Läsionen beteiligt ist. Aufgrund der synergistischen Interaktion von *mph1* mit *rad52* bezüglich der spontanen Reversionsraten könnte man postulieren, daß diese rekombinativen Wege unabhängig von Rad52 sind.

Eine Beteiligung von Mph1 an der rekombinativen Reparatur von Doppelstrangbrüchen erscheint hingegen unwahrscheinlich, da *mph1*-Mutanten keine ausgeprägte

Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung besitzen (SCHELLER *et al.*, 2000). Hinzu kommen experimentelle Daten, nach denen *mph1*-Mutanten einen Hyperrekombinationsphänotyp besitzen (A. SCHÜRER, unveröffentlicht). Auch dies spricht gegen eine Beteiligung von Mph1 an der rekombinativen Reparatur von Doppelstrangbrüchen.

Die vorhandenen Daten deuten also darauf hin, daß in *Saccharomyces cerevisiae* die beobachteten Deletionsereignisse hauptsächlich auf rekombinative Mechanismen zurückzuführen sind, während dem *primer template slippage* nur eine untergeordnete Bedeutung zukommt. Eine Beteiligung von Mph1 am letztgenannten Mechanismus kann zwar nicht ausgeschlossen werden, erscheint aber aufgrund der genetischen Befunde eher unwahrscheinlich. Offensichtlich lassen sich also anhand des KanKanMX4-Moduls Rekombinationsereignisse nachweisen, welche in Zusammenhang mit Replikationsprozessen stehen. Das System unterscheidet allerdings nicht zwischen Rekombinationsprozessen zur Reinitiation der *leading strand* Polymerase und dem Auffüllen einzelsträngiger DNA-Bereiche des *lagging strand*.

Ein großer Vorteil dieses genetischen Systems besteht im Vergleich zu den biochemischen Methoden allerdings darin, daß sich die Deletionereignisse sowohl unter »natürlichen« Bedingungen als auch nach Behandlung mit Mutagenen problemlos bestimmen lassen.

Welche Strukturen können bei einem Arrest des Replisoms entstehen?

Die Strukturen der bei einem Arrest der Replikation entstehenden Intermediate sind vielfältig und hängen von der Natur des Arrests ab

Es wurde bereits ausgeführt, daß immer mehr Untersuchungen darauf hindeuten, daß in der Zelle auftretende Replikationsintermediate sich in Abhängigkeit von den Hindernissen, welche zum Arrest geführt haben, unterscheiden (siehe Seite 17). Die möglichen Strukturen seien hier noch einmal kurz zusammengefaßt.

- 1) Für ein Thymin-Dimer auf der Matrize für den *leading strand* konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, daß es zu einer Entkopplung der *leading* und der *lagging strand* Polymerase kommt. Der *lagging strand* wird hierbei in *E. coli* rund 1000–2000 Nukleotide über das Ende des *leading strand* hinaus verlängert (CORDEIRO-STONE *et al.*, 1999; PAGÈS & FUCHS, 2003).
- 2) Anhand einer in ein Plasmid eingesetzten *ter-site* konnte gezeigt werden, daß der Arrest eines Replisoms an einem *ter/Tus*-Komplex *in vitro* ein anderes Intermediat zur Folge hat. Hier ist der *leading strand* rund 50–70 Nukleotide länger als der *lagging strand* (HILL & MARIANS, 1990).
- 3) In Hefe wurde gezeigt, daß sich ein Replisom, welches an einer natürlichen Barriere vor den rDNA-*clustern* arretiert, wiederum von den beiden beschriebenen Strukturen unterscheidet. Hier war die Länge des *leading* und des *lagging strand* nahezu gleich.

Bemerkenswert ist bei dieser Struktur, daß an der arretierten Replikationsgabel die einzelsträngigen Bereiche sehr kurz sind (GRUBER *et al.*, 2000).

- 4) Erreicht eine Replikationsgabel einen Einzelstrangbruch, so wird dieser durch die Replikation in einen Doppelstrangbruch überführt, so daß es zu einem Kollaps der Replikationsgabel kommt (KUZMINOV, 1995; KUZMINOV, 2001).

Die unterschiedlichen Replikationsintermediate können auf unterschiedliche Arten aufgelöst werden

Aufgrund der unterschiedlichen Strukturen kann man vermuten, daß die Reinitiation entsprechend der Intermediate jeweils auf unterschiedliche Art und Weise erfolgt.

Fehlerfreie Reinitiation nach Arresten an kleinen DNA-Läsionen

Bei den an kleinen Läsionen auftretenden Arresten besteht das Problem darin, daß sich die Läsion im Gegensatz zu DNA-Protein-Komplexen oder Sekundärstrukturen der DNA, nicht ohne weiteres entfernen läßt. Die meisten Reparatursysteme sind darauf angewiesen, Läsionen aus der DNA herauszuschneiden und anhand der Information des komplementären Stranges die Lücke zu schließen. Dies ist allerdings bei einem Arrest nicht ohne weiteres möglich, da an der Replikationsgabel die Stränge entwunden vorliegen.

Eine Möglichkeit besteht darin, die Replikationsgabel unter Ausbildung einer *Holliday junction* zurückzusetzen, so daß die Läsion sich wieder im doppelsträngigen Bereich befindet. Ist diese Struktur stabil, kann die Läsion über die gängigen Reparaturprozesse wie Nukleotidexcisionsreparatur oder Basenexcisionsreparatur entfernt werden.

Eine weitere Möglichkeit besteht in dem von HIGGINS *et al.* vorgeschlagenen Modell des *polymerase strand switch*. Auch hier wird eine *Holliday junction* ausgebildet. Da der *lagging strand* über das Ende des *leading strand* hinaus elongiert wurde, kann der *lagging strand* als Matrize für die Elongation des *leading strand* dienen. Durch Verschiebung der Struktur in Richtung der Replikation könnte eine fehlerfreie Überbrückung der Läsion erfolgen, wobei diese aber nach wie vor in der DNA persistiert und später entfernt werden muß (HIGGINS *et al.*, 1976; COX, 2001; MCGLYNN & LLOYD, 2002). In diesem Fall muß allerdings dafür Sorge getragen werden, daß die *Holliday junction* nicht vorzeitig z.B. durch Resolvasen geschnitten wird. Erfolgt eine solche Auflösung vor dem *polymerase strand switch*, würde die Invasion des 3'-Endes zwangsläufig vor der Läsion erfolgen und eine effiziente Elongation durch die DNA-Polymerasen wäre nicht möglich.

Für den Zeitpunkt der Auflösung der *Holliday junctions* durch Resolvasen gibt es mehrere denkbare Möglichkeiten. Der Arm bestehend aus *leading* und *lagging strand* kann vor der Auflösung der *Holliday junction* von den Enzymen der homologen Rekombination prozessiert und das entstehende 3'-Ende hinter der Läsion in die DNA eingeführt werden. An dieser Stelle kann dann die Assemblierung des Reinitiationsprimosoms erfolgen. Für eine erfolgreiche Reinitiation der Replikation muß die *Holliday*

junction nach der Invasion des 3'-Endes durch Resolvasen aufgelöst werden (HYRIEN, 2000; MCGLYNN & LLOYD, 2002).

Alternativ kann die *Holliday junction* auch vor der Invasion des 3'-Endes durch Resolvasen geschnitten werden, wobei ein vollständiges Chromosom sowie ein Teilchromosom mit einem doppelsträngigen DNA-Ende entsteht. Dieses kann wiederum durch die Enzyme der Doppelstrangbruchreparatur prozessiert werden, wobei ein einzelsträngiger 3'-Überhang entsteht. Dieser kann unter Ausbildung eines *D-loop* in das Chromosom eingeführt und an dieser Struktur das Reinitiationsprimosom assembliert werden (MICHEL, 2000; COX, 2001; MCGLYNN & LLOYD, 2002).

Gemein ist allen beschriebenen Prozessen, daß es zur Ausbildung einer *Holliday junction* kommt. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß *in vitro* gezeigt wurde, daß das bevorzugte Substrat von RecG eine Gabelstruktur der DNA ist, welche einer Replikationsgabel ähnelt, bei welcher der *lagging strand* über das Ende des *leading strand* hinaus verlängert ist. Dieses Substrat kann durch RecG *in vitro* in eine Struktur umgewandelt werden, welches durch die Resolvase RuvC geschnitten wird (MCGLYNN & LLOYD, 2001). Diese Befunde haben zu der Hypothese geführt, daß RecG für die Bildung von *Holliday junctions* verantwortlich ist, wobei das (zumindest *in vitro*) gebundene Substrat demjenigen entspräche, welches bei einem Arrest der Polymerase des *leading strands* an einer kleinen Läsion entsteht (CORDEIRO-STONE *et al.*, 1999; PAGÉS & FUCHS, 2003).

Wie durch RecG aus dem gebundenen Substrat eine *Holliday junction* gebildet werden könnte, wurde anhand der Kristallstruktur des RecG-Proteins aus *Thermotoga maritima* gezeigt. Aus dem Cokristall mit DNA wurde geschlossen, daß das RecG-Protein am Verzweigungspunkt bindet, wobei die Furchen für die parentalen Stränge so schmal sind, daß nur einzelsträngige DNA hineinpaßt. Bewegt sich das Protein unter ATP-Verbrauch in die der Replikation entgegengesetzte Richtung, würden beide neu synthetisierten Stränge quasi abgeschält werden. Dabei werden sie so abgeknickt, daß sie miteinander hybridisieren und auf diese Weise eine *Holliday junction* bilden (SINGLETON *et al.*, 2001; siehe auch Seite 114). Diese Befunde haben zu der Hypothese geführt, daß RecG bei Arrest des Replisoms an kleinen DNA-Läsionen an der Bildung von *Holliday junctions* beteiligt ist.

Reinitiation an Strukturen, bei welchen die Helikase arretiert wurde

Der Arrest des Replisoms durch eine Blockade der Helikasen unterscheidet sich an zwei Punkten von dem Arrest der Polymerasen. So ist die arretierende Struktur z.B. im Falle von Protein-DNA-Komplexen oder von Sekundärstrukturen vorübergehender Natur. In diesem Fall könnte die Blockade einfach entfernt werden, um eine Reinitiation zu ermöglichen (WHITBY *et al.*, 2002).

Zusätzlich sind bei einem solchen Arrest der *leading* und *lagging strand* entweder gleich lang oder aber der *leading strand* länger als der *lagging strand*. Ein *polymerase strand switch* ist also nicht möglich und wäre formal auch sinnlos, da die Enden der neu synthetisierten Stränge nicht über den Block hinausgehen und somit eine Überbrückung

des Blocks nicht möglich ist. Die Zelle ist dementsprechend zwangsläufig auf andere Mechanismen angewiesen.

Interessanterweise scheint ein Arrest des Replisoms an größeren Blockaden in *E. coli* trotzdem zu Strangbrüchen zu führen. So konnte gezeigt werden, daß die Deletion von *recB* und *recC* in einem *rep*⁻-Stammhintergrund letal ist. Das Rep-Protein ist eine nicht-essentielle Helikase, von welcher angenommen wird, daß sie das Voranschreiten der Replikationsgabel durch die Entfernung von Sekundärstrukturen, DNA-Protein-komplexen etc. erleichtert. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, daß das Fehlen des Rep-Proteins vermehrt zu arretierten Replikationsgabeln führt. Diese werden geschnitten, so daß doppelsträngige DNA-Enden entstehen. Durch das Fehlen des RecBCD-Komplexes kann keine Prozessierung mehr erfolgen, so daß es zur beobachteten Akkumulation von Doppelstrangbrüchen kommt (MICHEL *et al.*, 1997). Eine ähnliche Beobachtung wurde in Stämmen mit einer temperatursensitiven Mutante der replikativen Helikase *dnaB* bei nichtpermissiver Temperatur im Zusammenhang mit einer Deletion von *recB* gemacht. Auch hier kommt es in der Doppelmutante zu einer Akkumulation von Doppelstrangbrüchen (SEIGNEUR *et al.*, 2000).

In *rep recBC*-Doppelmutanten führte die zusätzliche Deletion von *ruvAB* zu einer Suppression der synthetischen Letalität. Es ließ sich zeigen, daß hier signifikant weniger doppelsträngige DNA-Enden entstehen. Aus diesen Befunden wurde geschlossen, daß die entstehenden doppelsträngigen DNA-Enden offensichtlich aus der Bildung von *Holliday junctions* resultieren, welche durch den RuvABC-Komplex geschnitten werden (SEIGNEUR *et al.*, 1998). Ein ähnlicher Effekt wurde bei der zusätzlichen Deletion von *ruvAB* in *dnaB recB*-Mutanten beobachtet, in welchen signifikant weniger Doppelstrangbrüche auftraten. Durch die Expression einer weiteren Resolvase, *RusA*, konnte die Akkumulation von Doppelstrangbrüchen wieder induziert werden. Diese Befunde liefern starke Evidenzen dafür, daß es bei Helikasearresten in *E. coli* zur Ausbildung von *Holliday junctions* kommt (SEIGNEUR *et al.*, 2000).

Zusätzliche Informationen konnten durch die Untersuchung von *E. coli*-Stämmen gewonnen werden, bei welchen zwei zusätzliche *ter-sites* auf dem Chromosom vorhanden waren. *recA*- sowie *recBC*-Deletionsmutanten mit solchen zusätzlichen *ter-sites* waren nicht lebensfähig. In diesen Stämmen traten gehäuft Doppelstrangbrüche in der Nähe der *ter-sites* auf (BIDNENKO *et al.*, 2002). Diese Befunde bestätigen, daß Arreste durch DNA-Protein-Komplexe zu Doppelstrangbrüchen führen. Allerdings konnte gezeigt werden, daß diese Doppelstrangbrüche im Falle des *ter*/Tus-Komplexes nicht von einem funktionellen RuvABC-Komplex abhängig sind. Die gewonnenen Daten deuten eher darauf hin, daß es in dem speziellen System zu einem erneuten Start einer Replikationsrunde am *oriC* kommt und daß die Replikationsgabeln bei Erreichen der Arreststelle kollabieren und zur Akkumulation linearer DNA-Fragmente führen (BIDNENKO *et al.*, 2002). Dies ist bemerkenswert, da unterschiedliche Strukturen, welche zu einem Arrest der Replikation führen, auch unterschiedliche Replikationsintermediate zur Folge haben. Während »spontane« Arreste, wie sie z.B. durch die Deletion des *rep*-Gens auftreten, vermehrt zu

Doppelstrangbrüchen führen, wird dies an den *ter*/Tus-Komplexen, welche natürliche Barrieren der Replikation darstellen, verhindert.

Aber auch bei spontan auftretenden Arresten lassen sich Unterschiede bezüglich der Prozessierung feststellen, welche von der Natur der Blockaden abhängen, die zum Arrest führen. Es wurde nachgewiesen, daß die Deletion von *recG* in *rep*-Mutanten keinen Einfluß auf die Bildung des Substrates für RuvABC zeigt (SEIGNEUR *et al.*, 2000). Dieser Befund läßt den Schluß zu, daß RecG (wie oben beschrieben) spezifisch für die Bildung von *Holliday junctions* an Arresten benötigt wird, bei welchen der *lagging strand* länger als der *leading strand* sind.

Diese Hypothese wurde auch in einem anderen Zusammenhang unterstützt. In *E. coli* führen bestimmte Mutationen wie z.B. *rpo*35* in der RNA-Polymerase zu einer Destabilisierung des sogenannten *open complex* des Transkriptionsapparates. Derartige Mutationen führen nach UV-Bestrahlung zu einer deutlich erhöhten Überlebensfähigkeit der Zellen in einem *ruvAC*⁻-Stammhintergrund. Dieser Effekt wurde darauf zurückgeführt, daß die Bestrahlung mit UV zu Läsionen führt, an welchen RNA-Polymerasen arretieren. Hier kann es zu einem sekundären Arrest der Replikation an dem RNA-Polymerase/DNA-Komplex kommen. Durch MICHEL *et al.* wurde postuliert, daß Arreste der Replikation an DNA-Protein-Komplexen vermehrt zur RuvABC-abhängigen Bildung von Doppelstrangbrüchen führen (MICHEL *et al.*, 1997). Eine Destabilisierung der Bindung der RNA-Polymerasen an die DNA würde dann dazu führen, daß eine leichtere Entfernung möglich ist, so daß weniger Hindernisse für die Replikation vorhanden sind (MCGLYNN & LLOYD, 2000).

Gehen die beobachteten Effekte auf RNA-Polymerase/DNA-Komplexe zurück, dann sollte, sofern RecG an der Reinitiation von Replikationsgabeln beteiligt ist, die an kleinen Läsionen arretiert sind, die Deletion von *recG* auf die beobachteten Effekte keinen großen Einfluß haben. Genau dies wurde beobachtet. Allerdings führte eine Deletion von *recG* sowie *ruvAC* zu einer massiv verschlechterten Überlebensfähigkeit von *rpo*35*-Zellen. Dies deutet darauf hin, daß RecG bei Abwesenheit von RuvAB eine wichtige Rolle zukommt (MCGLYNN & LLOYD, 2000).

Nach den dargestellten Befunden ließe sich spekulieren, daß arretierte RNA-Polymerasen ein Hindernis sind, durch welches vermehrt Doppelstrangbrüche entstehen. Durch die Destabilisierung aufgrund der *rpo*35*-Mutation könnten die arretierten RNA-Polymerasen leichter entfernt werden. In diesem Fall würde allerdings ein Arrest der DNA-Polymerasen an den Läsionen erfolgen, an welchen die RNA-Polymerasen arretiert waren. In diesem Fall wird dann RecG benötigt, um die vorhandenen Primärläsionen zu umgehen, was im Fall der RNA-Polymerasen/DNA-Komplexe nicht möglich war. Nimmt man an, daß die Umgehung der Läsion durch RecG u.a. über einen *polymerase strand switch* erfolgt, würde auch der RuvABC-Komplex weniger benötigt werden, was eine Erklärungsmöglichkeit für den Synergismus von *recG* und *ruvABC* ist.

Diese Daten geben einen Hinweis darauf, daß unterschiedliche Strukturen wie Läsionen oder DNA-Proteinkomplexe zu unterschiedlichen Arresten der Replikation

führen können und daß die Reinitiation in Abhängigkeit von der auslösenden Struktur in *E. coli* in unterschiedlicher Art und Weise gehandhabt wird.

Welche Läsionen werden durch die eingesetzten Chemikalien ausgelöst?

4-NQO führt primär zu kleinen Läsionen der DNA

4-NQO führt hauptsächlich zu kleineren DNA-Läsionen. Zunächst erfolgt über mehrere Schritte eine Aktivierung des 4-NQO. Die entstehenden aktivierten Produkte reagieren mit der DNA insbesondere zu dG- N^2 -Aminochinolin-1-oxid (dG- N^2 -AQO), welches mit über 50% der Addukte das häufigste Produkt darstellt. Aber auch C^8 -dG-AQO oder dA- N^6 -AQO ließen sich nachweisen (TURESKY, 1994; FRIEDBERG *et al.*, 1995). Die entstehenden Guanyl-Addukte führen hauptsächlich zu G→A-Transitionen sowie seltener zu G→T-Transversionen, wobei diese beiden Mutationsarten 90% aller durch 4-NQO hervorgerufenen Veränderungen ausmachen (TURESKY, 1994).

Neben diesen sogenannten *bulky adducts* können allerdings auch weitere Produkte entstehen. Insbesondere das *N*-(guanosin-7-yl)-4-aminochinolin-1-oxid kann zur Bildung von 8-oxo-Guanin führen (NEWCOMB & LAWRENCE, 1998), welches bei der Replikation mit A paaren kann (MILLER, 1998).

Das durch 4-NQO ausgelöste Schadensspektrum ist dergestalt, daß der größere Teil der Läsionen mit Hilfe der Nukleotidexcisionsreparatur repariert wird. Dies ähnelt den durch UV hervorgerufenen Pyrimidin-Dimeren und (6-4)-Photoprodukten, so daß 4-NQO oftmals als UV-Mimetikum bezeichnet wird (FRIEDBERG *et al.*, 1995). Dementsprechend sollten durch die primär von 4-NQO ausgelösten Läsionen hauptsächlich Arreste der replikativen Polymerasen ausgelöst werden.

Der Arrest z.B. von RNA-Polymerasen an durch 4-NQO ausgelösten Läsionen oder noch nicht geschlossene Einzelstrangbrüche nach der Reparatur derartiger Läsionen kann allerdings Sekundärereignisse auslösen, welche zu anderen Arresten des Replisoms führen. Es wurde bereits ausgeführt, daß insbesondere der Arrest des Transkriptionskomplexes zum Arrest der replikativen Helikasen führen kann. Durch 4-NQO können also durchaus auch Helikese-arreste ausgelöst werden. Sofern sich allerdings nicht dicht an die Transkription die Replikation anschließt, sollten die Läsionen relativ schnell mit Hilfe der transkriptionsgekoppelten Nukleotidexcisionsreparatur beseitigt werden können, während die Läsionen in nicht transkribierten Bereichen als solche persistieren (SELBY & SAN CAR, 1994). Es ist aus diesem Grund zu vermuten, daß der größere Teil der durch 4-NQO ausgelösten Läsionen zu einem Arrest der replikativen Polymerasen führt.

Die Behandlung von Zellen mit Camptothecin führt zu unterschiedlichen Läsionen

Wie bereits dargestellt (siehe Seite 68) führt die Behandlung von Zellen mit Camptothecin zu einer Hemmung des kovalenten Topoisomerase-I-DNA-Komplexes.

Durch Topoisomerase kann der topologische Zustand der DNA verändert werden, wobei sich die Reaktion in vier Schritte unterteilen läßt. Zunächst bindet ein Monomer an die DNA und es kommt zu einer partiellen Entwindung des Doppelstranges. Im einzelsträngigen Bereich findet eine Transesterifikation statt, bei welcher die Hydroxylgruppe eines Tyrosins kovalent an ein 3'-Phosphat bindet. Es entsteht hierbei ein freier 5'-Hydroxylterminus der DNA. Die den *nick* flankierenden Enden können nun rotieren und auf diese Weise eine Entspannung der DNA erreichen. Anschließend wird das 5'-Hydroxylende wieder mit dem 3'-Phosphatende verknüpft, so daß die kovalente Bindung zum Enzym aufgelöst und der *nick* in der DNA geschlossen wird. Camptothecin stabilisiert den Zustand, in welchem die Topoisomerase kovalent mit der DNA verknüpft ist, so daß die Religation nicht stattfinden kann (WANG, 2002).

Erreicht eine Replikationsgabel einen DNA-Topoisomerasekomplex, so entstehen unterschiedliche Intermediärstrukturen. Durch *in-vitro*-Experimente konnte gezeigt werden, daß es im Falle eines Komplexes auf der *leading strand* Matrize zu einem glatten Doppelstrangbruch kommt. Es entsteht vermutlich ein sogenanntes *run-off*-Produkt, bei welchem gegenüber der letzten Base noch ein Nukleotid inkorporiert wird (STRUMBERG *et al.*, 2000). Dieses doppelsträngige DNA-Ende kann durch die Enzyme der Doppelstrangbruchreparatur prozessiert werden, wobei der kovalente Topoisomerase I-DNA-Komplex vorher degradiert werden muß. An der Degradation sind mehrere Proteasen beteiligt, wobei der Abbau des Tyrosyl-DNA-Phosphodiesters durch das TdpI-Protein (*Tyrosyl-DNA phosphodiesterase-1*) erfolgt (DEBETHUNE *et al.*, 2002).

Anders ist dies bei einem Komplex auf der Matrize des *lagging strand*. Hier konnten keine doppelsträngigen DNA-Enden nachgewiesen werden. Eine mögliche Deutung ist, daß die kovalenten Topoisomerase-DNA-Komplexe die Replikation des *lagging strand* anhalten, bevor der *nick* erreicht wird und ein Doppelstrangbruch entstehen kann (STRUMBERG *et al.*, 2000).

Die Behandlung von Zellen mit Camptothecin führt also offensichtlich im Fall von Komplexen auf der Matrize des *leading strand* zu einem Kollaps der Replikationsgabel, bei welchem ein zu reparierendes doppelsträngiges DNA-Ende entsteht. Hingegen führen Komplexe auf der Matrize des *lagging strand* vermutlich zu Arresten der replikativen Helikasen, welche mit dem kovalenten Komplex kollidieren. Im Gegensatz zu kleinen DNA-Läsionen verbleiben also bei derartigen Läsionen keine einzelsträngigen DNA-Bereiche des *lagging strands*, sondern es kommt zu einem Arrest der Replikation. Dies unterscheidet die durch Camptothecin ausgelösten Läsionen deutlich von den durch 4-NQO ausgelösten Schäden.

Untersuchungen zum Zusammenspiel fehlerfreier und fehlerbehafteter Mechanismen zur Umgehung von DNA-Läsionen

Das Mph1-Protein wird für die fehlerfreie Umgehung kleiner DNA-Läsionen benötigt

mph1-Deletionsmutanten weisen insbesondere gegen MMS und 4-NQO eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Sensitivität auf, während die Sensitivität gegenüber Camptothecin nur schwach ausgeprägt ist (SCHELLER *et al.*, 2000). Dieser Befund ist ein Hinweis darauf, daß das Mph1 insbesondere an der Prozessierung kleiner DNA-Läsionen beteiligt ist, welche zu einem Arrest der replikativen Polymerasen führen.

Diese Hypothese wird durch den Mutatorphänotyp der *mph1*-Mutante weiter gestärkt. Dieser deutet darauf hin, daß zumindest ein Teil der Läsionen, welche normalerweise durch Mph1 prozessiert würden, in Abwesenheit von Mph1 durch die Transläsions-synthese überlesen werden. Da *mph1*-Mutanten gegenüber Camptothecin keine ausgeprägte Sensitivität zeigen, läßt sich hieraus schließen, daß dem Mph1-Protein bei der Prozessierung von Helikasearresten und an Einzelstrangbrüchen kollabierten Replikationsgabeln nur eine untergeordnete Rolle zukommt.

Wenn Mph1 insbesondere an der Umgehung kleiner DNA-Läsionen beteiligt ist, dann sollten sich die Zahl der durch die Transläsionssynthese verursachten Mutationen in Abwesenheit von Mph1 insbesondere durch die Induktion derartiger Schäden steigern lassen.

Genau dieser Effekt ließ sich in zwei unterschiedlichen experimentellen Systemen nachweisen. Zum einen konnten die Mutationsfrequenzen nach Behandlung der Zellen mit 4-NQO deutlich stärker als im Wildtyp erhöht werden, wobei diese Erhöhung durch die Deletion von *REV3* supprimiert wurde.

Ein ähnliches Ergebnis wurde durch die Deletion der beiden Gene erreicht, welche für die beiden AP-Endonukleasen von Hefe, *Apn1* und *Apn2*, codieren. In dieser Mutante werden auftretende AP-Stellen nicht mehr ohne weiteres prozessiert (JOHNSON *et al.*, 1998). Es ist plausibel anzunehmen, daß durch AP-Stellen kein Arrest der replikativen Helikasen sondern der replikativen Polymerasen ausgelöst wird. Es sollte also angenommen werden, daß die zusätzliche Deletion von *mph1* die Mutationsrate in einem *apn1*-Hintergrund massiv erhöht, wobei genau dies beobachtet wurde. Die Mutationsrate konnte durch die zusätzliche Deletion von *APN2* noch stärker gesteigert werden (SCHÜRER *et al.*, in Vorbereitung).

Aus diesen Befunden lassen sich zwei Hypothesen ableiten:

- 1) Mph1 ist hauptsächlich für die fehlerfreie Umgehung von Läsionen zuständig, welche so klein sind, daß sie eher zu einem Arrest der replikativen Polymerasen als der replikativen Helikasen führen.
- 2) Mph1 ist nicht nur an der Prozessierung einer einzigen Schadensart beteiligt, da sowohl durch AP-Stellen als auch durch von 4-NQO ausgelösten Läsionen die Muta-

tionsrate bzw. die Mutationsfrequenz in Abhängigkeit von *REV3* gesteigert werden kann.

Das Mph1-Protein wird für die fehlerfreie Umgehung eines spezifischen Substrates von DNA-Läsionen benötigt

Ein weiteres Enzym, welches auch an der fehlerfreien Umgehung insbesondere von UV-Schäden beteiligt ist, ist Rad30. Durch die Untersuchungen der genetischen Interaktionen von *rad30* und *mph1* konnten insbesondere die Substratspektren beider Enzyme näher eingegrenzt werden.

Die Mutationsraten der *rad30*-Mutante deuten darauf hin, daß Polymerase η unter normalen Wachstumsbedingungen nur in geringem Maße für diejenigen Läsionen eingesetzt werden kann, die in der *mph1*-Mutante nicht mehr fehlerfrei prozessiert werden können. Während eine Deletion von *REV3* den Mutatorphänotyp der *mph1*-Mutante nahezu vollständig supprimiert, zeigt die Deletion von *RAD30* nur einen geringen Effekt.

Geht man davon aus, daß eine mögliche Rolle für Polymerase η die spezifische und vor allem fehlerfreie Prozessierung von UV-Schäden ist, dann ist dieser Effekt auch nicht weiter verwunderlich, da bei dem experimentellen Ablauf zur Messung der Mutationsrate nahezu keine UV-Einstrahlung erfolgte.

Durch die Bestimmung der Mutationsfrequenzen nach Behandlung mit 4-NQO konnte allerdings nachgewiesen werden, daß Polymerase η auch einen Teil der durch 4-NQO ausgelösten Schäden fehlerfrei überliest. Bei den Mutationsfrequenzen zeigt sich in *rad30*-Deletionsmutanten in Korrelation mit der 4-NQO-Konzentration eine deutliche Erhöhung. Es ist plausibel anzunehmen, daß die Prozessierung der Schäden dann durch Polymerase ζ erfolgt, obwohl dies nicht direkt gezeigt wurde.

In der *rad30 mph1*-Doppelmutante kann dieser Effekt noch deutlich verstärkt werden. Leider lassen die gemessenen Daten keine genaue Aussage zu, ob der Phänotyp der Doppelmutante synergistisch oder additiv ist. In jedem Fall entstehen durch 4-NQO jedoch Läsionen, welche durch Mph1 und Rad30 fehlerfrei prozessiert werden können. Dies unterscheidet sich von den Läsionen, die zu spontanen Mutationen führen, da Rad30 hier offenbar nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Aus diesem Befund läßt sich ableiten, daß Mph1 ein distinktes Spektrum von Läsionen fehlerfrei prozessiert, welches nur partiell mit dem Substratspektrum von Rad30 überlappt. Eine mögliche Hypothese ist, daß Mph1 für einen erheblichen Anteil der spontan im Metabolismus entstehenden Läsionen sowie für einen Teil der induzierten Schäden zuständig ist, während Rad30 vermehrt z.B. durch UV-Licht induzierte Schäden fehlerfrei umgeht, an deren Umgehung Mph1 nur in geringem Maße beteiligt ist.

Die vorhandenen Daten deuten auf eine spezifische Erkennung von DNA-Läsionen hin

Die beobachtete Abgrenzung der Läsionstypen deutet darauf hin, daß beide Proteine spezifisch für die Umgehung kleiner DNA-Läsionen eingesetzt werden. Dies setzt aller-

dings voraus, daß die einzelnen Läsionen in irgendeiner Art von der Zelle erkannt werden können. Eine solche Erkennung wäre entweder durch die auftretenden Läsionen selbst oder durch Strukturen wie Replikationsintermediate möglich, welche durch die Läsionen hervorgerufen werden. Mit einem solchen Erkennungssystem wäre es der Zellen möglich, passende Systeme für die Umgehung oder Reparatur spezifischer Schäden einzusetzen.

Die Hypothese von einer differenzierten Schadenserkenkung wird durch zwei unterschiedliche Arbeiten unterstützt. So konnte durch HOEGE *et al.* gezeigt werden, daß PCNA während der Replikation sowohl durch Ubiquitin als auch durch SUMO (*small ubiquitinlike modifier*) an der Position K164 modifiziert werden kann. Die Ubiquitylierung ist hierbei abhängig vom Rad6, Ubc13-Mms2, Rad18 und Rad5 (HOEGE *et al.*, 2002), von welchen angenommen wird, daß es sich um Schlüsselenzyme sowohl des fehlerfreien als auch des fehlerhaften Weges der postreplikativen Reparatur handelt (MATUNIS, 2002). In Abwesenheit von Rad5, Ubc13 und Mms2 erfolgt im Falle von DNA-Schäden zunächst eine Monoubiquitylierung von PCNA durch Rad6, welches durch Rad18 zur an die DNA gebundene PCNA rekrutiert wird. Für diese Monoubiquitylierung wird angenommen, daß sie z.B. eine Rolle bei der fehlerhaften Umgehung von DNA-Läsionen spielt (HOEGE *et al.*, 2002).

Diese Hypothese konnte durch den Befund bestätigt werden, daß in Mutanten, in welchen keine Ubiquitylierung mehr möglich ist, eine zusätzliche Deletion sowohl von RAD30 als auch von REV3 keine erhöhte UV-Sensitivität zur Folge hat. Offenbar ist die Monoubiquitylierung von PCNA ein entscheidender Faktor für die Transläsionssynthese durch Polymerase η und Polymerase ζ (STELTER & ULRICH, 2003).

DNA-Schäden führen zudem zu einer Translokation von Ubc13-Mms2 in den Kern. Durch eine Interaktion von Rad5 mit Rad18 wird der Ubc13-Mms2-Komplex in Kontakt mit Rad6 gebracht. Auf diese Weise ist eine Polyubiquitylierung von PCNA möglich. Die Verknüpfung der einzelnen Ubiquitin-Moleküle erfolgt hierbei am (ungewöhnlichen) Rest K63. Derartige Ketten markieren ein Protein nicht für eine Degradation durch das Proteasom, wie die »normalen« K48-Ketten, sondern scheinen eine fehlerfreie Umgehung von Läsionen zu ermöglichen (HOEGE *et al.*, 2002).

Für die Sumolyierung, welche durch Ubc9 und Siz1 erfolgt, läßt sich ein inhibitorischer Effekt auf die DNA-Reparatur nach Bestrahlung mit UV nachweisen (STELTER & ULRICH, 2003). Dies ist darauf zurückzuführen, daß eine Sumolyierung offenbar dazu führt, daß durch Pol ζ die DNA-Reparatur gehemmt wird. In Mutanten, welche zu einer Sumolyierung nicht mehr in der Lage sind, wird hingegen eine Monoubiquitylierung von PCNA für die Aktivität von Pol ζ benötigt (STELTER & ULRICH, 2003).

Interessant im Bezug auf die Modifizierung von PCNA an Position K164 ist, daß die spontane Mutationsrate einer *pol30(K164R)*-Mutante gegenüber dem Wildtyp nicht verändert ist. Offenbar sind die spontan auftretenden Mutationen nicht von der Ubiquitylierung von PCNA abhängig. Im Kontrast hierzu kann der Mutatorphänotyp einer *rad18*-Mutante durch die Mutation *pol30(K164R)* supprimiert werden (STELTER & ULRICH, 2003).

Diese Daten unterstützen die Hypothese, daß PCNA einen Schalter repräsentiert, welcher es ermöglicht, unterschiedliche Reparaturprozesse selektiv zu nutzen. Wie bereits für *E. coli* gezeigt (BERDICHEVSKY *et al.*, 2002) deuten aber auch hier die vorhandenen Daten darauf hin, daß im Falle von Läsionen zunächst fehlerfreie Systeme wie z.B. Mph1 oder auch Rad30 fehlerhaften Systemen wie Rev3 vorgezogen werden. Wird dann allerdings Polymerase ζ rekrutiert, kommt es zu einer Hemmung anderer Reparaturprozesse (STELTER & ULRICH, 2003).

Das Mph1-Protein ist an einem rekombinativen Mechanismus zur Umgehung kleiner DNA-Läsionen beteiligt

Es wurde bereits erwähnt, daß bezüglich der Mutationsrate sowie der Sensitivität gegenüber Mutagenen eine epistatische Interaktion von *mph1* mit *rad51*, *rad52* und *rad55* beobachtet wurde (SCHÜRER *et al.*, in Vorbereitung; siehe Seite 73). Dies legt die Annahme nahe, daß Mph1 an einem rekombinativen Prozeß zur Umgehung kleiner, spontan auftretender DNA-Läsionen beteiligt ist.

Diese Hypothese konnte durch die spontane Reversionsrate des KanKanMX4-Moduls sowie durch die Reversionsfrequenzen nach Behandlung mit Chemikalien gestützt werden. Es wurde bereits ausgeführt, daß sich die Reversionsereignisse des KanKanMX4-Moduls hauptsächlich auf rekombinative Mechanismen zurückführen lassen (siehe Seite 133). Die erniedrigte spontane Reversionsrate sowie die erniedrigten Reversionsfrequenzen nach Behandlung mit Mutagenen deuten also darauf hin, daß in *mph1*-Mutanten weniger Rekombinationsereignisse stattfinden. Dies ist im Einklang mit den gemessenen epistatischen Interaktionen von *mph1* mit *rad51*, *rad52* und *rad55*.

Zusätzlich wird die Hypothese durch die Befunde unterstützt, daß die Behandlung mit Camptothecin und 4-NQO unterschiedlich starken Einfluß auf *mph1*-Mutanten haben. Beide Mutagene führen im Wildtyp zu einer Erhöhung der Reversionsfrequenzen in Korrelation mit der Konzentration des eingesetzten Mutagens.

In *mph1*-Mutanten zeigten die Mutagene jedoch unterschiedliche Effekte. Während bei Behandlung mit 4-NQO die Reversionsfrequenzen deutlich erniedrigt waren, fiel die Erniedrigung bei Behandlung mit Camptothecin moderater aus. Offenbar ist Mph1 an der rekombinativen und fehlerfreien Umgehung von Läsionen, welche durch 4-NQO ausgelöst werden, beteiligt, während durch Camptothecin ausgelöste Läsionen zumindest weniger durch den rekombinativen Mph1-Weg prozessiert werden. Eine nichtrekombinative Prozessierung durch Mph1 kann nicht ausgeschlossen werden, erscheint aber aufgrund der mangelnden Sensitivität der *mph1*-Mutanten eher unwahrscheinlich.

Die experimentellen Daten deuten auf eine Beteiligung von Mph1 an der Prozessierung von Replikationsintermediaten hin

An welchem Prozeß könnte Mph1 beteiligt sein?

Aus den vorhandenen Daten lassen sich die folgenden Eingrenzungen bezüglich des Prozesses machen, an dem das Mph1-Protein beteiligt ist.

- 1) Durch Mph1 wird ein definierter Subsatz kleiner DNA-Schäden, zu denen vermutlich AP-Stellen, aber auch durch 4-NQO hervorgerufene Läsionen gehören, fehlerfrei umgangen. Läsionen, welche bevorzugt die replikativen Helikasen arretieren, werden vermutlich kaum durch Mph1 prozessiert.
- 2) In Abwesenheit von Mph1 wird ein erheblicher Teil der Läsionen bevorzugt durch Polymerase ζ mutagen überlesen.
- 3) Die fehlerfreie Umgehung der Läsionen erfolgt über Mechanismen, die Enzyme der homologen Rekombination benötigen und an denen Mph1 entweder direkt oder indirekt beteiligt ist.

Aus ersten Experimenten zur Sensitivität der *mph1*-Mutante gegenüber 4-NQO während des Zellzyklus ging hervor, daß die *mph1*-Mutante offenbar insbesondere während der S-Phase des Zellzyklus eine erhöhte Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp zeigt (Daten nicht gezeigt). Demnach erscheint die Annahme plausibel, daß Mph1 an der Reinitiation von Replikationsgabeln beteiligt ist, welche an kleinen Läsionen arretiert sind. Bei diesem Vorgang ist eine Beteiligung an mehreren Prozessen vorstellbar.

- A) Mph1 könnte am *gap filling* des *lagging strand* beteiligt sein, welches vermutlich rekombinativ erfolgt. In *mph1*-Deletionsmutanten wäre dann dieser Prozeß gestört, so daß das Auffüllen der Lücken vermehrt mit Hilfe der Transläsionssynthese erfolgt. Es ist leicht vorstellbar, daß es auch bei derartigen homologen Rekombinationsereignissen zu einer Deletion von Sequenzduplikationen kommt, so daß sich auch die Verminderung der Reversionsraten und Frequenzen erklären ließe.
- B) Mph1 könnte an der Entstehung oder Stabilisierung von *Holliday junctions* beteiligt sein und somit zur fehlerfreien Umgehung von Läsionen insbesondere auf dem *leading strand* beitragen. Bei Ausfall von Mph1 würden weniger *Holliday junctions* entstehen oder diese vermehrt wieder mittels *branch migration* aufgelöst, so daß die Reinitiation verstärkt über Transläsionspolymerasen erfolgt. Sofern weniger *Holliday junctions* entstehen, werden diese auch weniger mittels Resolvasen geschnitten, so daß es zu weniger Rekombinationsereignissen kommt. So erklärten sich die verringerten Reversionsraten und Reversionsfrequenzen, jedoch nicht die erhöhte mitotische Rekombinationsrate von *mph1*-Deletionsmutanten.
- C) Mph1 könnte spezifisch an dem Prozeß beteiligt sein, bei welchem nach dem *polymerase strand switch* am vierten Arm der *Holliday junction* direkt ein einzelsträngiges 3'-Ende gebildet wird, damit ein Substrat für die homologe Rekombination vorhanden ist. Auch in diesem Fall würde der Ausfall von Mph1 zu weniger Re-

kombinationsereignissen führen und damit gleichzeitig einen Anstieg von Reinitiationsereignissen über die Transläsionspolymerasen herbeiführen. Diese Möglichkeiten schließen sich nicht gegenseitig aus. So ist es denkbar, daß Mph1 sowohl für rekombinative Prozesse bei einem Arrest der *lagging-strand*- als auch der *leading-strand*-Polymerase zum Einsatz kommt. Bei der Annahme, daß Mph1 an der Ausbildung von *Holliday junctions* beteiligt ist, wäre es plausibel anzunehmen, daß Mph1 an Prozessen beteiligt ist, bei welchen eine entstandene *Holliday junction* auch ohne Rekombinationsereignis wieder aufgelöst wird.

Eine Beteiligung von Mph1 an einem Prozeß nach der Stranginvasion, also z.B. bei der Prozessierung des entstehenden *D-loops*, erscheint hingegen unwahrscheinlich, da Modelle für eine Deletion *nach* der Stranginvasion im Gegensatz zu der sehr plausiblen Möglichkeit der Deletionsentstehung im Zuge der Stranginvasion aus mehreren Schritten bestehen müßten und durch vorhandene Daten kaum belegbar sind.

Durch die heterologe Expression von *recG* wird der *mph1*-Phänotyp nicht komplementiert

Das RecG-Protein ist an der Prozessierung kleiner DNA-Läsionen beteiligt

Die heterologe Expression von *recG* in Hefe kann unterschiedliche Effekte zur Folge haben. Einerseits ist es möglich, daß das RecG-Protein an der Katalyse ähnlicher Prozesse wie in *E. coli* beteiligt ist. Es ist allerdings ebenfalls möglich, daß das Protein an ein Substrat bindet und dadurch, insbesondere in der überexprimierten Form, anderen Reparatursystemen den Zugang erschwert und somit phänotypische Veränderungen auslöst. Dies ist theoretisch auch dann möglich, wenn das gebildete Protein in *Saccharomyces cerevisiae* nicht in der Lage ist, den Prozeß, für den es in *E. coli* zuständig ist, zu katalysieren, oder wenn bei einem bestimmten Teilschritt Kofaktoren fehlen.

Die durch die Expression von RecG beobachteten phänotypischen Veränderungen sind, wie im folgenden diskutiert, allerdings recht ähnlich zu den Phänotypen, welche für *E. coli* beobachtet wurden. Aus diesem Grund wird in der folgenden Diskussion davon ausgegangen, daß das Protein in Hefe primär an einem ähnlichen Prozeß wie in *E. coli* beteiligt ist.

Wie bereits oben erläutert, ist RecG insbesondere an der Prozessierung kleiner DNA-Läsionen beteiligt, während eine Beteiligung bei der Prozessierung von Strukturen, die zu Helikasearresten führen, bisher nicht nachgewiesen werden konnte (siehe Seite 115). Diese Hypothese konnte auch durch die heterologe Expression von *recG* in *Saccharomyces cerevisiae* unterstützt werden. Bezüglich der Reversionsfrequenzen nach Mutagenbehandlung zeigt sich, daß die Expression bei Behandlung mit 4-NQO einen deutlichen Effekt zeigt, während bei Behandlung mit Camptothecin nur ein wenig ausgeprägter Effekt zu beobachten ist.

Die Erniedrigung der Mutationsrate im Wildtyp deutet zudem darauf hin, daß auch spontan im Organismus auftretende Läsionen durch RecG prozessiert werden. Dies gilt

jedoch offenbar nur bedingt für die Läsionen, welche in Abwesenheit von Mph1 mittels der Transläsionssynthese prozessiert werden, da die Mutationsrate in *mph1*-Mutanten durch die Expression von RecG kaum erniedrigt ist.

Ein ähnlicher Effekt läßt sich auch bei den Reversionsfrequenzen nach Behandlung mit 4-NQO zeigen. Hier führt interessanterweise bereits die Expression von *recG* zu einer Erniedrigung der Reversionsfrequenzen, wobei diese Erniedrigung durch die zusätzliche Deletion von *MPH1* verstärkt werden kann. Offenbar hat die Expression von *recG* also einen stabilisierenden Effekt auf Sequenzwiederholungen. Die zusätzliche Erniedrigung durch die Deletion von *MPH1* könnte bedeuten, daß RecG und Mph1 unterschiedliche Prozesse katalysieren.

Dies ist bei Behandlung der Zellen mit Camptothecin anders. Hier werden die durch die Deletion von *MPH1* erniedrigten Reversionsfrequenzen nicht verändert. Diese Daten deuten also ebenso darauf hin, daß RecG kleine DNA-Läsionen oder daraus entstehende Intermediate prozessiert. Hingegen spielt RecG bei der Umgehung von durch Camptothecin ausgelösten Läsionen offensichtlich kaum eine Rolle. Dies ist bezüglich Mph1 anders, welches einen distinkten Teil der durch Camptothecin ausgelösten Läsionen zu prozessieren scheint.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß sich die Expression von RecG auf die Sensitivitäten der Zellen gegenüber Mutagenen auswirkt. Insbesondere bei der dauerhaften Behandlung der Zellen mit MMS und 4-NQO kann die Sensitivität der *mph1*-Mutante partiell supprimiert werden. Interessant an diesem Effekt ist die Tatsache, daß durch Expression von RecG die Mutationsrate der *mph1*-Mutante nicht verändert wird. Dies könnte bedeuten, daß durch Mph1 bei Behandlung mit 4-NQO und MMS Läsionen prozessiert werden, welche zur Sensitivität jedoch nicht zur Mutationsrate beitragen.

Allerdings haben die Experimente mit *sgs1*-Deletionsmutanten gezeigt, daß sich die spontane Mutationsrate und die Mutationsfrequenzen nach Mutagenbehandlung drastisch unterscheiden können. Während die Mutationsrate der *mph1*-Deletionsmutante durch die zusätzliche Deletion von *SGS1* supprimiert ist, sind die Mutationsfrequenzen in *mph1 sgs1* Doppelmutanten drastisch erhöht. Aus den spontanen Mutationsraten läßt sich dementsprechend nicht auf die Mutationsfrequenzen der Zellen nach Mutagenbehandlung schließen. Es wäre also möglich, daß die Expression von *recG* auf die Mutationsfrequenzen nach Mutagenbehandlung durchaus einen Effekt ausübt, der sich in den spontanen Mutationsraten nicht widerspiegelt.

Neben der partiellen Komplementation der Mutagensensitivitäten der *mph1*-Deletionsmutante führte die Expression allerdings auch zu einer Erhöhung der Sensitivität des Wildtyps gegenüber Camptothecin, wobei dies in der *mph1*-Mutante nicht beobachtet werden konnte. Eine Erklärung für diesen Phänotyp wäre, daß die gemeinsame oder aufeinanderfolgende Prozessierung von durch Camptothecin ausgelösten Läsionen durch Mph1 und RecG ein für die Zellen letales Produkt zur Folge hat. Dies ist hingegen nicht der Fall, wenn nur eines der beiden Proteine vorhanden ist. Dieses Er-

gebnis unterstreicht noch einmal den Befund, daß durch beide Proteine offensichtlich unterschiedliche Substrate prozessiert werden.

An welchem Reinitiationsweg ist RecG beteiligt?

Die gezeigten Ergebnisse sind zu einem nicht unerheblichen Teil bereits in *E. coli* beschrieben worden. Die Deletion von *recG* führt hier zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber UV-Strahlung (BOLT & LLOYD, 2002). Zusätzlich wurde nachgewiesen, daß die Deletion von *recG* zu einer Erhöhung der Deletion von *tandem repeats* in einem ähnlichen wie dem hier genutzten System führt (BIERNE *et al.*, 1997A; SAVESON & LOVETT, 1999), während die Deletion von *recG* in *rep⁻*-Mutanten nicht verstärkt zur Bildung von Doppelstrangbrüchen führt (SEIGNEUR *et al.*, 2000; siehe auch Seite 137).

In vitro wurde gezeigt, daß das bevorzugte Substrat von RecG eine Gabelstruktur der DNA ist, welche einer Replikationsgabel ähnelt, bei welcher der *lagging strand* über das Ende des *leading strand* hinaus verlängert ist (MCGLYNN & LLOYD, 2001). Für diese Struktur wird angenommen, daß sie genau dann entsteht, wenn eine kleine Läsion zu einem Arrest der *leading strand* Polymerase führt. Es erscheint plausibel, daß RecG an der Umgehung derartiger Läsionen beteiligt ist. Zu dieser Überlegung passen die experimentellen Befunde, daß die Behandlung der Zellen mit 4-NQO großen Einfluß auf die Reversionsfrequenzen zeigt und hier auch eine bessere Überlebensfähigkeit beobachtet wird, während sich bei Behandlung der Zellen mit Camptothecin deutlich geringere Effekte verzeichnen lassen.

Für die Interpretation bezüglich der Funktion von RecG und Mph1 gibt es eine Reihe unterschiedlicher Möglichkeiten. Von MCGLYNN & LLOYD wurde die Hypothese vorgestellt, daß RecG in *E. coli* an der Bildung von *Holliday junctions* beteiligt ist. Diese können u.a. zu einem *polymerase strand switch* genutzt werden und somit zur fehlerfreien Umgehung von DNA-Läsionen beitragen (MCGLYNN & LLOYD, 2002).

Andererseits sollte das vermehrte Auftreten von *Holliday junctions* dazu führen, daß diese auch vermehrt durch Resolvasen geschnitten werden, so daß mehr doppelsträngige DNA-Enden entstehen, welche *tandem repeats* destabilisieren können. Genau dies wird jedoch genetisch nicht beobachtet, sondern RecG scheint sowohl in *E. coli* als auch in *Saccharomyces cerevisiae* für eine Stabilisierung von *tandem repeats* zu sorgen.

Als Alternative wurde von Cox vorgeschlagen, daß durch RecG *Holliday junctions* aufgelöst werden könnten, ohne daß es zu einem rekombinativen Ereignis kommt (Cox, 2001). Diese Hypothese stützt sich u.a. auf den Befund, daß *in vitro* gezeigt werden konnte, daß replikationsgabelähnliche Substrate durch RecA in *Holliday junctions* überführt werden (ROBU *et al.*, 2001). In diesem Fall würde RecG für eine Destabilisierung von *Holliday junctions* sorgen und damit vermutlich auch die rekombinative Auflösung verhindern. Durch diese Hypothese ließe sich dementsprechend eher erklären, wie durch RecG eine Stabilisierung von *tandem repeats* erreicht werden kann. Man kann dementsprechend einen Mechanismus annehmen, nach welchem in *E. coli* durch RecA eine *Holliday junction* gebildet wird. Anschließend kann durch einen *polymerase strand switch*

die Läsion fehlerfrei umgangen und die *Holliday junction* durch RecG aufgelöst werden. Dies würde neben den genetischen und biochemischen Daten aus *E. coli* auch die Befunde aus *Saccharomyces cerevisiae* erklären.

Allerdings darf nicht außer Acht gelassen werden, daß die einzelnen Proteine teilweise zahlreiche Interaktionen mit anderen Proteinen eingehen. So konnte sowohl für Sgs1 (WU *et al.*, 2001) als auch für Srs2 (KREJCI *et al.*, 2003) eine Interaktion mit Rad51 nachgewiesen werden. In humanen Zellen konnte die Interaktion von Blm mit hRad51 ebenfalls gezeigt werden, (WU *et al.*, 2001), wobei es in humanen Zellen zusätzlich Evidenzen gibt, daß Blm in einem Komplex mit 15 weiteren Komponenten zu finden ist, zu welchem Wrn, Atm, Brca1, Msh2-Msh6 und andere gehören. Dieser Komplex wird als BASC (*BRCA1-associated genome surveillance complex*) bezeichnet und es konnte nach Behandlung mit Mutagenen eine Kolo-kalisation dieses Komplexes mit PCNA gezeigt werden (WANG *et al.*, 2000). Auch für Mph1 wurden Interaktionen mit einer Reihe anderer Proteine gezeigt, was darauf hindeutet, daß es in einem größeren Komplex vorliegt (GAVIN *et al.*, 2002).

Bei der Expression von RecG in *Saccharomyces cerevisiae* sollte man allerdings davon ausgehen, daß die notwendigen Interaktionsstellen zur Rekrutierung in einen solchen Komplex nicht vorhanden sind. Sofern RecG nur bedingt Cofaktoren benötigt, ist es möglich, daß es den gleichen Prozeß katalysiert, für welchen es auch in *E. coli* zuständig ist. Es bleibt jedoch nach wie vor die Möglichkeit offen, daß der beobachtete Phänotyp in Hefe auf Prozesse zurückgeht, die mit den in *E. coli* katalysierten Reaktionen nur wenig gemein haben.

Der Ausfall von *REV3* führt in An- und Abwesenheit von *MPH1* verstärkt zu Reversionsereignissen

In Abwesenheit einer funktionalen Transläsionspolymerase ζ werden verstärkt rekombinative Prozesse für die Reinitiation genutzt

Mit Hilfe des KanKanMX4-Systems ließ sich zeigen, daß die Reversionsfrequenzen in einer *rev3*-Deletionsmutante nach Behandlung mit 4-NQO sogar über das Niveau des Wildtyps erhöht sind. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit den von LIMOLI *et al.* vorgestellten Daten, nach welchen es in XP-V-Zellen, in welchen keine funktionsfähige Transläsionspolymerase η mehr gebildet wird, vermehrt zur Bildung von Doppelstrangbrüchen kommt. Es wird angenommen, daß auftretende UV-Schäden nicht durch Pol η überlesen werden können, sondern daß an arretierten Replikationsgabeln vermehrt *Holliday junctions* gebildet werden. Die vermehrte rekombinative Auflösung dieser Strukturen bedingt dann die erhöhte Frequenzen von Rekombinationsereignissen (LIMOLI *et al.*, 2000). Prinzipiell lassen sich die erhöhten Reversionsfrequenzen der *rev3*-Deletionsmutante auf die gleiche Art erklären.

Auffallend ist aber, daß auch die Reversionsfrequenzen der *rev3 mph1*-Doppelmutante über das Niveau des Wildtyps erhöht sind. Dieser Befund ist ein Beleg dafür, daß es in

Abwesenheit von *rev3* sowie *mph1* Mechanismen gibt, welche zu einer vermehrten Entstehung von Reversionsereignissen führen, wobei diese Prozesse aber offenbar durch Rev3 supprimiert werden, da in *mph1*-Mutanten einer Erniedrigung der Reversionsfrequenzen beobachtet wird. Eine solche Supprimierung alternativer Reparaturmechanismen wurde bereits von STELTER & ULRICH für Polymerase ζ gezeigt (STELTER & ULRICH, 2003; siehe Seite 143).

Es wurden bereits Evidenzen gezeigt, daß auch in *Saccharomyces cerevisiae* fehlerfreie Mechanismen zunächst fehlerbehafteten Mechanismen vorgezogen werden (siehe Seite 75). Wenn allerdings die Transläsionspolymerasen rekrutiert werden, dann werden durch diese aktiv fehlerfreie Mechanismen gehemmt. Diese Befunde lassen es zwar nicht unmöglich aber unwahrscheinlich erscheinen, daß die Rekrutierung auf rein kinetischen Faktoren beruht. Die vorliegenden Daten legen allerdings nahe, daß die Rekrutierung bestimmter Reparaturenzyme aktiv erfolgt (siehe auch Seite 143). In diesem Fall wäre eine interessante Frage, ob das Reparatursystem, welches in Abwesenheit von Rev3 vermehrt zu Reversionsereignissen führt, ebenfalls spezifisch rekrutiert wird, oder ob das Fehlen von Rev3 zu einem unregulierten Einsatz dieses Systems führt.

Offensichtlich hat in einer *rev3*-Deletionsmutante auch die zusätzliche Deletion von *mph1* nur noch einen geringfügigen Effekt. Dies könnte darauf hindeuten, daß in *rev3*-Mutanten von vornherein ein alternativer Weg genutzt wird, so daß Mph1 nicht mehr »zum Zuge« kommt. Es wäre also denkbar, daß in *rev3*-Deletionsmutanten bei einem Arrest ein Signal gegeben wird, welches den Einsatz von Mph1 nahezu ausschließt.

Alternativ könnte angenommen werden, daß Läsionen bei Ausfall von Rev3 durch einen weiteren Mechanismus prozessiert werden, der vermehrt zu Reversionsereignissen führt. Bei Ausfall von Rev3 kommt es aus diesem Grund vermehrt zu Reversionsereignissen. Gleichzeitig werden aber auch Läsionen mit Hilfe von Mph1 fehlerfrei umgangen. Fällt nun Mph1 zusätzlich aus, können die durch Mph1 umgangenen Läsionen nicht mehr durch Rev3 überlesen werden, so daß ebenfalls eine Prozessierung durch den zusätzlich angenommenen Mechanismus erfolgt. Da sowohl durch die Mph1-abhängige Umgehung als auch durch den zusätzlich angenommenen Weg Reversionsereignisse entstehen, hat die Deletion von *MPH1* keinen ausgeprägten Effekt auf die Reversionsfrequenzen.

Es läßt sich spekulieren, daß z.B. Rev3 die Polyubiquitylierung von PCNA verhindert und damit zu einer Verminderung der Prozessierung von Läsionen durch die fehlerfreien Wege der postreplikativen Reparatur führt. Für diese müßte man annehmen, daß sie eine Erhöhung der Reversionsfrequenzen zur Folge haben. In Abwesenheit von Rev3 würden die Läsionen dann sowohl von Mph1 als auch von der fehlerfreien postreplikativen Reparatur prozessiert, wobei beide Wege zu Reversionsereignissen führen. Durch die zusätzliche Deletion von *MPH1* würden auch hier die Läsionen durch die fehlerfreie postreplikative Reparatur ebenfalls unter Entstehung von Reversionsereignissen prozessiert. Da beide Wege zu Reversionsereignissen führen, sind die Unterschiede bei

Ausfall von Mph1 nur moderat. Durch einen solchen Weg wäre auch die Repression von Reparaturmechanismen durch Rev3 erklärt (siehe auch Seite 142).

Diese Überlegung wird in gewisser Weise durch die Reversionsfrequenzen nach Behandlung der Zellen mit Camptothecin gestützt, da hier ein ähnlicher Effekt auftritt. Bei niedrigeren Camptothecin-Konzentrationen zeigt die *rev3*-Deletionsmutante eine leichte Erniedrigung der Reversionsfrequenz, erreicht dann aber bei hohen Konzentrationen das Niveau des Wildtyps. Die *rev3 mph1*-Doppelmutante ist mit der *rev3*-Einzelmutante nahezu identisch. Auch hier findet sich also die Übereinstimmung der Reversionsfrequenzen von Einzel- und Doppelmutante.

Aus diesen Daten läßt sich zum einen der Schluß ziehen, daß durch Camptothecin offensichtlich Läsionen ausgelöst werden, für deren Prozessierung die Anwesenheit von Rev3 eine Rolle spielt, da die Reversionsfrequenzen erniedrigt sind. Andererseits wird bei höheren Konzentrationen das Niveau des Wildtyps erreicht, was den Schluß zuläßt, daß die Rolle von Rev3 bei der Prozessierung von Läsionen, die durch Camptothecin ausgelöst wurden, nicht sehr groß ist. Diese Überlegung ist im Einklang mit den für Camptothecin erwarteten Schadenstypen, welche präferentiell wohl nicht durch die Transläsionssynthese überlesen werden können (siehe Seite 68).

Die spontane Reversionsrate ist in *rev3*-Mutanten nicht stark verändert. Es wurde bereits postuliert, daß auch in *Saccharomyces cerevisiae* fehlerfreie Mechanismen der fehlerhaften Prozessierung von Läsionen vorgezogen werden, so daß es nicht überrascht, daß unter Normalbedingungen (also ohne zusätzliche Mutagenbehandlung) nur eine sehr schwache Erhöhung der Reversionsrate zu verzeichnen ist.

In der Doppelmutante ist hingegen die spontane Reversionsrate im Vergleich zur *mph1*-Einzelmutante auf das Niveau des Wildtyps erhöht. Auch hier gleichen sich also die Einzel- und die Doppelmutante, wobei sich dieser Effekt ebenfalls darauf zurückführen läßt, daß bei Abwesenheit von Rev3 das Signal für einen rekombinativen Reinitiationsweg gegeben wird, welcher von vornherein unabhängig von der Anwesenheit von Mph1 ist. Aus den vorliegenden Daten kann allerdings keine Aussage darüber gemacht werden, um was für einen Weg es sich handeln könnte.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die beobachteten experimentellen Daten wäre die Annahme einer Interaktion von Mph1 mit Rev3. So wäre es möglich, daß Rev3 in bestimmten Situationen zu einer Aktivierung von Mph1 führt, wodurch die Transläsionssynthese verringert und die Mph1-kontrollierten rekombinativen Reinitiationsprozesse verstärkt würden. In diesem Fall sollte man annehmen, daß die zusätzliche Deletion von *MPH1* keinen größeren Einfluß auf eine *rev3*-Deletionsmutante hat, wobei für die Mutationsrate, die Mutationsfrequenzen und auch die Reversionsrate und Reversionsfrequenzen genau dies beobachtet wird.

Dagegen spricht jedoch, daß bezüglich der Sensitivität insbesondere gegenüber MMS ein synergistischer Phänotyp von *rev3* und *mph1* beobachtet wurde (SCHELLER *et al.*, 2000). Hierfür sind mehrere Möglichkeiten denkbar. Einerseits ist es möglich, durch MMS eine weitere Klasse von Schäden hervorgerufen wird, welche weder bei 4-NQO und

bei Camptothecin in größerer Konzentration vorkommt und welche in einer Art und Weise prozessiert wird, die zu dem beobachteten synergistische Phänotyp führt. Oder durch die Behandlung mit MMS entstehen Schäden, deren Prozessierung in Abwesenheit von Mph1 und Rev3 (also z.B. durch die fehlerfreie, postreplikative Reparatur) zu für die Zellen toxischen Intermediaten führen.

Die enigmatische Rolle von Polymerase η

Durch Rad30 werden kleine Läsionen der DNA größtenteils fehlerfrei umgangen

Die Deletion von *RAD30* führt nur zu einer moderaten Sensitivität gegenüber UV (STELTER & ULRICH, 2003) und 4-NQO, während die *rad30*-Deletionsmutante keine Sensitivität gegenüber Camptothecin zeigt. Dies ist im Einklang mit den biochemischen Befunden, daß Rad30 als Transläsionspolymerase an der fehlerfreien Prozessierung kleiner DNA-Läsionen beteiligt ist (JOHNSON *et al.*, 1999).

Diese Hypothese wird auch durch die Mutationsfrequenzen bestätigt. Durch die Behandlung von *rad30*-Mutanten mit 4-NQO kann die Mutationsfrequenz deutlich erhöht werden. Offenbar ist Rad30 an der fehlerfreien Umgehung von durch 4-NQO ausgelösten Läsionen beteiligt, die in dessen Abwesenheit mutagen überlesen werden.

Auch die Daten der Reversionsfrequenzen deuten auf eine solche Beteiligung hin. Hier zeigt sich, daß insbesondere die Behandlung mit 4-NQO einen Einfluß auf die Reversionsfrequenzen des KanMX4-Moduls in der *rad30*-Mutante hat, während die Behandlung der Zellen mit Camptothecin nur einen geringen Effekt zeigt. Die vorhandenen Daten stimmen diesbezüglich mit der biochemisch nachgewiesenen Funktion des Proteins überein.

Die Deletion von RAD30 führt nicht zu einer verstärkten Bildung von Doppelstrangbrüchen nach Behandlung der Zellen mit 4-NQO

Interessanterweise lassen sich die Ergebnisse für XP-V, dem Homolog von Polymerase η (siehe Seite 150), in *rad30*-Mutanten nicht bestätigen. Sowohl die Behandlung mit 4-NQO als auch die Behandlung mit Camptothecin führt nicht zur Erhöhung sondern zu einer Erniedrigung der Reversionsfrequenzen. Offenbar unterscheiden sich die Konsequenzen eines Fehlens von Polymerase η in Hefe und in humanen Zellen.

Bezüglich der Behandlung mit 4-NQO ist beachtenswert, daß sich die *rad30*- und die *mph1*-Mutante ähnlich verhalten, obwohl aus den bisher vorhandenen Daten hervorgeht, daß beide funktionell unterschiedlich sind. Während bezüglich Mph1 einiges dafür spricht, daß das Protein an einem rekombinativen Mechanismus zur Umgehung arretierter Replikationsgabeln beteiligt ist, erscheint für Polymerase η gemäß den biochemischen Befunden zunächst eine Rolle in der Transläsionssynthese wesentlich plausibler. Unter diesem Gesichtspunkt ist es dann allerdings verwunderlich, warum in der *rad30*-Deletionsmutante die Reversionsfrequenzen erniedrigt sind.

Es wurde bereits diskutiert, daß für Polymerase η in *Schizosaccharomyces pombe* auch ein Zusammenhang mit der Kontrolle des *checkpoint* gezeigt wurde (siehe Seite 86). Hieraus ließe sich schließen, daß das Rad30-Protein auch eine gewissen regulatorische Funktion besitzt.

Diese regulatorische Funktion muß sich jedoch nicht zwingend auf den *checkpoint* beziehen. Nimmt man erneut das Modell zu Hilfe, nach welchem Schäden definiert erkannt und bestimmte Reinitiationsmöglichkeiten eingeschaltet werden, dann wäre es denkbar, daß bei Ausfall von Polymerase η vermehrt Polymerase ζ eingesetzt wird, wobei bereits gezeigt wurde, daß durch diese andere Reparaturmechanismen gehemmt werden können (STELTER & ULRICH, 2003). Auch auf diese Weise ließe sich also eine Erniedrigung der Reversionsfrequenzen erklären.

Nimmt man an, daß durch Rad30 insbesondere spezielle UV-Schäden spezifisch prozessiert werden (JOHNSON *et al.*, 1999; WASHINGTON *et al.*, 2000), dann verwundert es nicht, daß sich die Reversionsfrequenzen nach Behandlung der Zellen mit Camptothecin nicht massiv ändern, da hier der Einsatz von Pol η nur eine untergeordnete Rolle spielen sollte. Bei der *rad30 mph1*-Doppelmutante sind (im Gegensatz zur *rev3 mph1*-Doppelmutante) die Frequenzen auch nicht gleich, sondern die zusätzliche Deletion von *MPH1* führt zu einer Erniedrigung der Frequenzen der Doppelmutante. Diese Befunde unterstützen die Hypothese, daß Mph1 und Rad30 in unterschiedlichen Wegen an der Prozessierung von DNA-Läsionen beteiligt sind.

Bei der Behandlung mit Camptothecin ist – wie schon bei *rev3*-Mutanten – bemerkenswert, daß die Frequenzen sowohl der *rad30*- als auch der *rad30 mph1*-Doppelmutante bei niedrigen Mutagenkonzentrationen leicht verringert sind, während sie bei hohen Konzentrationen über das Niveau des Wildtyps bzw. der Einzelmutante hinausgehen. In Anbetracht der zumindest biochemisch klar definierten Rolle von Rad30 ist ohne zusätzliche Daten auch hier die Annahme am plausibelsten, daß die Effekte auf regulatorische Funktionen des Rad30-Proteins zurückzuführen sind.

Auf Schäden, welche von Mph1 fehlerfrei umgangen werden, haben die Deletionen von RAD30 und REV3 unterschiedliche Einflüsse

In vitro konnte gezeigt werden, daß durch Polymerase η (6-4)TT-Dimere relativ effizient überlesen werden können, während die weitere Verlängerung des entstehenden Primer-Terminus nur relativ ineffizient erfolgt. Hingegen konnte dieses Primerende von Polymerase ζ effizient verlängert werden. Diese biochemischen Befunde haben zusammen mit genetischen Daten zu der Hypothese geführt, daß an der Transläsionssynthese zwei unterschiedliche Polymerasen beteiligt sein könnten, wobei durch eine Polymerase gegenüber der Läsionen Basen inkorporiert werden, während durch Polymerase ζ die Elongation des Primers, welcher gegenüber der Läsion endet, erfolgt (BRESSON & FUCHS, 2002; PRAKASH & PRAKASH, 2002).

Die hier vorgestellten Daten zeigen allerdings eindeutig, daß diese Hypothese, zumindest bezüglich der untersuchten Läsionen und bezüglich einer sequentiellen Aktivi-

tät von Polymerase η und Polymerase ζ , nicht zutreffend ist. Bei den Mutationsfrequenzen nach 4-NQO-Behandlung führt die Deletion von *RAD30* zu einer deutlichen Verstärkung der Mutationsfrequenzen, wobei angenommen werden kann, daß diese Verstärkung durch Polymerase ζ hervorgerufen wird. Sofern beide Polymerasen für die Prozessierung von Läsionen zuständig sein sollten, dann sollte der Mutatorphänotyp der *mph1*-Mutante auch durch die Deletion von *RAD30* supprimiert werden, was nicht der Fall ist. Auch hier sind offenbar Polymerase η und ζ in unterschiedlichen Wegen involviert. Sofern die aufgestellte Hypothese zutreffend ist, gilt sie nicht für die untersuchten Läsionsarten, sondern z.B. nur für UV-Läsionen.

Ein ähnliches Ergebnis erhält man auch aus den spontanen Mutationsraten. Bei einer sequentiellen Prozessierung spontan auftretender Läsionen von Polymerase ζ und Polymerase η sollte man auch hier eine Unterdrückung des Mutatorphänotyps der *mph1*-Mutante in der *mph1 rad30*-Doppelmutante erwarten. Die Absenkung ist hingegen nur gering, so daß auch hier davon ausgegangen werden kann, daß bezüglich der spontan auftretenden Schäden, die von Mph1 fehlerfrei prozessiert werden, bei Ausfall von Mph1 keine sequentielle Prozessierung von Polymerase ζ und Polymerase η vorliegt.

Sgs1 ist ein Regulator von Rekombinationsprozessen

Sgs1 ist an der Prozessierung unterschiedlicher Läsionen beteiligt

In *sgs1*-Deletionsmutanten zeigen alle Läsionstypen einen Effekt. Dieser ist allerdings heterogen. Zunächst ist auffallend, daß durch die Deletion von *SGS1* der Mutatorphänotyp der *mph1*-Deletionsmutante supprimiert wird. Dieser Befund deutet darauf hin, daß Sgs1 direkt oder indirekt an der Transläsionssynthese von Schäden, welche im Rahmen des normalen Zellmetabolismus entstehen, beteiligt ist. Der Ausfall von Sgs1 führt offensichtlich zu einem geringeren Einsatz von Polymerase ζ , so daß eine andere Prozessierung der Läsionen erfolgen muß.

Im scharfen Kontrast zu diesen Daten stehen die Ergebnisse der Mutationsfrequenzen, aus welchen eindeutig hervor geht, daß es bei Behandlung der Zellen mit Mutagenen zu einer Erhöhung der Mutationsfrequenzen kommt. Offenbar führt hier das Fehlen von Sgs1 zu einer verstärkten Transläsionssynthese.

Interessant ist, daß sich diese Diskrepanz auch bei den Reversionsraten und Reversionsfrequenzen wiederfindet. Während die spontane Reversionsrate erhöht ist, sind die Reversionsfrequenzen nach Behandlung mit 4-NQO deutlich erniedrigt.

Diese Diskrepanz läßt sich durch mehrere Hypothesen erklären. Eine Möglichkeit ist, daß Sgs1 in Abhängigkeit der Schadensdichte die Prozessierung von Läsionen beeinflusst. Bei relativ wenig auftretenden Läsionen würde dann in Abwesenheit von Mph1 durch Sgs1 die Transläsionssynthese ermöglicht werden, was zu dem beobachteten Phänotyp und zur Suppression des *mph1*-Phänotyps durch die zusätzliche Deletion von *SGS1* führt. Man mag in diesem Zusammenhang argumentieren, daß ein schnelles Beenden der

Replikation bei einer niedrigen Schadensdichte einer hochgradig genauen Replikation vorgezogen wird.

Bei einer hohen Schadensdichte wäre hingegen die Zahl der potentiell auftretenden Mutationen zu groß, so daß alternative Mechanismen gegenüber der Translasionssynthese bevorzugt werden. Eine solche regulatorische Funktion von Sgs1 hätte zur Folge, daß bei geringen Schadensdichten weniger Läsionen mittels der Translasionssynthese umgangen werden, während bei hohen Schadensdichten keine Unterdrückung der Translasionssynthese mehr erfolgen kann, so daß die beobachtete Erhöhung der Mutationsfrequenzen auftritt.

Hierdurch ließe sich auch erklären, warum es in *sgs1*-Mutanten bei Behandlung mit MMS im Gegensatz zum Wildtyp zu keiner Verlangsamung des Zellzyklus kommt (FREI & GASSER, 2000). Es würde vermehrt die Translasionssynthese für die Prozessierung der Läsionen eingesetzt werden, wobei leicht vorstellbar ist, daß diese schneller als alternative Reparaturprozesse ist. Allerdings müßten die Läsionen anschließend entfernt werden, was den beobachteten verlangsamten G₂/M-Übergang erklären könnte (FREI & GASSER, 2000).

Sgs1 ist offenbar nicht an der vermehrten Bildung von Holliday junctions beteiligt

Die biochemischen Daten deuten an, daß Sgs1 an der Bildung oder an der Auflösung von *Holliday junctions* beteiligt sein könnte. Eine mögliche Hypothese hierbei ist die Annahme, daß Sgs1 *Holliday junctions* nach dem *polymerase strand switch* durch *branch migration* auflöst, wodurch die arretierende Läsion fehlerfrei überbrückt werden könnte (KAROW *et al.*, 2000).

Diese Hypothese konnte in dieser Einfachheit durch die gewonnenen Daten verworfen werden, da die Reversionsfrequenzen nach Behandlung der Zellen mit 4-NQO deutlich erniedrigt sind. Das Fehlen von Sgs1 führt also ganz offensichtlich nicht zu einer Stabilisierung von *Holliday junctions*. Allerdings wäre eine Rolle von Sgs1 bei der Bildung von *Holliday junctions* denkbar, so daß in Abwesenheit von Sgs1 weniger rekombinative Reinitiationsereignisse stattfinden können.

Überraschend war der Befund, daß die Deletion von *SGS1* im Falle der Behandlung der Zellen mit Camptothecin zu einer kräftigen Erhöhung der Reversionsfrequenzen führt. Hieraus läßt sich schließen, daß in Wildtypzellen kleine DNA-Läsionen Sgs1-vermittelt rekombinativ umgangen werden, während bei anderen Typen von DNA-Schäden eine rekombinative Umgehung unterbunden wird.

In diesem Zusammenhang ist interessant, daß durch COURCELLE & HANAWALT gezeigt werden konnte, daß durch RecJ und RecQ in *E. coli* eine Degradation des *lagging strand* nach UV-Bestrahlung nachweisbar ist (COURCELLE & HANAWALT, 1999). Nimmt man eine ähnliche Funktion für Sgs1 und eine bisher unbekannte Exonuklease an, dann könnte durch eine gezielte Degradation des *lagging strand* in bestimmten Fällen verhindert werden, daß eine Prozessierung z.B. über die Bildung einer *Holliday junction* erfolgt. Es wäre aber in Hinblick auf die Substratspezifität des Mms4-Mus81-Komplexes möglich,

daß durch Camptothecin ebenfalls Läsionen gebildet werden, bei welchen der *lagging strand* über den *leading strand* hinaus verlängert ist, welche aber nicht mittels des Mms4-Mus81-Komplexes geschnitten werden sollen. Fehlt Sgs1, dann bleibt u.a. häufiger eine Struktur erhalten, welche durch den Mms4-Mus81-Komplex geschnitten werden kann, woran sich zwangsläufig ein Rekombinationsprozeß anschließen muß. Dies würde die Erhöhung der Reversionsfrequenzen in *sgs1*-Deletionsmutanten nach Behandlung mit Camptothecin erklären.

Interessant ist das Ergebnis, daß die spontane Reversionsrate in *sgs1*-Deletionsmutanten deutlich gegenüber der des Wildtyps erhöht ist. Dies ließe sich erklären, wenn man davon ausgeht, daß ein signifikanter Anteil von Arresten der Replikation an größeren Hindernissen wie u.a. DNA-Proteinkomplexen, Sekundärstrukturen der DNA etc. erfolgte. Dann würde in diesen Fällen gemäß der oben aufgestellten Hypothese häufiger eine Degradation durch Mms4-Mus81 erfolgen und sich damit die Zahl der Reversionsereignisse erhöhen.

Srs2 ist ein positiver Regulator von Rekombinationsprozessen

Im Gegensatz zu den unterschiedlichen Phänotypen der *sgs1*-Deletionsmutante zeigt eine *srs2*-Deletionsmutante eine Erniedrigung der spontanen Reversionsrate und eine kräftige Erniedrigung der Reversionsfrequenzen sowohl nach Behandlung mit 4-NQO als auch mit Camptothecin. Dieser Befund steht im Widerspruch zu der beschriebenen erhöhten Rekombinationsrate (RONG ET AL., 1991; WANG *et al.*, 2001). Zusätzlich wurde für *srs2*-Mutanten eine Erhöhung der heteroalleischen Rekombination nach Bestrahlung mit UV gezeigt.

Interessant an diesen Befunden ist, daß durch VAZE *et al.* gezeigt wurde, daß *srs2*-Mutanten nach einem Doppelstrangbruch am G₂/M-Übergang dauerhaft arretiert bleiben, auch wenn der Bruch bereits repariert wurde (VAZE *et al.*, 2002). Aus diesem Befund läßt sich schließen, daß offenbar die beobachteten heteroalleischen Rekombinationsereignisse nicht auf Doppelstrangbrüche, sondern auf die Bildung von Heteroduplex-DNA zurückgehen. Erfolgt die Reparatur der Fehlpaarungen in unterschiedliche Richtungen, führt dies zu einem Rekombinationsereignis, ohne daß ein Doppelstrangbruch gebildet wurde.

Nimmt man an, daß *srs2*-Zellen, in welchen es zur Bildung von Doppelstrangbrüchen kommt, dauerhaft arretieren, dann könnte die beobachtete Erniedrigung der Reversionsfrequenzen gerade darauf beruhen, daß die Reversionsereignisse auf Doppelstrangbrüche zurückgehen. Da Doppelstrangbrüche in einem *srs2*-Hintergrund zu einem dauerhaften Arrest am G₂/M-Übergang führen, würden Zellen, in welchen es zu Reversionsereignissen gekommen ist, keine Kolonien mehr bilden. Für diese Hypothese mag auch der Befund sprechen, daß *srs2*-Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp eine ausgeprägte Sensitivität sowohl gegenüber 4-NQO als auch gegenüber Camptothecin zeigen.

Allerdings ist in diesem Zusammenhang auffallend, daß die Reversionsraten weniger stark erniedrigt sind als die Reversionsraten einer *rad52*-Deletionsmutante. Nimmt man

an, daß alle entstehenden Doppelstrangbrüche zum Tod der *srs2*-Deletionsmutante durch dauerhaften Arrest der Zellen führen, dann ist verwunderlich, warum die Absenkung der Reversionsrate weniger ausgeprägt als im Falle der *rad52*-Mutante ist. Dies ließe sich u.U. dadurch erklären, daß Rad52 auch an anderen Rekombinationsprozessen der Zellen beteiligt ist (AGUILERA, 2001), die in der *srs2*-Mutante noch zu Reversionen führen und bei denen kein Doppelstrangbruch auftritt.

Durch diese Hypothese ließe sich auch der Befund der synthetischen Letalität einer *sgs1 srs2*-Doppelmutante erklären. Es wurde gezeigt, daß die spontane Reversionsrate von *sgs1*-Mutanten gegenüber dem Wildtyp erhöht ist. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß in *sgs1*-Deletionsmutanten vermehrt Doppelstrangbrüche entstehen, welche in Abwesenheit von Srs2 zu einem dauerhaften Arrest des Zellzyklus führen. Wird zusätzlich z.B. *RAD51* deletiert, so könnte dies einerseits dazu führen, daß das Signal, welches den *checkpoint response* auslöst, nicht mehr gebildet wird. Andererseits könnten die Läsionen auch über andere Mechanismen wie z.B. die Transläsionssynthese prozessiert werden, so daß die Bildung von Doppelstrangbrüchen vermieden wird.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß alle bisherigen Daten darauf hindeuten, daß auch die zusätzliche Deletion von *MPH1* in einem *srs2*-Hintergrund synthetisch letal ist (E. PANICO, unveröffentlicht). Dies ist insbesondere im Licht der Hypothese bemerkenswert, nach welcher Mph1 gerade an einem rekombinativen Weg beteiligt ist, durch welchen die Reinitiation arretierter Replikationsgabeln ermöglicht wird. Wenn jedoch *srs2*-Deletionsmutanten sensitiv auf Doppelstrangbrüche reagieren, dann stellt sich die Frage, warum gerade die zusätzliche Deletion von *MPH1*, welche vermutlich zu einer Erhöhung der Transläsionssynthese und einer Verringerung rekombinativer Ereignisse führt, synthetisch letal ist.

Eine Erklärungsmöglichkeit liegt in der biochemisch dargestellten Funktion von Srs2, Rad51-Filamente aufzulösen. So könnte das Fehlen von Srs2 in *mph1*-Mutanten zu einer Stabilisierung von Rekombinationsintermediaten führen. Für diese müßte angenommen werden, daß sie in Abwesenheit von Mph1 verstärkt in Doppelstrangbrüche überführt werden. In diesem Fall würde durch das Fehlen von Srs2 zusätzlich dauerhaft der Arrest am G₂/M-Übergang erfolgen und somit das Wachstum der Zellen ausbleiben.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß nach der Bildung der *Holliday junction* der vierte Arm direkt prozessiert und für die Stranginvasion genutzt werden kann (siehe Seite 136). Es wäre also denkbar, daß genau dieser Arm für die Bildung des Rad51-Filamentes genutzt wird. Wird in *mph1*-Mutanten vermehrt die Transläsionssynthese genutzt, dann wäre es möglich, daß die Rad51-Filamentbildung in *mph1*-Mutanten durch die Funktion von Srs2 erniedrigt wird, so daß es seltener zu Rekombinations- und damit zu Reversionsereignissen kommt. Fehlt hingegen Srs2, dann würde die *Holliday junction* mit dem Rad51-Filament stabilisiert werden. Eine vermehrte Auflösung dieser *Holliday junction* durch Resolvasen würde wiederum zu mehr Doppelstrangbrüchen und damit zu mehr Zellen führen, die dauerhaft am G₂/M-Übergang arretieren.

Gegen diese Hypothese spricht allerdings die relativ hohe Reversionsfrequenz des KanKanMX4-Moduls, welches mit einer Rate von $1 \cdot 10^{-4}$ in einem Sequenzabschnitt von 266 Basenpaaren revertiert. Dies bedeutet, daß es in einer von $1 \cdot 10^4$ Zellen pro 266 Basenpaaren zu einem Rekombinationsereignis mit einem Doppelstrangbruch kommt. Bezogen auf die gesamte Genomgröße mit $1,2 \cdot 10^7$ Basenpaaren sollte man erwarten, daß derartige Rekombinationsereignisse über das gesamte Genom gesehen mit einer Rate von $1 \cdot 10^7 / 266 \cdot 1 \cdot 10^{-4} \approx 4$ auftreten. Demnach müßte es in jeder Zelle zu derartigen Ereignissen kommen, so daß *srs2*-Deletionsmutanten generell nicht lebensfähig sein sollten.

Allerdings darf bei dieser Überlegung nicht übersehen werden, daß die Reversionsfrequenzen des KanKanMX4-Moduls bei chromosomaler Integration niedriger als im Falle des auf dem Plasmid lokalisierten Systems. Es kann dementsprechend sein, daß die Rate von derartigen Rekombinationsereignissen im gesamten Chromosom niedriger ist.

Für diese Hypothese könnte sprechen, daß für *srs2*-Mutanten ein Wachstumsdefekt gezeigt wurde (VAZE *et al.*, 2002). Dieser könnte dadurch zustande kommen, daß ein Teil der Zellen aufgrund von Doppelstrangbrüchen im Zellzyklus arretiert. Dann müßte man allerdings entweder voraussetzen, daß es den Zellen zumindest teilweise gelingt, den Arrest dennoch gelegentlich aufzulösen oder annehmen, daß nur in einem bestimmten Prozentsatz von Zellen Doppelstrangbrüche auftreten.

Über das Zusammenspiel von Mms4 und Mph1

Mms4 ist an der Prozessierung eines zu Mph1 inversen Schadensspektrums beteiligt

Die biochemischen und genetischen Daten mehrerer Arbeitsgruppen haben Hinweise dafür geliefert, daß auch der Mms4-Mus81-Komplex an der Reinitiation arretierter Replikationsgabeln beteiligt ist. Den Mutationsraten läßt sich aber entnehmen, daß *mms4*-Deletionsmutanten im Gegensatz zu *mph1*-Mutanten zumindest unter normalen Wachstumsbedingungen keinen Mutatorphänotyp besitzen. Hieraus läßt sich ableiten, daß der Mms4-Mus81-Komplex entweder nicht an der fehlerfreien Prozessierung von Läsionen beteiligt ist, welche im Verlauf des normalen Zellmetabolismus auftreten, oder daß die prozessierten Läsionen in der Regel dergestalt sind, daß sie nicht durch Transläsionspolymerasen überlesen werden können. Die formal synergistische Mutationsrate der *mms4 mph1*-Doppelmutante läßt zudem den Schluß zu, daß beide Proteine in unterschiedlichen Wegen involviert sind, die partiell überlappende Substratspezifitäten besitzen.

Diese Hypothese wird durch die Reversionsfrequenzen nach Mutagenbehandlung gestützt. Im Gegensatz zur *mph1*-Mutante zeigt die *mms4*-Deletionsmutante bei Behandlung mit 4-NQO nur eine moderate Erniedrigung der Reversionsfrequenzen. Hingegen führt die Behandlung mit Camptothecin, welches in *mph1*-Mutanten nur zu einer moderaten Erniedrigung führte, zu einem kräftigen Rückgang der Frequenzen. Eine mögliche Interpretation diese Daten ist, daß durch den Mms4-Mus81-Komplex nicht

kleine, replikationsarretierende Läsionen prozessiert werden, sondern Blockade, welche so groß sind, daß sie nicht durch Transläsionspolymerasen überlesen werden können und welche auch nicht zu einem Arrest der Polymerasen sondern der replikativen Helikasen führen.

Der Mms4-Mus81-Komplex könnte an der Prozessierung mehrerer Substrate beteiligt sein

Den spontanen Reversionsraten läßt sich entnehmen, daß unter normalen metabolischen Bedingungen vermehrt Reversionsereignisse auftreten. Formal läßt sich dies also so interpretieren, daß *Mms4* die Stabilität von *tandem repeats* erhöht.

Dies ist allerdings anders, wenn die Zellen mit Mutagenen behandelt werden. Wie bereits ausgeführt, sind die Reversionsfrequenzen von *mms4*-Mutanten nach 4-NQO-Behandlung moderat erniedrigt, während die Deletion von *MMS4* zu einer drastischen Abnahme der Reversionsfrequenzen nach Behandlung mit Camptothecin führt. Dies ist auch aus den Sensitivitäten der Stämme erkennbar. Zwar ist auch die *mms4*-Mutante gegen 4-NQO empfindlich. Im Gegensatz zu *mph1*-Mutanten besitzen *mms4*-Mutanten aber eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber Camptothecin. Ganz offensichtlich ist also das Schadensspektrum, welches durch *Mms4*-*Mus81* prozessiert wird, ein anderes als dasjenige, welches durch *Mph1* prozessiert wird.

Auch die Daten zur Sensitivität unterstützen die Hypothese, daß durch den *Mms4*-*Mus81*-Komplex voluminöse Schäden umgangen werden, die naturgemäß nicht durch Polymerasen überlesen werden können. Die Erniedrigung der Reversionsfrequenzen im Falle der Behandlung mit 4-NQO kann dann entweder daran liegen, daß bereits durch die Behandlung mit 4-NQO Schäden entstehen, welche nicht mit Hilfe der Transläsionssynthese überlesen werden können. Oder es kann sich um Sekundärschäden handeln, indem an replikationsarretierenden Läsionen z.B. Transkriptionskomplexe arretieren. Wenn diese nicht sofort von der DNA entfernt werden, können sie zu Arresten der replikativen Helikasen führen (McGLYNN & LLOYD, 2000; TRAUTINGER & LLOYD, 2002).

Bei dieser Argumentation ergibt sich allerdings die Schwierigkeit, daß durch den *Mms4*-*Mus81*-Komplex ein Substrat erkannt wird, welches gerade dann entstehen sollte, wenn die *leading strand* Polymerase durch eine kleine Läsion arretiert wird, wenn also der *lagging strand* über den *leading strand* hinaus elongiert ist (COX, 2001; COX, 2002; McGLYNN & LLOYD, 2002). Diese Überlegung paßt auf den ersten Blick nicht zu der erhöhten Sensitivität gegenüber Camptothecin, da man davon ausgehen kann, daß gerade dieses Replikationsintermediat bei Behandlung mit Camptothecin weniger häufig anzutreffen ist.

Andererseits führt die Deletion von *MMS4* zu einer weiteren Erhöhung der spontanen Mutationsrate in *mph1*-Mutanten. Diese Daten lassen den Schluß zu, daß es offenbar Läsionen gibt, die zumindest in Abwesenheit von *Mph1* durch *Mms4*-*Mus81* fehlerfrei umgangen werden und die durch die Transläsionssynthese überlesen werden können. Dies scheint jedoch der kleinere Teil anfallender Läsionen zu sein.

Durch FABRE *et al.* wurde folgende Hypothese aufgestellt: Der Mms4-Mus81-Komplex könnte an der Prozessierung von Intermediaten beteiligt sein, welche beim Schließen einzelsträngiger DNA-Bereiche gegenüber von Läsionen entstehen. Ein mögliche Funktion von Sgs1 wäre die Vermeidung einzelsträngiger DNA-Bereiche während der Replikation. In *sgs1*-Deletionsmutanten müßten diese einzelsträngigen DNA-Bereiche mit Hilfe rekombinativer Prozesse geschlossen werden. Hier kann z.B. angenommen werden, daß ein einzelsträngiges 3'-Ende in das Schwesterchromatid eingeführt und replikativ verlängert wird. Ist der Strang ausreichend elongiert, könnte der Strang wieder mit dem ursprünglichen Strang zum Doppelstrang hybridisieren. Wurde bei der Elongation das 3'-Ende über den einzelsträngigen Bereich hinaus elongiert, entsteht im Verlauf der Relokation des elongierten Stranges eine 3'-*flap*-Struktur, welche gerade das ideale Substrat für den Mms4-Mus81-Komplex darstellt (FABRE *et al.*, 2002).

Die starke Absenkung der Reversionsfrequenzen nach Chemikalienbehandlung unterstützt diese Hypothese allerdings nicht, da der Mms4-Mus81-Komplex erst nach der Invasion des 3'-Endes benötigt würde. Die Reversionsereignisse müssen allerdings bereits vorher, nämlich bei der Invasion des 3'-Endes, entstehen. Zusätzlich kann durch diese Hypothese nicht die hohe Sensitivität der *mms4*-Mutante gegenüber Camptothecin erklärt werden. Camptothecin führt zwar zu einem Arrest der Polymerasen auf dem *lagging strand* (STRUMBERG *et al.*, 2000), aber dieser Arrest sollte dadurch zustande kommen, daß die replikativen Helikasen mit dem kovalenten Topoisomerase-DNA-Komplex kollidieren und so zu einem Arrest des Replisoms führen. Es erscheint unplausibel, daß durch Camptothecin verstärkt unvollendete Okazaki-Fragmente und damit einzelsträngige DNA-Bereiche in der DNA zurückbleiben. Mms4 muß also entweder eine andere oder eine zusätzliche Funktion besitzen.

Eine weitere Hypothese besagt, daß durch Mms4-Mus81 direkt Replikationsintermediate geschnitten werden (WHITBY *et al.*, 2002). Gemäß der biochemischen Aktivität des Mms4-Mus81-Komplexes erfolgt der Schnitt in der Matrize für den *leading strand*, wobei ein einzelsträngiges 5'-Ende entsteht. Bei dessen Degradation würde dann die replikationsarretierende Läsion beseitigt und ein für die homologe Rekombination geeignetes 3'-Ende entstehen, durch welches die Replikation reinitiiert werden könnte. Auch durch diese Hypothese läßt sich jedoch nicht ohne weiteres die hohe Sensitivität gegenüber Camptothecin erklären, da die durch Camptothecin ausgelösten Läsionen gerade auf dem *leading strand* zu *run-off*-Produkten führen, die vermutlich unabhängig von Mms4-Mus81 entstehen.

Weiterhin ist bezüglich dieser Hypothese problematisch, daß der Mms4-Mus81-Komplex insbesondere dann Gabelstrukturen schneidet, wenn das 5'-Ende weniger als fünf Nukleotide vom Verzweigungspunkt der Replikationsgabel entfernt ist. Man müßte also annehmen, daß nach der Entfernung aller replikativen Proteine von der Gabel entweder dieses Substrat übrig bleibt oder gebildet wird.

Durch eine weitere Hypothese läßt sich zumindest die erhöhte Sensitivität der *mms4*-Mutante gegenüber Camptothecin erklären. Es wurde bereits ausgeführt, daß ein

Camptothecin-Komplex auf der Matrize des *leading strand* zu einem sogenannten *run-off*-Produkt führt, wobei ein doppelsträngiges DNA-Ende entsteht. Erreicht das Replisom eine solche Läsion, so ist es vorstellbar, daß die replikativen Helikasen, sofern sie die Matrize des *lagging strand* umschließen (YUZHAKOV *et al.*, 1996; GOODMAN, 2002), nicht sofort stoppen, sondern, wie schematisch in Abb. 36 gezeigt, die Entwindung der Stränge noch etwas fortsetzen. In diesem Fall könnte auch der *lagging strand* verlängert werden. Es entstünde also einerseits ein doppelsträngiges DNA-Ende, welches *via* homologe Rekombination eingeführt werden müßte. Zusätzlich entsteht durch die Verlängerung des *lagging strand* eine 3'-*flap*-Struktur, welche entfernt werden muß. Diese Struktur ist zumindest *in vitro* das optimale Substrat für den Mms4-Mus81-Komplex. Durch dessen Schnitt würde eine Lücke entstehen, die mit Hilfe einer Polymerase und einer Ligase geschlossen werden könnte. Anschließend könnte das doppelsträngige DNA-Ende eingeführt werden.

Einen Hinweis für die Entstehung einer solchen Struktur bietet der Befund von STRUMBERG *et al.*, nach welchem ein durch Camptothecin inhibierter DNA-Topoisomerase I-Komplex auf der Matrize für den *leading strand* zu einem *run-off*-Produkt führt. Dies ist insofern bemerkenswert, als durch das Topoisomerasemolekül mehrere Basen auf beiden Seiten des Einzelstrangbruchs bedeckt werden, so daß die replikative Polymerase nicht ohne weiteres bis an das Ende des Stranges synthetisieren kann (STRUMBERG *et al.*, 2000). Dies wäre hingegen leicht möglich, wenn die replikative Helikase den Strang über den Einzelstrangbruch hinaus entwinden würde.

Mit dieser Hypothese ließe sich auch die synthetische Letalität einer *mms4 sgs1*- sowie einer *rad27 mus81*-Doppelmutante erklären (MULLEN *et al.*, 2001; KLEIN, 2001; BASTIN-SHANOWER *et al.*, 2003), wenn man davon ausgeht, daß bei auftretenden Einzelstrangbrüchen durch die Replikation ebenfalls eine 3'-*flap*-Struktur entsteht. Da AP-Stellen eine der häufigsten Läsionsarten in Zellen sind (BERNSTEIN & BERNSTEIN, 1991), kann davon ausgegangen werden, daß durch die Reparatur mit Hilfe von AP-Endonukleasen immer wieder Einzelstrangbrüche auftreten, welche zu einem Kollaps der Replikation führen.

Durch FABRE *et al.* wurde postuliert, daß Sgs1 u.a. in der Lage ist, eine 3'- in eine 5'-*flap*-Struktur umzuwandeln. Diese könnte dann in *Saccharomyces cerevisiae* durch Rad27 geschnitten werden. In Abwesenheit von Mms4 könnte die entstehende Struktur also über Sgs1/Rad27 aufgelöst werden. Sofern sowohl Mms4/Mus81 als auch Sgs1 bzw. Rad27 fehlen und dadurch die 3'-*flap*-Struktur persistiert, wäre eine Reinitiation durch die Invasion des Rad51-Filaments nicht möglich. Die Invasion des Rad51-Filamentes würde auf dem *lagging strand* erfolgen und eine Elongation vom 3'-Ende an der *flap*-Struktur wiederum beendet werden (siehe Abb. 36)

Wird allerdings das doppelsträngige DNA-Ende durch die Ausbildung des Rad51-Filamentes vor der Degradation durch Exonukleasen geschützt, würde sich spätestens dann eine große Gefahr für die Zelle ergeben, wenn eine Replikationsgabel, welche an einem benachbarten *origin* mit der Replikation begonnen hat, diesen Bereich erreicht. Vermutlich sind die entstehenden Intermediate letal für die Zelle, da Teile des betroffenen

Chromosoms verloren gehen können. Im Falle der Abwesenheit von Rad51 könnte durch Exonukleasen das doppelsträngige DNA-Ende degradiert werden, so daß ein einfacher Doppelstrang entsteht. In diesem Fall würde die Replikation am gleichen *origin* neu initiiert werden müssen, oder der Bereich müßte durch die Replikationsgabeln vom rechts bzw. links liegenden *origin* kommend repliziert werden. Auf diese Weise ließe sich erklären, warum die synthetische Letalität der *mms4 sgs1*-Doppelmutante durch die zusätzliche Deletion von *RAD51* aufgehoben werden kann (FABRE *et al.*, 2002; BASTIN-SHANOWER *et al.*, 2003).

Allerdings läßt sich auch durch diese Hypothese nicht ohne weiteres erklären, warum die Reversionsfrequenzen in *mms4*-Deletionsmutanten erniedrigt sind, da die entstehenden doppelsträngigen DNA-Enden unabhängig von den Mms4-Mus81-abhängigen Schnitten entstehen. Sofern man von der oben dargelegten Hypothese ausgeht, muß durch den Mms4-Mus81-Komplex noch ein anderes Substrat erkannt und geschnitten werden, dessen Prozessierung zur vermehrten Bildung von Reversionsereignissen führt. So ist es durchaus möglich, daß auch Replikationsintermediate nach einem Arrest des *leading strand* geschnitten werden, sofern die entstehenden Strukturen stabil erhalten bleiben. In diesem Zusammenhang wäre die Fragestellung interessant, ob die in *rev3 mph1*-Doppelmutanten erhöhte Reversionsfrequenzen durch den Mms4-Mus81-Komplex oder einen anderen Weg zustande kommen.

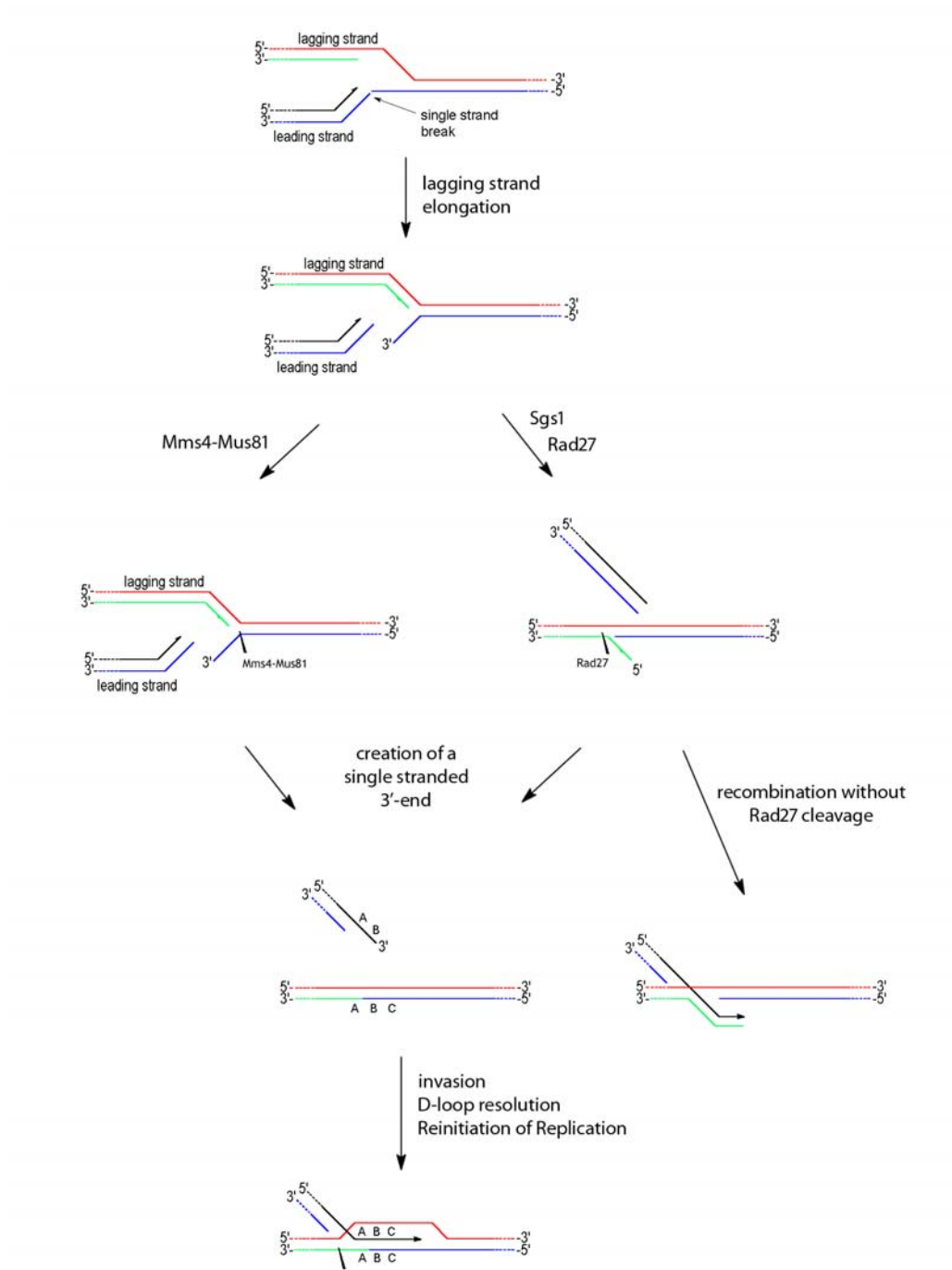


Abb. 36: Schematische Darstellung der Entstehung eines Substrates für den Mms4-Mus81-Komplex bzw. für Rad27 unter Beteiligung von Sgs1. Die Details sind im Text erklärt. Die parentalen Stränge sind in rot und blau, die neu synthetisierten Stränge in schwarz (*leading strand*) und grün (*lagging strand*) dargestellt. Die am jeweiligen Schritt möglicherweise beteiligten Proteine bzw. Prozessierungsschritte wurden eingetragen (Abbildung modifiziert nach Fabre *et al.*, 2002).

ZUSAMMENFASSUNG

mph1-Deletionsmutanten weisen einen spontanen *REV3*-abhängigen Mutatorphänotyp auf und sind sensitiv gegenüber verschiedenen DNA-schädigenden Chemikalien. Epistasianalysen zeigen, daß *MPH1* nicht zu einem der bekannten Reparaturwege gehört. Es wurden jedoch genetische Interaktionen mit Genen gefunden, welche vermutlich an der Reinitiation arretierter Replikationsgabeln beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein experimentelles System aus *E. coli* adaptiert, mit dessen Hilfe anhand der Reversion einer Antibiotikaresistenz die Stabilität einer Sequenzduplikation in *Saccharomyces cerevisiae* bestimmt werden kann. Als weiterer Phänotyp wurde die Häufigkeit von Mutationen im Canavaninresistenz-Vorwärtsmutationstest bestimmt. Für beide Phänotypen wurde die spontane Rate sowie die durch DNA-schädigende Agenzien induzierte Frequenz vermessen. Als DNA-schädigende Agenzien kamen 4-NQO sowie Camptothecin zum Einsatz, wobei die Behandlung mit 4-NQO hauptsächlich kleine Läsionen in der DNA auslöst, während Camptothecin vornehmlich zu Einzelstrangbrüchen und großen DNA-Proteinkomplexen führt.

Die spontane Mutationsrate war in *mms4*-Mutanten wenig erhöht. Hingegen zeigte eine *mms4 mph1*-Doppelmutante eine synergistische Erhöhung. In *recG*-exprimierenden Zellen war die spontane Mutationsrate leicht erniedrigt. Auch die erhöhte Mutationsrate der *mph1*-Mutante wurde durch die Expression von *recG* leicht abgesenkt.

Die Mutationsfrequenzen von *mph1*-, *sgs1*- und *rad30*-Deletionsmutanten waren nach Behandlung mit 4-NQO erhöht, wobei die zusätzliche Deletion von *MPH1* in den beiden letztgenannten Mutanten zu einem weiteren Anstieg führte.

Die spontanen Reversionsraten in *mph1*-, *rad52*- und *srs2*-Mutanten waren erniedrigt, wobei in *rad52*-Mutanten eine sehr starke Absenkung erfolgte. Die *rad52 mph1*-Doppelmutante zeigte eine synergistische genetische Interaktion. In *rev3*-Mutanten wurde keine deutliche Veränderung der Reversionsraten gemessen. Allerdings war die Rate der *rev3 mph1*-Doppelmutante im Vergleich zur *mph1*-Einzelmutante etwa auf das Niveau der *rev3*-Einzelmutante erhöht. In *sgs1*- und *mms4*-Deletionsmutanten waren die Reversionsraten erhöht. Die zusätzliche Deletion von *MPH1* führt in beiden Fällen zu einer Erniedrigung im Vergleich zur jeweiligen Einzelmutante.

Bezüglich der Reversionsfrequenzen nach 4-NQO-Behandlung zeigten *mph1*-, *rad30*-, *mms4*-, *sgs1*-, *srs2*-Mutanten sowie Stämme, welche *recG* aus *E. coli* exprimierten, eine Erniedrigung. Im Falle von *rad30*-, *mms4*- und *sgs1*-Mutanten führte die zusätzliche Deletion von *MPH1* zu einer weiteren Erniedrigung. Eine *srs2 mph1*-Doppelmutante konnte nicht erzeugt werden, was möglicherweise auf eine synthetische Letalität zurückzuführen ist. Die Deletion von *REV3* führte hingegen zu einer Erhöhung der Reversionsfrequenzen, auf welche die zusätzliche Deletion von *MPH1* nur einen minimalen Einfluß hatte.

Die Reversionsfrequenzen nach Behandlung mit Camptothecin waren in *mph1*-, *mms4*- und *srs2*-Mutanten erniedrigt. In der *mms4 mph1*-Doppelmutante war diese Erniedrigung verstärkt. Sowohl *rev3*- als auch *rad30*-Mutanten zeigten bei niedrigen Camptothecin-Konzentrationen eine Erniedrigung der Reversionsfrequenzen, während bei hohen Konzentrationen die Frequenzen über das Niveau des Wildtyps hinaus anstiegen. Die zusätzliche Deletion von *MPH1* hatte auf die Frequenzen der *rev3*-Mutanten nur einen geringen Einfluß, während die Reversionsfrequenzen der *rad30 mph1*-Doppelmutante etwa denen der *mph1*-Einzelmutter entsprachen. Die Expression von *recG* hatte nur einen sehr geringen Einfluß auf den Wildtyp und die *mph1*-Mutante. *sgs1*-Mutanten wiesen eine Erhöhung der Reversionsfrequenzen auf, die sich in der *mph1 sgs1*-Doppelmutante geringfügig änderte.

Aus diesen Befunden wurden folgende Schlußfolgerungen gezogen:

- 1) Die gemessenen Deletionsereignisse gehen hauptsächlich auf Prozesse zurück, in deren Verlauf es zu einer Invasion eines einzelsträngigen 3'-Endes kommt. Prozesse wie *primer template slippage* spielen nur eine untergeordnete Rolle.
- 2) *Mph1* ist hauptsächlich an einem rekombinativen Prozeß zur fehlerfreien Umgehung kleiner DNA-Läsionen beteiligt. Bei der Umgehung größerer Blockaden wie DNA-Protein-Komplexen spielt es nur eine untergeordnete Rolle.
- 3) *Mms4* ist umgekehrt hauptsächlich an der Umgehung größerer Blockaden beteiligt. Der fehlende Mutatorphänotyp der *mms4*-Deletionsmutante deutet darauf hin, daß der *Mms4*-*Mus81*-Komplex hauptsächlich Läsionen prozessiert, die nicht durch die Transläsionssynthese überlesen werden können.
- 4) Die durch die Expression von *RecG* in Hefe beobachteten Effekte ähneln denjenigen, die bereits für *E. coli* beschrieben wurden. Durch *RecG* werden bevorzugt kleine Läsionen der DNA umgangen. Dies wird zusätzlich durch die Befunde unterstützt, daß die Sensitivität einer *mph1*-Mutanten gegenüber 4-NQO und MMS partiell durch die Expression von *recG* unterdrückt werden kann. Die Umgehung erfolgt aber durch einen anderen Mechanismus als bei *Mph1*.
- 5) *Sgs1* wirkt sowohl als positiver als auch als negativer Regulator rekombinatorischer Prozesse.

- 6) Durch Rev3 werden insbesondere kleine Läsionen der DNA überlesen, während Camptothecin-induzierte Blockaden nur untergeordnet prozessiert werden. In Abwesenheit von Rev3 werden auftretende Läsionen vermehrt mittels rekombinatorischer Prozesse umgangen, die weitgehend unabhängig von Mph1 sind.
- 7) Rad30 ist an der fehlerfreien Umgehung kleiner DNA-Läsionen beteiligt. Die Erniedrigung der Reversionsfrequenzen deutet zusätzlich auf eine regulatorische Funktion bei der Umgehung von DNA-Läsionen hin.
- 8) Die Erniedrigung der Reversionsrate sowie der Reversionsfrequenzen in *srs2*-Mutanten könnte darauf zurückzuführen sein, daß Doppelstrangbrüche zu einem dauerhaften Arrest des Zellzyklus führen und aus diesem Grund auftretende Reversionsereignisse nicht detektiert werden können.

LITERATURVERZEICHNIS

- ABOUSSEKHRA, A., CHANET, R., ZGAGA, Z., CASSIER-CHAUVAT, C., HEUDE, M. UND FABRE, F. (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 (18), 7211–9.
- AGUILERA, A. (2001). Double-strand break repair: are Rad51/RecA-DNA joints barriers to DNA replication? *Trends Genet* 17 (6), 318–21.
- AL-DEIB, A. A., MAHDI, A. A. UND LLOYD, R. G. (1996). Modulation of recombination and DNA repair by the RecG and PriA helicases of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 178 (23), 6782–9.
- ARNAUDEAU, C., LUNDIN, C. UND HELLEDAY, T. (2001). DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells. *J Mol Biol* 307 (5), 1235–45.
- ASHLEY, C. T., JR. UND WARREN, S. T. (1995). Trinucleotide repeat expansion and human disease. *Annu Rev Genet* 29, 703–28.
- BAKER, T. A. UND BELL, S. P. (1998). Polymerases and the replisome: machines within machines. *Cell* 92 (3), 295–305.
- BASTIN-SHANOWER, S. A., FRICKE, W. M., MULLEN, J. R. UND BRILL, S. J. (2003). The mechanism of Mus81-Mms4 cleavage site selection distinguishes it from the homologous endonuclease Rad1-Rad10. *Mol Cell Biol* 23 (10), 3487–96.
- BENNETT, R. J., KECK, J. L. UND WANG, J. C. (1999). Binding specificity determines polarity of DNA unwinding by the *Sgs1* protein of *S. cerevisiae*. *J Mol Biol* 289 (2), 235–48.
- BERDICHEVSKY, A., IZHAR, L. UND LIVNEH, Z. (2002). Error-free recombinational repair predominates over mutagenic translesion replication in *E. coli*. *Mol Cell* 10 (4), 917–24.
- BERNSTEIN, C.; BERNSTEIN, H. (1991). *Aging, Sex, and DNA Repair*, Academic Press Inc. (New York), 1. Edition.
- BIDNENKO, V., EHRLICH, S. D. UND MICHEL, B. (2002). Replication fork collapse at replication terminator sequences. *EMBO J* 21 (14), 3898–907.
- BIERNE, H., SEIGNEUR, M., EHRLICH, S. D. UND MICHEL, B. (1997a). *uvrD* mutations enhance tandem repeat deletion in the *Escherichia coli* chromosome via SOS induction of the RecF recombination pathway. *Mol Microbiol* 26 (3), 557–67.
- BIERNE, H., VILETTE, D., EHRLICH, S. D. UND MICHEL, B. (1997b). Isolation of a *dnaE* mutation which enhances RecA-independent homologous recombination in the *Escherichia coli* chromosome. *Mol Microbiol* 24 (6), 1225–34.
- BOLT, E. L. UND LLOYD, R. G. (2002). Substrate specificity of RusA resolvase reveals the DNA structures targeted by RuvAB and RecG in vivo. *Mol Cell* 10 (1), 187–98.
- BOYE, E., LOBNER-OLESEN, A. UND SKARSTAD, K. (2000). Limiting DNA replication to once and only once. *EMBO Rep* 1 (6), 479–83.
- BRESSON, A. UND FUCHS, R. P. (2002). Lesion bypass in yeast cells: Pol eta participates in a multi-DNA polymerase process. *EMBO J* 21 (14), 3881–7.
- BURGERS, P. M. UND GERIK, K. J. (1998). Structure and processivity of two forms of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase delta. *J Biol Chem* 273 (31), 19756–62.
- CHILKOVA, O., JONSSON, B. H. UND JOHANSSON, E. (2003). The quaternary structure of DNA polymerase epsilon from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278 (16), 14082–6.

- COBB, J. A., BJERGBAÆK, L. UND GASSER, S. M. (2002). RecQ helicases: at the heart of genetic stability. *FEBS Lett* 29 (1), 43–8.
- CONTI, E., UY, M., LEIGHTON, L., BLOBEL, G. UND KURIYAN, J. (1998). Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* 94 (2), 193–204.
- COOK, P. R. (1999). The organization of replication and transcription. *Science* 284 (5421), 1790–5.
- CORDEIRO-STONE, M., MAKHOV, A. M., ZARITSKAYA, L. S. UND GRIFFITH, J. D. (1999). Analysis of DNA replication forks encountering a pyrimidine dimer in the template to the leading strand. *J Mol Biol* 289 (5), 1207–18.
- CORDONNIER, A. M. UND FUCHS, R. P. (1999). Replication of damaged DNA: molecular defect in *xeroderma pigmentosum* variant cells. *Mutat Res* 435 (2), 111–9.
- COURCELLE, J. UND HANAWALT, P. C. (1999). RecQ and RecJ process blocked replication forks prior to the resumption of replication in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 262 (3), 543–51.
- COX, M. M. (2001). Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli*: questions. *Annu Rev Genet* 35, 53–82.
- COX, M. M. (2002). The nonmutagenic repair of broken replication forks via recombination. *Mutat Res* 510 (1–2), 107–20.
- COX, M. M., GOODMAN, M. F., KREUZER, K. N., SHERRATT, D. J., SANDLER, S. J. UND MARIANS, K. J. (2000). The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* 404 (6773), 37–41.
- DEBETHUNE, L., KOHLHAGEN, G., GRANDAS, A. UND POMMIER, Y. (2002). Processing of nucleopeptides mimicking the topoisomerase I-DNA covalent complex by tyrosyl-DNA phosphodiesterase. *Nucleic Acids Res* 30 (5), 1198–204.
- DEBRAUWERE, H., LOEILLET, S., LIN, W., LOPES, J. UND NICOLAS, A. (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 U S A* 98 (15), 8263–9.
- DOE, C. L., AHN, J. S., DIXON, J. UND WHITBY, M. C. (2002). Mus81-Eme1 and Rqh1 involvement in processing stalled and collapsed replication forks. *J Biol Chem* 277 (36), 32753–9.
- DUA, R., EDWARDS, S., LEVY, D. L. UND CAMPBELL, J. L. (2000). Subunit interactions within the *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase epsilon (pol epsilon) complex. Demonstration of a dimeric pol epsilon. *J Biol Chem* 275 (37), 28816–25.
- ENTIAN, K. D., SCHUSTER, T., HEGEMANN, J. H., BECHER, D., FELDMANN, H., GULDENER, U., GOTZ, R., HANSEN, M., HOLLENBERG, C. P., JANSEN, G., KRAMER, W., KLEIN, S., KOTTER, P., KRICKE, J., LAUNHARDT, H., MANNHAUPT, G., MAIERL, A., MEYER, P., MEWES, W., MUNDER, T., NIEDENTHAL, R. K., RAMEZANI RAD, M., ROHMER, A., ROMER, A., HINNEN, A. *et al.* (1999). Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol Gen Genet* 262 (4–5), 683–702.
- FABRE, F., CHAN, A., HEYER, W. D. UND GANGLOFF, S. (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 U S A* 99 (26), 16887–92.
- FALASCHI, A. (2000). Eukaryotic DNA replication: a model for a fixed double replisome. *Trends Genet* 16 (2), 88–92.

- FLORES, M. J., BIERNE, H., EHRLICH, S. D. UND MICHEL, B. (2001). Impairment of lagging strand synthesis triggers the formation of a RuvABC substrate at replication forks. *EMBO J* 20 (3), 619–29.
- FREI, C. UND GASSER, S. M. (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 (1), 81–96.
- FRICKE, W. M., KALIRAMAN, V. UND BRILL, S. J. (2001). Mapping the DNA topoisomerase III binding domain of the Sgs1 DNA helicase. *J Biol Chem* 276 (12), 8848–55.
- FRIEDBERG, E. C., FEAVER, W. J. UND GERLACH, V. L. (2000). The many faces of DNA polymerases: strategies for mutagenesis and for mutational avoidance [comment]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (11), 5681–3.
- FRIEDBERG, E. C.; WALKER, G. C. UND SIEDE, W. (1995). DNA repair and mutagenesis, ASM Press (Washington, D. C.)
- FRIEDL, A. A., LIEFSHITZ, B., STEINLAUF, R. UND KUPIEC, M. (2001). Deletion of the SRS2 gene suppresses elevated recombination and DNA damage sensitivity in *rad5* and *rad18* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 486 (2), 137–46.
- GANGLOFF, S., McDONALD, J. P., BENDIXEN, C., ARTHUR, L. UND ROTHSTEIN, R. (1994). The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Mol Cell Biol* 14 (12), 8391–8.
- GANGLOFF, S., SOUSTELLE, C. UND FABRE, F. (2000). Homologous recombination is responsible for cell death in the absence of the Sgs1 and Srs2 helicases. *Nat Genet* 25 (2), 192–4.
- GAVIN, A. C., BOSCHE, M., KRAUSE, R., GRANDI, P., MARZIOCH, M., BAUER, A., SCHULTZ, J., RICK, J. M., MICHON, A. M., CRUCIAT, C. M., REMOR, M., HOFERT, C., SCHELDER, M., BRAJENOVIC, M., RUFFNER, H., MERINO, A., KLEIN, K., HUDAK, M., DICKSON, D., RUDI, T., GNAU, V., BAUCH, A., BASTUCK, S., HUHSE, B., LEUTWEIN, C., HEURTIER, M. A., COPLEY, R. R., EDELMANN, A., QUERFURTH, E., RYBIN, V., DREWES, G., RAID, M., BOUWMEESTER, T., BORK, P., SERAPHIN, B., KUSTER, B., NEUBAUER, G. UND SUPERTI-FURGA, G. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415 (6868), 141–7.
- GIETZ, R. D. UND SUGINO, A. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74 (2), 527–34.
- GOODMAN, M. F. (2000). Coping with replication 'train wrecks' in *Escherichia coli* using Pol V, Pol II and RecA proteins. *Trends Biochem Sci* 25 (4), 189–95.
- GOODMAN, M. F. (2002). Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 71, 17–50.
- GOODMAN, M. F. UND TIPPIN, B. (2000). Sloppier copier DNA polymerases involved in genome repair. *Curr Opin Genet Dev* 10 (2), 162–8.
- GREGG, A. V., MCGLYNN, P., JAKTAJI, R. P. UND LLOYD, R. G. (2002). Direct rescue of stalled DNA replication forks via the combined action of PriA and RecG helicase activities. *Mol Cell* 9 (2), 241–51.
- GRUBER, M., WELLINGER, R. E. UND SOGO, J. M. (2000). Architecture of the replication fork stalled at the 3' end of yeast ribosomal genes. *Mol Cell Biol* 20 (15), 5777–87.
- HANADA, K., UKITA, T., KOHNO, Y., SAITO, K., KATO, J. UND IKEDA, H. (1997). RecQ DNA helicase is a suppressor of illegitimate recombination in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (8), 3860–5.
- HARACSKA, L., PRAKASH, S. UND PRAKASH, L. (2000). Replication past O(6)-methylguanine by yeast and human DNA polymerase ϵ . *Mol Cell Biol* 20 (21), 8001–7.

- HARMON, F. G. UND KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1998). RecQ helicase, in concert with RecA and SSB proteins, initiates and disrupts DNA recombination. *Genes Dev* 12 (8), 1134–44.
- HARMON, F. G., DIGATE, R. J. UND KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1999). RecQ helicase and topoisomerase III comprise a novel DNA strand passage function: a conserved mechanism for control of DNA recombination. *Mol Cell* 3 (5), 611–20.
- HIGGINS, N. P., KATO, K. UND STRAUSS, B. (1976). A model for replication repair in mammalian cells. *J Mol Biol* 101 (3), 417–25.
- HIGUCHI, K., KATAYAMA, T., IWAI, S., HIDAKA, M., HORIUCHI, T. UND MAKI, H. (2003). Fate of DNA replication fork encountering a single DNA lesion during oriC plasmid DNA replication *in vitro*. *Genes Cells* 8 (5), 437–49.
- HILL, T. M. UND MARIANS, K. J. (1990). *Escherichia coli* Tus protein acts to arrest the progression of DNA replication forks in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (7), 2481–5.
- HOEGE, C., PFANDER, B., MOLDOVAN, G. L., PYROWOLAKIS, G. UND JENTSCH, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419 (6903), 135–41.
- HOLBECK, S. L. UND STRATHERN, J. N. (1997). A role for REV3 in mutagenesis during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 147 (3), 1017–24.
- HOPPERT, M. (2003). *Microscopic Techniques in Biotechnology*, Wiley-VCH GmbH & Co KgaA, 1. Auflage.
- HOZÁK, P., HASSAN, A. B., JACKSON, D. A., UND COOK, P. A. (1993). Visualization of Replication Factories Attached to a Nucleoskeleton. *Cell* 73, 361–73.
- HYRIEN, O. (2000). Mechanisms and consequences of replication fork arrest. *Biochimie* 82 (1), 5–17.
- INMAN, R. B. (1984). Methodology for the study of the effect of drugs on development and DNA replication in *Drosophila melanogaster* embryonic tissue. *Biochim Biophys Acta* 783 (3), 205–15.
- INOUE, H., NOJIMA, H. UND OKAYAMA, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96 (1), 23–8.
- JIN, Y. H., OBERT, R., BURGERS, P. M., KUNKEL, T. A., RESNICK, M. A. UND GORDENIN, D. A. (2001). The 3'→5' exonuclease of DNA polymerase delta can substitute for the 5' flap endonuclease Rad27/Fen1 in processing Okazaki fragments and preventing genome instability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (9), 5122–7.
- JOHNSON, R. E., PRAKASH, S. UND PRAKASH, L. (1999). Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Poleta. *Science* 283 (5404), 1001–4.
- JOHNSON, R. E., TORRES-RAMOS, C. A., IZUMI, T., MITRA, S., PRAKASH, S. UND PRAKASH, L. (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 (19), 3137–43.
- JOHNSON, R. E., WASHINGTON, M. T., HARACSKA, L., PRAKASH, S. UND PRAKASH, L. (2000). Eukaryotic polymerases iota and zeta act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature* 406 (6799), 1015–9.
- JOHNSON, R. E., YU, S. L., PRAKASH, S. UND PRAKASH, L. (2003). Yeast DNA polymerase zeta (zeta) is essential for error-free replication past thymine glycol. *Genes Dev* 17 (1), 77–87.
- KAI, M. UND WANG, T. S. (2003). Checkpoint activation regulates mutagenic translesion synthesis. *Genes Dev* 17 (1), 64–76.
- KALDERON, D., ROBERTS, B. L., RICHARDSON, W. D. UND SMITH, A. E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39 (3 Pt 2), 499–509.

- KALIRAMAN, V., MULLEN, J. R., FRICKE, W. M., BASTIN-SHANOWER, S. A. UND BRILL, S. J. (2001). Functional overlap between Sgs1-Top3 and the Mms4-Mus81 endonuclease. *Genes Dev* 15 (20), 2730–40.
- KANNOUCHE, P., BROUGHTON, B. C., VOLKER, M., HANAOKA, F., MULLENDERS, L. H. F. UND LEHMAN, A. R. (2001). Domain structure, localization and function of DNA polymerase eta, defective in *xeroderma pigmentosum* variant cells. *Genes Dev* 15, 158–172.
- KAO, H. I., HENRICKSEN, L. A., LIU, Y. UND BAMBARA, R. A. (2002). Cleavage specificity of *Saccharomyces cerevisiae* flap endonuclease 1 suggests a double-flap structure as the cellular substrate. *J Biol Chem* 277 (17), 14379–89.
- KAROW, J. K., CONSTANTINO, A., LI, J. L., WEST, S. C. UND HICKSON, I. D. (2000). The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of holliday junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (12), 6504–8.
- KARTHIKEYAN, R., VONARX, E. J., STRAFFON, A. F., SIMON, M., FAYE, G. UND KUNZ, B. A. (2000). Evidence from mutational specificity studies that yeast DNA polymerases delta and epsilon replicate different DNA strands at an intracellular replication fork. *J Mol Biol* 299 (2), 405–19.
- KAYTOR, M. D., NGUYEN, M. UND LIVINGSTON, D. M. (1995). The complexity of the interaction between *RAD52* and *SRS2*. *Genetics* 140 (4), 1441–2.
- KECK, J. L. UND BERGER, J. M. (2000). DNA replication at high resolution. *Chem Biol* 7 (3), R63–71.
- KIM, S., DALLMANN, H. G., MCHENRY, C. S. UND MARIANS, K. J. (1996). tau couples the leading- and lagging-strand polymerases at the *Escherichia coli* DNA replication fork. *J Biol Chem* 271 (35), 21406–12.
- KLEIN, H. L. (2001). Mutations in recombinational repair and in checkpoint control genes suppress the lethal combination of *srs2Delta* with other DNA repair genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 157 (2), 557–65.
- KOGOMA, T. (1997). Is RecF a DNA replication protein? *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (8), 3483–4.
- KOOL, E. T. (2002). Active site tightness and substrate fit in DNA replication. *Annu Rev Biochem* 71, 191–219.
- KOWALCZYKOWSKI, S. C., DIXON, D. A., EGGLESTON, A. K., LAUDER, S. D. UND REHRAUER, W. M. (1994). Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 58 (3), 401–65.
- KREJCI, L., VAN KOMEN, S., LI, Y., VILLEMAIN, J., REDDY, M. S., KLEIN, H., ELLENBERGER, T. UND SUNG, P. (2003). DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament. *Nature* 423 (6937), 305–9.
- KUNKEL, T. A. UND BEBENEK, K. (2000). DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem* 69, 497–529.
- KUZMINOV, A. (1995). Collapse and repair of replication forks in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 16 (3), 373–84.
- KUZMINOV, A. (2001). Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (15), 8241–6.
- LANE, H. E. UND DENHARDT, D. T. (1975). The *rep* mutation. IV. Slower movement of replication forks in *Escherichia coli rep* strains. *J Mol Biol* 97 (1), 99–112.
- LASKEY, R. A. UND MADINE, M. A. (2003). A rotary pumping model for helicase function of MCM proteins at a distance from replication forks. *EMBO Rep* 4 (1), 26–30.

- LAWRENCE, C. W. UND CHRISTENSEN, R. B. (1979). Metabolic suppressors of trimethoprim and ultraviolet light sensitivities of *Saccharomyces cerevisiae rad6* mutants. *J Bacteriol* 139 (3), 866–76.
- LEA, D. E. UND COULSON, C. A. (1948). The distribution of mutants in bacterial populations. *J Genet* 49, 248–264.
- LEE, S. K., JOHNSON, R. E., YU, S. L., PRAKASH, L. UND PRAKASH, S. (1999). Requirement of yeast *SGS1* and *SRS2* genes for replication and transcription. *Science* 286 (5448), 2339–42.
- LEMON, K. P. UND GROSSMAN, A. D. (1998). Localization of bacterial DNA polymerase: evidence for a factory model of replication. *Science* 282 (5393), 1516–9.
- LEMON, K. P. UND GROSSMAN, A. D. (2000). Movement of replicating DNA through a stationary replisome. *Mol Cell* 6 (6), 1321–30.
- LEONHARDT, H., RAHN, H. P., WEINZIERL, P., SPORBERT, A., CREMER, T., ZINK, D. UND CARDOSO, M. C. (2000). Dynamics of DNA replication factories in living cells. *J Cell Biol* 149 (2), 271–80.
- LEXIKON DER BIOCHEMIE IN DREI BÄNDEN (1991). Herder (Freiburg · Basel · Wien).
- LIBERI, G., CHIOLO, I., PELLICCIOLI, A., LOPES, M., PLEVANI, P., MUZI-FALCONI, M. UND FOIANI, M. (2000). Srs2 DNA helicase is involved in checkpoint response and its regulation requires a functional Mec1-dependent pathway and Cdk1 activity. *EMBO J* 19 (18), 5027–38.
- LIMOLI, C. L., GIEDZINSKI, E., MORGAN, W. F. UND CLEAVER, J. E. (2000). Inaugural article: polymerase eta deficiency in the *xeroderma pigmentosum* variant uncovers an overlap between the S phase checkpoint and double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (14), 7939–46.
- LINDAHL, T. UND WOOD, R. D. (1999). Quality control by DNA repair. *Science* 286 (5446), 1897–905.
- LIU, B. UND ALBERTS, B. M. (1995). Head-on collision between a DNA replication apparatus and RNA polymerase transcription complex. *Science* 267 (5201), 1131–7.
- LLOYD, R. G. UND SHARPLES, G. J. (1991). Molecular organization and nucleotide sequence of the *recG* locus of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 173 (21), 6837–43.
- LLOYD, R. G. UND SHARPLES, G. J. (1993). Dissociation of synthetic Holliday junctions by *E. coli* RecG protein. *EMBO J* 12 (1), 17–22.
- LOTTSPREICH, F. UND ZORBAS, H. (1998). Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag (Heidelberg · Berlin · Oxford), 1. Auflage.
- LOVETT, S. T., DRAPKIN, P. T., SUTERA, V. A., JR. UND GLUCKMAN-PESKIND, T. J. (1993). A sister-strand exchange mechanism for *recA*-independent deletion of repeated DNA sequences in *Escherichia coli*. *Genetics* 135 (3), 631–42.
- MAFSAHI, M., HOPE, J. C., DELGADO-CRUZATA, L., HAN, C. S. UND FREYER, G. A. (2002). The severe slow growth of *Deltasrs2 Deltarqh1* in *Schizosaccharomyces pombe* is suppressed by loss of recombination and checkpoint genes. *Nucleic Acids Res* 30 (21), 4781–92.
- MAHDI, A. A., MCGLYNN, P., LEVETT, S. D. UND LLOYD, R. G. (1997). DNA binding and helicase domains of the *Escherichia coli* recombination protein RecG. *Nucleic Acids Res* 25 (19), 3875–80.
- MAHL, H., MÖLDNER, K. (1973). Herstellung von Formvar-Objektträgern nach dem Eintauchverfahren. In: SCHIMMEL, G., VOGELL, W. (Hrsg.). Methodensammlung der Elektronenmikroskopie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft (Stuttgart), 1. Auflage.
- MANDAL, T. N., MAHDI, A. A., SHARPLES, G. J. UND LLOYD, R. G. (1993). Resolution of Holliday intermediates in recombination and DNA repair: indirect suppression of *ruvA*, *ruvB*, and *ruvC* mutations. *J Bacteriol* 175 (14), 4325–34.

- MANKOURI, H. W., CRAIG, T. J. UND MORGAN, A. (2002). *SGS1* is a multicopy suppressor of *srs2*: functional overlap between DNA helicases. *Nucleic Acids Res* 30 (5), 1103–13.
- MARIANS, K. J. (2000). PriA-directed replication fork restart in *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci* 25 (4), 185–9.
- MARNETT, L. J. UND PLASTARAS, J. P. (2001). Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet* 17 (4), 214–21.
- MATSUDA, T., BEBENEK, K., MASUTANI, C., HANAOKA, F. UND KUNKEL, T. A. (2000). Low fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase- ϵ . *Nature* 404 (6781), 1011–3.
- MATUNIS, M. J. (2002). On the road to repair: PCNA encounters SUMO and ubiquitin modifications. *Mol Cell* 10 (3), 441–2.
- MCGLYNN, P. UND LLOYD, R. G. (2000). Modulation of RNA polymerase by (p)ppGpp reveals a RecG-dependent mechanism for replication fork progression. *Cell* 101 (1), 35–45.
- MCGLYNN, P. UND LLOYD, R. G. (2001). Rescue of stalled replication forks by RecG: simultaneous translocation on the leading and lagging strand templates supports an active DNA unwinding model of fork reversal and Holliday junction formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (15), 8227–34.
- MCGLYNN, P. UND LLOYD, R. G. (2002). Genome stability and the processing of damaged replication forks by RecG. *Trends Genet* 18 (8), 413–9.
- MCVEY, M., KAEBERLEIN, M., TISSENBAUM, H. A. UND GUARENTE, L. (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 (4), 1531–42.
- MICHEL, B. (2000). Replication fork arrest and DNA recombination. *Trends Biochem Sci* 25 (4), 173–8.
- MICHEL, B., EHRLICH, S. D. UND UZEST, M. (1997). DNA double-strand breaks caused by replication arrest. *EMBO J* 16 (2), 430–8.
- MICHEL, B., FLORES, M. J., VIGUERA, E., GROMPONE, G., SEIGNEUR, M. UND BIDNENKO, V. (2001). Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (15), 8181–8.
- MILLER, J. H. The »GO« System in *Escherichia coli*, aus: *DNA Damage and Repair, Vol 1: DNA Repair in Prokaryotes and Lower Eukaryotes, 1998*, edited by J. A. NICKOLOFF AND M. F. HOEKSTRA, Humana Press Inc. (Totowa · New York), 1. Edition.
- MOHAGHEGH, P., KAROW, J. K., BROSH JR, R. M., JR., BOHR, V. A. UND HICKSON, I. D. (2001). The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases. *Nucleic Acids Res* 29 (13), 2843–9.
- MÜLHARDT, C. (1999). *Der Experimentator: Molekularbiologie*, Gustav Fischer Verlag (Stuttgart · Jena · Lübeck · Ulm), 1. Auflage.
- MULLEN, J. R., KALIRAMAN, V., IBRAHIM, S. S. UND BRILL, S. J. (2001). Requirement for three novel protein complexes in the absence of the Sgs1 DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 157 (1), 103–18.
- MYUNG, K., DATTA, A., CHEN, C. UND KOLODNER, R. D. (2001). *SGS1*, the *Saccharomyces cerevisiae* homologue of BLM and WRN, suppresses genome instability and homeologous recombination. *Nat Genet* 27 (1), 113–6.
- NAVAS, T. A., SANCHEZ, Y. UND ELLEDGE, S. J. (1996). RAD9 and DNA polymerase epsilon form parallel sensory branches for transducing the DNA damage checkpoint signal in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 10 (20), 2632–43.
- NEWCOMB, T. G.; LAWRENCE, A. L. *Oxidative DNA Damage and Mutagenesis*, aus: *DNA Damage and Repair, Vol 1: DNA Repair in Prokaryotes and Lower Eukaryotes, 1998*, edited by

- J. A. NICKOLOFF AND M. F. HOEKSTRA, Humana Press Inc. (Totowa · New York), 1. Edition.
- NISHIOKA, K., OHTSUBO, T., ODA, H., FUJIWARA, T., KANG, D., SUGIMACHI, K. UND NAKABEPPU, Y. (1999). Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. *Mol Biol Cell* 10 (5), 1637–52.
- OAKLEY, T. J. UND HICKSON, I. D. (2002). Defending genome integrity during S-phase: putative roles for RecQ helicases and topoisomerase III. *DNA Repair (Amst)* 1 (3), 175–207.
- OHMORI, H., FRIEDBERG, E. C., FUCHS, R. P., GOODMAN, M. F., HANAOKA, F., HINKLE, D., KUNKEL, T. A., LAWRENCE, C. W., LIVNEH, Z., NOHMI, T., PRAKASH, L., PRAKASH, S., TODO, T., WALKER, G. C., WANG, Z. UND WOODGATE, R. (2001). The Y-family of DNA polymerases. *Mol Cell* 8 (1), 7–8.
- ONODA, F., SEKI, M., MIYAJIMA, A. UND ENOMOTO, T. (2001). Involvement of *SGS1* in DNA damage-induced heteroallelic recombination that requires *RAD52* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 264 (5), 702–8.
- ONODERA, R., SEKI, M., UI, A., SATOH, Y., MIYAJIMA, A., ONODA, F. UND ENOMOTO, T. (2002). Functional and physical interaction between Sgs1 and Top3 and Sgs1-independent function of Top3 in DNA recombination repair. *Genes Genet Syst* 77 (1), 11–21.
- PAGES, V. UND FUCHS, R. P. (2003). Uncoupling of leading- and lagging-strand DNA replication during lesion bypass in vivo. *Science* 300 (5623), 1300–3.
- PHILIPPSSEN, P., STOTZ, A. UND SCHERF, C. (1991). DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 194, 169–82.
- POMMIER, Y., POURQUIER, P., FAN, Y. UND STRUMBERG, D. (1998). Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1400 (1–3), 83–105.
- POSTOW, L., CRISONA, N. J., PETER, B. J., HARDY, C. D. UND COZZARELLI, N. R. (2001). Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (15), 8219–26.
- PRAKASH, S. UND PRAKASH, L. (2002). Translesion DNA synthesis in eukaryotes: a one- or two-polymerase affair. *Genes Dev* 16 (15), 1872–83.
- REES, D. A. UND WELSH, E. J. (1977). Sekundär- und Tertiärstruktur von Polysacchariden in Lösungen und in Gelen. *Angewandte Chemie* 89, 228 – 239.
- REYNOLDS, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17, 208–213.
- ROBU, M. E., INMAN, R. B. UND COX, M. M. (2001). RecA protein promotes the regression of stalled replication forks in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (15), 8211–8.
- RÖMPP CHEMIE LEXIKON (1989). Herausgeber: Prof. Dr. Jürgen Falbe und Prof. Dr. Manfred Regitz, Georg Thieme Verlag (Stuttgart · New York), 9. Auflage.
- RONG, L. UND KLEIN, H. L. (1993). Purification and characterization of the *SRS2* DNA helicase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268 (2), 1252–9.
- RONG, L., PALLADINO, F., AGUILERA, A. UND KLEIN, H. L. (1991). The hyper-gene conversion *hpr5-1* mutation of *Saccharomyces cerevisiae* is an allele of the *SRS2/RADH* gene. *Genetics* 127 (1), 75–85.
- ROTHSTEIN, R., MICHEL, B. UND GANGLOFF, S. (2000). Replication fork pausing and recombination or »gimme a break«. *Genes Dev* 14 (1), 1–10.
- RUPP, W. D., WILDE, C. E., 3RD, RENO, D. L. UND HOWARD-FLANDERS, P. (1971). Exchanges between DNA strands in ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 61 (1), 25–44.

- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2. Edition.
- SANDLER, S. J. UND MARIANS, K. J. (2000). Role of PriA in replication fork reactivation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182 (1), 9–13.
- SAVESON, C. J. UND LOVETT, S. T. (1997). Enhanced deletion formation by aberrant DNA replication in *Escherichia coli*. *Genetics* 146 (2), 457–70.
- SAVESON, C. J. UND LOVETT, S. T. (1999). Tandem repeat recombination induced by replication fork defects in *Escherichia coli* requires a novel factor, RadC. *Genetics* 152 (1), 5–13.
- SAWITZKE, J. UND AUSTIN, S. (2001). An analysis of the factory model for chromosome replication and segregation in bacteria. *Mol Microbiol* 40 (4), 786–94.
- SCHELLER, J., SCHÜRER, A., RUDOLPH, C., HETTWER, S. UND KRAMER, W. (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 (3), 1069–81.
- SEIGNEUR, M., BIDNENKO, V., EHRLICH, S. D. UND MICHEL, B. (1998). RuvAB acts at arrested replication forks. *Cell* 95 (3), 419–30.
- SEIGNEUR, M., EHRLICH, S. D. UND MICHEL, B. (2000). RuvABC-dependent double-strand breaks in dnaBts mutants require recA. *Mol Microbiol* 38 (3), 565–74.
- SELBY, C. P. UND SANCAR, A. (1994). Mechanisms of transcription-repair coupling and mutation frequency decline. *Microbiol Rev* 58 (3), 317–29.
- SHOR, E., GANGLOFF, S., WAGNER, M., WEINSTEIN, J., PRICE, G. UND ROTHSTEIN, R. (2002). Mutations in homologous recombination genes rescue top3 slow growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 162 (2), 647–62.
- SIKORSKI, R. S. UND HIETER, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122 (1), 19–27.
- SINGLETON, M. R., SCAIFE, S. UND WIGLEY, D. B. (2001). Structural analysis of DNA replication fork reversal by RecG. *Cell* 107 (1), 79–89.
- SOGO, J. M., LOPES, M. UND FOIANI, M. (2002). Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science* 297 (5581), 599–602.
- SONODA, E., OKADA, T., ZHAO, G. Y., TATEISHI, S., ARAKI, K., YAMAIZUMI, M., YAGI, T., VERKAIK, N. S., VAN GENT, D. C., TAKATA, M. UND TAKEDA, S. (2003). Multiple roles of Rev3, the catalytic subunit of polzeta in maintaining genome stability in vertebrates. *EMBO J* 22 (12), 3188–97.
- STELTER, P. UND ULRICH, H. D. (2003). Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* 425 (6954), 188–91.
- STRUMBERG, D., PILON, A. A., SMITH, M., HICKEY, R., MALKAS, L. UND POMMIER, Y. (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 (11), 3977–87.
- STRYER, L. (1994). *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag (Heidelberg · Berlin · Oxford), 2. Auflage.
- SUGAWARA, N., WANG, X. UND HABER, J. E. (2003). In vivo roles of Rad52, Rad54, and Rad55 proteins in Rad51-mediated recombination. *Mol Cell* 12 (1), 209–19.
- SVOBODA, D. L. UND VOS, J. M. (1995). Differential replication of a single, UV-induced lesion in the leading or lagging strand by a human cell extract: fork uncoupling or gap formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (26), 11975–9.
- TRAUTINGER, B. W. UND LLOYD, R. G. (2002). Modulation of DNA repair by mutations flanking the DNA channel through RNA polymerase. *EMBO J* 21 (24), 6944–53.

- TRINCAO, J., JOHNSON, R. E., ESCALANTE, C. R., PRAKASH, S., PRAKASH, L. UND AGGARWAL, A. K. (2001). Structure of the catalytic core of *S. cerevisiae* DNA polymerase ϵ : implications for translesion DNA synthesis. *Mol Cell* 8 (2), 417–26.
- TURESKY, R. J. (1994). DNA adducts of heterocyclic aromatic amines, arylazides and 4-nitroquinoline 1-oxide. *IARC Sci Publ* 125 217–28.
- 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 (17), 3487–94.
- UZEST, M., EHRLICH, S. D. UND MICHEL, B. (1995). Lethality of *rep recB* and *rep recC* double mutants of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 17 (6), 1177–88.
- VAN DYCK, E., STASIAK, A. Z., STASIAK, A. UND WEST, S. C. (1999). Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature* 398 (6729), 728–31.
- VAZE, M. B., PELLICOLI, A., LEE, S. E., IRA, G., LIBERI, G., ARBEL-EDEN, A., FOIANI, M. UND HABER, J. E. (2002). Recovery from checkpoint-mediated arrest after repair of a double-strand break requires Srs2 helicase. *Mol Cell* 10 (2), 373–85.
- VEAUTE, X., JEUSSET, J., SOUSTELLE, C., KOWALCZYKOWSKI, S. C., LE CAM, E. UND FABRE, F. (2003). The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature* 423 (6937), 309–12.
- VOET, D. ; VOET, J. (1992). *Biochemie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH (Weinheim · New York · Basel · Cambridge), 1. Auflage.
- WACH, A., BRACHAT, A., POHLMANN, R. UND PHILIPPSEN, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10 (13), 1793–808.
- WAGA, S. UND STILLMAN, B. (1998). The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 67, 721–51.
- WAGA, S., MASUDA, T., TAKISAWA, H. UND SUGINO, A. (2001). DNA polymerase epsilon is required for coordinated and efficient chromosomal DNA replication in *Xenopus egg* extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (9), 4978–83.
- WANG, J. C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (6), 430–40.
- WANG, S. W., GOODWIN, A., HICKSON, I. D. UND NORBURY, C. J. (2001). Involvement of *Schizosaccharomyces pombe* Srs2 in cellular responses to DNA damage. *Nucleic Acids Res* 29 (14), 2963–72.
- WANG, Y., CORTEZ, D., YAZDI, P., NEFF, N., ELLEDGE, S. J. UND QIN, J. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 14 (8), 927–39.
- WASHINGTON, M. T., JOHNSON, R. E., PRAKASH, S. UND PRAKASH, L. (2000). Accuracy of thymine-thymine dimer bypass by *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase ϵ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (7), 3094–9.
- WATT, P. M., HICKSON, I. D., BORTS, R. H. UND LOUIS, E. J. (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 (3), 935–45.
- WHITBY, M. C. UND LLOYD, R. G. (1998). Targeting Holliday junctions by the RecG branch migration protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 273 (31), 19729–39.
- WHITBY, M. C., OSMAN, F. UND DIXON, J. (2002). Cleavage of model replication forks by fission yeast Mus81-Eme1 and budding yeast Mus81-Mms4. *J Biol Chem* 278 (9), 6928–35.
- WHITBY, M. C., VINCENT, S. D. UND LLOYD, R. G. (1994). Branch migration of Holliday junctions: identification of RecG protein as a junction specific DNA helicase. *EMBO J* 13 (21), 5220–8.

- WU, L., DAVIES, S. L., LEVITT, N. C. UND HICKSON, I. D. (2001). Potential role for the BLM helicase in recombinational repair via a conserved interaction with *RAD51*. *J Biol Chem* 276 (22), 19375–81.
- XU, L. UND MARIANS, K. J. (2003). PriA mediates DNA replication pathway choice at recombination intermediates. *Mol Cell* 11 (3), 817–26.
- YUZHAVOV, A., TURNER, J. UND O'DONNELL, M. (1996). Replisome assembly reveals the basis for asymmetric function in leading and lagging strand replication. *Cell* 86 (6), 877–86.
- ZOU, H. UND ROTHSTEIN, R. (1997). Holliday junctions accumulate in replication mutants *via* a RecA homolog-independent mechanism. *Cell* 90 (1), 87–96.

ANHANG

Verzeichnis ungebräuchlicher Abkürzungen

4-NQO	4-Nitrochinolin-1-oxid
BrdU	Bromdeoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
dYT	<i>double yeast tryptone</i>
EMS	Ethylmethansulfonat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
MMS	Methylmethansulfonat
<i>S. c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. p.</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Oligonukleotidsequenzen**Primer für die Deletion von *RAD30***

Bezeichnung	Sequenz
5'- <i>RAD30</i> disrupt	5' ATGTCAAATTTACTTGGAAAGGAGTTGATTCAGCTTG GTTTCAGCTGAAGCTTCGTACGCTG
3'- <i>RAD30</i> disrupt	5' CATTTTTTTCTTGTAATAAATGATAAGATGTTTTTGG AGGCATAGGCCACTAGTGGATCTG
5' his out	5' GTAAAGTCGTAAGCTCCAGCCT
3' his out	5' GACGAAGCTCTTTCTAGAAGCG
5'- <i>rad30</i> delsc	5' ACGCTACCTAATCCTGCCGAT
3'- <i>rad30</i> delsc	5' TGAACAATCAGCTGAGGTCAG
5'- <i>rad30</i> out	5' TGGGGAAGATCCAATACGTCA
3'- <i>rad30</i> out	5' ATCAGGTCCAGTTGCGTACAA

Primer für die Sequenzierung der KanKanMX4-Kassette

Bezeichnung	Sequenz
5'-KanScreen	5' TCAGGTGCGACAATCTATCGAT
3'-KanScreen	5' ATAGGATGGCAAGATCCTGGTA

Primer für die Amplifizierung des *recG*-Gens aus *E. coli*

Bezeichnung	Sequenz
5'-RecG_ <i>Bam</i> HI	5' GTGCTAGGATCCAAATGAAAGGTCGCCTGT
3'-RecG_ <i>NLS_Xho</i> I	5' GTAATCCTCGAGTTATCAAACCTTTCTCTT

Primer für die Sequenzierung des Vektors pYGET-*recG*

Bezeichnung	Sequenz
5'pYES-MCS	5' GGGCGTGAATGTAAGCGTGACATA
5'pYGET-RecG II	5' AGGGCCGCGAATCTCCAGATCT
5'pYGET-RecG III	5' CAACGCCGACTTCAATAACGGT
5'pYGET-RecG IV	5' TCAGTTATGCAGGCGTGGTGCA
5'pYGET-RecG V	5' TCGTCGATAATCACCAGCGCCA
5'pYGET-RecG VI	5' TCGGTTGGTGCCATCAATGCTA
5'pYGET-RecG VII	5' TTCAGCGTGTCAATTGGCGCTCA
5'pYGET-RecG VIII	5' AGTTCTTCAATGGCGCAGGTGT
5'pYGET-RecG IX	5' TCGCTGATCTGGCAGGTCATCA
3'pYGET-RecG I	5' CCAGTTCCTGAAAT'TATTCCC
3'pYGET-RecG II	5' TGGCGCAGCACTTAGTAACAAA
3'pYGET-RecG III	5' ATGGCGAAGCAAAGCGCGGTAA
3'pYGET-RecG IV	5' ACCGACGCTACAGCTTAGCGTA
3'pYGET-RecG V	5' AGATCGAGCGGATATGGCGCT
3'pYGET-RecG VI	5' AAGGTAAAGCACGGCTGGCACA
3'pYGET-RecG VII	5' CGATCTCGATACCTCGGTGATA
3'pYGET-RecG VIII	5' AGTTGAACGTTGGCCTGGTACA
3'pYGET-RecG IX	5' TCTCACTGCGTGCTGCTCTACA
3'pYGET-RecG X	5' CACGCCATATTCACGAACGTTA

Nukleotid- und deduzierte Aminosäuresequenz von recG aus E. coli

a	1	GATCCAAATG	AAAGGTCGCC	TGTTAGATGC	TGTCCCCTC	AGTTCCTTAA
		M	K	G	R	L
		L	D	A	V	P
		L	S	S	L	T
a	51	CGGGCGTTGG	CGCAGCACTT	AGTAACAAAC	TGGCGAAAAT	CAACCTGCAT
		G	V	G	A	A
		L	S	N	K	L
		A	K	I	N	L
		H				
a	101	ACCGTGCAGG	ATCTACTCTT	ACACCTTCCC	CTGCGCTACG	AAGATCGCAC
		T	V	Q	D	L
		L	L	L	H	L
		P	L	R	Y	E
		D	R	T		
a	151	CCATCTCTAC	CCCATCGGAG	AACTACTGCC	GGGCGTTTAT	GCCACGGTGG
		H	L	Y	P	I
		G	E	L	L	P
		G	V	Y	A	T
		V	E			
a	201	AAGGCGAAGT	GCTGAACTGC	AATATCTCCT	TCGGCGGTCG	GCGGATGATG
		G	E	V	L	N
		C	N	I	S	F
		G	G	R	R	M
		M				
a	251	ACCTGCCAGA	TCAGCGACGG	TTCCGGCATC	CTCACCATGC	GCTTTTTCAA
		T	C	Q	I	S
		D	G	S	G	I
		L	T	M	R	F
		F	F	N		
a	301	TTTCAGCGCG	GCAATGAAAA	ATAGCCTGGC	GGCGGGCCGC	CGTGTACTGG
		F	S	A	A	M
		K	N	S	L	A
		A	A	G	R	R
		V	L	A		
a	351	CTTATGGCGA	AGCAAAGCGC	GGTAAATATG	GTGCGGAGAT	GATCCACCCG
		Y	G	E	A	K
		R	G	K	Y	G
		A	E	M	I	H
		P				
a	401	GAATACCGCG	TGCAGGGCGA	TCTCAGCACG	CCAGAATTAC	AGGAAACGCT
		E	Y	R	V	Q
		G	D	L	S	T
		P	E	L	Q	E
		T	L			
a	451	CACGCCGGTT	TATCCAACAA	CGGAAGGCGT	AAAGCAGGCC	ACGCTGCGTA
		T	P	V	Y	P
		T	T	E	G	V
		K	Q	A	T	L
		R	K			
a	501	AATTAACCGA	CCAGGCGCTG	GATCTGCTCG	ACACCTGCGC	CATTGAAGAA
		L	T	D	Q	A
		L	D	L	L	D
		T	C	A	I	E
		E				

551 CTCCTGCCGC CGGAAGTGTG ACAAGGAATG ATGACGCTAC CGGAAGCGTT
a L L P P E L S Q G M M T L P E A L

601 GCGCACTTTG CACCGCCCGC CACCGACGCT ACAGCTTAGC GATCTGGAAA
a R T L H R P P P T L Q L S D L E T

651 CCGGGCAGCA TCCGGCGCAA CGTCGTCTGA TTCTGGAAGA ACTGCTGGCG
a G Q H P A Q R R L I L E E L L A

701 CACAACCTCA GCATGTTAGC CTTACGTGCC GGAGCACAGC GTTTTCATGC
a H N L S M L A L R A G A Q R F H A

751 CCAGCCGCTG AGCGCCAATG ACACGCTGAA AAATAAACTC CTCGCCGCCT
a Q P L S A N D T L K N K L L A A L

801 TACCGTTCAA GCCAACGGGC GCACAGGCAC GCGTAGTGGC GGAGATCGAG
a P F K P T G A Q A R V V A E I E

851 CGCGATATGG CGCTGGATGT GCCGATGATG CGTCTGGTGC AGGGCGATGT
a R D M A L D V P M M R L V Q G D V

901 AGGTTCCGGT AAAACGCTGG TCGCCGCCCT CGCCGCGTTG CGTGCGATTG
a G S G K T L V A A L A A L R A I A

951 CCCACGGCAA ACAGGTAGCA TTGATGGCAC CAACCGAATT ACTCGCCGAG
a H G K Q V A L M A P T E L L A E

1001 CAGCACGCCA ATAACCTCCG CAACTGGTTT GCACCGCTCG GTATCGAAGT
a Q H A N N F R N W F A P L G I E V

1051 GGGCTGGCTC GCCGGTAAGC AGAAAAGGTAA AGCACGGCTG GCACAGCAGG
a G W L A G K Q K G K A R L A Q Q E

1101 AAGCCATCGC CAGCGGTCAG GTGCAGATGA TTGTGCGTAC ACACGCCATC
a A I A S G Q V Q M I V G T H A I

1151 TTCCAGGAAC AGGTGCAGTT TAACGGCCTG GCGCTGGTGA TTATCGACGA
a F Q E Q V Q F N G L A L V I I D E

1201 ACAGCATCGT TTTGGCGTGC ATCAGCGTCT GGCATTGTGG GAGAAAAGGCC
a Q H R F G V H Q R L A L W E K G Q

1251 AGCAGCAGGG CTTCCATCCG CATCAGTTGA TCATGACCGC CACGCCGATC
a Q Q G F H P H Q L I M T A T P I

1301 CCCCACACGC TGGCAATGAC TGCATATGCC GATCTCGATA CCTCGGTGAT
a P R T L A M T A Y A D L D T S V I

1351 AGATGAGCTG CCGCCAGGCC GCACGCCAGT GACTACGGTC GCTATTCCCTG
a D E L P P G R T P V T T V A I P D

1401 ATACCCGCCG TACCGACATC ATTGACCGCG TGCACCACGC CTGCATAACT
a T R R T D I I D R V H H A C I T

1451 GAAGGTCGTC AGGCATACTG GGTTTGTACG TTGATTGAAG AGTCGGAATT
a E G R Q A Y W V C T L I E E S E L

1501 GCTGGAAGCG CAGGCGGCGG AAGCTACCTG GGAAGAGTTG AAACCTGGCGC
a L E A Q A A E A T W E E L K L A L

1551 TACCAGAGTT GAACGTTGGC CTGGTACACG GGCGGATGAA ACCTGCCGAG
a P E L N V G L V H G R M K P A E

1601 AAACAGGCGG TGATGGCGTC GTTTAAACAA GGTGAGCTAC ACCTGCTGGT
a K Q A V M A S F K Q G E L H L L V

1651 TGCCACAACC GTTATTGAAG TCGGCGTTGA TGTGCCTAAC GCCAGTCTGA
a A T T V I E V G V D V P N A S L M

1701 TGATTATCGA AAACCCGGAG CGTCTGGGTC TGGCGCAGTT ACACCAGCTG
a I I E N P E R L G L A Q L H Q L

```

1751 CGCGGGCGCG TAGGTCGTGG CGCGGTGGCT TCTCACTGCG TGCTGCTCTA
a   R G R V G R G A V A S H C V L L Y
1801 CAAAACGCCG CTTTCTAAAA CGGCGCAAAT TCGCCTGCAA GTGCTGCGCG
a   K T P L S K T A Q I R L Q V L R D
1851 ACAGTAACGA CGGTTTTGTG ATTGCGCAAA AAGATCTGGA GATTCGCGGC
a   S N D G F V I A Q K D L E I R G
1901 CCTGGCGAAT TGTTAGGCAC GCGTCAGACG GGTAATGCTG AATTTAAAGT
a   P G E L L G T R Q T G N A E F K V
1951 GCGGGATTTA CTGCGCGATC AGGCGATGAT CCCGGAAGTT CAGCGCCTGG
a   A D L L R D Q A M I P E V Q R L A
2001 CACGCCATAT TCACGAACGT TACCCACAAC AGGCAAAAGC CCTGATAGAA
a   R H I H E R Y P Q Q A K A L I E
2051 CGCTGGATGC CGGAGACGGA ACGTTACTCG AATGCGCCAA AGAAGAAGAG
a   R W M P E T E R Y S N A P K K K R
2101 AAAGGTTTGA TAAC
a   K V * *
    
```

Multipler Sequenzvergleich von ausgewählten putativen RecG-Orthologen

```

Pae      1 ~~~~~
Ppu      1 ~~~~~
Eco_m    1 ~~~~~
Sty      1 ~~~~~
Pmu      1 ~~~~~
Hin      1 ~~~~~
Fnu      1 ~~~~~
Bth      1 ~~~~~
Dra      1 MSEMATVAELQERLRRPLAAELAGGCHDRVVAGGVEKLLSTPLAGPFPKVVREVLSSGYAGL
    
```

```

Pae      1 ~~~~~MTELSRVPVTALKGVGA
Ppu      1 ~~~~~MSELKVPVTVLKGVGE
Eco_m    1 ~~~~~MKGRLLDAVPLSSLTGVGA
Sty      1 ~~~~~MSGRLLDAVPLNSLTGVGA
Pmu      1 ~~~~~MTIQFLDAVPLITLSGVGA
Hin      1 ~~~~~MSELLEDAVPLITLSGVGA
Fnu      1 ~~~~~MIESYRNIYSKLEDIPT...KYITTA...
Bth      1 ~~~~~MFDLITRDIKFISGVGP
Dra      61 DESARAVALREALTLGSGTKTTRRAAAPAPTKMAPPQAAPGERLEPLDAPAERLNIGPFGG
    
```

```

Pae      18 ALAEKLAR.VGLETLQDILFHLPLRYQDRTRVTAIGALRPGA.DAVVEGVVAGA...DVV
Ppu      18 AMAEKLAQ.VGLENLQDVLFHLPLRYQDRTRVVPICQLRPGQ.DAVIEGVVSGA...DVT
Eco_m    20 ALSNKLAK.INLHTVQDLLLHLPTRYEDRTHLYPIGELLPGV.YATVEGEVLNCL...NIS
Sty      20 AQSSKLAK.IGLHTVQDLLLHLPTRYEDRTHLYPIGELLPGI.YATVEGEVLNCL...NIT
Pmu      20 ALSDKLGR.IGLHNLQDLLFHLPLRYEDRTRITPIHDLRPDA.YATIEGLVQTC...EVQ
Hin      20 ALSNKLAK.IGLHNLQDLLFHLPLRYEDRTRITLIANLRPEQ.YFTIEGLVQTC...EVA
Fnu      23 .KQLSNLKSGLNIVYDLIYYFPRAYDDRTRNIKKIGELKFN.EYVVLKATVMSAVNLTVR
Bth      18 QKAAVLNKELEIYSLYDLIYYFVYKVDRSRIYYIHEIDGNMPYIQLKGEIIGFE..TIG
Dra      121 ARKLS...TLGLHTLRDVLHAYPHRHEDRRALPDLADVEEGQK.VIVMGTIVVSKFRRAPR
    
```

Pae 73 MGRRRSLVRLQDGSGLTLRFRYHFSQAQKQDGLKRGTHLRQYGEVVRPGASGLEIYHPEYR
Ppu 73 MGKRRSLVRLQDGSGLTLRFRYHFSNAQKQDGLKRGTHLRQYGEARPGASGLEIYHPEYR
Eco_m 75 FGGRRMTCQISDGSGLTMRFFNFSAAMKNSLAAGRRLVAYGEAKRGKYGAEMIHPEYR
Sty 75 FGGRRMTCQISDGSGLTMRFFNFNAAMKNSLATGRRVLAYGEAKRGKYGAEMIHPEYR
Pmu 75 FGKRPILNVSLSDGTSKIMLRFFNFNAGMKNSLQPGARVKAFGEVKRGRFMAEIHHPYQ
Hin 75 FGRRPILSVSLSDGTSKIMLRFFNFNAGMRNSFQVGVVRVKAFGEVKRGRHMPFIHHPYQ
Fnu 81 SGK.KLVKAMVTDGTGIMELWF.GMPYIKKSLKIGEEYLFIGQ.TKKSAVFQLINPEYK
Bth 76 EGRQRRLTAHFSDGITGIVDLVWFQGIKYLKGYKLHEEYLIIFGKPTVFNGRINVAHPDID
Dra 177 PGMLIETVLETPSGGRVKATWF.NQPWVEKQLREGARLVLTGRAKKFGRQQLSVEHME

Pae 133 ALNGDE.PIPVEQTLTPYPTTEGLTQORLRQLSQQALAMLGSSLPDWLP...AELAR
Ppu 133 ALNGNEPPPVEQTLTPYPTTEGLTQORLRLLCQQLALLGPRSLPDWLP...DELAR
Eco_m 135 .VQGDLPSTPELQETLTPYPTTEGVKQATLRKLLDQALDLDTCALAEELLP...PELSQ
Sty 135 .LQGDLPSTPELQETLTPYPTTEGVKQATLRKLLDQALELDDTCALAEELLP...PELAQ
Pmu 135 .IIRDNAPILIEETLTPYPTTEGKQNSLRKLLDQALAVLENIQIAEELLP...NEFNP
Hin 135 .IVRDNAPIVLEETLTPYPTTEGKQNSLRKLLDQALAVLDKVQIAEELLP...NEFNP
Fnu 138 LF.SGQQKVS.ENEILPIYSSNKNITQNSLRK.LVEKFLVNFNLYFEENIPK...KLIK
Bth 136 K..PDDLKLS.SVGLQPYNTTEKMKRSFNLNSHAIEKMMATVIOQIQEPLPETLSPKILS
Dra 236 TVDKAEGSL.S.TRRIVGVYDAKEGISQEFRLKAAAYKALEAAPL...DDYLPBAHWRK...

Pae 188 DYQLGPIEDQAIRYLHRPPPDADIEELAEGRHWAQLRLAFEELLTHQLSQ...RLREA
Ppu 189 DYQLAPIDEAIRYLHNPPADADLDELAEQHWAOHRLAFEELLTHQLSQ...RLRES
Eco_m 190 ..GMMTLEALRTLHRPPPTLQLSDLETGQHPAQRRLLIEELLAHNLSML...ALRAG
Sty 190 ..GMMTLEALRTLHRPPPTLQLADLETGKHPAQRRLLIEELLAHNLSML...ALRAG
Pmu 190 ..HPFSLKEAIRFLHRPPPDVSLAELEKCTHPAQRRLLIEELLAHNLSML...KVRIG
Hin 190 ..HOYSLKEALRLLHRPPPTISLEMLEQCKHPAQRRLLIEELLAHNLSML...KVRIG
Fnu 191 EYKIMERKSAIKNIHYVSMKEIEE.....AKRRFAIEELLILELGLI...KNRFIIE
Bth 193 DHHLMPITEALRNIFHPNPDLSRR.....AQYRLKFEELFYVQLNIIICYAKDR....
Dra 289 .YGLTDLGDALWGIHFPRDEAQLAR.....AHGRLRFDYFLFLELRMLLQGEDAVL..

Pae 243 VRSQAAPRIPAAARLPKRFI..ANLGFQPTGAQRRVGAETAYDLAQDEPMLRLVQGDVVGAG
Ppu 244 LRSRLAPVLRPRATRLQAQYL..ANLGFQPTGAQRRVANEIAYDLSQHEPMMRLVQGDVVGAG
Eco_m 243 AQRFHAAQPLSANDTLKKNLL..AALPFKPTGAQARVVAEIERDMALDVPMMRLVQGDVVGSG
Sty 243 AQRHYAAQPLSTNNILKDKLL..ASLPPKPTSAQARVVAEIERDMALDVPMMRLVQGDVVGSG
Pmu 243 TQQFSAYPLSYQTDLKQRFI..AQLPFTPTDAQVRVTOEIEQDLTHFPMMRLVQGDVVGSG
Hin 243 TQQFSALPLHYQTDLKQRFI..ATLPFQPTNAQKRVVSDIEQDLIKDYPMMLVQGDVVGSG
Fnu 241 NSNSKNYEVGKKEKVRREFLSQ.LTFNLTNAQKKVIKEIYDEISNGKIVNRLIQGDVVGSG
Bth 242 QRRYRCYIFERVGDVFNIFYSQNLPFQLTGAQKRVLKEIRNDVGSGRQMMRLVQGDVVGSG
Dra 339 ...QKRFEARGEDINKF.EAALPFRFTNAQRRVLEITDDMRSDQMMRLVQGDVVGSG

Pae 302 KTVVAALAAALQAEAGYQVALMAPTEILAEQHFLNFSKWLQPLDIEVAWLAKGKIGKARA
Ppu 303 KTVVAALAAALQAEAGYQVALMAPTEILAEQHYITFKRWLEPLGIEVAWLAKGKIGKARA
Eco_m 302 KTLVAALAAALRAIAHGKQVALMAPTEILAEQHANNFRNWFAPLGEVWGLAGKQKGGKARL
Sty 302 KTLVAALAAALRAIAHGKQVALMAPTEILAEQHANNFRNWFAPLGEVWGLAGKQKGGKARQ
Pmu 302 KTLVAALAAALRAIDNGKQVALMAPTEILAEQHATNFRNWFESLGEVWGLAGKVKGGKARQ
Hin 302 KTLVAALAAALRAIDNGKQVALMAPTEILAEQHANNFRNWFKPFGEVWGLAGKVKGGKSRQ
Fnu 300 KTVVAMVMLIYMAENGYQCALMAPTEILANOHYLGIKERLEQIGLRVELLTSSIKGKKKN
Bth 302 KTLVALMSMLLALDNGFQACMMAPTEILANOHYETIKELIFGMDIRVELLTGSIKGGKRE
Dra 394 KTAVAACALYLAVRDGYQCALMAPTEILARQHYANLCCGYLQGLDVRVGLLIGAMTPKAKL

Pae 362 AALERIGDGA.PMVVGTHALFQDEVKFKRLALAIIDEQHRFGVQQRLLALRQKGVDRGLCP
Ppu 363 ASLEQIANGA.PMVVGTHALFQEEVRFKHLALAIIDEQHRFGVQQRLLALRRKGVAGELCP
Eco_m 362 AQQEAIASGQVQMIIVGTHAIFQEQVQFNGLALVIIDEQHRFGVHQRLALWEKGGQQGFHP
Sty 362 AQQEAIASGQVQMIIVGTHAIFQEQVQFNGLALVIIDEQHRFGVHQRLALWEKGGQQGFHP
Pmu 362 TELEKIRITGQVQMVVGTHALFQEEVEFSDALVIIDEQHRFGVHQRLMLREKGGKQADHYP
Hin 362 AELEKIKITGAVQMVVGTHALFQEEVEFSDALVIIDEQHRFGVHQRLMLREKGGKAGFYF
Fnu 360 EILLDGIANGDIDIVIGTHSLIEDDVIIFKKLGLVIDEQHRFGVHQRNKLEKGFLL...G
Bth 362 AILLTGLLTGDVKLLIGTHAVIEDTVNFSSGLVVIDEQHRFGVAQRARLWTKNIQP...P
Dra 454 EMQTRIAEGCDVIVVVGTOALIQENVQFDNLGLAVVDEEHRFGVQQRRLLAS...R...P

Pae 421 HQLIMTATPIPRTLAMSAYADLDTSIIDELPPGRTPVNTVLVADSRRIEVIERVRAAC.R
Ppu 422 HQLIMTATPIPRTLAMSAYADLDTSVIDELPPGRTPVNTVLVADSRREFEVVERVRAAC.A
Eco_m 422 HQLIMTATPIPRTLAMTAYADLDTSVIDELPPGRTPVTTVAIPDTRRIDIIDRVHACIT
Sty 422 HQLIMTATPIPRTLAMTAYADLDTSVIDELPPGRTPVTTVAIPDTRRHEIIDRVNACTT
Pmu 422 HQLIMTATPIPRTLAMTVYADLDTSIIDELPPGRTPITTVVASEERRAEVIARVNHACVN
Hin 422 HQLIMTATPIPRTLAMTVYADLDTSIIDELPPGRTPITTVVSEERRAEIVMRVKNACVN
Fnu 416 NLLVMSATPIPRSLALSIIYGDLDLSIIDELPPGRTPIKTKWIANDEDLEKMYNFIYKKVN
Bth 419 HVLVMTATPIPRTLAMTLYGDLDVSVIIDELPPGRTPITTIH.QFDNRRESMYRAVRKQIE
Dra 508 DVLVMSATPIPRSLALTAYGDLELSIIDELPPGRTPIETKLTQ.DTARQQAYGFVMQOIR

Pae 480 EGRQAYWVCTLIEESEELTCQAABTTYEELSSALGELRVGLIHGRMKPADKAVVMEAFKE
Ppu 481 EGRQAYWVCTLIEESEELTCQAABSTYEELGSALGELKVGLIHGRMKPAEKAEIVMAEFKA
Eco_m 482 EGRQAYWVCTLIEESEELLEQAABATWEELKLALPELVGLVHGRMKPAEKQAVMASFKQ
Sty 482 EGRQAYWVCTLIEESDLEQAABATWEELKLALPELVGLVHGRMKPAEKQAVMQAFKQ
Pmu 482 EKROAYWVCTLIESEVLEAQAABAIAEDLRKILPPLRIGLVHGRMKPAEKQDVMQAFKQ
Hin 482 EKROAYWVCTLIESEVLEAQAABAIAWEDLTKALEMNLNIGLVHGRMKPQEKQDVMRFRKN
Fnu 476 DGNQAYFVAPLIEISDKMALKSVKQVSEEI ERKFNKKGIGI IHGKMKAKEKDEVMLKFKN
Bth 478 EGRQYIVYPLIESEKIDLKNLEEGYQHILEEFPCTVAKVHGKMSAEKDEQMQLEIS
Dra 567 QGRQAYVVITALIEENENLELLAATQLADDLKTIILPEARIDLHGMKMSAEKDYVMERFRA

Pae 540 GMLQQLLVATTVIEVGVDVNPASLMIENPERLGLAQLHQLRGRVGRGSAASHCVLLIYHPP
Ppu 541 GNLQQLLVATTVIEVGVDVNPASLMIENPERLGLAQLHQLRGRVGRGSAVSHCVLLIYHPP
Eco_m 542 GELHLLVATTVIEVGVDVNPASLMIENPERLGLAQLHQLRGRVGRGAVASHCVLLIYKTP
Sty 542 GELHLLVATTVIEVGVDVNPASLMIENPERLGLAQLHQLRGRVGRGAVASHCVLLIYKSP
Pmu 542 AELDLLVATTVIEVGVDVNPASLMIENAEERLGLSOLHQLRGRVGRGTASFVLMYKPP
Hin 542 AELDLLVATTVIEVGVDVNPASLMIENAEERLGLSOLHQLRGRVGRGTASFVLMYKPP
Fnu 536 KEYDILLVATTVIEVGIDVPASTIMTIYNAERFGLSALHQLRGRVGRGSKQSYCFLLISN.S
Bth 538 GQQAQIMVATTVIEGVNVPNASVMIENAEERFGLSOLHQLRGRVGRGAEQSYCILTNYK
Dra 627 HEFDDLVTSTVIEVGVDVNPSTVMVLENAERFGLAQLHQLRGRVGRGSLQSYCVMIAG.E

Pae 600 LSQIGRERLIGIMRETSDFGVIAEKDLELRGPGEMLGTRQTGLL.....QFKVADLM
Ppu 601 LSQIGRERLIGIMRETNDFGIIAEKDLELRGPGEMLGTRQTGLL.....QFKVADLM
Eco_m 602 LSKTVQIRLQVLRDSNDGFVIAQKDLERIRGPGEMLGTRQTGNA.....EFKVADLL
Sty 602 LSKTAQKRLQVLRDSNDGFVIAQKDLERIRGPGEMLGTRQTGNA.....EFKVADLL
Pmu 602 LGKISQKRLQVLRDTODGFVISEKDLEIRGPGEVLGTRQTGVA.....EFKVANLM
Hin 602 LGKVSQKRLQVLRDSQDGFVISEKDLEIRGPGEVLGTRQTGTA.....ELRVANLM
Fnu 595 TTEENSKQRLSIMEETEDGFRIABEDLKLRLNSGEIFGLRQSGFSDLKFDIITYDVKTIKLV
Bth 598 LTEDTRKRLEIMVRTNDGFIEABEDLKLRLNSGEIFGLRQSGFSDLKFDIITYDVKTIKLV
Dra 686 TSLKTRKRLKILEGSTDFGVIAEADLKLRLNSGEIFGLRQSGIP.....DLRIADLA


```

Pae 651 RDADLLPAVRDAAQSLTAHWPEQHVSPLLERWLRHGQQYGV~~~~~
Ppu 652 RDADLLPAVRDAAQALVSRWPEHVSPLLDRWLRHGQQYGV~~~~~
Eco_m 653 RDQAMIEVQRLARHIHERYPQQAKALIERWMPETERYSNA~~~~~
Sty 653 RDQAMIEVQRIARHIHERYPQQAQALIERWMPETERYSNA~~~~~
Pmu 653 RDRKMIPTVQYYARRLIVEQPEVATKLIQRWINQREIYTHV~~~~~
Hin 653 RDRKMIPTVQHYAKSLIQKYPDVAESLIRRWLNKKEIYSNA~~~~~
Fnu 655 RD.ECTIKYLKEHKGETLDNIYLKYDIEQKFSDIQAGN~~~~~
Bth 650 RDGQLIQYVRSIAEDIVDNDESAQSPENIILWRQLKSLRKTNVNWAAS
Dra 737 NDADLIEQARELAKHILANDERLEHPRIQYLRSELQNRSSVAYREVI~

```

Pseudomonas aeruginosa (Pae)

Pseudomonas putida (Ppu)

Escherichia coli modifiziert (Eco_m)

Salmonella typhimurium (Sty)

Pasteurella multocida (Pmu)

Haemophilus influenza (Hin)

Fusobacterium nucleatum subsp. (Fnu)

Bacteroides thetaiotaomicron (Bth)

Deinococcus radiodurans (Dra)

DANKSAGUNGEN

Nach einer gigantischen Zahl prozessierter Agarplatten ist es endlich soweit: das Zählen von Kolonien hat ein Ende. Viele Personen haben zum Gelingen der Arbeit beigetragen und vielen ist daher zu danken. An dieser Stelle möchte ich diejenigen hervorheben, die für mich im Bezug auf die Arbeit eine besondere Rolle gespielt haben.

Wilfried Kramer möchte ich dafür danken, daß ich das spannende Thema bearbeiten konnte, welches nie aufgehört hat, mich zu fesseln. Vor allem durch die unendlich geduldige Diskussionsbereitschaft bezüglich der theoretisch-experimentellen Inhalte habe ich viel lernen können. Und natürlich auch durch die spannenden und vielseitigen Diskussionen über die vielen schönen und spannenden Dinge dieser Welt.

Ganz besonders danke ich Wilfried für das langmütige Ertragen meiner typographischen Launen, die hoffentlich wenigstens zu einer Verschönerung des schriftlichen Teils dieser Arbeit beigetragen haben.

Die Arbeitsgruppenleiter Hans-Joachim Fritz, Harald Kolmar, Susanne Behrens und Andreas Schwienhorst haben durch hilfreiche Anregungen ihren Anteil am Gelingen dieser Arbeit gehabt. Harald Kolmar möchte ich besonders für die freudige Übernahme des Korreferates danken.

Ein besonderer Dank geht an meine Laborkollegin Anke Schürer, die mich über die gesamte Zeit mit Rat und Tat in allen Dingen des (Labor)Alltags und einer zusätzlichen großen Portion guter Laune unterstützt hat.

Birgit Zeike möchte ich insbesondere für die tolle technische Unterstützung bei den letzten Experimenten sowie für das Sortieren der *paper* danken.

Für die nette Atmosphäre in der Abteilung möchte ich allen (z.T. ehemaligen) Mitarbeitern der Etage danken. Hierzu gehört insbesondere die »Mittagsrunde« mit Anke, Wilfried, Gerrit (was waren die Weine lecker!), Thorsten, Schmoldi (beide müssen den »Schweinefraß« noch etwas ertragen), Stefan, Andreas, Alexander, Julia I., Stina, Eva, Martina und Evandro.

Bei Jan Hegermann und Michael Hoppert möchte ich mich für die Unterstützung bei der Immunelektronenmikroskopie bedanken. Christof Biebricher möchte ich für die außerordentlich hilfreichen Tips bezüglich der Ultrazentrifugation danken. Leider konnten die Experimente keinen Einzug mehr in die Arbeit halten.

Während der Anfertigung der Arbeit haben meine Praktikanten Georg Kren, Malte Skodda, Gert Weber, Ben Harder, Jan Eilers, Asja Guzman und Philipp Müller einerseits nicht unerheblich an den Experimenten mitgewerkelt und andererseits in erfreulicher Art und Weise meine Langmütigkeit gestärkt und ausgebaut.

Ein herzliches Dankeschön geht an Jan Hegermann, Thorsten Adams, Stina Schiller, Katja Horvay und Susanne Behrens, welche Teile der Arbeit korrigiert haben.

Ohne die »wichtigsten Mitarbeiter der dritten Etage«, Marita Kalck, Rainer Merkl, Olaf Waase, Patrick Regin, Bettina Hucke, Christiane Preiß, Angelika Löffers und Marlies Bartels, wäre die Abteilung unrettbar verloren.

Ein großer Dank gebührt meiner Familie für die wunderbare Unterstützung in allen Lebenslagen. Besonders möchte ich meiner Freundin Gaby danken. Dafür, daß sie für mich da ist.

... und ich danke dem Urknall, durch den die Entstehung unseres Universums überhaupt erst möglich gewesen ist ...

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Name: Christian Rudolph
Geburtsdatum: 17. Mai 1975
Geburtsort: Bremen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

1981 – 1994 Freie Waldorfschule Bremen
15. Juni 1994 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife.

Zivildienst

1994 – 1995 Zivildienst im Operationsbereich
der Paracelsus-Kurfürstenklinik in Bremen

Hochschulbildung

1995 – 1999 Studium der Biologie
an der Georg-August-Universität Göttingen.
1999 – 2000 Diplomarbeit am Institut für Molekulare Genetik
und Präparative Molekularbiologie bei Prof. H.-J. Fritz.
2000 – 2001 Experimentelle Arbeiten zur vorliegende Dissertation
als Stipendiat des Graduiertenkollegs
»Chemische Aktivitäten von Mikroorganismen«.
2001 – 2003 Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation
als Stipendiat der Studienstiftung
des Deutschen Volkes e. V.