Untersuchungen zur Rolle von Mph1 aus *Saccharomyces cerevisiae* und seines menschlichen Orthologen FANCM bei der Erhaltung der genomischen Integrität

DISSERTATION

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

„Doctor rerum naturalium“

der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm Biologie

der *Georg-August University School of Science* (GAUSS)

vorgelegt von

Sabine Andrea Smolorz

aus

Köln

Göttingen 2022

Betreuungsausschuss

PD Dr. Wilfried Kramer, Molekulare Genetik, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Prof. Dr. Holger Bastians, Molekulare Onkologie, Universitätsmedizin Göttingen (UMG)

Prof. Dr. med. Steffen Emmert (Anleiter), Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, UMG; ab 2015: Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Universitätsmedizin Rostock

Mitglieder der Prüfungskommission

Referent/in: PD Dr. Wilfried Kramer, Molekulare Genetik, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Korreferent/in: Prof. Dr. Ernst Wimmer, Entwicklungsbiologie, Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für Zoologie und Anthropologie

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Kai Heimel, Mikrobielle Zellbiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Prof. Dr. Lutz Walter, Primatengenetik, Deutsches Primatenzentrum

Dr. Oliver Valerius, *Mass Spectrometry – Yeast Group*, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Prof. Dr. med. Jürgen Brockmöller, Institut für Klinische Pharmakologie, Universitätsmedizin Göttingen

Datum der mündlichen Prüfung: 28. März 2022

Für meinen Vater *

* die vielleicht einzige Person, die diese Arbeit mit Freude gelesen hätte

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung ... 1

1.1 Leben ist lebensgefährlich ... 1

1.2 Mit Netz und doppeltem Boden: die *DNA damage response* ... 2

1.2.1 Reparaturmechanismen ... 4

1.2.2 Schadenstoleranzsysteme zum Umgang mit Replikationsproblemen ... 10

1.2.3 Regulation der *DNA damage response* ... 19

1.2.4 Herausforderung *interstrand crosslink* ... 22

1.3 Die FANCM-Familie: multifunktionale DNA-Motorproteine ... 29

1.3.1 FANCM ... 30

1.3.2 Mph1 – FANCM-Homolog aus *Saccharomyces cerevisiae* ... 33

1.4 Zielsetzung der Arbeit ... 34

2 Material und Methoden ... 35

2.1 Material – Mph1-Projekt ... 35

2.1.1 Stämme ... 35

2.1.2 Plasmide ... 36

2.1.3 Primer (Oligonukleotide) ... 39

2.1.4 Enzyme und andere Proteine ... 43

2.1.5 Antikörper ... 43

2.1.6 Geräte ... 43

2.1.7 Verbrauchsmaterialien und Glaswaren ... 44

2.1.8 Chemikalien ... 44

2.1.9 Puffer und Lösungen ... 45

2.1.10 Nährmedien ... 46

2.1.11 Kits ... 47

2.1.12 Längenstandards ... 48

2.1.13 Software, *online tools* und Datenbanken ... 48

2.2 Methoden – Mph1-Projekt ... 49

2.2.1 Kultivierung und genetische Manipulation von *Escherichia coli* ... 49

2.2.2 Molekularbiologische Methoden ... 50

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden ... 59

2.2.4 Kultivierung und genetische Manipulation von *Saccharomyces cerevisiae* ... 60

2.2.5 Methoden zur phänotypischen Untersuchung von *Saccharomyces cerevisiae* ... 70

2.3 Material – FANCM-Projekt ... 78

2.3.1 Primäre und immortalisierte Zelllinien (human) ... 78

2.3.2 Plasmide ... 79

2.3.3 Primer (Oligonukleotide) ... 79

2.3.4 Enzyme ... 82

2.3.5 Antikörper ... 82

2.3.6 Geräte ... 83

2.3.7 Verbrauchsmaterialien ... 83

2.3.8 Chemikalien ... 83

2.3.9 Puffer und Lösungen 83
2.3.10 Nährmedien für humane Zellkultur 84
2.3.11 Kits 84
2.3.12 Längenstandards 85
2.3.13 Software, *online tools* und Datenbanken 85

2.4 Methoden – FANCM-Projekt 85
2.4.1 Kultivierung und genetische Manipulation von *Escherichia coli* 85
2.4.2 Molekularbiologische Methoden 85
2.4.3 Biochemische Methoden 89
2.4.4 Kultivierung und genetische Manipulation von humanen Zellen 91
2.4.5 Funktionale Analysen an humanen Zellen 93

3 Ergebnisse – Mph1-Projekt 98

3.1 *Fine-Tuning* von Mph1 durch Phosphorylierung? 98
3.1.1 Rational und Vorarbeiten 99
3.1.2 Stammkonstruktion und phänotypische Charakterisierung 101

3.2 Die Reversionen in der Revision 104
3.2.1 Hintergrund des KanKanMX4-Systems 104
3.2.2 Systematische Untersuchung spontaner und induzierter Reversionen in unabhängigen KanKanMX4-Transformanten 106
3.2.3 Einfluss der Kopienzahl des KanKanMX4-Moduls 111
3.2.4 Überprüfung des *mph1*Δ-Phänotyps 116

3.3 Ist Mph1 in der S-Phase entbehrlich? 118
3.3.1 Können wir das verschieben? 119
3.3.2 G2-*Tag* : Begrenzung der Expression auf die G2/M-Phase 119
3.3.3 Untersuchung von *G2-MPH1* sowie G2-Allelen von Genen der homologen Rekombination 120
3.3.4 Untersuchung von *G2-MPH1* im Kontext der *interstrand crosslink*-Reparatur 126

4 Ergebnisse – FANCM-Projekt 128

4.1 Untersuchung der Transkriptvariante *FANCM-669* 130
4.1.1 Die Suche nach FANCM-669 in Transkriptom und Proteom 132
4.1.2 Untersuchungen zur Funktion von FANCM-669 135

4.2 RT-PCR: Wer suchet, der findet…etwas anderes 141
4.2.1 Spezifischer Nachweis von *FANCM-669* mittels (q)RT-PCR? 141
4.2.2 Suche nach weiteren Transkriptvarianten 145
4.2.3 Spezifischer Nachweis von *FANCM-Ex11b*, *FANCM-Δ3* und *FANCM-Δ21/22* 149

5 Diskussion 151

5.1 MPH1 151
5.1.1 Phosphorylierung von Mph1 151
5.1.2 Die Reversionen in der Revision 155
5.1.3 Mph1 scheint in der S-Phase entbehrlich zu sein 160
5.1.4 Zur Funktion von Mph1 163

5.2 FANCM 164
5.2.1 *O FANCM-669, Where Art Thou*? 164

5.2.2 Das Transkriptom: unendliche Transkriptvarianten-Weiten 167
5.2.3 Mögliche Bedeutung spontaner *FANCM*-Transkriptvarianten im pathologischen Kontext 170

6 Zusammenfassung 171

7 Anhang 172

7.1 Ergänzende Abbildungen 172

8 Literaturverzeichnis 174

9 Danksagung 193

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Mechanismen und DNA-Schäden

DDR	*DNA damage response*
DDT	*DNA damage tolerance* (Schadenstoleranz)
DDC	*DNA damage checkpoint*
MMR	*mismatch*-Reparatur
BER	Basenexzisionsreparatur
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
HR	Homologe Rekombination
DSBR	*double strand break repair* (Weg zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen)
SDSA	*synthesis dependent strand annealing* (Weg zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen)
BIR	*break induced replication* (Weg zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen)
SSA	*single strand annealing* (Weg zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen)
NHEJ	*non-homologous end joining* (Weg zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen)
TLS	Transläsionssynthese
TS	*template switching*
FA-Weg	Fanconi-Anämie-Weg
DSB	Doppelstrangbruch
ICL	*interstrand crosslink*
IaCL	*intrastrand crosslink*

Sonstige relevante Abkürzungen

4-NQO	4-Nitrochinolin-1-oxid
5-FOA	*5-Fluoroorotic acid*
aa	Aminosäuren
AP-Stelle	apurinische/apyrimidinische Stelle
CP	Cisplatin
Cpt.	Camptothecin
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
dHJ	doppelte *Holliday junction*
D-loop	*diplacement loop*

DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMF	*N*,*N*-Dimetylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FA	Fanconi-Anämie
GCR	*gross chromosomal rearrangements*
GFP	*green fluorescent protein*
HCR	*Host Cell Reactivation Assay*
LOH	*loss of heterozygosity*
MMS	Methymethansulfonat
mRNA	*messenger* RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid bzw. Abkürzung für den MTT *Assay*
NES	*nuclear export sequence*
NLS	*nuclear localization sequence*
NMD	*nonsense-mediated mRNA decay*
PAS	Polyadenylierungssignal
PCR	*polymerase chain reaction*
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
q(RT)-PCR	quantitative (Reverse Transkriptase)-PCR
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOE-PCR	*splicing by overlap extension*-PCR
ssDNA	einzelsträngige DNA
TMP	4,5',8-Trimethylpsoralen; Trioxsalen
XP	*Xeroderma pigmentosum*

Abkürzungen für Einheiten, Nukleobasen und Aminosäuren entsprechen den jeweiligen Konventionen.

1 EINLEITUNG

1.1 LEBEN IST LEBENSGEFÄHRLICH

Die DNA bildet als Träger der genetischen Erbinformation die Grundlage aller Prozesse einer lebenden Zelle. Chemisch gesehen ist sie aber ein Molekül unter vielen und unterliegt wie alle biologischen Makromoleküle der spontanen Zersetzung (LINDAHL 1993).

Was aber macht der DNA zu schaffen? Häufig wird bei DNA-schädigenden Einflüssen der Fokus vor allem auf exogene Einflüsse wie UV-Strahlung, ionisierende Strahlung und genotoxische Chemikalien aus der Nahrung, dem Trinkwasser oder der Umwelt gelegt. Natürlich können alle diese Faktoren – vor allem bei hoher Dosierung oder langfristiger Exposition – zu DNA-Schäden und in der Folge zu Erbgutveränderungen führen. Eine unausweichlichere Gefahr lauert allerdings in der Zelle selbst. Jede Zelle ist ein Hexenkessel chemischer Reaktionen im wässrigen Milieu: ein gefährlicher Aufbewahrungsort für genetisches Material. Trotz strenger Regulation, hochspezifischen Katalysatoren und ausgefeilter Kompartimentierung kommt es aufgrund der Vielzahl an reaktiven Molekülen immer wieder zu Unfällen im Chemielabor Zelle. So führen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als endogene Mutagene zu oxidativen Schäden und alkylierend wirkende Stoffwechsel-Intermediate methylieren willkürlich Basen der DNA-Doppelhelix (LINDAHL 1993). Glukose-6-Phosphat, ein zentrales Stoffwechselintermediat, kann Addukte mit der DNA oder sogar zwischen Proteinen und der DNA erzeugen (BUCALA *et al.* 1984, LEE & CERAMI 1987). Außerdem sind viele Bindungen innerhalb der DNA empfindlich gegenüber Hydrolyse, was sogar die allgegenwärtigen Wassermoleküle zur Gefahr macht. Die hydrolytischen Angriffe auf Phosphodiesterbindungen, N-glykosidische Bindungen und die exozyklischen Aminogruppen der DNA-Basen führen zu Einzelstrangbrüchen, AP-Stellen (apurinischen/apyrimidinischen Stellen) und modifizierten Basen (LINDAHL 1993). In einer einzigen Säugerzelle entstehen pro Tag bis zu 2.000 8-Oxo-Guanine durch Sauerstoffradikale und bis zu 10.000 AP-Stellen allein durch den spontanen, hydrolytischen Verlust von Purinen (LINDAHL 1993, BJELLAND & SEEBERG 2003).

Alle DNA-Schäden sind zunächst als prämutagene Läsionen zu betrachten. Erst wenn die Läsion in der Folge zu einer dauerhaften Veränderung der in der DNA codierten Information führt, ist eine Mutation entstanden. Das Spektrum möglicher Mutationen reicht dabei vom Austausch einer einzelnen Base über Genduplikationen bis hin zu großen Umlagerungen zwischen den Chromosomen. Während seltene, vorteilhafte Mutationen die Triebfeder der Evolution darstellen, hat die Mehrheit der Mutationen schädliche Auswirkungen auf den Organismus, in dem sie auftritt. Die Anzahl spontan auftretender Mutationen, die durch die chemische Schädigung der DNA sowie die intrinsische Fehlerrate bei der Replikation der Erbinformation bedingt ist, übersteigt bei weitem die Toleranz an genetischer Variabilität. Die Mutationsrate darf einen bestimmten Schwellenwert nicht überschreiten, da andernfalls jegliche Information verloren geht (*error catastrophe*; EIGEN & SCHUSTER 1977). Da sich Organismen insbesondere

den endogenen Schadensquellen nicht entziehen können, mussten sie im Laufe der Evolution „Maßnahmen“ entwickeln, die das Auftreten von Mutationen reduzieren, um mit den ständigen Angriffen auf ihre DNA im wahrsten Sinne des Wortes leben zu können. Gegen ein Anhäufen von DNA-Schäden vorzugehen, ist im Übrigen nicht nur aufgrund der mutagenen Wirkung der Schäden essenziell. Viele DNA-Läsionen behindern auch lebensnotwendige Prozesse wie Transkription und Replikation (SELBY & SANCAR 1993, PAGES *et al.* 2005). Die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität – sowohl bezüglich ihres Informationsgehalts als auch bezüglich ihrer Nutzbarkeit – ist Voraussetzung für eine funktionierende Zelle und für die Weitergabe der genetischen Information an die nächste Generation.

Andere Zellbestandteile können bei Beschädigung abgebaut und durch neue ersetzt werden. So unterliegen zum Beispiel mRNAs, Proteine und Phospholipide einem ständigen *turnover*. Die DNA kann nicht einfach ersetzt werden, da sie in ihrer Eigenschaft als Matrize über die Zeit erhalten bleiben muss und in kopierter Form von Generation zu Generation weitergegeben wird. Daher müssen Schäden und Fehler innerhalb des bestehenden Makromoleküls repariert werden.

1.2 MIT NETZ UND DOPPELTEM BODEN: DIE *DNA DAMAGE RESPONSE*

Unter dem ständigen Selektionsdruck DNA-schädigender Einflüsse hat sich in eukaryotischen Zellen im Laufe der Evolution immer größer werdender Genome ein komplexes Netzwerk aus DNA-Reparaturwegen, Schadenstoleranzmechanismen und Signaltransduktionswegen entwickelt: die *DNA damage response* (DDR; Abbildung 1.1).

Um die Entstehung von Mutationen zu vermeiden, müssen Schäden im prämutagenen Stadium repariert werden. Diesem Vorhaben widmen sich die Enzyme der DNA-Reparaturwege, die auf unterschiedliche Schäden spezialisiert sind. Allerdings werden nicht immer alle Schäden vor der DNA-Replikation repariert und behindern dann die Replikationsmaschinerie. Hier greifen die Schadenstoleranzmechanismen ein, um das Abschließen der Verdopplung der genetischen Information in Anwesenheit der Schäden zu ermöglichen. Um die vielfältigen, teilweise konkurrierenden Mechanismen aufeinander abzustimmen, existiert eine koordinierende Signaltransduktion: der *DNA damage checkpoint* (DDC). Dabei wirken die Proteinkinasen ATM und ATR als Masterregulatoren: sie werden bei Vorliegen von DNA-Schäden aktiviert und aktivieren ihrerseits Signalkaskaden, die die Reparatur- und Schadenstoleranzmechanismen regulieren und zudem Einfluss auf den Zellzyklus nehmen. Ein vorübergehender Arrest des Zellzyklus verschafft der Zelle Zeit für die notwendigen Prozesse zur Verhinderung von Mutationen. Eine zu hohe Schadensdichte kann den kontrollierten Zelltod durch Apoptose auslösen. (*reviewed* in GIGLIA-MARI *et al.* 2011, COLOMBO *et al.* 2020)

Die biologische Bedeutung der *DNA damage response* wird dadurch sichtbar, dass einige Erbkrankheiten durch Mutationen in Genen bedingt sind, die für Proteine der *DNA damage response* codieren (*reviewed* in HOEIJMAKERS 2001). Typische Symptome umfassen neurologische Degeneration, beschleunigte Alterung und das gehäufte Auftreten von Tumoren und anderen malignen Veränderungen. Neben der familiären Prädisposition für bestimmte Krebsarten durch vererbte Mutationen bestimmter Tumorsuppressorgene

wie *BRCA1* oder *BRCA2* (FUTREAL *et al.* 1994, WOOSTER *et al.* 1995), tritt eine (sekundäre) Inaktivierung der DDR auch bei spontanen Tumoren auf (GAILLARD *et al.* 2015). Zudem kann eine Überaktivierung bestimmter Reparaturwege oder eine Inaktivierung Apoptose-auslösender Signalwege Resistenzen gegenüber chemotherapeutisch eingesetzten DNA-schädigenden Agenzien vermitteln (HOEIJMAKERS 2009).

Besonders in der medizinischen Forschung wird die DDR direkt an menschlichen Zellen oder am Tiermodell untersucht. Viele grundlegende Erkenntnisse wurden und werden aber ergänzend am Modell der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* gemacht. Bei diesem einfachen, meist einzellig und haploid kultivierten Eukaryoten entspricht die DDR in allen wesentlichen Punkten den Prozessen beim Menschen. Auch viele der beteiligten Enzyme haben Homologe in der Hefe.

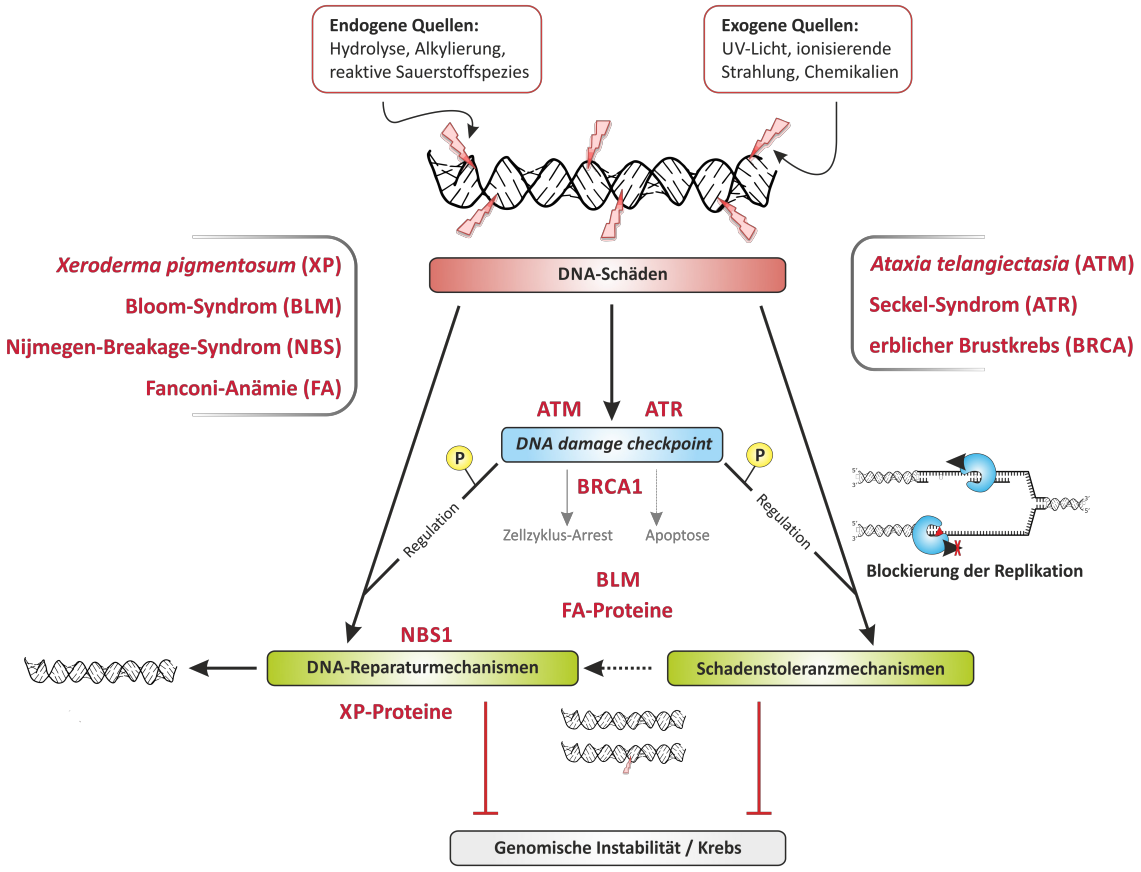


Abbildung 1.1: *DNA damage response* (DDR) bei Eukaryoten. Endogene und exogene Einflüsse schädigen die DNA. Dies aktiviert zelleigene Reparaturmechanismen, die den Ausgangszustand wieder herstellen sollen. Kommt es bei der Replikation zu einem Arrest an einer Läsion, sorgen die Schadenstoleranzmechanismen dafür, dass die Verdopplung der DNA trotz des Schadens zu Ende geführt werden kann. Die eigentliche Reparatur übernehmen die Reparaturenzyme. Der *DNA damage checkpoint* übernimmt die Koordination der Prozesse sowie das Auslösen von Zellzyklus-Arresten oder des kontrollierten Zelltods. In Anwesenheit von Schäden werden die Proteinkinasen ATM und ATR (bei Hefe Tel1 und Mec1) aktiviert und phosphorylieren weitere Proteine, die die spezifischen Effekte auslösen. Wenn alles korrekt funktioniert, kann die DNA-Replikation abgeschlossen werden, Schäden wurden repariert und der Zellzyklus-Arrest wird aufgehoben. Die angegebenen Erbkrankheiten (rote Schrift) können durch Defekte der genannten Proteine bedingt sein. (ATM = *Ataxia telangiectasia mutated*; ATR = *Ataxia telangiectasia mutated and rad3 related*) Für weitere Beispiele und genauere Informationen zu den Krankheiten siehe HOEIJMAKERS 2001.

1.2.1 REPARATURMECHANISMEN

Reparatur bedeutet im Idealfall die Wiederherstellung des Zustands vor dem Auftreten der DNA-Läsion. Neben solchen fehlerfreien Wegen gibt es aber auch fehlerbehaftete Reparaturwege nach dem Motto „besser eine lokal begrenzt mutagene Reparatur als gar keine Reparatur“ (siehe NHEJ, Seite 9).

Obwohl die Reparaturwege – wie grundsätzlich auch im Folgenden – häufig als getrennte, klar definierte Wege beschrieben werden, gibt es vielfach Überlappungen zwischen den Reparaturmechanismen und mit anderen Prozessen wie der Transkription und der Replikation. Die Überschneidungen zwischen den Wegen werden unter anderem dadurch bedingt, dass sich viele Intermediate ähneln, was eine Konkurrenz zwischen Reparaturenzymen mit ähnlichen Subtratspektren zur Folge hat. Während im letzten Jahrhundert vor allem die einzelnen Wege aufgeklärt wurden, rücken in den letzten Jahrzehnten auch im Licht der Krebsforschung immer mehr die systembiologischen Zusammenhänge in den Fokus.

Grundsätzlich unterscheidet sich die Behebung von Replikationsfehlern durch die *Mismatch*-Reparatur von den übrigen Reparaturmechanismen für DNA-Schäden. Während sich bei einem Schaden der zu reparierende Fehler chemisch von den normalen DNA-Basen unterscheidet, besteht ein *mismatch* aus zwei natürlichen DNA-Basen. Der Fehler liegt hier per Definition auf dem neu synthetisierten Strang.

1.2.1.1 *Mismatch*-Reparatur (MMR)

Die Proteine der *Mismatch*-Reparatur (MMR) erkennen und entfernen bei der DNA-Replikation misinkorporierte Nukleotide sowie kleine Deletionen und Insertionen aus dem neu synthetisierten Strang. Der Fehler wird zusammen mit den umgebenden Nukleotiden entfernt und die Lücke wird mit dem Gegenstrang als Matrize geschlossen. Die MMR stellt neben der Einbaugenauigkeit der replikativen Polymerasen und deren *proofreading*-Aktivität die dritte Stufe der Replikationsgenauigkeit dar (PEÑA-DIAZ & JIRICNY 2012, JIRICNY 2013). Vor allem für die schadenserkennenden MutS-Komplexe wurden vielfältige Funktionen außerhalb der MMR beschrieben, z.B. bei der Reparatur von *interstrand crosslinks* und im *DNA damage checkpoint* (JIRICNY 2013, LI *et al.* 2016).

1.2.1.2 Reparatur von DNA-Schäden

Unterschiedliche Klassen von DNA-Schäden werden von spezialisierten Proteinen erkannt und repariert. Bei jeder Reparatur ist die Schadenserkennung der erste Schritt. Darauf folgt die Entfernung des Schadens und, wenn nötig, die Wiederherstellung einer intakten DNA-Doppelhelix. Im Folgenden werden vier klassische Wege zur Behebung von DNA-Schäden erläutert:

- direkte Schadensumkehr
- Basenexzisionsreparatur
- Nukleotidexzisionsreparatur
- Doppelstrangbruchreparatur

Darüber hinaus gibt es weitere Mechanismen, die zum Beispiel DNA-Protein-*crosslinks*, DNA-RNA-Hybride oder DNA-Sekundärstrukturen wie G-Quadruplexe beseitigen (*reviewed* in LINKE *et al.* 2021, PALANCADE &

ROTHSTEIN 2021, WEI *et al.* 2021). Der Sonderfall der *interstrand crosslinks* wird in einem späteren Kapitel beschrieben (Seite 22).

Direkte Schadensumkehr

Nur in Einzelfällen existieren in der Zelle Enzyme, die den Schaden chemisch umkehren und so den Ursprungszustand des DNA-Moleküls durch einen einzigen Reaktionsschritt wiederherstellen können. Das Standardbeispiel ist die Photolyase, die sichtbares Licht zur Umkehr von UV-Schäden nutzt (SANCAR 2003). Der Mensch besitzt keine Photolyase, aber zum Beispiel die O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) und das AlkB-Homolog ALKBH1, die bestimmte Alkylierungsschäden revertieren können (WOOD 1996, PENG & PEI 2021). Auch die direkte Ligation von Einzelstrangbrüchen durch eine DNA-Ligase kann als direkte Schadensumkehr gedeutet werden.

Basenexzisionsreparatur (BER)

Die klassischen Substrate der BER sind DNA-Basen mit kleinen, chemischen Modifikationen (z.B. Methylierungen), die die Struktur der Doppelhelix kaum verzerren. Eine schadensspezifische DNA-Glykosylase erkennt die modifizierte Base und entfernt sie durch Spaltung der N-glykosidischen Bindung, wobei eine AP-Stelle zurückbleibt. Eine AP-Endonuklease schneidet das Rückgrat der DNA neben der AP-Stelle und eine DNA-Polymerase ersetzt das beschädigte Nukleotid bzw. mehrere Nukleotide. Wenn nötig wird überstehende ssDNA von einer *flap*-Endonuklease entfernt und eine DNA-Ligase verknüpft die Enden. (*reviewed* in ROBERTSON *et al.* 2009)

Nukleotidexzisionsreparatur (NER)

Die NER erkennt ein breites Spektrum von Schäden, deren Gemeinsamkeit das Hervorrufen einer Verzerrung der Doppelhelix ist. Dies sind häufig sperrige Basenaddukte. Da Säugern die Photolyase fehlt, ist die NER hier zudem der zentrale Reparaturweg zur Behebung von UV-Schäden wie Pyrimidindimeren und 6-4-Photoprodukten (GILLET & SCHÄRER 2006, NOUSPIKEL 2009).

Der Reparaturprozess beginnt mit der Schadenserkennung und der anschließenden Rekrutierung eines Helikase-Komplexes, der die DNA rund um den Schaden aufschmilzt. Spezielle Endonukleasen schneiden den beschädigten Strang *upstream* und *downstream* des Schadens am Rand der gebildeten „Blase“, sodass der Schaden mitsamt eines etwa 24–32 Nukleotide langen Oligonukleotids entfernt werden kann. Durch DNA-Synthese mit dem unbeschädigten Strang als Matrize und abschließende Ligation wird die Einzelstranglücke geschlossen (*reviewed* in GILLET & SCHÄRER 2006, NOUSPIKEL 2009, MARTEIJN *et al.* 2014, SPIVAK 2015). Bei der sogenannten *global genome repair* (GGR) erfolgt die Schadenserkennung überall im Genom. Schäden auf dem codogenen Strang aktiv transkribierter Gene können alternativ durch den Arrest der RNA-Polymerase detektiert und dem Hauptweg der NER zugeführt werden (*transcription-coupled repair*, TCR; *reviewed* in SPIVAK 2016).

Beim Menschen sind mehr als 40 Proteine am Prozess der NER beteiligt (FERRI *et al.* 2020). Mutationen in den für NER-Faktoren codierenden Genen führen zu einer Reihe heterogener, rezessiv vererbter Syndrome, darunter *Xeroderma pigmentosum* (XP). Die Haut von XP-Patienten reagiert typischerweise mit

extremer Pigmentierung, verfrühter Hautalterung und meist bereits im Kindesalter auftretendem Hautkrebs auf UV-Licht-Exposition. Die Schlüsselenzyme der NER sind nach den XP-Komplementationsgruppen mit XPA bis XPG benannt. (*reviewed* in FERRI *et al.* 2020, MARTENS *et al.* 2021).

Aufgrund seiner Vielseitigkeit von besonderem Interesse ist das Heterodimer XPF-ERCC1 (Rad1-Rad10 in *S. cerevisiae*), welches in der NER für den endonukleolytischen Schnitt auf der 5'-Seite des Schadens verantwortlich ist. XPF-ERCC1 ist unter anderem in die Reparatur von *interstrand crosslinks* involviert (KLEIN DOUWEL *et al.* 2014).

Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch homologe Rekombination (HR)

Doppelstrangbrüche (DSBs) entstehen sowohl durch exogene Ursachen wie ionisierende Strahlung als auch spontan – meist ungewollt – als Intermediate der normalen zellulären Prozesse, vor allem während der DNA-Replikation oder Reparaturprozessen (MEHTA & HABER 2014). Schätzungsweise kommt es pro Zellzyklus in einer menschlichen Zelle zu 50 spontanen DSBs (VILENCHIK & KNUDSON 2003). Dabei stellt jeder einzelne DSB eine enorme Gefahr für die Zelle dar, da unreparierte DSBs zwangsläufig zu einem Verlust genetischer Information führen, wenn bei der nächsten Zellteilung ein Teil eines Chromosoms ohne Centromer nicht korrekt auf die Tochterzellen verteilt werden kann. Die Herausforderung für die Zelle besteht darin, zusammengehörige Enden zu identifizieren und möglichst fehlerfrei wieder zusammenzufügen. Eine Möglichkeit zur fehlerfreien Reparatur bietet die Abfrage der verloren gegangenen Information von einem sequenzidentischen DNA-Molekül über homologe Rekombination (HR). Sofern vorhanden – also nur in der S- und G2-Phase – ist das Schwesterchromatid das ideale *template*. Bei Diplonten kommt auch das homologe Chromosom in Frage, wird aber in Säugern nur selten genutzt. Die homologe Rekombination ist auch die mechanistische Grundlage für die Ausbildung von Chiasmata und das *crossing-over* bei der ersten meiotischen Teilung ausgehend von gezielt induzierten DSBs. Auch beim Umgang mit Replikationsproblemen spielen Prozesse der HR eine Rolle (Seite 12ff).

Ausgehend von einem DSB existieren verschiedene Wege, wie dieser durch homologe Rekombination repariert werden kann (Abbildung 1.2). Sowohl in *S. cerevisiae* als auch im Menschen codieren Gene der *RAD52*-Epistasisgruppe bzw. deren Homologe für zentrale Proteine der HR (PETRINI *et al.* 1997). In der Hefe ist Rad52 für alle im Folgenden vorgestellten Prozesse essenziell, während beim Menschen diese zentrale Rolle von BRCA2 eingenommen wird (MEHTA & HABER 2014). Im Folgenden werden die Prozesse an *S. cerevisiae* vorgestellt, woran auch viele der zugrunde liegenden mechanistischen Untersuchungen durchgeführt wurden und werden, die aber zumeist auf höhere Eukaryoten übertragbar sind.

Double strand break repair (DSBR; Abbildung 1.2-i/ii)

Die DSBR ist trotz ihres Namens nur einer der Wege zur Reparatur von DSBs. Der Name geht auf eines der ersten schematischen Modelle zurück (SZOSTAK *et al.* 1983). Auf die Bindung der DSB-Enden durch den MRX-Komplex (Mre11-Rad50-Xrs2) folgt zunächst der 5'-3'-exonukleolytische Abbau mehrerer hundert Nukleotide zur Generierung von 3'-Überhängen. Die 3'-Überhänge werden zunächst von dem einzelstrangbindenden Proteinkomplex RPA stabilisiert, welcher dann mit Hilfe von Rad52 durch die Rad51-Rekombinase ersetzt wird, welche ein Filament um die ssDNA bildet.

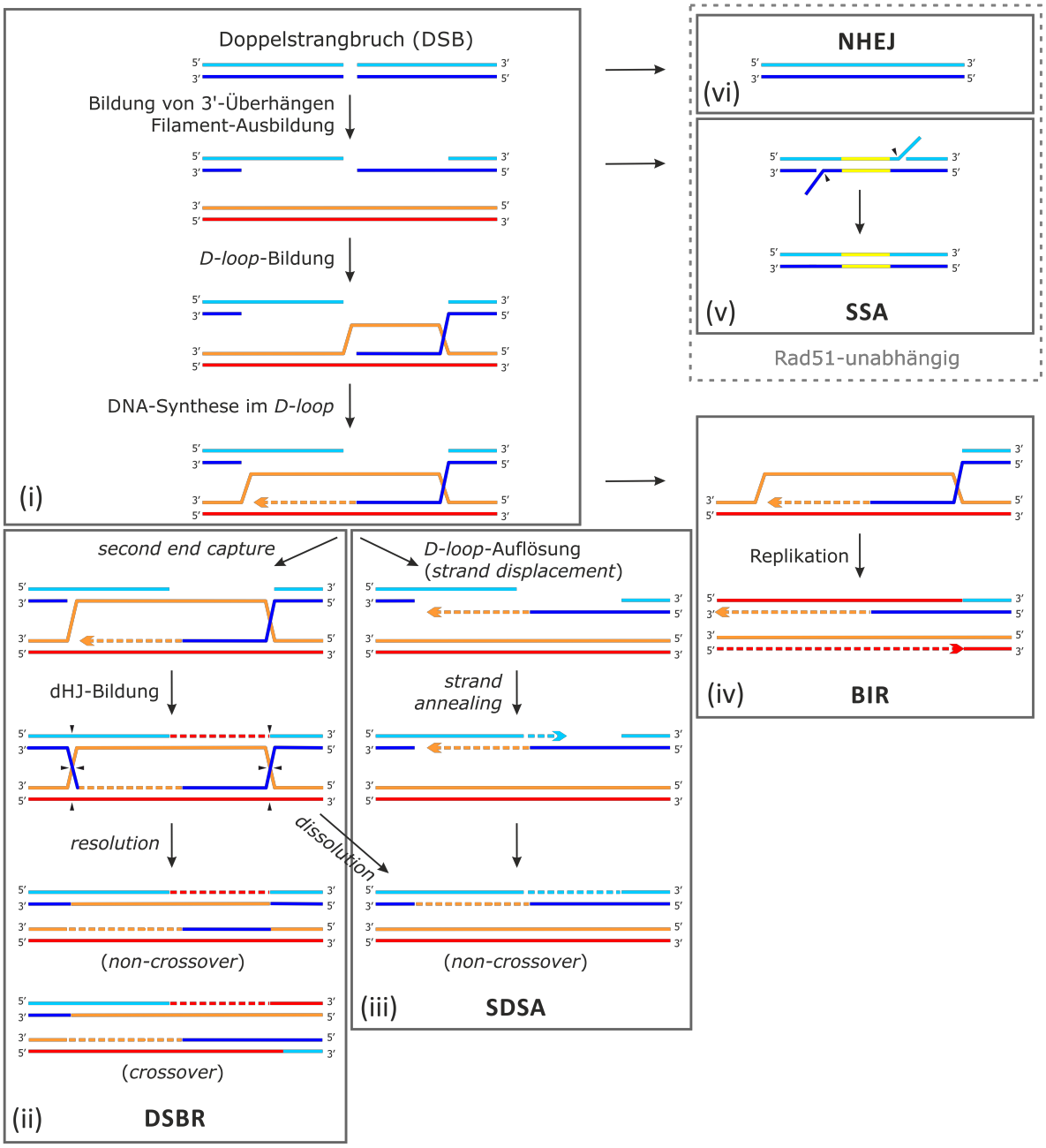


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der verschiedenen Wege zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen. (i) Nach der Bildung von 3'-Überhängen können diese als Rad51-Filament in einen homologen Donor invadieren. Am entstandenen *D-loop* kann der 3'-Überhang durch DNA-Synthese verlängert werden. **(ii)** DSBR (*double strand break repair*): Wenn das zweite DSB-Ende mit dem verdrängten Strang des Donors hybridisiert, kann ein dHJ-Intermediat gebildet werden, das von Resolvasen zu einem *crossover*- oder *noncrossover*-Produkt aufgelöst werden kann. Alternativ kann die dHJ über den Sgs1-Top3-Rmi1-Komplex mittels *dissolution* zu 100 % *noncrossover*-Produkt umgesetzt werden. **(iii)** SDSA (*synthesis dependent strand annealing*): Ausgehend vom *D-loop*-Intermediat kann der verlängerte Strang nach Auflösen des *D-loops* mit dem zweiten 3'-Überhang des DSBs hybridisieren und die Reparatur hier vollendet werden. **(iv)** BIR (*break induced replication*): Wenn das zweite DSB-Ende fehlt, kann der *D-loop* in eine Replikationsgabel umgewandelt werden und die DNA-Synthese bis zum Ende des Chromosoms ablaufen. **(v)** SSA (*single strand annealing*): Bei Komplementarität innerhalb der 3'-Überhänge (gelbe Bereiche) können diese Rad52-abhängig, aber Rad51-unabhängig hybridisieren, wodurch nach Entfernen der überstehenden *flaps* die Reparatur beendet werden kann. Dabei wird der in der Mitte liegende Bereich allerdings deletiert. **(vi)** NHEJ (*non-homologous end joining*): Alternativ zur homologen Rekombination können die Enden Ku70-Ku80-abhängig verbunden werden, wobei fast immer kleinere Insertionen oder Deletionen geschehen. Dieser Weg wird vor allem in der G0- und G1-Phase genutzt. (Schwarze Dreiecke markieren die Schnittstellen für Resolvasen bzw. *flap*-Endonukleasen. Gestrichelte Linien bedeuten neu synthetisierte DNA.; dHJ = doppelte *Holliday junction*; *D-loop* = *diplacement loop*) Abbildung neu erstellt nach KREJCI *et al.* 2012.

Das Rad51-Nukleoproteinfilament katalysiert die Suche nach einer homologen Sequenz und vermittelt dort die Stranginvasion unter Ausbildung eines *displacement-loops* (*D-loop*), in dem der invadierende 3'-Überhang mit dem komplementären Strang hybridisiert, wobei der andere Strang des Donors verdrängt wird. Nach der Invasion wird das 3'-Ende im *D-loop* durch eine DNA-Polymerase verlängert, wobei der komplementäre Strang des Donormoleküls als Matrize dient. (*reviewed* in KROGH & SYMINGTON 2004, KREJCI *et al.* 2012, MEHTA & HABER 2014, SYMINGTON 2014, SYMINGTON *et al.* 2014)

Der nicht invadierte 3'-Überhang kann mit dem verdrängten Strang des *D-loops* hybridisieren (*second end capture*) und das 3'-Ende kann ebenfalls durch DNA-Synthese verlängert werden. Als Resultat kann ein Intermediat mit einer sogenannten doppelten *Holliday junction* (dHJ) entstehen, die durch strukturspezifische Endonukleasen, die Resolvasen, aufgelöst werden kann (dHJ-*resolution*). Je nach Schnittrichtung der Resolvasen entsteht dabei ein *crossover*- oder ein *noncrossover*-Produkt. Beim *crossover*-Produkt wurden die flankierenden Bereiche der zwei Ausgangmoleküle ausgetauscht. Dies ist bei korrekter Rekombination mit dem Schwesterchromatid ohne Belang und bei der meiotischen Rekombination sogar erforderlich für die Erhöhung der genetischen Variabilität. Bei fehlerhafter Rekombination kann ein *crossover* allerdings zu *gross chromosomal rearrangements* (GCRs, z.B. Translokationen) und damit zu genetischer Instabilität führen. Auch beim *noncrossover*-Produkt kann bei einem nicht vollständig sequenzidentischen Donor (z.B. dem homologen Chromosom) Heteroduplex-DNA vorhanden sein. Je nachdem, ob und wie diese repariert wird, kann dies zu Genkonversion führen, dem nonreziproken Transfer genetischer Information von einem Chromosom zum anderen. Alternativ kann die doppelte *Holliday junction* durch *branch migration* und Auflösung des entstandenen Hemikatenans durch die Topoisomerase III beseitigt werden (dHJ-*dissolution*). Diese Möglichkeit, bei der nur *noncrossover*-Produkte entstehen, wird vom Sgs1-Top3-Rmi1-Komplex (STR) katalysiert. (*Reviewed* in KROGH & SYMINGTON 2004, KREJCI *et al.* 2012, MEHTA & HABER 2014, SYMINGTON *et al.* 2014.) Das menschliche Sgs1-Homolog ist das Protein BLM, dessen Nicht-Funktionalität das autosomal-rezessiv vererbte Bloom-Syndrom bedingt (*reviewed* in HOEIJMAKERS 2001). Betroffene Patienten entwickeln unter anderem Leukämien und Lymphome, was durch die erhöhte Rate an *crossovern* und die dadurch verminderte genomische Stabilität erklärbar ist (WATT & HICKSON 1996). Die Steuerung des Anteils von *crossover*-Produkten ist eine der entscheidendsten regulativen Aufgaben bei der Abstimmung der verschiedenen Wege der homologen Rekombination und ein wichtiger Unterschied zwischen mitotischer und meiotischer Rekombination.

Synthesis dependent strand annealing (SDSA; Abbildung 1.2-iii)

Wird ein analog zum DSBR-Weg gebildeter *D-loop* vor dem *second end capture* und der Bildung einer dHJ aufgelöst (*strand displacement*), kann das im *D-loop* verlängerte Ende nun mit dem anderen Ende des DSB hybridisieren (*strand annealing*). Verbliebene Lücken können durch DNA-Synthese aufgefüllt werden und mögliche Überhänge durch *flap*-Endonukleasen entfernt werden. Eine Ligase schließt die Reparatur ab. Beim SDSA entsteht immer ein *noncrossover*-Produkt. (*reviewed* in KROGH & SYMINGTON 2004, KREJCI *et al.* 2012, MEHTA & HABER 2014, SYMINGTON *et al.* 2014, KLEIN *et al.* 2019)

Break induced replication (BIR; Abbildung 1.2-iv)

Ist nur ein DSB-Ende zugänglich oder vorhanden, kann im Anschluss an die Rad51-katalysierte Invasion in den homologen Bereich des Donormoleküls die DNA-Synthese bis zum Ende des Chromosoms fortgeführt werden (*reviewed* in KOCKLER *et al.* 2021). In der Hefe geschieht dies mittels eines migrierenden *D-loops* und wird von Pol δ katalysiert (SAINI *et al.* 2013, WILSON *et al.* 2013, DONNIANNI *et al.* 2019). Die DNA-Synthese erfolgt konservativ, wobei der im *D-loop* verlängerte Strang erst später zum Doppelstrang ergänzt wird, während das Donormolekül rehybridisiert (DONNIANNI & SYMINGTON 2013, SAINI *et al.* 2013). Da hier der gesamte fehlende Teil des invadierten Chromosoms anhand des Donors repliziert wird, kann es bei Verwendung des homologen Chromosoms zu einem umfangreichen *loss of heterozygosity* (LOH) kommen, der in somatischen Zellen zur Krebsentstehung beitragen kann, wenn beispielweise ein Tumorsuppressorgen betroffen ist (KNUDSON 2001). Zudem bedingt die Art der Synthese, dass zwischenzeitlich viel instabile ssDNA vorliegt und *mismatches* bei der Synthese des zweiten Strangs direkt zu Mutationen manifestiert werden (STIVISON *et al.* 2020). Daher ist BIR mit einem relativ hohen Level an genetischer Instabilität verbunden. BIR wird unter anderem, auch mangels Alternativen, zur Reinitiierung kollabierter Replikationsgabeln verwendet (Seite 16).

Single strand annealing (SSA; Abbildung 1.2-v)

Enthalten die am DSB gebildeten 3'-Überhänge komplementäre Bereiche, können sie ohne Invasion in ein homologes Molekül direkt miteinander hybridisieren. Zu dieser Situation kommt es, wenn der DSB innerhalb oder zwischen zwei Sequenzduplikationen oder in einem Bereich repetitiver Sequenzen (dann auch als *Microhomology-mediated end joining* bezeichnet) liegt. Nach dem Entfernen eventuell vorhandener *flaps* durch Endonukleasen und DNA-Synthese zum Auffüllen vorhandener Lücken kann die Reparatur durch eine Ligation abgeschlossen werden. Da der zwischen den hybridisierten Bereichen liegende Bereich verloren geht, ist diese Art der Reparatur *per se* mutagen. SSA geschieht unabhängig von Rad51, ist aber abhängig von Rad52, weshalb es formal als Weg der homologen Rekombination gilt. (*reviewed* in KREJCI *et al.* 2012, SYMINGTON *et al.* 2014)

Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch *non-homologous end joining* (NHEJ; Abbildung 1.2-vi)

NHEJ ist im Gegensatz zur homologen Rekombination eine „*quick and dirty*"-Reparatur, bei der die zwei Enden eines DSBs relativ schnell, aber ohne Informationsabfrage von einem homologen DNA-Strang ligiert werden. Zentraler Faktor dieses Reparaturwegs ist der Ku70-Ku80-Komplex, der bis zum Menschen konserviert ist. Inkompatible Enden werden dabei zunächst prozessiert, bis sie ligierbar sind, wobei Information verlorengeht oder zufällige Insertionen passieren, weshalb das NHEJ prinzipiell fehlerbehaftet ist. In der G1-Phase (bzw. G0 bei nicht teilungsaktiven Zellen), also bei Fehlen eines Schwesterchromatids, ist NHEJ der bevorzugte Weg für die DSB-Reparatur (*reviewed* in FROCK *et al.* 2021). Vor allem in höheren Eukaryoten hat die Rekombination mit dem homologen Chromosom ein größeres mutagenes Potenzial als das NHEJ, da aufgrund der repetitiven Bereiche innerhalb des Genoms die Gefahr von falscher Rekombination und daraus folgenden *rearrangements* (z.B. Translokationen) erhöht ist. Zudem kann es

auch bei korrekter Rekombination zwischen homologen Chromosomen zu einem *loss of heterozygosity* (LOH) kommen.

1.2.2 SCHADENSTOLERANZSYSTEME ZUM UMGANG MIT REPLIKATIONSPROBLEMEN

Trotz der fortwährenden Aktivität der DNA-Reparatursysteme entgehen einige Läsionen der Reparatur, bevor die Replikationsmaschinerie den betreffenden Bereich des Genoms in der S-Phase des Zellzyklus erreicht. Je nach Art und Lage der Läsion hat dies unterschiedliche Auswirkungen auf den Fortgang der Replikation. Da eine unvollständige Replikation zu genomischer Instabilität führt, sind in allen eukaryotischen Zellen konservierte Mechanismen zur Schadenstoleranz zu finden.

1.2.2.1 Eukaryotische DNA-Replikation

Die Replikation eukaryotischer Chromosomen geht von einer Vielzahl definierter Replikationsursprünge aus, die beim Eintritt in die S-Phase aktiviert werden, wobei eine Replikationsblase mit zwei sich auseinanderbewegenden Replikationsgabeln gebildet wird (*reviewed* in O'DONNELL *et al.* 2013). An jeder Replikationsgabel befindet sich ein Komplex aus einer replikativen Helikase, je einer replikativen DNA-Polymerase zur Synthese des *leading* und des *lagging strands* sowie einer Primase: das Replisom (BENKOVIC *et al.* 2001). Innerhalb der eukaryotischen, replikativen Helikase CMG (Cdc45, Mcm2–7, GINS) enthält das hexamere Mcm2–7 die ATP-abhängige Helikase-Aktivität, durch die sich die Helikase auf der *leading strand*-Matrize in 3‘-5‘-Richtung fortbewegt und dadurch die DNA-Stränge trennt (GEORGESCU *et al.* 2017). Die replikativen Polymerasen δ und ε katalysieren die Synthese des *lagging* bzw. des *leading strands*, während der Pol α/Primase-Komplex durch die Synthese von Primern die Ansatzpunkte für die DNA-Synthese durch Pol δ und Pol ε liefert (O'DONNELL *et al.* 2013, LUJAN *et al.* 2016). Während Pol ε den *leading strand* ausgehend von nur einem Primer synthetisieren kann, läuft die Syntheserichtung von Pol δ entgegen der Laufrichtung der Helikase. Der *lagging strand* wird daher diskontinuierlich synthetisiert, indem etwa alle 200 Nukleotide von Pol α/Primase ein neuer Primer gesetzt und die Lücken zwischen den Primern von Pol δ mit den Okazaki-Fragmenten aufgefüllt werden (DEPAMPHILIS & WASSARMAN 1980, BURGERS & KUNKEL 2017). Weitere – auch für die Schadensumgehung – wichtige Faktoren an der Replikationsgabel sind das heterotrimere Einzelstrangbindeprotein RPA (Rfa1–3), das freiliegende ssDNA schützt, und die *sliding clamp* PCNA, die die Prozessivität der replikativen Polymerasen erhöht (HU *et al.* 2012, O'DONNELL *et al.* 2013).

In der Hefe *S. cerevisiae* muss ein Replisom eine Distanz von bis zu 100 Kilobasen überwinden, bis es zum Zusammenlaufen mit der vom benachbarten Replikationsursprung gestarteten Replikationsmaschinerie kommt (SEKEDAT *et al.* 2010, DEWAR & WALTER 2017). Diese Strecke legt das Replisom mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 1,5–2 kb/min zurück (CONTI *et al.* 2007, SEKEDAT *et al.* 2010, YEELES *et al.* 2017) – sofern es nicht gestört wird.

1.2.2.2 Replikationsprobleme

Viele Erbkrankheiten mit erhöhter Krebsanfälligkeit sowie spontane Tumore sind auf Defekte in der Reaktion auf Replikationsprobleme zurückzuführen (*reviewed* in GAILLARD *et al.* 2015). Der Fortschritt der Replikation kann neben DNA-Schäden auch durch DNA-Sekundärstrukturen, *repeat*-Sequenzen, Konflikte mit der Transkriptionsmaschinerie oder einen Mangel an Nukleotiden ausgelöst werden (Replikationsstress; *reviewed* in ZEMAN & CIMPRICH 2014, GAILLARD *et al.* 2015, MUÑOZ & MÉNDEZ 2017). Für diese Arbeit sind drei Umstände von Interesse, die allesamt durch DNA-Läsionen hervorgerufen werden: der Arrest der replikativen Polymerase, der Arrest der Helikase und das Kollabieren der Replikationsgabel infolge eines Strangbruchs.

Arrest der replikativen Polymerase an einer DNA-Läsion

Replikative Polymerasen besitzen eine hohe Genauigkeit, die durch ein sehr passgenaues aktives Zentrum und eine davon räumlich getrennte *proofreading*-Aktivität zum Ausschneiden falscher Nukleotide bedingt wird (KUNKEL 1988, KOOL 2002). Genau diese Eigenschaften bewirken aber, dass die Polymerase an großen Addukten in der Matrize hängenbleibt, da diese nicht in das aktive Zentrum gelangen können, und bei kleineren Läsionen in einen Teufelskreis aus Einbau und *proofreading*-Aktivität gerät, der ebenfalls ihr Fortkommen behindert (PAGES *et al.* 2005). Ein Pol δ-Arrest auf dem *lagging strand* bringt das Replisom nicht zum Stillstand: die DNA-Synthese wird mit dem nächsten Okazaki-Fragment normal fortgesetzt, allerdings verbleibt im *lagging strand* eine kurze ssDNA-Lücke zwischen dem Schaden und dem vorausgehenden Okazaki-Fragment (TAYLOR & YEELES 2018). Steckt Pol ε auf dem *leading strand* fest, verlangsamt dies hingegen das Fortkommen der Replikationsgabel, da es zu einer Abkopplung von Pol ε vom Rest des Replisoms kommt. Helikase und *lagging strand*-Synthese können mit niedriger Geschwindigkeit noch mehrere Kilobasen weiterarbeiten, wobei lange Abschnitte RPA-ummantelter ssDNA entstehen (TAYLOR & YEELES 2018, 2019).

Arrest der replikativen Helikase

An kleinen Läsionen einzelner Basen, die den replikativen Polymerasen bereits Probleme bereiten können, gleitet die replikative Helikase vorbei. Durch eine Kollision der Helikase mit einem sperrigen Addukt wie einer G4-Struktur (Quadruplex; LERNER & SALE 2019), einem DNA-Protein-*crosslink* oder DNA-bindenden Proteinen wie einer entgegenkommenden, aktiv transkribierenden RNA-Polymerase (RUDOLPH *et al.* 2007, GARCÍA-MUSE & AGUILERA 2016) sowie durch die Untrennbarkeit der DNA-Stränge durch *interstrand crosslinks* kann es allerdings zu einem Arrest der Replikation kommen (LEHOCZKÝ *et al.* 2007). Da die Helikase auf der *leading strand*-Matrize entlanggleitet, stellen kleinere Addukte, die nur die *lagging strand*-Matrize betreffen, eine geringere Gefahr des Arrests dar (FU *et al.* 2011).

Strangbrüche führen zu einem Kollaps der Replikationsgabel

Doppelstrangbrüche in der parentalen DNA führen zu einem Kollaps der Replikationsgabel und einer Disassemblierung des Replisoms (*run-off*-Synthese). Bei einem Einzelstrangbruch in einem der Matrizenstränge verliert eine der replikativen DNA-Polymerasen den Kontakt zur Matrize und ein bereits

replizierter Teil des Chromosoms wird als so genannter *one-ended* DSB frei. Kollabierte Replikationsgabeln sind besonders gefährlich für die Zelle, da hier nicht nur der Abschluss der Replikation verzögert wird, sondern auch unmittelbar der Verlust genetischen Materials droht. Auch nach einem Arrest von Polymerase oder Helikase kann es sekundär durch die inhärente Fragilität größerer einzelsträngiger Bereiche und der Anfälligkeit stationärer DNA-Intermediate für Nukleasen zum Auseinanderbrechen der Replikationsgabel kommen.

1.2.2.3 Der Werkzeugkasten der Schadenstoleranz

Schadenstoleranzmechanismen (DNA *damage tolerance*; DDT) schützen arretierte Replikationsgabeln vor dem Auseinanderbrechen und ermöglichen die Vollendung des Replikationsprozesses, indem sie für eine Umgehung von DNA-Schäden sorgen. Oberste Priorität hat dabei, dass das Replisom seine normale Geschwindigkeit wieder aufnehmen kann. DDT beschränkt sich dabei nicht auf die Reaktivierung arretierter Replikationsgabeln durch Prozesse direkt an der Replikationsgabel, sondern beinhaltet auch das postreplikative Schließen hinter der Replikationsgabel zurückbleibender ssDNA-Lücken (*gap filling*). Die eigentliche Reparatur des Schadens ist außer bei manchen Strangbrüchen nicht Teil der DDT und erfolgt über die in Kapitel 1.2.1 vorgestellten Mechanismen, sobald der Schaden wieder in einem dsDNA-Bereich liegt und Exzisionsreparatur wieder möglich ist. (*reviewed* in BRANZEI & SZAKAL 2016a, MUÑOZ & MÉNDEZ 2017, YANG *et al.* 2019, GUILLIAM 2021)

Während zunächst vor allem genetische Interaktionsstudien an *S. cerevisiae* zur Aufklärung der DDT-Mechanismen beigetragen haben, wurden in den letzten Jahren durch *in vitro*-Rekonstruktion, die Strukturaufklärung größerer Komplexe, elektronenmikroskopische Beobachtungen sowie weitere *single molecule*-Techniken rasche Fortschritte beim Verständnis der Prozesse sowie ihrer Regulation gemacht.

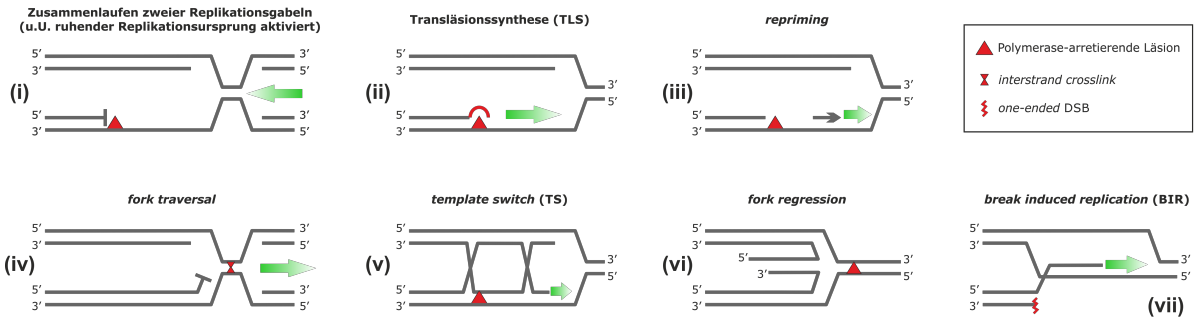


Abbildung 1.3: Übersicht über zelluläre Mechanismen zum Umgang mit Replikationsproblemen (Schadenstoleranz; DDT). In Reaktion auf einen Replikationsarrest oder einen Kollaps der Replikationsgabel wird die Replikation so schnell wie möglich mit normaler Geschwindigkeit wieder aufgenommen (grüner Pfeil). *Fork regression* dient vermutlich vor allem der Stabilisierung einer arretierten Gabel. Gezeigt sind jeweils charakteristische Intermediate. Für mechanistische Details siehe Fließtext und Abbildung 1.4.

Die zur Schadenstoleranz einer eukaryotischen Zelle beitragenden Mechanismen sind in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt und werden im Folgenden zunächst einzeln betrachtet:

- Aktivierung ruhender Replikationsursprünge
- Transläsionssynthese (TLS; fehlerbehaftete postreplikative Reparatur)

- *template switch* (TS; fehlerfreie postreplikative Reparatur)
- *repriming*
- homologe Rekombination (HR)
- *fork regression*
- *fork traversal*

Aktivierung ruhender Replikationsursprünge (Abbildung 1.3-i; Abbildung 1.4-iv)

Bei geringer Schadensdichte könnte die arretierte Replikationsgabel „warten", bis die Region von dem am benachbarten Replikationsursprung gestarteten Replisom passiv repliziert wird (*fork convergence*). Bei höherer Schadensdichte oder in schwierig zu replizierenden Regionen wie der rDNA und centromerischer DNA ist es allerdings unwahrscheinlich, dass die benachbarte Replikationsgabel die arretierte Gabel erreicht (BRANZEI & SZAKAL 2016a). In diesem Fall ist es hilfreich, dass nur etwa 20–30 % der in der G1-Phase an Replikationsursprüngen gebildeten pre-RCs (*pre replication complexe*s) normalerweise während der S-Phase aktiviert werden (COURTOT *et al.* 2018). Die restlichen ruhenden Komplexe dienen als *backup* und können als Antwort auf Replikationsstress aktiviert werden (MUÑOZ & MÉNDEZ 2017, COURTOT *et al.* 2018). Da die wartende Replikationsgabel aber instabil ist und kollabieren könnte und da das Warten auf passive Replikation insgesamt die Replikationszeit erhöht, gibt es weitere Mechanismen, die direkt an der arretierten Replikationsgabel ansetzen.

Postreplikative Reparatur (PRR)

Bereits vor 50 Jahren wurde beobachtet, dass bei der Replikation nach UV-Exposition fragmentierte genomische DNA entsteht, die nach kurzer Inkubationszeit wieder in höher molekulare DNA umgewandelt wird (RUPP *et al.* 1971, LEHMANN 1972, DI CAPRIO & COX 1981, PRAKASH 1981). Die für diese Umwandlung zuständigen Prozesse wurden postreplikative Reparatur (*postreplication repair*; PRR) genannt.

Basierend auf genetischen Interaktionsstudien bei *S. cerevisiae* wurden *RAD6* und *RAD18* als zentral für die PRR identifiziert (PRAKASH 1981), deren Genprodukte einen stabilen E2-E3-Ubiquitinligase-Komplex bilden, welcher an ssDNA bindet und die *sliding clamp* PCNA an K164 mono-ubiquitiniert (HOEGE *et al.* 2002, STELTER & ULRICH 2003). Während diese Modifikation den fehlerbehafteten Weg der PRR, die Transläsionssynthese, auslöst, führt die darauf aufbauende Poly-Ubiquitinierung von PCNA an K164 (via K63 des Ubiquitins) durch Rad5 und das Mms2-Ubc13-Heterodimer zu fehlerfreier PRR über einen rekombinationsähnlichen Informationsaustausch mit dem Schwesterchromatid (Abbildung 1.4-i; HOEGE *et al.* 2002, STELTER & ULRICH 2003, ZHANG & LAWRENCE 2005). Der fehlerfreie Weg der PRR wird *template switch* genannt, um ihn von der genetisch nicht identischen homologen Rekombination (HR) zu unterscheiden. PCNA kann an K164 und zusätzlich an K127 auch SUMOyliert werden, wodurch HR an der Replikationsgabel durch Rekrutierung der anti-rekombinogenen Helikase Srs2 unterdrückt wird (HOEGE *et al.* 2002, PFANDER *et al.* 2005, MOLDOVAN *et al.* 2007), wobei die für den *template switch*-Mechanismus notwendige Rad51-Assemblierung im Falle eines Arrests durch den Srs2-regulierenden Faktor Esc2 ermöglicht wird (URULANGODI *et al.* 2015). Bei der Betrachtung der regulierenden Funktion der PCNA-

Modifikationen ist es wichtig, dass PCNA ein Homotrimer ist und drei K164-Reste besitzt, wodurch mehr als eine der genannten Modifikationen am gleichen Molekül auftreten könnte (BRANZEI & SZAKAL 2016a).

Die für die PRR zentralen posttranslationalen Modifikationen von PCNA, weitere zentrale Faktoren sowie die Mechanismen der PRR sind in höheren Eukaryoten bis hin zum Menschen konserviert (BRANZEI & SZAKAL 2016a).

Transläsionssynthese (TLS; fehlerbehaftete PRR; Abbildung 1.3-ii; Abbildung 1.4-ii/v)

Im Gegensatz zu replikativen Polymerasen können spezialisierte Transläsionspolymerasen durch ihr breiteres aktives Zentrum und fehlende *proofreading*-Aktivität Nukleotide gegenüber DNA-Läsionen inserieren (FRIEDBERG *et al.* 2001). Die gleichen Eigenschaften führen aber zu hoher Ungenauigkeit, auch auf unbeschädigter Matrize, weshalb die erst durch die K164-Mono-Ubiquitinierung von PCNA ausgelöste Rekrutierung der TLS-Polymerase und deren geringe Prozessivität die Aktivität lokal begrenzen (FRIEDBERG *et al.* 2001, BIENKO *et al.* 2005).

Die eukaryotischen TLS-Polymerasen der Y-Familie Pol η, Pol ι, Pol κ und Rev1 (davon nur Pol η und Rev1 auch bei *S. cerevisiae* vorhanden) inserieren Nukleotide gegenüber verschiedenen DNA-Läsionen, können aber zumeist das entstehende fehlgepaarte Primerende nur ineffizient verlängern (SALE *et al.* 2012). Die wie die replikativen Polymerasen zur B-Familie gehörende Pol ζ mit den katalytischen Untereinheiten Rev3 und Rev7 verlängert diesen Strang, sodass ein Primerende entsteht, an dem die normale Replikation wieder ansetzen und das Replisom seine Arbeit wieder ordnungsgemäß aufnehmen kann (JOHNSON *et al.* 2000). Die Transläsionssynthese stellt einen schnellen und effizienten Mechanismus der DDT dar, ist aber aufgrund der intrinsischen Fehlerrate der TLS-Polymerasen grundsätzlich fehlerbehaftet, wobei der Hauptteil der resultierenden Mutationen auf die Aktivität von Pol ζ zurückzuführen ist (LAWRENCE 2002).

Beim Umgang mit Replikationsstress wird Transläsionssynthese von eukaryotischen Zellen als Möglichkeit des postreplikativen *gap fillings* oder direkt an der Replikationsgabel („*on the fly*“) eingesetzt (GUILLIAM 2021).

Template switch (TS; fehlerfreie PRR; Abbildung 1.3-v; Abbildung 1.4-iii/viii)

Verschiedene Mechanismen sind denkbar, wie das arretierte 3‘-Ende durch ein Abgreifen der Sequenzinformation vom bereits replizierten Schwesterchromatid-Bereich über den Schaden hinaus verlängert werden und wieder mit der ursprünglichen Matrize hybridisieren kann, um die normale Replikation fortsetzen zu können. Solch ein *template switch* kann prinzipiell über eine *fork regression* (siehe Seite 16) oder über eine Art homologe Rekombination geschehen. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass trotz der genetischen Unterschiede zwischen klassischer HR und fehlerfreier PRR letztere über einen Rad51- und Rad52-abhängigen, rekombinationsähnlichen Prozess verläuft: mit Hilfe von 2D-Gelanalysen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten in der Nähe von Replikationsgabeln X-förmige Rekombinationsintermediate mit Verbindungen zwischen den Schwesterchromatiden (*sister chromatid junctions*) nachgewiesen werden, deren Auftreten abhängig von den zentralen Genen der fehlerfreien PRR war (BRANZEI *et al.* 2008, VANOLI *et al.* 2010, GIANNATTASIO *et al.* 2014). Aus diesen und

weiteren Studien wurde ein Modell abgeleitet, wie durch *template switch* postreplikative ssDNA-Bereiche zu vollständigen Doppelsträngen ergänzt werden können (VANOLI *et al.* 2010; *reviewed* in BRANZEI & SZAKAL 2016a). Dabei invadiert nicht das arretierte 3'-Ende in das Schwesterchromatid (*end invasion*), sondern der einzelsträngige Bereich rund um den Schaden: dieser wird zunächst durch Helikasen (u.a. Pif1) und Exonukleasen (u.a. Exo1) vergrößert (GARCÍA-RODRÍGUEZ *et al.* 2018), sodass zunächst RPA und anschließend Rad52-vermittelt Rad51 binden kann. Vermittelt durch Rad55-Rad57 hybridisiert das Rad51-Filament mit einem Strang des Schwesterchromatids (*gap invasion*), wobei der Gegenstrang verdrängt wird und mit dem freien 3'-Ende hybridisieren kann (Abbildung 1.4-iii). Dieses kann anschließend durch Pol δ verlängert werden, wobei eine pseudo-dHJ entsteht. Diese wird durch den STR-Komplex (Sgs1-Top3-Rmi1) aufgelöst, wobei nur *non-crossover*-Produkte entstehen. Das *template switching* wird durch die durch Kohäsine vermittelte räumliche Nähe der Schwesterchromatiden erleichtert (FUMASONI *et al.* 2015, LITWIN *et al.* 2018, DELAMARRE *et al.* 2020).

Über *template switch* werden nicht nur ssDNA-Lücken zwischen den Okazaki-Fragmenten nach Arresten am *lagging strand* geschlossen, sondern auch ssDNA-Lücken im *leading strand*, nachdem die eigentliche Replikation hier durch *repriming* wieder aufgenommen wurde (BRANZEI & SZAKAL 2016a).

Repriming (Abbildung 1.3-iii; Abbildung 1.4-vi)

Obwohl das *repriming* auch für den *leading strand* bereits nach den Ergebnissen der ersten PRR-Untersuchungen aus den 70er- und 80er-Jahren wahrscheinlich erschien, wurde es erst in den letzten fünfzehn Jahren als normal auftretender DDT-Mechanismus sowohl für *S. cerevisiae* als auch für menschliche Zellen akzeptiert. Eine Primase setzt dabei einen neuen Primer hinter dem Schaden auf die *leading strand*-Matrize, von dem aus das Replisom seine Arbeit wieder aufnehmen kann. Zurück bleibt eine kleine ssDNA-Lücke rund um den Schaden, die mittels TS oder TLS postreplikativ geschlossen werden kann. (*reviewed* in BRANZEI & SZAKAL 2016a, GUILLIAM 2021, TIRMAN *et al.* 2021)

Bei *S. cerevisiae* führt die auch für die „normalen" Primer zuständige Pol α/Primase das *repriming* aus, wird aber *in vitro* von RPA inhibiert, weshalb vermutlich *in vivo* weitere Faktoren zur Auslösung der *repriming*-Aktivität von Pol α/Primase notwendig sind (FUMASONI *et al.* 2015, TAYLOR & YEELES 2018). *Repriming*-Mutanten zeigen eine deutliche Reduzierung von *template switch*-Intermediaten und eine erhöhte Nutzung fehlerbehafteter Wege zur Schadensumgehung (FUMASONI *et al.* 2015).

In Vertebraten, Pflanzen und niederen Eukaryoten, aber nicht in *S. cerevisiae*, existiert mit PrimPol eine spezialisierte *repriming*-Polymerase, die bei Replikationsarresten dNTP-Primer einige Nukleotide *downstream* des Schadens auf der *leading strand*-Matrize setzen kann (BIANCHI *et al.* 2013, GARCÍA-GÓMEZ *et al.* 2013, WAN *et al.* 2013). Während geringe Mengen RPA PrimPol aktivieren, hemmen hohe RPA-Mengen seine *repriming*-Aktivität, wodurch der Einsatz von PrimPol zeitlich begrenzt werden könnte (GUILLIAM & DOHERTY 2017). Menschliche Zellen sind ohne PrimPol lebensfähig, zeigen aber erhöhte Mutationsraten und Schwesterchromatidaustausche (BAILEY *et al.* 2019).

Fork regression (Abbildung 1.3-vi; Abbildung 1.4-vii)

Fork regression (oder *fork reversal*) beschreibt eine Rückwärtsbewegung der Replikationsgabel, wobei die parentalen Stränge rehybridisieren und es durch Hybridisierung zwischen den Tochtersträngen zu einer *Holliday junction*-ähnlichen Struktur („*chicken foot*"; *four-way-junction; reversed fork*) kommt. In dieser Struktur kann es zu einer Verlängerung des *leading strands* mit dem *lagging strand* als Matrize kommen oder auch zu einer Reparatur des Schadens durch Exzisionsreparatur, da dieser nun temporär in einem doppelsträngigen Bereich liegt. Ein verlängertes 3'-Primerende könnte nach exonukleolytischem Abbau des Gegenstranges auch rekombinationsähnlich in den parentalen Doppelstrangbereich invadieren. Die *chicken foot*-Struktur ist aber auch ein Substrat für Nukleasen, deren Aktivität – gewollt oder ungewollt – zu einer kollabierten Replikationsgabel führt. Alle Möglichkeiten sind im Detail in MENG & ZHAO (2017) nachzulesen. Ob *fork regression* ein in Wildtyp-Zellen vorkommender Mechanismus zur Schadensumgehung ist, ist für *S. cerevisiae* umstritten. So wurden beispielsweise von FUMASONI *et al.* 2015 *reversed forks* nur in Zellen mit einem *repriming*-Defekt beobachtet. Vermutlich sind in der Hefe andere DDT-Mechanismen unter den meisten Umständen ausreichend. Gezeigt wurde aber für menschliche Zellen, dass die kontrollierte Rückwärtsbewegung zum Schutz der Replikationsgabel und gezielter Remodellierung bei Replikationsstress eingesetzt wird (*reviewed* in BRANZEI & SZAKAL 2016a, BERTI *et al.* 2020, GUILLIAM 2021). Beim Menschen ist für das *fork reversal* eine nicht-kanonische Aktivität von RAD51 notwendig: diese benötigt weder den Mediator BRCA2 noch die Strangaustausch-Aktivität von RAD51, sondern ein diskontinuierliches RAD51-RPA-Cofilament (MIJIC *et al.* 2017, BHAT & CORTEZ 2018). Zum effizienten Schutz der *four-way-junction* vor der Prozessierung durch Nukleasen wird allerdings ein BRCA2-vermitteltes, stabiles RAD51-Filament benötigt (BHAT & CORTEZ 2018). Sowohl in der Hefe als auch beim Menschen gibt es zahlreiche Helikasen und Translokasen, die in den Vorgang des *fork reversal* (*branch migration*) und den umgekehrten Prozess zur Wiederaufnahme der Replikation (*reversed branch migration*) involviert sind bzw. sein könnten (*reviewed* in MENG & ZHAO 2017, BERTI *et al.* 2020).

Homologe Rekombination (HR)

Neben der Involvierung einiger HR-Faktoren in die fehlerfreie PRR mittels *template switch* und eine mögliche Stranginvasion nach *fork regression* kommt die homologe Rekombination bei der Reinitiierung kollabierter Replikationsgabeln zum Einsatz, bei denen das Replisom disassembliert wurde. Solche Replikationsgabeln stellen *one-ended* DSBs dar, die über *break induced replication* (BIR; Abbildung 1.3-vii; vgl. Seite 9) konservativ an einem migrierenden *D-loop* verlängert oder mit Hilfe von Nukleasen wieder in Replikationsgabeln umgewandelt werden können. An unbeschädigten Replikationsgabeln sollte homologe Rekombination unterdrückt werden, um die Gefahr genomischer Umstrukturierungen durch erratische Rekombination zu vermeiden (*reviewed* in LEHMANN *et al.* 2020). Wie bereits erwähnt, geschieht dies unter anderem durch die Bindung der anti-rekombinogenen Helikase Srs2 an die SUMOylierte *sliding clamp* PCNA (PFANDER *et al.* 2005). Entfällt die Inhibierung durch Srs2, kann es auch ohne Beteiligung der *RAD6*/*RAD18*-abhängigen PRR zu einer Interaktion mit dem Schwesterchromatid durch homologe Rekombination kommen, wobei die gebildeten Intermediate denen der fehlerfreien PRR entsprechen (Abbildung 1.4-iii; BRANZEI *et al.* 2008, BRANZEI & SZAKAL 2016a). Dieser manchmal auch „*salvage pathway*"

genannte Weg kann in PRR-Mutanten beobachtet werden und kommt in Wildtyp-Zellen vermutlich in der G2-Phase als letzte Option zum Einsatz, um verbliebene Replikationsprobleme und Rekombinationsintermediate zu lösen (BRANZEI & SZAKAL 2016a).

Fork traversal (Abbildung 1.3-iv)

Lange galt die Annahme, dass Helikase-arretierende Läsionen wie DNA-Protein-*crosslinks* und *interstrand crosslinks* (ICLs) ein unüberwindliches Hindernis für das Replisom darstellen. Offenbar kann der CMG-Helikase-Komplex aber solche Hindernisse überwinden und die Replikation in gleicher Richtung jenseits der Läsion wieder aufnehmen, indem der Mcm2–7-Ring transient geöffnet wird. Dieser Vorgang wird als *fork traverse* (oder *fork traversal*) bezeichnet und wurde zuerst anhand von *DNA fiber*-Analysen für ICLs direkt beobachtet (HUANG *et al.* 2013). *Fork traversal* wurde hier bei mehr als der Hälfte der ICLs beobachtet und stellt demnach einen bedeutenden Prozess zur Schadensumgehung dar. Auch für DNA-Protein-*crosslinks* (SPARKS *et al.* 2019) und G4-Strukturen (SATO *et al.* 2020) wurde *fork traversal* beschrieben: in beiden Fällen wird auch hier der Mcm2–7-Ring transient geöffnet, während eine akzessorische Helikase die DNA-Stränge jenseits den Schadens auftrennt, um das *traversal* zu erleichtern. Während die Wiederaufnahme der Replikation bei einer nur einen Strang betreffenden Läsion unter Umständen durch TLS ermöglicht werden kann, muss im Falle von ICLs zwingend *repriming* erfolgen (*reviewed* in GUILLIAM 2021). Alle genannten Studien zum *fork traversal* wurden an Vertebraten durchgeführt.

1.2.2.4 Entscheidung am Arrest: welches ist der beste Weg?

Bei den meisten Replikationsproblemen kommen mehrere der vorgestellten DDT-Mechanismen in Frage, um die Replikation zu Ende zu bringen. Während einige Mechanismen kombiniert auftreten, schließen sich andere gegenseitig aus. Die Entscheidung, welcher Weg Priorität erhält, muss dabei die Schnelligkeit sowie die möglicherweise entstehende Gefahr für die genomische Integrität berücksichtigen. Abbildung 1.4 zeigt eine Übersicht über die momentane Vorstellung der nach einem Arrest der replikativen Polymerase am *lagging* bzw. *leading strand* ablaufenden Vorgänge. Letztlich stellt jeder Arrest *in vivo* aber eine Einzelfallentscheidung dar, abhängig von der Art der Läsion, der genomischen Umgebung, dem zellulären (Replikations-) Stresslevel und möglichen individuellen Defekten der Zelle bzw. des Organismus.

Bei einem Arrest von Pol δ an einem Schaden in der *lagging strand*-Matrize (Abbildung 1.4-ii/iii) kann das Replisom die Replikation mit dem nächsten Okazaki-Fragment ungestört weiterführen. Die zurückbleibende ssDNA-Lücke kann postreplikativ durch Transläsionssynthese oder durch die Verlängerung des 3‘-Endes am *leading strand* nach *template switch* erfolgen. TLS ist dabei fehlerbehaftet, während TS aufgrund der *dissolution* durch den STR-Komplex theoretisch fehlerfrei verläuft. Ein durch die Poly-Ubiquitinierung von PCNA ausgelöster *template switch* ist daher – zumindest während der frühen S-Phase – der bevorzugte Weg (BRANZEI & SZAKAL 2016a, 2016b). Entfällt die Inhibierung der homologen Rekombination durch Srs2, kann es unabhängig von der Poly-Ubiquitinierung der PCNA zu einem rekombinationsabhängigen *gap filling* kommen (*salvage pathway*), dessen Intermediate denen des TS entsprechen (BRANZEI *et al.* 2008). Es ist aber noch unklar, inwiefern diese Option – zum Beispiel in der späten G2-Phase – gezielt eingesetzt wird (BRANZEI & SZAKAL 2016a).

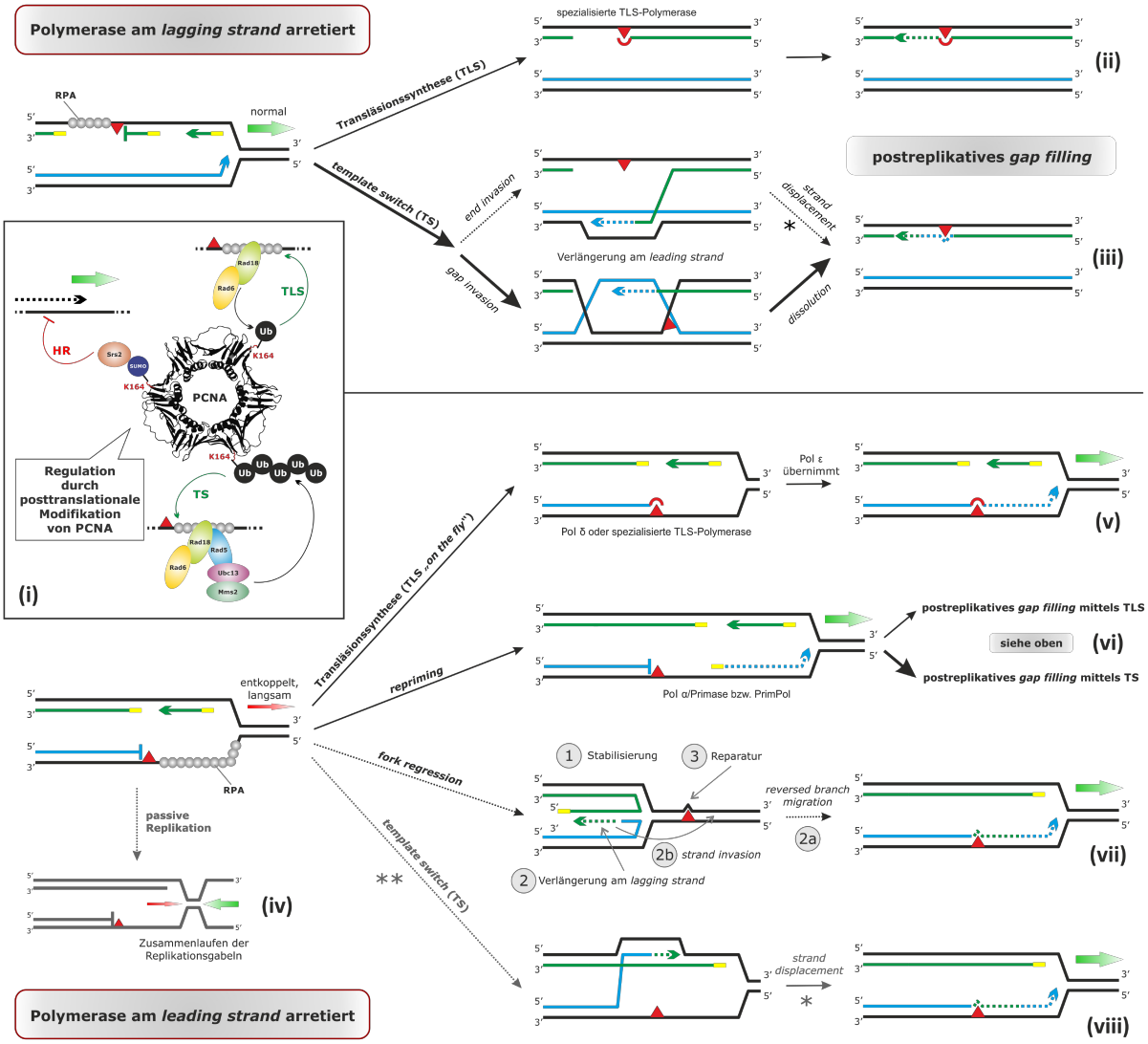


Abbildung 1.4: **Vereinfachte, schematische Darstellung der möglichen Wege zur Wiederaufnahme bzw. zum Abschluss der Replikation nach einem schadensinduzierten Arrest der replikativen Polymerase am *lagging* bzw. am *leading strand*. (i)** Regulation durch alternative Ubiquitinierung der replikativen *sliding clamp* PCNA. Die SUMOylierung hemmt erratische Rekombination an unbeschädigten Replikationsgabeln. Mono-Ubiquitinierung fördert TLS, Poly-Ubiquitinierung TS. PCNA ist ein Homotrimer, weshalb unterschiedliche posttranslationale Modifikationen von K164 theoretisch auch an einem Molekül vorkommen können. **(ii–iii)** Arrest am *lagging strand*: Während die Replikation durch Erzeugung der folgenden Okazaki-Fragmente weiterlaufen kann, können die verbleibenden ssDNA-Bereiche durch Transläsionssynthese (ii) oder Verlängerung mit dem *leading strand* als Matrize nach *template switch* (iii) geschlossen werden. TS ist als weniger mutagene Methode der bevorzugte Weg für dieses postreplikative *gap filling*. Mechanistisch kann der *template switch* über eine Invasion des 3'-Endes (*end invasion*) oder des einzelsträngigen Bereichs (*gap invasion*) in das Schwesterchromatid erfolgen. Elektronenmikroskopisch konnten Intermediate beobachtet werden, die dem Weg über *gap invasion* entsprechen, was dazu passt, dass dieser Bereich zunächst von RPA und anschließend von der Rekombinase Rad51 gebunden wird, die die Invasion vermitteln kann. Die Auflösung des Intermediats erfolgt über STR-katalysierte *dissolution* zum *non-crossover*-Produkt. **(iv–viii)** Arrest am *leading strand*: Die einfachste Möglichkeit der Wiederherstellung eines funktionalen Replisoms ist ein *polymerase switch* hin zu einer schadenstoleranteren Polymerase (v). Die Primerverlängerung versucht vermutlich zuerst Pol δ, bevor eine spezialisierte TLS-Polymerase „gerufen" wird. Pol ε kann anschließend wieder übernehmen und den Kontakt zur Helikase wieder herstellen. Wenn TLS nicht funktioniert, ist das *repriming* durch Pol α/Primase (*S. cerevisiae*) bzw. PrimPol (fast überall außer in *S. cerevisiae*) die nächstbessere Option. Zurückbleibende ssDNA-Lücken werden hinter der Replikationsgabel nach Mechanismus (ii) oder (iii) geschlossen. Ein mindestens in höheren Eukaryoten wichtiger Weg ist die durch Helikasen/Translokasen katalysierte *fork regression* (vii). Diese dient der Stabilisierung der instabilen Replikationsgabel (1), um etwa auf passive Replikation durch zusammenlaufende Replikationsgabeln zu warten (iv). Außerdem bietet eine *reversed fork* die Möglichkeit zur Verlängerung des arretierten 3'-Endes, da hier ebenfalls ein *template switch* stattfindet (2). Eine (andere) Helikase könnte die *reversed fork* durch *reversed branch migration* wieder in eine Replikationsgabel

umwandeln (2a) oder das verlängerte 3'-Primerende könnte nach exonukleolytischem Abbau des Gegenstranges rekombinationsähnlich in den parentalen Doppelstrangbereich invadieren (2b). Dies würde ebenso den Fortgang der Replikation erlauben wie eine Exzisionsreparatur des Schadens, während dieser in einem doppelsträngigen Bereich liegt (3). Die Umgehung des Schadens durch homologe Rekombination bzw. *template switch* durch Stranginvasion (viii) stellt vermutlich an der Replikationsgabel selbst nur einen *backup*-Mechanismus dar, der erst greift, wenn zum Ende der S-Phase noch anderweitig nicht auflösbare Arreste existieren. (Die Dicke der Pfeile deutet die Wahrscheinlichkeit an, mit der der jeweilige Weg eingeschlagen wird. Gestrichelte Linien stellen neu synthetisierte DNA-Abschnitte dar. (*) Gezeigt ist nur die Auflösung über *strand displacement*, also die Auflösung des *D-loops*. Theoretisch ist auch der Weg über Ausbildung einer doppelten *Holliday junction* möglich (vgl. Abbildung 1.2). (**) Gezeigt ist hier *strand invasion*, wobei auch die unter (iii) gezeigte *gap invasion* möglich wäre. Ub = Ubiquitin; HR = homologe Rekombination; TLS = Transläsionssynthese; TS = *template switch*) Abbildung erstellt anhand der im Text genannten Quellen.

Die Priorisierung nach einem Arrest von Pol ε an einer Läsion in der *leading strand*-Matrize (Abbildung 1.4-iv-viii) kann unter anderem anhand von Daten aus *in vitro*-Rekonstitutionen mit Komponenten von *S. cerevisiae* wie folgt zusammengefasst werden (*reviewed* in GUILLIAM 2021). Am Anfang steht ein zweistufiger Versuch des *polymerase switchings*. Die erste Stufe bildet dabei offenbar die eigentlich für den *lagging strand*, aber auch für andere Reparatursynthesen zuständige Pol δ, die die *leading strand*-Synthese bei einer Entkopplung vom Replisom übernehmen kann (HIROTA *et al.* 2016, GUILLIAM & YEELES 2020a, 2020b). Kann Pol δ gegenüber dem Schaden die DNA-Synthese ebenfalls nicht fortführen, erfolgt der Versuch der „*on the fly*"-Transläsionssynthese. Führt eine der Polymerasen zu einer Synthese über den Schaden hinweg, kann Pol ε wieder übernehmen und das verlangsamte Rest-Replisom einholen, damit es zur Wiederherstellung des voll funktionsfähigen Replisoms kommen kann. Bei sperrigen Läsionen oder bei Ausfall der TLS konkurrieren *repriming* und *fork regression* als mögliche Wege (FUMASONI *et al.* 2015, QUINET *et al.* 2020). Nach erfolgreichem *repriming* durch Pol α/Primase werden die zurückbleibenden Lücken analog zum *gap filling* am *lagging strand* postreplikativ geschlossen. Eine *reversed fork* kann neben der Stabilisierung der Verlängerung des arretierten Strangs oder der Reparatur der nun in dsDNA liegenden Läsion dienen. *In vivo* stellt *repriming* möglicherweise von Vornherein die bevorzugte Methode dar, da so die fehlerbehaftete TLS zugunsten eines fehlerfreien *gap-fillings* vermieden wird. Ein HR-abhängiger Mechanismus spielt zur direkten Wiederaufnahme der Replikation bei einem Polymerase-Arrest vermutlich nur in Ausnahmefällen eine Rolle (BRANZEI & SZAKAL 2016a).

1.2.3 REGULATION DER *DNA DAMAGE RESPONSE*

Die Reparatur- und Toleranzmechanismen müssen flexibel und schnell auf alle möglichen DNA-Schäden reagieren. Jede unbehandelte Läsion ist nicht nur potenziell mutagen, sondern kann durch Behinderung der Transkription sofort negativen Einfluss auf die Zellfunktion haben kann. Für eine jederzeit angemessene zelluläre Antwort müssen Enzyme rekrutiert, aktiviert und deaktiviert und Intermediate erkannt, umgewandelt und geschützt werden. Zudem werden einige Abzweigungen im Netzwerk der DDR zellzyklusabhängig reguliert und das Auftreten von DNA-Schäden kann seinerseits Auswirkungen auf den Zellzyklus haben.

1.2.3.1 Posttranslationale Modifikationen

Posttranslationale Modifikationen spielen eine wichtige Rolle bei der Koordinierung der Reparatur- und Schadenstoleranzwege. Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Neddylierung, Mono- und Poly-

Ubiquitinierung, SUMOylierung und Poly-ADP-Ribosylierung verändern Bindungseigenschaften, *fine-tunen* katalytische Aktivität oder übermitteln Signale (HARPER & ELLEDGE 2007, HUEN & CHEN 2008). So beinhaltet beispielsweise – wie zuvor beschrieben – die Regulation der PRR eine alternative Ubiquitinierung der *sliding clamp* PCNA, was ihre Affinität gegenüber Interaktionspartnern verändert.

Da die DNA bei Eukaryoten im Komplex mit Histonproteinen vorliegt, findet jede Reparatur im Kontext unterschiedlich stark kondensierten Chromatins statt. Um die beschädigte DNA für die Reparaturfaktoren zugänglich zu machen, muss das Chromatin teilweise mit Hilfe von *chromatin remodeling*-Komplexen aktiv umgebildet werden. Im Zusammenhang mit der DNA-Reparatur wurden zudem der Einbau alternativer Histonvarianten sowie vielfältige posttranslationale Histonmodifikationen beschrieben (schadens-abhängiger Histon-Code; *reviewed* in APELT *et al.* 2021, SANCHEZ *et al.* 2021).

Die differentielle Phosphorylierung ist wie in den meisten Signalwegen der Zelle auch in der DDR eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen. Die meisten dieser Phosphorylierungen erfolgen im Rahmen einer schadensabhängigen Phosphorylierungskaskade, dem *DNA damage checkpoint*.

1.2.3.2 Der *DNA damage checkpoint* (DDC)

Bei Vorliegen von DNA-Schäden ist es entscheidend für das Überleben der Zelle, dass der Zellzyklus verlangsamt oder vorübergehend angehalten wird, um Zeit für die Reparatur bzw. die Schadensumgehung zu schaffen und das Auftreten chromosomaler Defekte durch verfrühte Zellteilung zu vermeiden.

Initiiert durch Doppelstrangbrüche und persistierende ssDNA, wie sie nach der Generierung der 3'-Überhänge bei der Doppelstrangbruchreparatur, aber auch bei Replikationsarresten bzw. den dabei zurückbleibenden Einzelstranglücken entsteht, aktivieren eukaryotische Zellen den *DNA damage checkpoint* (DDC). Durch eine komplexe Verschaltung, in deren Zentrum bei der Bäckerhefe die Proteinkinasen Tel1 und Mec1 bzw. beim Menschen deren Homologe ATM und ATR stehen, wird ein Zellzyklus-Arrest ausgelöst, DNA-Reparaturproteine rekrutiert und Einfluss auf die Expression bestimmter Gene genommen (HARRISON & HABER 2006).

Der DDC kann in drei Phasen des Zellzyklus aktiviert werden und danach in drei Sub-*checkpoints* unterteilt werden: G1-, S- und G2/M-*checkpoint*. In der G1-Phase auftretende DNA-Läsionen verzögern den Eintritt in die S-Phase, um den klassischen Reparaturmechanismen mehr Zeit zu geben, eine möglichst fehlerfreie Matrize für die Replikation bereitzustellen (SIEDE *et al.* 1994). Schäden während der S-Phase verzögern die Replikation und der DDC koordiniert die Schadensumgehung (PAULOVICH & HARTWELL 1995). Schäden, die nach dem Abschluss der Replikation noch vorhanden sind, aktivieren den G2/M-checkpoint, wodurch die Zellteilung bis nach der Reparatur aufgeschoben wird (WEINERT & HARTWELL 1988). Nach erfolgreicher Reparatur wird der DDC deaktiviert und der Zellzyklus normal fortgesetzt. Bei anhaltender Schadensdichte kann der Zellzyklusarrest nach einer gewissen Zeit entweder trotzdem aufgehoben werden (Adaptation) oder bei höheren Eukaryoten in die Einleitung der p53-vermittelten Apoptose übergehen. Während der DDC in der Hefe relativ sensitiv ist und schon auf einen einzelnen DSB mit einem Zellzyklusarrest reagieren kann (SANDELL 1993), toleriert das System in menschlichen Zellen höhere Schadensdichten, bevor deutliche

Verzögerungen des Zellzyklus eingeleitet werden. Beim Menschen werden in diesem Fall einige Läsionen sogar erst in der nächsten G1-Phase repariert (LUKAS *et al.* 2011). (*reviewed* in WATERMAN *et al.* 2020)

Auf molekularer Ebene phosphorylieren die Kinasen Tel1 (ATM) und Mec1 (ATR) mit Hilfe einiger Adapterproteine die Effektorkinasen Chk1 und Rad53 (CHK1 und CHK2 beim Menschen), die wiederum Zielproteine phosphorylieren, die die gewünschten Effekte auf den Zellzyklus und die Reparaturprozesse haben. Im Gegensatz zu den meisten anderen DDC-Faktoren werden die Effektorkinasen durch ihre Aktivierung vom Chromatin freigesetzt und verteilen sich im Zellkern, um ihre Zielproteine zu finden (KASTAN & BARTEK 2004).

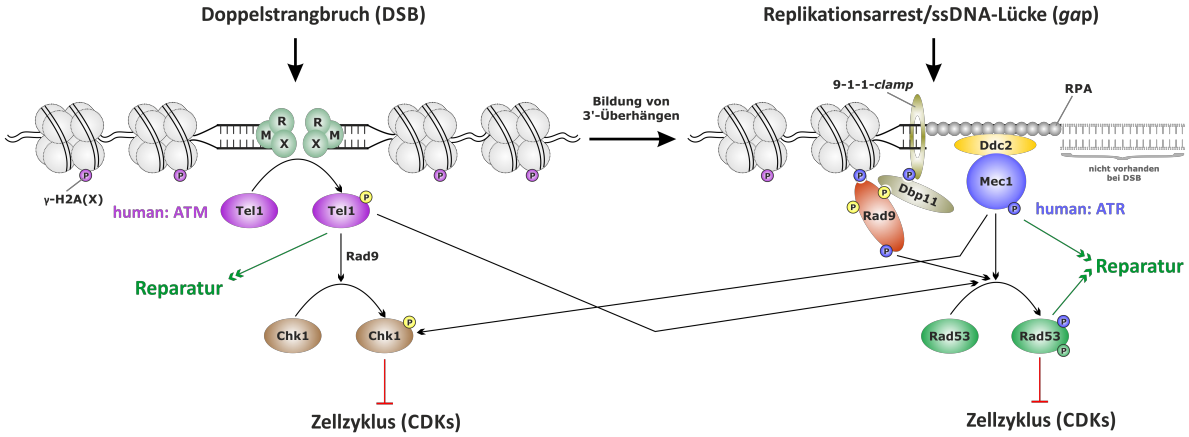


Abbildung 1.5: **Vereinfachte Darstellung des *DNA damage checkpoint* bei *S. cerevisiae*.** Tel1 und Mec1 (die Hefe-Homologe der menschlichen Entsprechungen ATM und ATR) phosphorylieren mit Hilfe spezifischer Adapterproteine die Effektorkinasen Chk1 und Rad53, die die gewünschten Effekte auf den Zellzyklus und die DNA-Reparatur durch Phosphorylierung ihrer Zielproteine steuern (genauer Ablauf vgl. Fließtext). Tel1 und Mec1 phosphorylieren auch Histon H2A bzw. die menschliche Histonvariante H2AX. Das Produkt dieser Phosphorylierung wird als γ-H2AX bezeichnet und häufig, z.B. in der Fluoreszenzmikroskopie, als Marker für geschädigte DNA verwendet. (Die Farbe der angehängten Phosphatgruppen entspricht der Farbe der zuständigen Kinase: lila für Tel1, blau für Mec1, grün für Rad53 und gelb für Phosphatgruppen, die von der Aktivität anderer Kinasen stammen. CDK = Cyclin-abhängige Kinase (*cyclin dependent kinase*)). Abbildung neu konzipiert und vereinfacht nach: HARRISON & HABER 2006, SMITH *et al.* 2020, WATERMAN *et al.* 2020.

Für *S. cerevisiae* ist der Ablauf der Signalkaskade vereinfacht in Abbildung 1.5 gezeigt. An Doppelstrangbrüchen beginnt die Kaskade mit der Schadenserkennung durch den MRX-Komplex (Mre11-Rad50-Xrs2), was die Phosphorylierung von Tel1 auslöst. Tel1 phosphoryliert, vermittelt vom Adapterprotein Rad9, in geringem Maße die Effektorkinasen Chk1 und Rad53. Nach der Bildung von 3'-Überhängen (siehe Seite 6) werden die einzelsträngigen Bereiche von RPA stabilisiert. RPA-überzogene ssDNA findet sich auch bei den Einzelstranglücken bei bzw. nach einem Replikationsarrest. Ddc2 bindet an RPA und rekrutiert so die Kinase Mec1, was allerdings noch nicht ausreichend für die Aktivierung von Rad53 ist. Mec1 phosphoryliert zunächst (wie auch Tel1) das Histon H2A im umgebenden Chromatin an S129 (γ-H2A(X)). Unabhängig davon wird die 9-1-1-*clamp* am dsDNA/ssDNA-Übergang auf die DNA geladen und von Mec1 phosphoryliert. Das Adapterprotein Dbp11 bindet an die phosphorylierte 9-1-1-*clamp* und sorgt damit dafür, dass der Adapter Rad9 gleichzeitig Dbp11 und γ-H2A(X) binden kann und anschließend von Mec1 phosphoryliert wird. Erst jetzt kann die Effektorkinase Rad53 rekrutiert und

in der Folge durch Mec1-abhängige Phosphorylierung aktiviert werden. Aktiviertes Rad53 phosphoryliert weitere Rad53-Moleküle, was zur vollen *checkpoint*-Aktivierung führt. Dadurch, dass sich erst ein mehrteiliger Komplex an der Stelle des DNA-Schadens aufbauen muss, wird die Gefahr einer vorschnellen Aktivierung des DDC verringert. Zu den Zielproteinen von Chk1 und Rad53 zählen neben Reparaturproteinen Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs), um den jeweiligen Zellzyklusarrest auszulösen. (*reviewed* in WATERMAN *et al.* 2020)

Auch die Stabilität arretierter Replikationsgabeln wird durch die *checkpoint*-Aktivierung erhöht. So verzögern Mec1 und Rad53 das Feuern später Replikationsursprünge, um einem RPA-Mangel vorzubeugen, sorgen für die Stabilisierung des Replisoms und verringern lokal die Aktivität strukturspezifischer Nukleasen, deren Aktivität zu einem Kollaps der Replikationsgabel führen würde (BRANZEI & SZAKAL 2016a, MUÑOZ & MÉNDEZ 2017).

Beim Menschen verläuft die Aktivierung des DDC grundsätzlich ähnlich, wobei ATM vor allem CHK2 und ATR vor allem CHK1 aktiviert. Weitere Proteinkinasen spielen eine Rolle, darunter DNA-PKcs (reguliert NHEJ) und WEE1 (reguliert CDKs). Zudem ist der Tumorsuppressor und Masterregulator p53, der in 40 % aller Tumoren defekt ist (BOUAOUN *et al.* 2016), in den Weg eingebunden und wird von ATM, ATR, CHK1 und CHK2 beeinflusst (WATERMAN *et al.* 2020).

1.2.4 HERAUSFORDERUNG *INTERSTRAND CROSSLINK*

Bei einem *interstrand crosslink* (ICL) sind die beiden Stränge der DNA kovalent miteinander verbunden, können also nicht mehr voneinander getrennt werden. Da dies Replikation, Transkription und auch einfache Exzisionsreparatur verhindert, gehören ICLs zu den gefährlichsten DNA-Schäden. So kann bereits ein einziger unreparierter ICL für eine Hefezelle tödlich sein (GROSSMANN *et al.* 2001) und auch für menschliche Zellen sind sie bereits in geringer Anzahl letal (LIU & WANG 2013). Um dieser Gefahr zu begegnen, müssen Zellen fast den gesamten Werkzeugkasten der *DNA damage response* bemühen.

1.2.4.1 Quellen von ICLs

Aufgrund ihrer besonders für teilungsaktive Zellen hohen Toxizität werden ICL-auslösende Agenzien schon seit den 1940er-Jahren als Chemotherapeutika eingesetzt (GOODMAN & WINTROBE 1946, ROGERS *et al.* 2020b). Exogene Substanzen wie *nitrogen mustard*, Mitomycin C oder Cisplatin induzieren neben ICLs immer auch Monoaddukte, DNA-Protein-*crosslinks* und *intrastrand crosslinks* (IaCLs; kovalente Verknüpfung von Basen desselben DNA-Strangs; *reviewed* in ROGERS *et al.* 2020b). Psoralene, pflanzliche Sekundärstoffe, werden durch UV-A-Licht zur Bildung von ICLs angeregt.

Würden ICLs aber nur durch seltene, exogene Substanzen verursacht, wäre schwer erklärbar, warum sich ein komplexes System zu ihrer Beseitigung evolviert hat. Nachdem die Frage nach endogenen Verursachern von *interstrand crosslinks* lange ungeklärt war, kennt man heute vor allem eine Quelle: reaktive Aldehyde. Diese entstammen dem zellulären Fettstoffwechsel oder der Aufnahme und Verstoffwechselung exogener Toxine wie Alkohol, Zigarettenrauch oder Autoabgasen (STONE *et al.* 2008). Die biologische Bedeutung wird daran sichtbar, dass sowohl Mäuse als auch Menschen mit einem Defekt

der ICL-Reparatur einen stärkeren Phänotyp haben, wenn sie zusätzlich eine defekte Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH2) besitzen (LANGEVIN *et al.* 2011, HIRA *et al.* 2013). ALDH2 entgiftet Acetaldehyd, das unter anderem beim Abbau von Alkohol entsteht. Eine weitere Aldehydquelle liegt innerhalb der DNA selbst: AP-Stellen, die durch spontane Hydrolyse oder als Intermediate der BER in großen Zahlen vorliegen. Die Desoxyribose liegt ohne gebundene Base in einem Gleichgewicht zwischen zyklischer und offenkettiger Form vor. Die offenkettige Form ist ein Aldehyd und kann im geeigneten Sequenzkontext mit einer gegenüberliegenden Base reagieren (JOHNSON *et al.* 2013, PRICE *et al.* 2014).

Bezüglich ihrer Größe, der enthaltenen chemischen Bindungen sowie der durch sie ausgelösten Verzerrung der DNA-Struktur bilden *interstrand crosslinks* eine sehr heterogene Gruppe von DNA-Schäden, was Schadenserkennung und Reparatur zusätzlich erschwert (für Strukturformeln und Topologie verschiedener ICLs vgl. z.B. LOPEZ-MARTINEZ *et al.* 2016).

1.2.4.2 ICL-Reparatur in menschlichen Zellen

Der am besten untersuchte ICL-Reparaturweg bei Säugern ist der Fanconi-Anämie-Weg (FA-Weg). Dieser verwendet Komponenten vieler bekannter Reparatur- und Schadenstoleranzmechanismen, deren Einsatz von speziellen FA-Proteinen orchestriert wird. Die mittlerweile 22 bekannten FA-Proteine (FANCA–FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCE–FANCG, FANCI-FANCW) beschränken sich wiederum nicht auf die Reparatur von *interstrand crosslinks*, sondern bilden mit ihren assoziierten Proteinen ein komplexes Tumorsuppressor-Netzwerk (NIRAJ *et al.* 2019).

Fanconi-Anämie

Fanconi-Anämie ist eine seltene (USA: ca. 1:131.000; ROSENBERG *et al.* 2011) Erbkrankheit, die erstmals 1927 von dem Kinderarzt Guido Fanconi beschrieben wurde und durch bi-allelische Mutationen in einem der FA-Gene ausgelöst wird (NIRAJ *et al.* 2019). Die resultierende Symptomatik ist äußerst heterogen. Angeborene Fehlbildungen und ein durch hormonelle Defekte bedingter Kleinwuchs können auftreten oder auch völlig fehlen (CECCALDI *et al.* 2016). Das typischste Symptom ist fortschreitendes Knochenmarksversagen im Kindes- oder Jugendalter durch ein Absterben der blutbildenden Stamm- und Vorläuferzellen und daraus resultierende Panzytopenie (Abnahme weißer und roter Blutkörperchen sowie Blutplättchen; CECCALDI *et al.* 2016). Darüber hinaus leiden die Patienten unter einer erhöhten Krebsanfälligkeit, vor allem für maligne hämatologische Erkrankungen und Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Halsbereich (ROSENBERG *et al.* 2003, CECCALDI *et al.* 2016). Die Diagnose erfolgt meist zytologisch über die extreme Sensitivität der Patientenzellen gegenüber ICL-induzierenden Agenzien und dadurch bedingte aberrante Chromosomenstrukturen (*chromosome breakage test*; AUERBACH 1993), was ein gemeinsames Charakteristikum aller Komplementationsgruppen darstellt. Neben einer symptomatischen Behandlung der auftretenden Krebserkrankungen und einer gründlichen Krebsvorsorge besteht die wichtigste Behandlung meist in einer Knochenmarktransplantation, die die Lebenserwartung auf mehrere Jahrzehnte erhöhen kann (CECCALDI *et al.* 2016).

Fanconi-Anämie-Weg (FA -Weg)

Die Reparatur von ICLs über den FA-Weg geschieht replikationsabhängig, also in der S-Phase. FA-Proteine erkennen an einem ICL arretierte Replikationsgabeln und initiieren eine Kaskade aus endonukleolytischer Inzision, Transläsionssynthese und abschließender Reparatur über homologe Rekombination und Nukleotidexzisionsreparatur (*reviewed* in DEANS & WEST 2011, CECCALDI *et al.* 2016, NIRAJ *et al.* 2019, MILLETTI *et al.* 2020, RENAUDIN & ROSSELLI 2020, ROGERS *et al.* 2020b). Viele der mechanistischen Details wurden anhand eines vielfach abgewandelten *assays* mit zellfreiem, replikationsfähigem *Xenopus* Eizell-Extrakt aufgedeckt, in dem die Reparatur eines einzelnen, definierten ICLs in einem Plasmid untersucht wird (WALTER *et al.* 1998, RÄSCHLE *et al.* 2008). Dem entstammt auch das Modell, nach dem die Schadenserkennung und damit die Initiierung des FA-Wegs erst nach *fork convergence*, also dem Zusammenlaufen zweier Replikationsgabeln am ICL, geschieht (ZHANG *et al.* 2015). Offenbar löst die Kollision zweier replikativer Helikase-Komplexe (CMG) deren sequenzielle Poly-Ubiquitinierung durch die Replisom-assoziierte E3-Ubiquitinligase TRAIP (TRAF *interacting protein*) aus (WU *et al.* 2019, WU *et al.* 2021). Diese Poly-Ubiquitinierung führt zusammen mit der Erkennung der arretierten Replikationsgabeln durch den FANCM-MHF1/2-FAAP24-Komplex zur Initiierung des FA-Wegs. Abbildung 1.6 zeigt ein aktuelles Modell des Wegs.

FANCM ist eine durch die Interaktion mit den *histon-fold*-Proteinen MHF1 und MHF2 (*FANCM (or Mph1)–associated histone-fold protein*) konstitutiv am Chromatin lokalisierte DNA-Translokase (MEETEI *et al.* 2005, YAN *et al.* 2010) und entscheidend, wenn auch nicht essenziell, für die Schadenserkennung (WANG *et al.* 2013). Das Heterodimer UHF1-UHF2 ist an der Schadenerkennung beteiligt und kann ein Fehlen von FANCM teilweise kompensieren (LIANG & COHN 2016, MOTNENKO *et al.* 2018). Um Platz für die weiteren FA-Proteine zu schaffen, werden die Helikase-Komplexe unter Beteiligung von BRCA1 (FANCS) und der Segregase p97 von der DNA entfernt (LONG *et al.* 2014, FULLBRIGHT *et al.* 2016, WU *et al.* 2019). Die replikative Polymerase kann daraufhin den arretierten Strang bis auf ein Nukleotid an den ICL heran verlängern (LONG *et al.* 2014). Anschließend wird eine der Replikationsgabeln durch *fork regression* in eine *four way junction* umgewandelt, um ein besseres Substrat für die spätere Inzision durch XPF zu schaffen (AMUNUGAMA *et al.* 2018). Es ist nicht endgültig geklärt, ob FANCM diese *fork regression* katalysiert. Währenddessen rekrutiert der FANCM-Komplex einen zehn weitere Proteine umfassenden Komplex und bildet mit diesem gemeinsam den sogenannten FA *core complex*. Es erfolgt eine FANCM-abhängige Aktivierung des *DNA damage checkpoints* (ATR/ATM-Aktivierung), wodurch einige der FA-Proteine ihrerseits phosphoryliert werden (NIRAJ *et al.* 2019). Die Schlüsselfunktion des *core complex* ist die Ubiquitinierung des FANCD2-FANCI-Heterodimers. Dabei sind FANCT und FANCL als E2- bzw. E3-Ubiqitinligase die katalytisch relevanten Untereinheiten des *core complex* (MEETEI *et al.* 2003, RICKMAN *et al.* 2015). Das zweifach mono-ubiquitinierte FANCD2-FANCI-Dimer (FANCD2-I-Ub) bleibt daraufhin mit dem Chromatin assoziiert und rekrutiert *downstream*-Effektoren, die die eigentliche Reparatur einleiten (SMOGORZEWSKA *et al.* 2007).

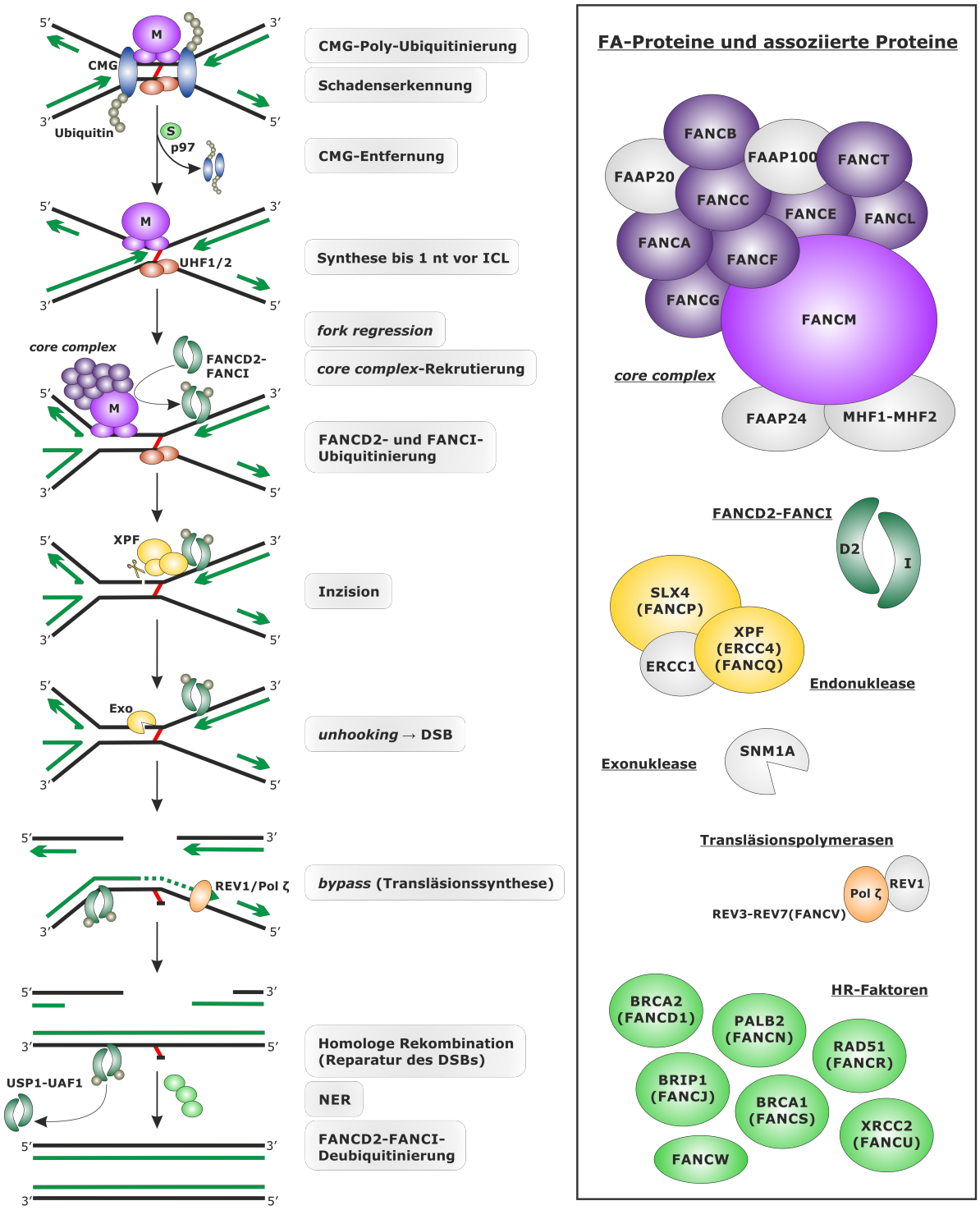


Abbildung 1.6: **Replikationsabhängige Reparatur von *interstrand crosslinks* über den Fanconi-Anämie-Weg. Rechts**: beteiligte Proteine. Farbig: FA-Determinanten; grau: FA-assoziierte Proteine (bisher keine bekannten Mutationen in FA-Patienten). Alternative Gen-/Proteinnamen sind in Klammern angegeben. **Links**: Modell des FA-Wegs. Ausgangspunkt ist eine doppelte Replikationsgabel, deren Helikase-Komplexe (CMG) durch den ICL arretiert wurden und TRAIP-abhängig poly-ubiquitiniert vorliegen. Der FANCM-MHF1/2-FAAP24-Komplex und das UHF1-UHF2-Heterodimer sind an der Erkennung des ICLs beteiligt. Nach der Dissoziierung der Helikase-Komplexe mit Hilfe von FANCS (BRCA1) und der Segregase p97 kann die DNA-Polymerase bis ein Nukleotid an den ICL heransynthetisieren. Anschließend erfolgt in nicht genau bekannter Reihenfolge eine einseitige *fork regression* sowie die Rekrutierung eines Komplexes aus 10 Proteinen, die zusammen mit dem FANCM-Komplex den FA *core complex* bilden. Der *core complex* wirkt über seine Untereinheiten FANCT (E2) und FANCL (E3) als Ubiquitin-Ligase und ubiquitiniert das FANCD2-FANCI-Heterodimer (FANCD2-I-Ub). FANCD2-I-Ub assoziiert daraufhin fest mit dem Chromatin und rekrutiert das Gerüstprotein SLX4,

welches wiederum die NER-Endonuklease XPF-ERCC1 bindet. XPF-ERCC1 schneidet 5‘ des ICL, sodass die Exonuklease SNM1A die Nukleotide rund um den ICL entfernen und so die zuvor kovalent verbundenen DNA-Stränge trennen kann („*unhooking*“). Nach dem *bypass* des „ICL-Restes“ durch die Transläsionspolymerasen REV1 und Pol ζ (REV3-REV7) kann der im anderen Schwesterchromatid entstandene Doppelstrangbruch mittels homologer Rekombination repariert werden. Die normale NER-Maschinerie kann postreplikativ den ICL-Rest aus dem betroffenen Strang entfernen. Die USP1-UAF1-katalysierte Deubiquitinierung von FANCD2-I-Ub beendet die Schadenssignalisierung. Neu konzipierte Abbildung nach Informationen aus CECCALDI *et al.* 2016, AMUNUGAMA *et al.* 2018, MOTNENKO *et al.* 2018, NIRAJ *et al.* 2019, WU *et al.* 2021.

In einem ersten Schritt wird – vermittelt durch das Gerüstprotein SLX4 – die aus der NER bekannte Endonuklease XPF-ERCC1 rekrutiert, die einen der DNA-Stränge 5‘ des ICLs endonukleolytisch schneidet (KLEIN DOUWEL *et al.* 2014). Lange wurde spekuliert, ob XPF auch auf der anderen Seite des Schadens schneidet oder eine weitere Endonuklease beteiligt ist. Das momentan wahrscheinlichste Modell beinhaltet aber den Abbau der Nukleotide von der Inzisionsstelle über den ICL hinweg durch die Exonuklease SNM1A (WANG *et al.* 2011, HOOGENBOOM *et al.* 2019, HOERR *et al.* 2021). Resultat dieses „*unhookings*“ der zuvor durch den ICL verbundenen Stränge ist ein Doppelstrangbruch in einem der Schwesterchromatide und ein sperriges Addukt sowie eine Einzelstranglücke im anderen. Damit das andere Schwesterchromatid als Donor für die Reparatur des DSBs über homologe Rekombination dienen kann, wird dieses zunächst zum Doppelstrang ergänzt. Dieser *bypass* geschieht mit Hilfe der Transläsionspolymerasen REV1 und Pol ζ (REV3-REV7) (BUDZOWSKA *et al.* 2015). Die homologe Rekombination erfolgt über RAD51-abhängige Stranginvasion analog zu einem der in Abbildung 1.2 gezeigten Wege, während die NHEJ aktiv unterdrückt wird (*reviewed* in NIRAJ *et al.* 2019). Damit ist der Schaden umgangen und die Replikation abgeschlossen. Für eine vollständige Reparatur muss der ICL-Rest über normale NER aus dem betroffenen Strang entfernt werden. FANCD2-I-Ub wird zu einem nicht exakt bekannten Zeitpunkt von USP1-UAF1 deubiquitiniert, um die Schadenssignalisierung zu beenden (NIJMAN *et al.* 2005, COHN *et al.* 2007).

Neben der Orchestrierung der ICL-Reparatur spielt der FA-Weg auch eine allgemeinere Rolle beim Umgang mit Replikationsstress: FA-Proteine stabilisieren *common fragile sites* (CFSs), interagieren mit dem *spindle assembly checkpoint*, helfen bei der Auflösung von *R-loops* (RNA-DNA-Hybride) und schützen arretierte Replikationsgabeln vor dem Abbau durch Nukleasen (*reviewed* in CECCALDI *et al.* 2016, NIRAJ *et al.* 2019). Interessanterweise sind einige FA-Proteine auch in Prozesse außerhalb des Kerns eingebunden, in denen sie unabhängig von der *DNA damage response* agieren. So wurden Verbindungen zu mitochondrialen Funktionen, Entzündungsprozessen und der Autophagie von Viruspartikeln beschrieben (*reviewed* in MILLETTI *et al.* 2020).

FA-Proteine als Tumorsuppressoren

Während bi-allelische Mutationen in FA-Genen Fanconi-Anämie auslösen, erhöhen mono-allelische Keimbahnmutationen das Risiko verschiedenster Krebserkrankungen (*reviewed* in NIRAJ *et al.* 2019, MILLETTI *et al.* 2020). Am besten dokumentiert ist dies für die Fanconi-Anämie-Determinanten *FANCS* und *FANCD1*, die als Determinanten für familiären Brust- und Eierstockkrebs (HBOC-Syndrom) besser unter ihren alternativen Namen *BRCA1* und *BRCA2* bekannt sind (KUCHENBAECKER *et al.* 2017). Aufgrund dieser Überschneidung wird der FA-Weg oft auch als FA/BRCA-Weg bezeichnet. Auch sind somatische Mutationen der FA-Gene häufig in Zellen unterschiedlicher Krebsarten nachweisbar (NIRAJ *et al.* 2019).

Andere Wege zum Umgang mit ICLs

Der beschriebene FA-Weg ist nicht die einzige Verteidigungslinie menschlicher Zellen gegen *interstrand crosslinks*. Das momentan bekannte Netzwerk zum Umgang mit ICLs ist in Abbildung 1.7 skizziert. Es existieren weitere replikationsabhängige Reparaturwege für bestimmte Arten von ICLs, das *fork traversal* als Alternative zur *fork convergence* sowie nicht replikationsabhängige Reparaturmechanismen, die auch außerhalb der S-Phase aktiv sind.

Zusätzlich zum FA-Weg sind zwei replikationsabhängige Wege bekannt, die ebenfalls *fork convergence* voraussetzen. Durch Acetaldehyde verursachte ICLs können offenbar von einem noch nicht beschriebenen Enzym in der Mitte des ICLs gespalten werden (HODSKINSON *et al.* 2020), während durch Psoralen oder AP-Stellen verursachte ICLs von der Glykosylase NEIL3 erkannt werden, die eine der N-glykosidischen Bindungen trennt, was ebenfalls ein *unhooking* bewirkt (SEMLOW *et al.* 2016). Bei beiden Wegen entfallen die Doppelstrang-verursachenden Inzisionen des FA-Wegs. Stattdessen erfolgt die weitere Reparatur direkt über TLS und NER (bzw. BER bei AP-Stellen). Der unterschiedliche Ubiquitinierungsstatus der CMG-Komplexe steuert vermutlich, welcher ICL-Reparaturweg eingeschlagen wird (WU *et al.* 2019, WU *et al.* 2021). Nur, wenn NEIL3 den ICL nicht beheben kann, wird die Disassemblierung des Replisoms und die Reparatur durch den FA-Weg auslöst (LI *et al.* 2020, WU *et al.* 2021). Der FA-Weg stellt also eine Art universelles *backup*-ICL-Reparatursystem dar.

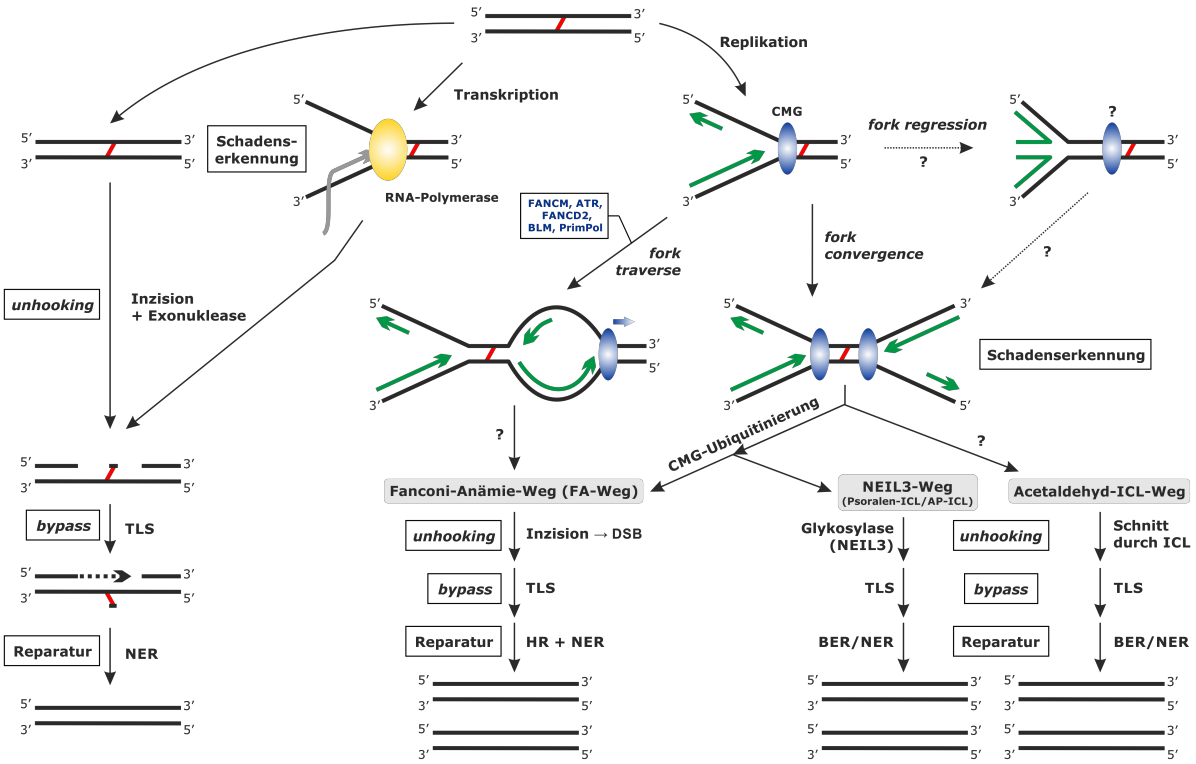


Abbildung 1.7: **Netzwerk zum Umgang mit ICLs in höheren Eukaryoten.** In Zellen ohne Teilungsaktivität (G0/G1-Phase) können ICLs über Faktoren der NER, der transkriptionsgekoppelten NER und der Transläsionssynthese repariert werden. Vor allem ohne den indirekten Schadenssensor RNA-Polymerase verläuft diese Reparatur aber häufig ineffizient. Während der S-Phase kommt es am ICL zum Arrest des replikativen Helikase-Komplexes CMG. Ausgehend davon kann es zu FANCM-abhängigem *fork traversal* oder zur *fork convergence* kommen. In beiden Fällen entsteht eine Struktur, die von den Proteinen des FA-Wegs erkannt und prozessiert werden kann (vgl. Abbildung 1.6). Durch Aldehyde, Psoralene oder AP-Stellen hervorgerufene ICLs können alternativ durch den Acetaldehyd-

bzw. den NEIL3-Weg repariert werden. Hier entstehen im Gegensatz zum FA-Weg keine Doppelstrangbrüche, weshalb keine Reparatur durch homologe Rekombination erfolgen muss. Die TRAIP-abhängige Ubiquitinierung von CMG beeinflusst, welcher Weg eingeschlagen wird. Inwiefern nach einem CMG-Arrest auch eine *fork regression* eine Rolle spielt, ist unklar. Möglicherweise kann so die Replikationsgabel bis zum Eintreffen einer zweiten Gabel stabilisiert werden. Abbildung nach Informationen aus ROGERS *et al.* 2020b und den im Fließtext genannten Quellen.

Im Gegensatz zum *Xenopus*-Plasmid-*assay* warten *in vivo* mehr als die Hälfte der an einem ICL arretierten Replisome nicht auf eine zweite Replikationsgabel. Stattdessen wird die Replikation jenseits des ICLs in gleicher Richtung fortgesetzt (HUANG *et al.* 2013). Dieses *fork traversal* (vgl. Seite 17) ist abhängig von FANCM, FANCD2, ATR, PCNA, der BLM-Helikase und *repriming* durch PrimPol, aber nicht von anderen Komponenten des FA-Wegs (HUANG *et al.* 2019, GONZÁLEZ-ACOSTA *et al.* 2021). Die FANCM-Interaktion führt zur Ablösung der GINS-Komponente aus dem CMG-Komplex, was vermutlich die zum *traversal* notwendige Öffnung des Mcm2–7-Rings ermöglicht (GUILLIAM 2021). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass dieses FANCM-vermittelte *fork traversal* vor allem in der späten S-Phase und in Heterochromatin-Bereichen auftritt (ZHANG *et al.* 2021a). Das nach dem *fork traversal* zurückbleibende X-förmige DNA-Intermediat entspricht im Wesentlichen der Struktur nach *fork convergence* und CMG-Entladung, wird also vermutlich postreplikativ vom FA-Weg repariert.

Auch nicht-replizierende Zellen besitzen Möglichkeiten zur ICL-Reparatur. In aktiv transkribierten Regionen werden ICLs indirekt durch einen Arrest der RNA-Polymerase erkannt und mit Hilfe von Faktoren der transkriptionsgekoppelten NER, der ICL-spezifischen Exonuklease SAN1 und TLS behoben (ENOIU *et al.* 2012, ANDREWS *et al.* 2018). In nicht transkriptionsaktiven Regionen werden ICLs durch NER- oder MMR-Faktoren erkannt, wobei nicht alle Läsionen korrekt weiter prozessiert werden können, sodass ein *futile cycle* aus Inzision und Ligation entstehen kann, wodurch die ICLs bis zur Replikation erhalten bleiben (DEANS & WEST 2011, NIRAJ *et al.* 2019).

1.2.4.3 ICL-Reparatur in *S. cerevisiae*

Die Reparatur von ICLs als eine Kombination aus NER und homologer Rekombination oder Transläsionssynthese ist bereits bei Prokaryoten etabliert (LAGE *et al.* 2003, LEHOCZKÝ *et al.* 2007). Eine Entsprechung zu dem Fanconi-Anämie-Weg höherer Eukaryoten gibt es allerdings nicht. Auch für die Hefe *S. cerevisiae* galt lange die Annahme, dass die ICL-Reparatur ohne Beteiligung FA-ähnlicher Prozesse abläuft. Bekannt waren neben der NER drei Epistasisgruppen (*PSO2*, *RAD52* und *RAD18*), die für die ICL-Reparatur von Bedeutung sind (GROSSMANN *et al.* 2001, LEHOCZKÝ *et al.* 2007). *RAD52* und *RAD18* stehen hierbei für die Beteiligung der homologen Rekombination und der Transläsionssynthese. Das Protein Pso2 ist eine Exonuklease und das Homolog des menschlichen SNM1A (vgl. Abbildung 1.6; *reviewed* in BADDOCK *et al.* 2020). Im Anschluss an die während der G1-Phase sehr effizient stattfindende Inzision durch NER-Faktoren kann Pso2 – stimuliert durch die Helikase Hrq1 (ROGERS *et al.* 2020a) – eine Einzelstranglücke über den ICL hinweg erzeugen, um ein Substrat für die Transläsionssynthese zu schaffen (entsprechend Abbildung 1.7 links). Pso2 scheint spezifisch für die ICL-Reparatur zu sein, da *pso2*Δ-Mutanten extrem sensitiv gegenüber ICL-induzierenden Agenzien, aber kaum sensitiv gegenüber anderen DNA-schädigenden Substanzen sind (HENRIQUES & MOUSTACCHI 1980).

Im Jahr 2012 wurde zudem ein „prototypischer FA-Weg“ für die ICL-Reparatur in *S. cerevisiae* postuliert (DAEE & MYUNG 2012, MCHUGH *et al.* 2012). Zwei verschiedene experimentelle Ansätze führten zu dem Ergebnis, dass die wenigen in der Hefe vorhandenen Homologe menschlicher FA-Proteine in einem replikationsabhängigen Weg zum Umgang mit ICLs zusammenwirken: Mph1, Mhf1/Mhf2, Chl1 und Slx4 als Homologe von FANCM, MHF1/MHF2, FANCJ (BRIP1) und FANCP (SLX4) (DAEE *et al.* 2012, WARD *et al.* 2012a). Der vorgeschlagene Mechanismus beinhaltet eine von der Helikase Mph1 katalysierte *fork regression* an ICL-arretierten Replikationsgabeln.

1.3 DIE FANCM-FAMILIE: MULTIFUNKTIONALE DNA-MOTORPROTEINE

Das menschliche FANCM (*Fanconi anemia complementation group M*) und sein *S. cerevisiae*-Homolog Mph1 (*mutator phenotype* 1) bilden mit weiteren Orthologen in anderen Spezies eine Familie multifunktionaler DNA-Motorproteine (*reviewed* in WHITBY 2010, XUE *et al.* 2015b, BASBOUS & CONSTANTINOU 2019). Vertreter dieser Familie finden sich von den Archaeen bis zum Menschen (KOMORI *et al.* 2002, MEETEI *et al.* 2005).

Allen Homologen gemeinsam ist eine N-terminale Helikase-Domäne aus sieben charakteristischen Motiven, aufgrund derer die FANCM-Familie der DEAH-Familie innerhalb der SF2 (*super family* 2) der Helikasen zugeordnet wird (Abbildung 1.8; GORBALENYA & KOONIN 1993, SCHELLER *et al.* 2000). Die Domäne vermittelt DNA-Bindung, bindet und spaltet ATP und kann die dabei freiwerdende Energie zur Translokation des Proteins entlang der DNA nutzen (Translokase-Aktivität). Das archaeelle Hef (*Helicase-associated endonuclease for fork-structured DNA*) besitzt zusätzlich eine C-terminale ERCC4 (XPF)-ähnliche Nuklease-Domäne und ein doppeltes *helix-hairpin-helix*-Motiv [$(HhH)_2$] (KOMORI *et al.* 2002). Die $(HhH)_2$-Domäne vermittelt DNA-Bindung und ermöglicht Hef die Dimerisierung, während die Nuklease-Domäne das strukturspezifische Schneiden arretierter Replikationsgabeln ermöglicht (KOMORI *et al.* 2002, NISHINO *et al.* 2005). Während die Nuklease-Domäne bei Mph1 fehlt, ist sie bei FANCM zwar vorhanden, durch Mutation essenzieller Reste aber katalytisch nicht aktiv (MEETEI *et al.* 2005).

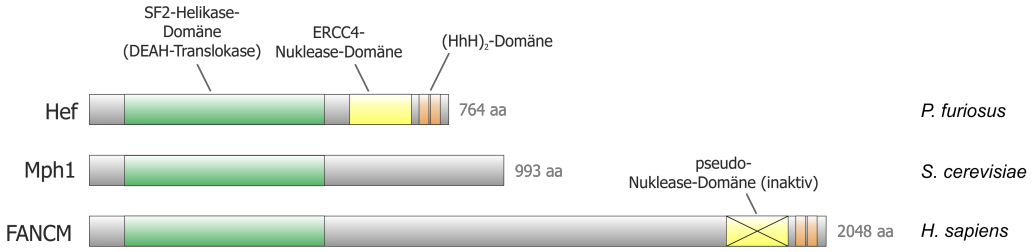


Abbildung 1.8: **Domänenstruktur ausgewählter Vertreter der FANCM-Familie.** Das archaeelle Hef besitzt sowohl eine N-terminale SF2-Helikase-Domäne als auch eine C-terminale, funktionale ERCC4-ähnliche Nuklease-Domäne. Zusätzlich befinden sich am C-Terminus ein doppeltes *helix-hairpin-helix*-Motiv (HhH) zur Dimerisierung und DNA-Bindung. Bei Mph1 fehlen die C-terminalen Domänen, während sie beim humanen FANCM zwar vorhanden sind, die Nuklease-Domäne aber inaktiv ist („pseudo-Nuklease-Domäne“).

Alle bekannten Vertreter der FANCM-Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität, indem sie strukturspezifisch an Replikationsgabeln und Intermediate der homologen Rekombination binden, sich ATP-abhängig auf der DNA bewegen und dabei die Struktur ihres

Substrats verändern können (*reviewed* in WHITBY 2010, XUE *et al.* 2015c). In Vertebraten fungiert FANCM zudem aufgrund seiner enormen Größe und zusätzlicher Protein-Protein-Interaktionsstellen als Schaltstelle und Ankerprotein bei Replikationsstress (*reviewed* in BASBOUS & CONSTANTINOU 2019).

1.3.1 FANCM

FANCM ist eine große, multifunktionale, strukturspezifische DNA-Translokase, die über definierte Protein-Protein-Interaktionen mit zentralen Wegen der *DNA damage response* vernetzt ist (Abbildung 1.9). In den letzten Jahren wurden immer wieder neue – teils überraschende – Facetten von FANCM entdeckt.

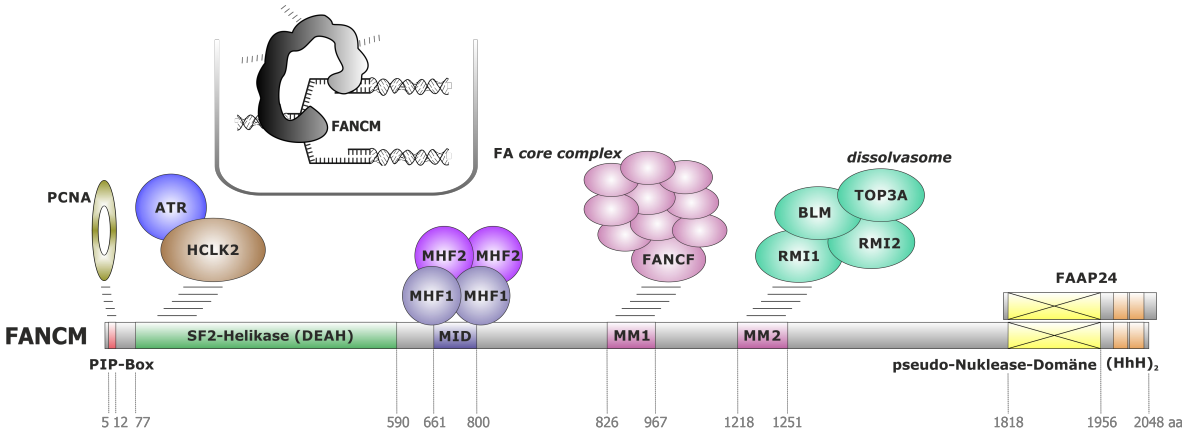


Abbildung 1.9: **Schematische Übersicht der Domänenorganisation und Bindungspartner von FANCM.** FANCM ist ein multifunktionales Bindeglied zwischen der DNA und zentralen Proteinen der *DNA damage response*. Die N-terminale PIP-Box (PCNA *interacting protein*-Box) kann mit der *sliding clamp* PCNA interagieren (ROHLEDER *et al.* 2016). Innerhalb der Translokase-Domäne (MEETEI *et al.* 2005) kann ein nicht näher eingegrenzter Bereich mit dem ATR-assoziierten Protein HCLK2 interagieren (COLLIS *et al.* 2008). Über das MID (MHF *interaction domain*)-Motiv bildet FANCM einen pentameren Komplex mit einem MHF1-MHF2-Tetramer (YAN *et al.* 2010). Die Interaktionsmotive MM1 und MM2 (FANCM *motif* 1 und 2) vermitteln über direkte Bindung an FANCF bzw. RMI1 die Interaktion mit dem FA *core complex* bzw. dem „*dissolvasome*" (Bloom-Komplex; BTR-Komplex) (DEANS & WEST 2009). Über die katalytisch inaktive Nuklease-Domäne und das $(HhH)_2$-Motiv erfolgt eine Hetero-Dimerisierung mit dem ebenfalls diese Domänen enthaltenden FAAP24, was insgesamt die DNA-Affinität erhöht (COULTHARD *et al.* 2013, YANG *et al.* 2013). Kasten oben: hypothetische Raumstruktur von FANCM, bei der die DNA-bindenden N- und C-terminalen Domänen in räumlicher Nähe liegen und die Interaktionsdomänen als Ankerplätze für DNA-Reparaturkomplexe dienen (COULTHARD *et al.* 2013, O'ROURKE *et al.* 2019).

FANCM bindet DNA mit klarer Präferenz für verzweigte (*branched*) DNA-Strukturen, darunter *Holliday junctions*, Replikationsgabeln und *D-loops* (MEETEI *et al.* 2005, GARI *et al.* 2008a, GARI *et al.* 2008b, XUE *et al.* 2008). Die strukturspezifische DNA-Bindung wird durch die Interaktion mit FAAP24 und dem MHF1/2-Heterotetramer verstärkt, wobei die FAAP24-Interaktion die Bindung von dsDNA-ssDNA-Übergängen ermöglicht (CICCIA *et al.* 2007, YAN *et al.* 2010). Elektronenmikroskopische Bilder zeigen, dass FANCM eine hakenartige Form besitzt, innerhalb derer die DNA-bindenden N- und C-terminalen Domänen in räumlicher Nähe liegen (COULTHARD *et al.* 2013). Die Erkennung einer gabelartigen Struktur könnte eine Konformationsänderung der zentralen Region des Proteins auslösen, wodurch bestimmte Interaktionsmotive zugänglich würden (COULTHARD *et al.* 2013).

Im Gegensatz zu Mph1 weist FANCM keine echte Helikase-Aktivität auf, sondern nutzt seine ATPase-Aktivität zur Fortbewegung an der DNA, ohne die DNA dabei in Einzelstränge aufzutrennen (MEETEI *et al.*

2005). Durch die Bindung verzweigter DNA-Strukturen gepaart mit der Translokase-Aktivität kann FANCM die gebundenen DNA-Strukturen umgestalten (GARI *et al.* 2008a, GARI *et al.* 2008b). Dieser Vorgang wird auch als *branch migration* bezeichnet und hat je nach DNA-Substrat ein unterschiedliches Resultat (*reviewed* in O'ROURKE *et al.* 2019): *branch migration* von *Holliday junctions* verschiebt diese lediglich, während *branch migration* an Replikationsgabeln zu *fork regression* führen kann. An einem *D-loop*-Intermediat kann *branch migration* zur Auflösung des *D-loops*, also zum *strand displacement* führen. Letzteres gilt auch für *R-loops*, also RNA-DNA-Hybride mit *D-loop*-ähnlicher Struktur. Tatsächlich führt das Fehlen von FANCM zu einer Akkumulation arretierter Replikationsgabeln (BLACKFORD *et al.* 2012) und replikationsbehindernder *R-loops* (SCHWAB *et al.* 2015) sowie einem vermehrten Auftreten von *crossover*-Produkten bei der Rekombination (DEANS & WEST 2009, WANG *et al.* 2013).

Die Rolle von FANCM als zentrales Protein des FA *core complex* bei der *interstrand crosslink*-Reparatur (Seite 24) ist also bei weitem nicht seine einzige biologische Funktion. Tatsächlich ist FANCM für die Aktivierung des FA-Wegs nicht einmal essenziell, da auch in FANCM-defizienten Zellen die FANCD2-FANCI-Ubiquitinierung nicht völlig fehlt (BAKKER *et al.* 2009, SINGH *et al.* 2009, WANG *et al.* 2013). Viele seiner anderen Funktionen übt FANCM unabhängig vom FA *core complex* aus. Eine Besonderheit ist die Katalyse des *fork traversals* an *interstrand crosslinks*, die auf Seite 27f beschrieben wurde.

FANCM ist außerdem über einen positiven *feedback-loop* mit dem *DNA damage checkpoint* vernetzt und unterstützt die ATR/CHK1-Aktivierung über seine direkte Interaktion mit HCLK2, welches die Stabilität der *checkpoint*-Kinasen erhöht (COLLIS *et al.* 2008). FANCM und FAAP24 erleichtern zudem die RPA-Anlagerung an ICL-arretierten Replikationsgabeln, was indirekt zur *checkpoint*-Aktivierung beiträgt (HUANG *et al.* 2010). Umgekehrt wird FANCM ATR-abhängig an Serin 1045 phosphoryliert, was für die Aktivierung des FA-Wegs essenziell ist (SINGH *et al.* 2013).

Generell vermittelt FANCM Toleranz gegenüber Replikationsstress. FANCM-defiziente Zellen zeigen nicht nur gegenüber ICL-induzierenden Agenzien, sondern auch gegenüber Hydroxyurea (HU; Hemmung der Ribonukleotidreduktase führt zu dNTP-Mangel), UV-Strahlung und dem Topoisomerase-Inhibitor Camptothecin eine erhöhte Sensitivität (SINGH *et al.* 2009, SCHWAB *et al.* 2010, KELSALL *et al.* 2012).

FANCM ist somit an einer Vielzahl verschiedener Wege beteiligt, die zum reibungslosen Ablauf der Replikation und zur Aufrechterhaltung der genomischen Integrität beitragen. Die bisher bekannten Funktionen wurden von BASBOUS & CONSTANTINOU (2019) übersichtlich in einem *Review* zusammengetragen und ausführlicher erläutert als das hier möglich und nötig ist.

Von der Fanconi-Anämie-Determinante zum Tumorsuppressor

FANCM erhielt seinen Namen aufgrund Patientin EUFA867, deren Zellen den typischen FA-Phänotyp erhöhter *crosslinker*-Sensitivität und aberranter Chromosomenstrukturen sowie als ursächlich angenommene bi-allelische *FANCM*-Mutationen aufwiesen (MEETEI *et al.* 2005). Später stellte sich aber heraus, dass die Patientin zusätzlich bi-allelische *FANCA*-Mutationen trug (SINGH *et al.* 2009). Obwohl FANCM Teil des FA *core complexes* ist, hat es seinen Namen also im Grunde zu Unrecht erhalten. Genau

genommen ist FANCM als FA-assoziiertes Protein einzustufen, zumal bis heute kein Fall von auf FANCM-Defekten beruhender Fanconi-Anämie beschrieben wurde.

In den letzten Jahren wurden zwar mehrfach Individuen mit homozygoten oder *compound*-heterozygoten *loss-of-function*-Mutationen in *FANCM* beschrieben, aber in keinem Fall folgten daraus das für FA-Patienten typische Knochenmarksversagen oder Fehlbildungen des Skeletts. Stattdessen wurden erhöhte Krebsanfälligkeit und Infertilität beschrieben, was mit dem Phänotyp des FANCM-defizienten Mausmodells (BAKKER *et al.* 2009) korreliert. So wurde bei zwei finnischen Schwestern mit prämaturer Ovarialinsuffizienz (Eintreten der Menopause vor dem 40. Lebensjahr) eine homozygote *FANCM*-Mutation entdeckt (FOUQUET *et al.* 2017). Auch männliche Infertilität aufgrund von Oligoasthenozoospermie bis hin zu nichtobstruktiver Azoospermie und *Sertoli-cell-only*-Syndrom wurde von mehreren Studien auf bi-allelische *FANCM*-Mutationen zurückgeführt (KASAK *et al.* 2018, YIN *et al.* 2019, ZHANG *et al.* 2021b). Bei acht Individuen mit bi-allelischen *FANCM*-Defekten wurden frühmanifeste Krebserkrankungen mit toxischen Reaktionen auf DNA-schädigende Chemotherapeutika festgestellt (BOGLIOLO *et al.* 2018, CATUCCI *et al.* 2018).

Neben bi-allelischen Mutationen wurden auch mono-allelische *FANCM*-Mutationen mit erblich bedingtem Krebs, unter anderem Brust- und Eierstockkrebs assoziiert (*reviewed* in PETERLONGO *et al.* 2021). Auch in sporadischen malignen Veränderungen steht *FANCM* auf Platz 15 der am häufigsten mutierten *DNA damage response*-Gene bei einer Analyse von 9.125 Proben des *Cancer Genome Atlas* (nicht-synonyme Austausche in etwa 2 % der Proben; KNIJNENBURG *et al.* 2018).

Eine weitere Bedeutungssteigerung erfuhr FANCM durch die Entdeckung, dass ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*)-positive Tumorzellen auf funktionales FANCM angewiesen sind (PAN *et al.* 2017, LU *et al.* 2019, SILVA *et al.* 2019). Um ein unbegrenztes Teilungspotential zu erhalten, müssen Tumorzellen die fortschreitende Verkürzung ihrer Telomere verhindern. Etwa 85–90 % aller Krebszellen reaktivieren dazu die körpereigene Telomerase (KIM *et al.* 1994, SHAY & BACCHETTI 1997). Die anderen 10–15 % verlängern die Telomere mit Hilfe eines rekombinations- und replikationsbasierten Mechanismus, dem *Alternative Lengthening of Telomeres* (ALT; HEAPHY *et al.* 2011, APTE & COOPER 2017). ALT ist kein regulärer zellulärer Prozess, sondern die Krebszellen kapern sozusagen die zelleigene DNA-Reparaturmaschinerie für ihre Zwecke. Hauptsächlich beruht das ALT auf einer Abwandlung der *break induced replication* (BIR) und nutzt dabei sowohl FANCM als auch BLM, die miteinander interagieren und vermutlich *D-loop*- und *R-loop*-Intermediate verarbeiten. Für ihr Überleben sind die Krebszellen auf ein funktionierendes ALT angewiesen (*reviewed* in DOMINGUES-SILVA *et al.* 2019, O'ROURKE *et al.* 2019). Wird FANCM außer Funktion gesetzt oder die Interaktion zwischen FANCM und dem BLM-Komplex inhibiert, entwickeln ALT-Zellen einen „hyper-ALT"-Phänotyp, der zu massiver genomischer Instabilität, Zellzyklus-Arrest und Zelltod führt (LU *et al.* 2019). Dabei ist die vorübergehende FANCM-Inhibition für andere Zellen kaum schädlich, was FANCM zu einem exzellenten Ziel bei der Bekämpfung ALT-positiver Krebszellen macht (LU *et al.* 2019).

All diese Befunde unterstreichen die Wichtigkeit eines funktionalen FANCM-Proteins für die Erhaltung der genomischen Integrität, aber auch die Chancen zur Ausnutzung spezifischer Schwachstellen, um die genomische Integrität von Krebszellen gezielt zu stören.

1.3.2 MPH1 – FANCM-HOMOLOG AUS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Mph1 war der erste Vertreter der FANCM-Familie, der genauer untersucht wurde. Das Gen *YIR002c* wurde 1999 in *MPH1* umbenannt, nachdem in einer systematischen Untersuchung von Genen unbekannter Funktion bei der Deletionsmutante ein spontaner Mutatorphänotyp festgestellt wurde (ENTIAN *et al.* 1999). Die Deletion von *MPH1* verursacht eine erhöhte Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien wie MMS und 4-NQO, aber eine nur gering erhöhte Sensitivität gegenüber UV-Strahlung, dem Topoisomerase-Inhibitor Camptothecin und ionisierender Strahlung (vgl. Seite 70; SCHELLER *et al.* 2000). Aufgrund genetischer Interaktionsstudien und der Beobachtung, dass der Mutatorphänotyp Rev3-abhängig ist, wurde für Mph1 eine Rolle bei einer Rad51-abhängigen fehlerfreien Umgehung von Replikationsarresten über homologe Rekombination postuliert, die unabhängig von der Rad6-abhängigen postreplikativen Reparatur ist (SCHELLER *et al.* 2000, SCHÜRER *et al.* 2004). Die Vermutung, dass hierbei eine Interaktion mit dem Schwesterchromatid eine Rolle spielt, wurde später experimentell bestätigt (EDE *et al.* 2011). *In vitro* zeigt Mph1 eine ATP-abhängige 3‘-5‘-Helikase-Aktivität (PRAKASH *et al.* 2005), *branch migration*-Aktivität an *Holliday junctions* und Replikationsgabeln (ZHENG *et al.* 2011) sowie die Fähigkeit zur Auflösung von *D-loops*, auch wenn diese als Rad51-Nukleoproteinfilament vorliegen (PRAKASH *et al.* 2009).

Durch zahlreiche experimentelle Daten wurde bestätigt, dass die *D-loop*-auflösende Wirkung von Mph1 biologisch relevant und für die Prozessierung *D-loop*-enthaltender Rekombinationsintermediate in verschiedenen Kontexten verantwortlich ist. Bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen leitet Mph1 Intermediate der homologen Rekombination in den *non-crossover*-Weg (SDSA) über, indem der verlängerte Strang aus dem *D-loop* herauslöst wird, und verhindert dadurch *crossover*, unerwünschte *break induced replication* (BIR), und *multi-invasions* (Intermediate, bei denen ein Einzelstrang mehr als einen Donor invadiert) (PRAKASH *et al.* 2009, LUKE-GLASER & LUKE 2012, MAZÓN & SYMINGTON 2013, MITCHEL *et al.* 2013, STAFA *et al.* 2014, JAIN *et al.* 2016, MEHTA *et al.* 2017, PIAZZA *et al.* 2017, PHAM *et al.* 2021). Bei der meiotischen Rekombination unterstützt Mph1 indirekt die Paarung der homologen Chromosomen, indem es unerwünschte *D-loops* zwischen Schwesterchromatiden auflöst (SANDHU *et al.* 2020).

Inwiefern die *branch migration*-Aktivität von Mph1 *in vivo* an arretierten Replikationsgabeln gezielt zur *fork regression* eingesetzt wird, ist umstritten. Obwohl die betreffenden Strukturen bisher nicht in *S. cerevisiae* beobachtet werden konnten – was aber auch daran liegen kann, dass sie zu kurzlebig sind und gleich weiter prozessiert werden – wird Mph1-katalysierte *fork regression* in einigen Modellen postuliert, zum Beispiel innerhalb des „prototypischen FA-Wegs“ (vgl. Seite 28) zur Reparatur von ICLs (DAEE *et al.* 2012, DAEE & MYUNG 2012, WARD *et al.* 2012a). Mehrmals wurde allerdings beschrieben, dass übermäßige *branch migration*-Aktivität von Mph1 an Replikationsgabeln der Zelle schadet (PENG *et al.* 2018, JØRGENSEN *et al.* 2019, AGASHE *et al.* 2021).

Die Aktivität von Mph1 wird durch Bindungspartner differentiell beeinflusst. So inhibiert der Smc5-Smc6-Komplex (Smc = *Structural Maintenance of Chromosome*), ein mit Kohäsinen und Kondensinen verwandtes *coiled-coil*-Heterodimer, selektiv die *fork regression*-Aktivität von Mph1, nicht jedoch seine *D-loop*-auflösende Wirkung (XUE *et al.* 2014). Durch die SUMOylierung von Smc5 wird diese Inhibierung allerdings aufgehoben und eine fehlerfreie Umgehung arretierender Schäden ermöglicht (ZAPATKA *et al.* 2019). Auch

die Interaktion mit den konservierten *histon-fold*-Proteinen Mhf1 und Mhf2 (YAN *et al.* 2010) befreit Mph1 von der Inhibierung durch Smc5-Smc6 (XUE *et al.* 2015a). Eine umgekehrte Wirkung hat Mte1 (*Mph1-associated telomere maintenance protein 1*), das die *fork regression*-Aktivität von Mph1 stimuliert aber die Auflösung von *D-loops* inhibiert (SILVA *et al.* 2016, XUE *et al.* 2016). Die Interaktion von Mph1 mit einem weiteren Protein, Fkh1 (*forkhead homolog 1*), beschränkt sich wiederum sehr spezifisch auf den Einsatz von Mph1 bei der homologen Rekombination im Zuge des *mating-type switchings* (DUMMER *et al.* 2016). Bei einem proteomischen Ansatz zur Identifizierung des Protein-Protein-Interaktions-Netzwerks wichtiger Helikasen und Nukleasen der homologen Rekombination wurden vor allem in mitotischen Zellen zahlreiche weitere Interaktionspartner von Mph1 identifiziert, die für kontextspezifische Regulation in Frage kommen (WILD *et al.* 2019).

Wie FANCM ist auch Mph1 in zahlreiche Prozesse der *DNA damage response* eingebunden. Obwohl Mph1 eher ein N-terminales Fragment von FANCM als ein vollständiges Ortholog ist, gibt es viele funktionale Gemeinsamkeiten. Daher ist die Erforschung der konservierten Prozesse im „Kleinen“ ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der Zusammenhänge im „Großen“: Krebsforschung an der Hefe. Schließlich ist das Problem der DNA-Schäden so alt wie die DNA selbst.

1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zum Verständnis der Funktion von Mph1 und FANCM im Gefüge der *DNA damage response* zu leisten.

Im ersten Teilprojekt wurde die Rolle von Mph1 im Modellsystem *S. cerevisiae* untersucht. Dabei lag der Fokus zunächst auf der Analyse einer möglichen Regulation von Mph1 durch differentielle Phosphorylierung. Im Laufe der Arbeit rückte die systematische Untersuchung experimenteller Ungereimtheiten einer zentralen Untersuchungsmethode zur Messung von Schwesterchromatid-Interaktionen in den Mittelpunkt dieses Projekts. Parallel wurde ein zweiter Ansatz verfolgt, in dem die Hypothese getestet wurde, dass Mph1 seine Funktionen beim Umgang mit Replikationsarresten auch postreplikativ in der G2/M-Phase ausüben kann.

Das zweite Teilprojekt war der Suche nach natürlichen FANCM-Isoformen in menschlichen Zellen gewidmet. Aus Vorarbeiten war ein alternatives Transkript bekannt, das nur für die ersten 669 der 2048 Aminosäuren von FANCM codiert (*FANCM-669*) und dessen Expression auf mRNA- und Proteinebene in unterschiedlichen Zellen und unter verschiedenen Bedingungen analysiert werden sollte. Phänotypische Untersuchungen sollten funktionale Unterschiede zwischen FANCM und der Isoform FANCM-669 adressieren. Im Laufe der Arbeit wurden weitere, teils unbekannte Transkriptvarianten von *FANCM* gefunden, die in die Untersuchungen miteingeschlossen wurden. Transkriptvarianten stellen unter Umständen relevante Biomarker für die personalisierte Medizin dar, wenn sie beispielsweise in Krebszellen überexprimiert werden und die von ihnen codierten Proteine dominant-negative Effekte zeigen.

2 MATERIAL UND METHODEN[1]

2.1 MATERIAL – MPH1-PROJEKT

2.1.1 STÄMME

Escherichia coli

DH5α: F-, *endA1*, *hsdR17*, (r_k-m_k-), *supE44*, *thi1*, *recA1*, *gyrA* (*Nal*$_r$), *relA1*, (*lacZYAargF*), *U169*, Φ*80dlacZΔ M15*) (HANAHAN 1983)

Saccharomyces cerevisiae

CEN.PK2-1C/-1D: *MAT*a (-1c)/*MAT*α (-1d), *leu2-3,112*, *ura3-52*, *trp1-289*, *his3Δ1*, *MAL2-8c*, *SUC2* (ENTIAN *et al.* 1999) [intern: #503]

Derivate von CEN.PK2-1C/-1D (alle *MAT*a, sofern nicht anders angegeben):

Bezeichnung (intern)	Modifikation	Konstruktionsmethode	Quelle
*mph1*Δ (#590)	*mph1::hisG*	PCR-basierte Deletion/Disruption	Labor W. Kramer
*rad5*Δ (#150)	*rad5::HisMX6*	PCR-basierte Deletion/Disruption	Labor W. Kramer
*rad51*Δ (#506)	*rad51::LEU2*	PCR-basierte Deletion/Disruption	Labor W. Kramer
*rad52*Δ (#297)	*rad52::URA3*	PCR-basierte Deletion/Disruption	Labor W. Kramer
*rad54*Δ (#177)	*rad54::HisMX6*	PCR-basierte Deletion/Disruption	Labor W. Kramer
G2-MPH1 (#622–625)	G2-*Tag* vor *MPH1*	PCR-basiertes *Tagging*	diese Arbeit
G2-RAD5 (#621)	G2-*Tag* vor *RAD5*	PCR-basiertes *Tagging*	diese Arbeit
G2-RAD51 (#620)	G2-*Tag* vor *RAD51*	PCR-basiertes *Tagging*	diese Arbeit
G2-RAD52 (#662)	G2-*Tag* vor *RAD52*	PCR-basiertes *Tagging*	diese Arbeit
G2-RAD54 (#663)	G2-*Tag* vor *RAD54*	PCR-basiertes *Tagging*	diese Arbeit
Clb2-R25A-RAD51 (#650)	Clb2-1-180-R25A-*Tag* vor *RAD51*	*gene replacement*	diese Arbeit
G2-RAD5 ***MAT*α** (#652)	G2-*Tag* vor *RAD5*	PCR-basiertes *Tagging*	diese Arbeit

[1] Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Materialien und Methoden für die Arbeit mit Mph1 von *S. cerevisiae* und seinem humanen Orthologen FANCM im Folgenden getrennt aufgeführt. Die Experimente wurden im Wesentlichen in zwei getrennten Laboren durchgeführt: für Mph1 am Institut für Mikrobiologie und Genetik in der Arbeitsgruppe Molekulare Genetik; für FANCM im Labor von Prof. Steffen Emmert in der UMG, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie.

G2-MPH1 G2-RAD5 (#657)	G2-*Tag* vor *MPH1*; G2-*Tag* vor *RAD5*	Kreuzung von #622 und #652	diese Arbeit
*pso2*Δ (#653)	*pso2::KanMX4*	PCR-basierte Deletion/Disruption	diese Arbeit
*pso2*Δ *mph1*Δ (#654)	*pso2::KanMX4; mph1::hisG*	PCR-basierte Deletion/Disruption (ausgehend von #590)	diese Arbeit
*pso2*Δ *G2-MPH1* (#655)	*pso2::KanMX4;* G2-*Tag* vor *MPH1*	PCR-basierte Deletion/Disruption (ausgehend von #622)	diese Arbeit
MPH1-„mut“ (#626–647)	10 verschiedene *MPH1*-Mutanten mit Mutationen an putativen Phosphorylierungs-stellen (→ Tabelle 2.1)	*gene replacement*	diese Arbeit

Zusätzlich wurden einige der aufgeführten Stämme mit episomalen Plasmiden oder Derivaten der integrativen Plasmide YIplac211 und YIplac128 transformiert. Die dabei entstandenen Stamm-Derivate werden hier nicht im Einzelnen aufgeführt, sondern bei den jeweiligen Experimenten erwähnt.

Aus im Labor von W. Kramer von C. Ede durchgeführten Experimenten wurden zwei bereits mit YIplac211-KanKanMX4 transformierte Stämme aus dem –80 °C-Archiv für vergleichende Versuche herangezogen:

wt (E): CEN.PK2-1C *ura3-52::YIplac211-KanKanMX4*

***mph1*Δ (E)**: CEN.PK2-1C *mph1::hisG ura3-52::YIplac211-KanKanMX4*

2.1.2 PLASMIDE

Klonierungsvektoren

Plasmid	Beschreibung und Verwendung	Quelle
pFA6-KanMX4	enthält die KanMX4-Disruptionskassette; *template* für PCR-basierte Gendeletionen	WACH *et al.* 1994
pGIK43	enthält das G2-*Tag*	KARRAS & JENTSCH 2010
pGIK43_R25A	enthält das G2-*Tag* mit R25A-Mutation	diese Arbeit

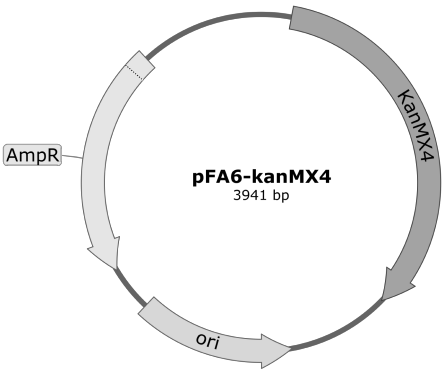
Episomale Hefevektoren

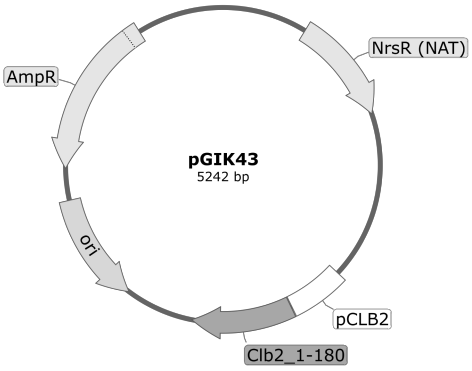
Plasmid	Beschreibung und Verwendung	Quelle
pRS316-KanKanMX4	enthält das KanKanMX4-Modul; Messung von Schwesterchromatid-Interaktionen	RUDOLPH 2003
pRS313	Komplementation von *mph1*Δ (Leervektor-Kontrolle)	SIKORSKI & HIETER 1989

pRS313-MPH1 (NcoI-SwaI)	enthält *MPH1* mit natürlichem Promotor und Terminator; Komplementation von *mph1*Δ	SCHELLER 1999
pRS313_e9e6	enthält ein chromosomales *Ssp*I/*Msc*I Fragment aus *S. cerevisiae* mit dem *MPH1*-Gen einschließlich Promotor- und Terminatorregion; *template* für *MPH1*-Mutagenese-PCR	ENTIAN *et al.* 1999

Integrative Hefevektoren

Plasmid	**Beschreibung und Verwendung**	**Quelle**
pRS306_e9e6-Derivate (pRS306_MPH1-mut)	enthalten das *MPH1*-Gen von *S. cerevisiae* einschließlich dessen Promotor- und Terminatorregion; die Derivate tragen verschiedene Allele von *MPH1*, die für die Mph1-Phosphorylierungsmutanten codieren (Details siehe Tabelle 2.1); für *gene replacement*	F. Hinz, M. Wuttke (Labor W. Kramer); diese Arbeit
pRS306	Ausgangsvektor für die Klonierung von pRS306_Rad51_Clb2-1-180_R25A	SIKORSKI & HIETER 1989
pRS306_ Clb2-1-180-R25A_Rad51	enthält *RAD51* mit flankierenden Sequenzen und N-terminalem Clb2-1-180-R25A-*Tag*; für *gene replacement*	diese Arbeit
YIplac211-KanKanMX4	enthält das KanKanMX4-Modul; Messung von Schwesterchromatid-Interaktionen	RUDOLPH 2003
YIplac128-KanKanMX4	enthält das KanKanMX4-Modul; Messung von Schwesterchromatid-Interaktionen	EDE 2009





(Bildbeschreibung nächste Seite)

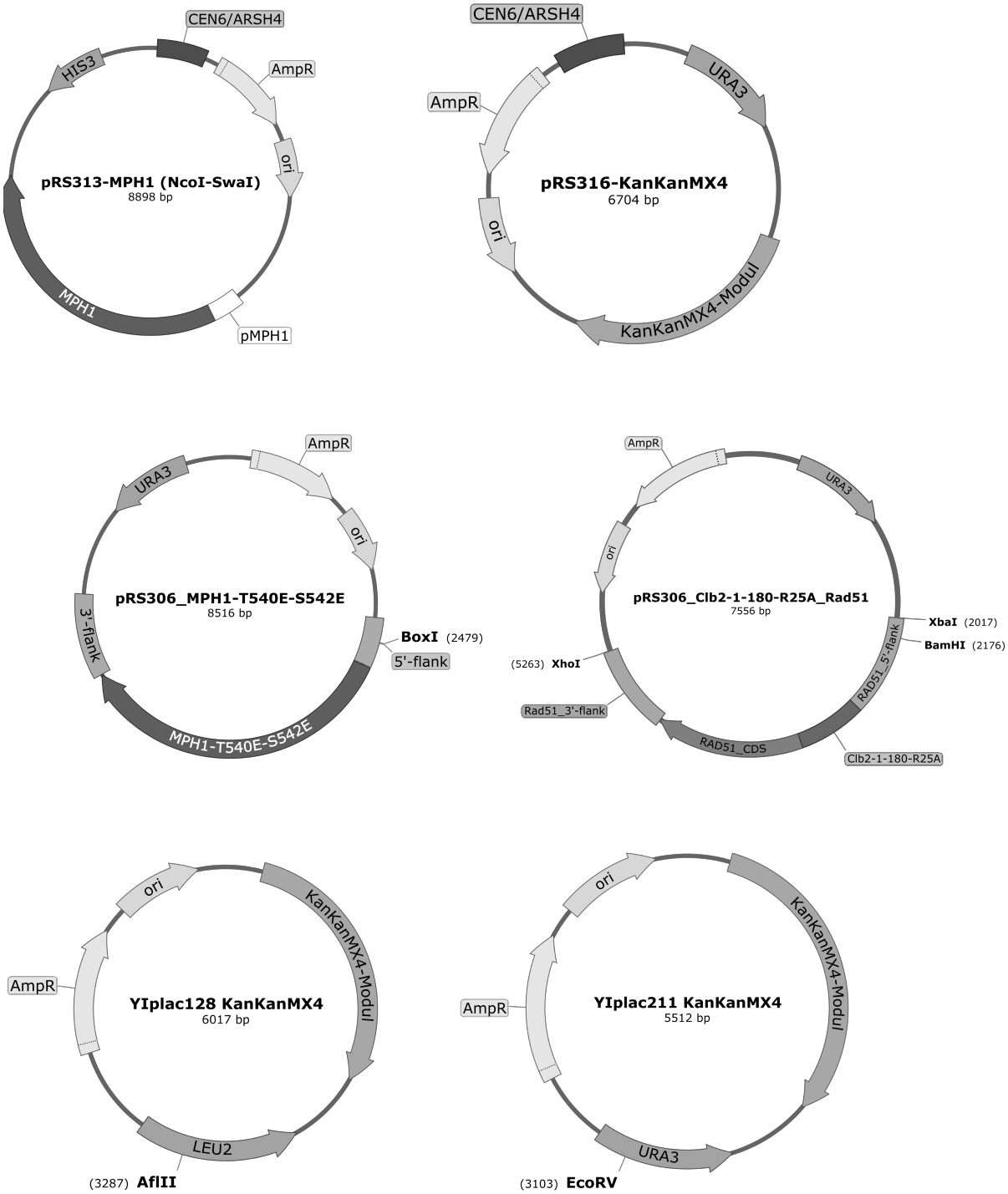


Abbildung 2.1: **Schematische Darstellung wichtiger Plasmid-Vektoren mit Angabe relevanter Restriktionsschnittstellen.** pFA6-KanMX4 und pGIK43 wurden als *templates* für PCRs zur Vervielfältigung der KanMX4-Markerkassette bzw. des G2-*Tags* (aus dem *CLB2*-Promotor p*CLB2* und der für die ersten 180 Aminosäuren von Clb2 codierenden Sequenz Clb2_1-180). Die Centromerplasmide pRS313-MPH1 und pRS316-KanKanMX4 wurden für die Komplementation des *mph1*Δ-Phänotyps bzw. für die Messung induzierter Reversionen des KanKanMX4-Moduls verwendet. pRS306_MHP1-T540E-S542E ist stellvertretend für alle pRS306_e9e6-Derivate (pRS306_MPH1-mut) gezeigt, die für das *gene replacement* von *MPH1* durch das jeweilige mutante Allel eingesetzt wurden. pRS306_Clb2-1-180-R25A_Rad51 diente zum *gene replacement* von *RAD51* mit der Clb2-1-180-R25A-*getaggten* Variante dieses Gens. YIplac211-KanKanMX4 und YIplac128-KanKanMX4 dienten zur Integration des KanKanMX4-Moduls in das Genom von *S. cerevisiae*. Legende: *AmpR*: vermittelt in *E. coli* Ampicillin-Resistenz; ori: prokaryotischer Replikationsursprung; *NrsR* (*NAT*): vermittelt in *S. cerevisiae* Nourseothricin-Resistenz; *LEU2*, *HIS3*, *URA3*: Prototrophiemarker, die Transformanten Leucin-, Histidin- bzw. Uracil-prototroph machen; *CEN6*: Centromersequenz; *ARSH4*: eukaryotischer Replikationsursprung.

Tabelle 2.1: **Basenaustausche und daraus resultierende Aminosäure-Austausche aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *MPH1*-Phosphorylierungsmutanten.** Alle mutanten Allele lagen als Derivate des Vektors pRS306_e9e6 (pRS306_MPH1-mut) vor. Die Positionen der Basenaustausche sind relativ zur ersten Base der codierenden Sequenz von *MPH1* angegeben. Unterstrichene Austausche führen zu den angegebenen Aminosäure-Austauschen; nicht unterstrichene Basenaustausche sind stumme Mutationen und dienten der Einführung von Restriktionsschnittstellen für die Überprüfung der Plasmide und der transformierten Hefestämme. (*) Diese Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. (AS = Aminosäure)

Kurzbezeichnung	Basenaustausche gegenüber wt-*MPH1*	AS-Austausche gegenüber wt-Mph1
5AQ	964T>G, 966A>T, 978C>G, 997A>G, 998G>C, 999C>T, 2073G>T, 2074A>G, 2076T>G, 2881A>G, 2882G>C, 2892T>C, 2917T>G, 2919C>T	S322A, S333A, T692A, S961A, S973A
5EQ	964T>G, 965C>A, 975C>T, 978C>A, 997A>G, 998G>A, 999C>A, 2073G>T, 2074A>G, 2075C>A, 2076T>G, 2881A>G, 2882G>A, 2883T>A, 2907C>T, 2917T>G, 2918C>A, 2919C>A	S322E, S333E, T692E, S961E, S973E
2AQ-3EQ*	964T>G, 966A>T, 978C>G, 997A>G, 998G>C, 999C>T, 2073G>T, 2074A>G, 2075C>A, 2076T>G, 2881A>G, 2882G>A, 2883T>A, 2907C>T, 2917T>G, 2918C>A, 2919C>A	S322A, S333A, T692E, S961E, S973E
3AQ-2EQ	964T>G, 966A>T, 978C>G, 997A>G, 998G>C, 999C>T, 2073G>T, 2074A>G, 2076T>G, 2881A>G, 2882G>A, 2883T>A, 2907C>T, 2917T>G, 2918C>A, 2919C>A	S322A, S333A, T692A, S961E, S973E
3EQ-2AQ	964T>G, 965C>A, 975C>T, 978C>A, 997A>G, 998G>A, 999C>A, 2073G>T, 2074A>G, 2075C>A, 2076T>G, 2881A>G, 2882G>C, 2892T>C, 2917T>G, 2919C>T	S322E, S333E, T692E, S961A, S973A
2EQ-3AQ	964T>G, 965C>A, 975C>T, 978C>A, 997A>G, 998G>A, 999C>A, 2073G>T, 2074A>G, 2076T>G, 2881A>G, 2882G>C, 2892T>C, 2917T>G, 2919C>T	S322E, S333E, T692A, S961A, S973A
2AQ-EQ-2AQ	964T>G, 966A>T, 978C>G, 997A>G, 998G>C, 999C>T, 2073G>T, 2074A>G, 2075C>A, 2076T>G, 2881A>G, 2882G>C, 2892T>C, 2917T>G, 2919C>T	S322A, S333A, T692E, S961A, S973A
2EQ-AQ-2EQ	964T>G, 965C>A, 975C>T, 978C>A, 997A>G, 998G>A, 999C>A, 2073G>T, 2074A>G, 2076T>G, 2881A>G, 2882G>A, 2883T>A, 2907C>T, 2917T>G, 2918C>A, 2919C>A	S322E, S333E, T692A, S961E, S973E
T540A/S542A*	1603A>C, 1606A>T, 1607G>C, 1608T>G, 1618A>G, 1624A>G, 1625G>C	T540A, S542A
T540E/S542E*	1618A>G, 1619C>A, 1624A>G, 1625G>A, 1626C>G, 1645A>T, 1646G>C, 1650A>G	T540E, S542E

2.1.3 PRIMER (OLIGONUKLEOTIDE)

Alle Sequenzen sind in 5'-3'-Orientierung angegeben. Die Nummern beziehen sich auf die laborinterne Nummerierung und sind daher nur teilweise fortlaufend. Alle neu bestellten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

Primer für die Sequenzierung der Phosphorylierungsmutanten

pRS306_Mph1_mut_seq_for_1 (#918)	AGCTCGGAATTAACCCTCAC (20 nt)
pRS306_Mph1_mut_seq_for_2 (#919)	CATGAGCTTGATTACGATGC (20 nt)

pRS306_Mph1_mut_seq_for_3 (#920)	CAAACCAGTGCTTCAACAGG (20 nt)
pRS306_Mph1_mut_seq_for_4 (#921)	AGGGAAGGAAGAAGGTAGAG (20 nt)
pRS306_Mph1_mut_seq_for_5 (#922)	GAGAATGATTCAACCGAGGAAG (22 nt)
pRS306_Mph1_mut_seq_for_6 (#923)	TCATTAAGGATACGGCACTG (20 nt)
pRS306_Mph1_mut_seq_rev_1 (#924)	GGCCAGTGAATTGTAATACGAC (22 nt)
pRS306_Mph1_mut_seq_rev_2 (#925)	ACAGTGCCGTATCCTTAATG (20 nt)
pRS306_Mph1_mut_seq_rev_3 (#926)	ATCTTCCGCTTCTTACTTGG (20 nt)
pRS306_Mph1_mut_seq_rev_4 (#927)	GCCTATGCAATCTCTCTACC (20 nt)
pRS306_Mph1_mut_seq_rev_5 (#928)	CGGCCATACCTAATTGTTCG (20 nt)
pRS306_Mph1_mut_seq_rev_6 (#929)	TACACGTAGAACGACAAAGC (20 nt)
5'mph1_del_screen (#91)	ATCTCCTCTAACTCCTTACTGGTG (24 nt)
3'mph1_screen_2 (#377)	TGCTTAGCTTTTGCGACACCTGTG (24 nt)

Mutageneseprimer für die Mutagenese der Positionen T540/S542 von Mph1

Mph1_T540A/S542A_PvuI_for (#914)	AGAGCGGCGAATGATAAACTTGAACGATCGGCCAGACGAGCGGGGGCCTCTGAAGAGGCT (60 nt)
Mph1_T540A/S542A_PvuI_rev (#915)	AGCCTCTTCAGAGGCCCCCGCTCGTCTGGCCGATCGTTCAAGTTTATCATTCGCCGCTCT (60 nt)
Mph1_T540E/S542E_PfoI_for (#916)	GCCAGACGAGAGGGGGAGTCTGAAGAGGCTCAGATTTCCGGGATGAACCAAAAAATGC (58 nt)
Mph1_T540E/S542E_PfoI_rev (#917)	GCATTTTTTGGTTCATCCCGGAAATCTGAGCCTCTTCAGACTCCCCCTCTCGTCTGGC (58 nt)

Primer für das G2-*Tagging*

Sequenzierungsprimer für pGIK43

pGIK43_G2-tag_seq_rev (#913)	TATAGGGAGACCGGCAGATC (20 nt)

Amplifikation der G2-Kassette aus pGIK43

Mph1_G2-tag_ins_for (#905)	ATTCAAGATATAGTAGCTCACTTCAGTTTTATTCAACACATTCCGGTTCTGAACGCGGCCGCCAGCTGAAGC (72 nt)
Mph1_G2-tag_ins_rev (#906)	TCCAGCTCGTCATCTTCGAAATCACTAAAGTAATCATCTGCACTAGCCATATCAGTTTCACTTTCGGTATTTC (73 nt)
Rad51_G2-tag_ins_for (#907)	5'TCCATATACTAGTAGTTGAGTGTAGCGACAAAGAGCAGACGTAGTTATTTGAACGCGGCCGCCAGCTGAAGC (72 nt)

Rad51_G2-tag_ins_rev (#908)	CCGTACTGAAGCTGTGACTCTGATATATGTTGTTCTTGAACTTGAGACAT ATCAGTTTCACTTTCGGTATTTC (73 nt)
Rad5_G2-tag_ins_for (#909)	TCACTTGAAAGTAAATTATCTACAAAGTTACATTATCAAAAGGCCTTAGA GAACGCGGCCGCCAGCTGAAGC (72 nt)
Rad5_G2-tag_ins_rev (#910)	AGGTCATCGTTAAAAAACCTCTTCCTTTCTTCCTGTTCAATATGACTCATA TCAGTTTCACTTTCGGTATTTC (73 nt)
Rad52_G2-tag_ins_for (#966)	TTGCCACTGAGAATCAACAAATGCAAACAAGGAGGTTGCCAAGAACTGCTG AACGCGGCCGCCAGCTGAAGC (72 nt)
Rad52_G2-tag_ins_rev (#967)	TGGTTACCGAAAACGGGCTTCTTCTCATCCATATCCATAATTTCATTCATA TCAGTTTCACTTTCGGTATTTC (73 nt)
Rad54_G2-tag_ins_for (#968)	GCTGCTACGAAAGTATAGAAAAATCAAACGCTCAGAACTTAGCTCTATTTG AACGCGGCCGCCAGCTGAAGC (72 nt)
Rad54_G2-tag_ins_rev (#969)	CCGGCTCCTATTCCATTTGGTGGTCTGTCTGGTAATCTGCGTCTTGCCATAT CAGTTTCACTTTCGGTATTTC (73 nt)
PCR-Screen: interne Primer im G2-*Tag*	
5'_G2-tag_int (#911)	CAGCGAAGGAGATAATCCAGCATG (24 nt)
3'_G2-tag_int (#912)	GTACGGGCGACAGTCACATCATGC (24 nt)
PCR-Screen: genspezifische Primer	
5'mph1_del_screen (#91)	ATCTCCTCTAACTCCTTACTGGTG (24 nt)
pRS306_Mph1_mut_seq_rev_5 (#928)	CGGCCATACCTAATTGTTCG (20 nt)
5'rad51_sc_for (#767)	TCTCACCATATCCCACGACTAG (22 nt)
3'rad51_intern (#488)	GCTTAGTTCACCACGACCAGAA (22 nt)
5'rad5_screen (#109)	GAGGCGAGCTAGCTGCTATTAA (22 nt)
3'rad5_intern (#108)	GACGTCCTCATCTGTCATCCTT (22 nt)
5'rad52 screen new (#976)	GAAAAGACGAAAAATATAGCGG (22 nt)
3'rad52 intern (#202)	TCCTAGAGCATTACCAAACCCT (22 nt)
5'rad54 screen (#357)	GCGAAGGCCAAAACTCTTCTCA (22 nt)
3'rad54 intern (#359)	GATGTGTCATGGACAATCATTT (22 nt)

Primer für Clb2-R25A-Mutagenese in pGIK43

pGIK43_mut_R25A_PvuII_for (#936)	CTAGTTCATCAAGGTTTTTGAGGAATGTACAAGCAGCTGCCTTAAACAAT GTAACAAATACGA (63 nt)
pGIK43_mut_R25A_PvuII_rev (#937)	TCGTATTTGTTACATTGTTTAAGGCAGCTGCTTGTACATTCCTCAAAAAC CTTGATGAACTAG (63 nt)

pGIK43_Clb2-Degron_SOE_for (#938)	AAACCTACTGCGAGCTATTC (20 nt)
pGIK43_G2-tag_seq_rev (#913)	TATAGGGAGACCGGCAGATC (20 nt)

Primer für die Klonierung von pRS306_Clb2-1-180-R25A_Rad51

Primer für SOE-PCR

Rad51_Clb2-R25A_SOE_vorn_for (#956)	CGAGCTAGCTTCTAGACCGGTAATCCCTAAGAAC (34 nt)
Rad51_Clb2-R25A_SOE_vorn_rev (#957)	ATGACGATAACAAATTAGTAG (21 nt)
Rad51_Clb2-R25A_SOE_Mitte_for (#954)	TACTAATTTGTTATCGTCATATGTCCAACCCAATAGAAAAC (41 nt)
Rad51_Clb2-R25A_SOE_Mitte_rev (#955)	TGTTCTTGAACTTGAGACATATCAGTTTCACTTTCGGTATTTC (43 nt)
Rad51_Clb2-R25A_SOE_hinten_for (#958)	ATGTCTCAAGTTCAAGAACAAC (22 nt)
Rad51_Clb2-R25A_SOE_hinten_rev (#959)	GTCTACTGTGCTCGAGAACACATCACCTGAGCGTG (35 nt)

Primer für Kolonie-PCR und Screen

5'rad51_sc_for (#767)	TCTCACCATATCCCACGACTAG (22 nt)
3'rad51_intern (#488)	GCTTAGTTCACCACGACCAGAA (22 nt)

Primer für *PSO2*-Deletion und zugehörigen PCR-Screen

5`_PSO2_disrupt (#960)	ATGTCAAGGAAATCTATAGTGCAAATAAGAAGATCTGAAGCAGCTGAAGCT TCGTACGCTG (61 nt)
3`_PSO2_disrupt (#961)	TTATTTAGCCGCCCGCGTTTTCCTAACGTTTTCCCAACATGCATAGGCCACT AGTGGATCTG (62 nt)
5' Kan out (#11)	CGTGAGTCTTTTCCTTACCCATGG (24 nt)
3' Kan out (#12)	ATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAG (24 nt)
5'_PSO2_screen (#962)	GCGAATTTCTTTGTCCCTGAGC (22 nt)
3'_PSO2_screen (#963)	GGAGAAAGGGACCATATGGCAC (22 nt)
5'_PSO2_intern (#964)	ATACTTGCATAGGCAGTGACCC (22 nt)
3'_PSO2_intern (#965)	GTAAGCTTTCGTCCCACATGTC (22 nt)

Primer für qPCR

qPCR_URA3_b (184 bp)

qPCR_URA3_b_for	GTTGAAGCATTAGGTCCCAAAA (22 nt)
qPCR_URA3_b_rev	CACCCGCAGAGTACTGCAA (19 nt)
qPCR_LEU2_a (191 bp)	
qPCR_LEU2_a_for	CCGTAAAGAACTTCAATTGTACGC (24 nt)
qPCR_ LEU2_a_rev	CACTATCCCAAGCGACACCA (20 nt)
qPCR_LEU2_b (179 bp)	
qPCR_ LEU2_b_for	AAAGAACTTCAATTGTACGCCAA (23 nt)
qPCR_ LEU2_b_rev	CAAGCGACACCATCACCATC (20 nt)
qPCR_KanKanMX4_repeat (161 bp)	
qPCR_KanKanMX4_repeat_for	ATCGCGTATTTCGTCTCGCT (20 nt)
qPCR_KanKanMX4_repeat_rev	CCTGGAATGCTGTTTTGCCG (20 nt)

2.1.4 ENZYME UND ANDERE PROTEINE

Thermo Scientific (Marke von Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)	Restriktionsendonukleasen
	T4 DNA Ligase
	Taq-DNA-Polymerase (*recombinant*)
	Pfu-DNA-Polymerase
	Phusion® *High-Fidelity* DNA Polymerase
	Shrimp Alkaline Phosphatase
New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)	Restriktionsendonukleasen
institutsinterne Produktion	α-Faktor
Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	Zymolyase®

2.1.5 ANTIKÖRPER

Clb2 (y-180): sc-9071	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA)

2.1.6 GERÄTE

Alle Experimente wurden mit Standard-Laborgeräten durchgeführt, die den jeweiligen Anforderungen entsprachen. Geräte, die nicht der Standardausstattung entsprachen oder von besonderer Bedeutung für das Gelingen der Versuche waren, werden bei der jeweiligen Methode, bei der sie Verwendung fanden, explizit aufgeführt.

2.1.7 VERBRAUCHSMATERIALIEN UND GLASWAREN

Alle Verbrauchsmaterialien wurden von gängigen Herstellern, u.a. Greiner Bio-One (Frickenhausen) und Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht) nach Standard-Labormaßstäben eingekauft. Glaswaren wurden zumeist von der Schott AG (Mainz) bezogen.

2.1.8 CHEMIKALIEN

DNA-schädigende Agenzien und andere Medienzusätze	
4-Nitrochinolin-1-oxid (4-NQO)	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
5-Fluoroorotic acid (5-FOA)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Camptothecin = (*S*)-(+)-Camptothecin ≥90% (HPLC) (C9911)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cisplatin = cis-Diammineplatinum(II) dichloride (P4394)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
G418	Calbiochem, Schwalbach
L-Canavanin	Calbiochem, Schwalbach
Methylmethansulfonat (MMS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nourseothricin (ClonNAT)	Werner BioAgents, Jena
Zutaten für Nährmedien	
bakteriologischer Agar	Oxoid, Cambridge, Großbritannien
Glucose	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Hefeextrakt	Oxoid, Cambridge, Großbritannien
Trypton	Oxoid, Cambridge, Großbritannien
Bacto-Pepton	Becton, Dickinson & Company, Sparks
BD Difco™ *Yeast Nitrogen Base without Amino Acids and Ammonium Sulfate*	Becton, Dickinson & Company, Sparks
Sonstige Chemikalien	
Hi-Di-Formamid	Applied Biosystems, Foster City USA
Protease Inhibitor Cocktail for Yeast and Fungi (P8215)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ampicillin (Na-Salz), Dithiothreitol (DTT), Glycin	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau, Dimethylsulfoxid (DMSO), Ponceau S	Fluka, Neu-Ulm

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien wurden von der Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), der Merck AG (Darmstadt) oder der Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) bezogen.

2.1.9 PUFFER UND LÖSUNGEN

Allgemeine Puffer und Lösungen:

Ammoniumacetat-Stammlösung	7 M Ammoniumacetat in H_2O, autoklaviert für 20 min bei 121 °C
Carrier-DNA-Stammlösung	2 mg/ml Lachssperma-DNA in Aktivkohle-gereinigtem H_2O, aufgekocht für 5 min bei ca. 100 °C, Lagerung bei –20 °C
DTT-Stammlösung	1 M DTT in H_2O, sterilfiltriert, bei –20 °C gelagert
EDTA-Stammlösung	0,5 M EDTA (unter Zugabe von NaOH-Plätzchen in H_2O gelöst), pH 8,6
EtBr-Stammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid
Glucose-Stammlösung	2 M Glucose in H_2O, autoklaviert für 20 min bei 121 °C
Kaliumacetat-Stammlösung	7 M Kaliumacetat in H_2O, autoklaviert für 20 min bei 121 °C
LiAc-Stammlösung	1 M Lithiumacetat in Aktivkohle-gereinigtem H_2O, autoklaviert für 20 min bei 121 °C
PBS-Puffer	10 mM Na_2HPO4; 1,8 mM KH_2PO_4 pH 7,3; 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl
P-solution	33 mM K_2HPO_4; 67 mM KH_2PO_4 pH 6,5; 1,2 M Sorbitol
SCE-Puffer	1 M Sorbitol; 100 mM *tri*-Natriumcitrat; 60 mM EDTA
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris/Acetat; 50 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA in H_2O, sterilfiltriert
TES-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA; 1% SDS in H_2O, sterilfiltriert
α-Faktor-Stammlösung	2 mg/ml α-Faktor in EtOH, Lagerung bei 4 °C

Stammlösungen für Nährmedien-Zusätze:

Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in H_2O, sterilfiltriert, bei –20 °C gelagert
Kanamycin-Stammlösung	50 mg/ml in H_2O, sterilfiltriert bei –20 °C gelagert
L-Canavanin-Stammlösung	100 mg/ml L-Canavanin in H_2O, steril filtriert, Lagerung bei 4 °C
Nourseothricin (ClonNAT)-Stammlösung	100 mg/ml Nourseothricin in H_2O, sterilfiltriert bei 4 °C gelagert

Stammlösungen für DNA-schädigende Agenzien:

4-NQO-Stammlösung	2,5 mg/ml, 25 mg/ml und 250 mg/ml 4-NQO in EtOH, Lagerung bei 4 °C
Camptothecin-Stammlösung	5 mg/ml Camptothecin in DMSO, Lagerung bei 4 °C
Cisplatin-Stammlösung	50 mM in DMF (Dimethylformamid; entspricht 15 mg/ml; –20°C)
MMS-Stammlösung	10 % oder 1 % (v/v) Methylmethansulfonat in EtOH, direkt vor Benutzung angesetzt

Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen:

TFBI	30 mM Kaliumacetat; 100 mM RbCl; 10 mM $CaCl_2$; 50 mM $MnCl_2$; 15 % Glycerin; pH 8,5 mit Essigsäure; sterilfiltriert
TFBII	10 mM MOPS; 75 mM $CaCl_2$; 10 mM RbCl; 15 % Glycerin; pH 6,5 mit KOH; sterilfiltriert

Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot:

Sammelgel (5 %)	16,7 % (v/v) ROTIPHORESE® Gel 30; 125 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) APS; 0,1 % (w/v) TEMED
Trenngel (8 %)	26,7 % (v/v) ROTIPHORESE® Gel 30; 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) APS; 0,1 % (w/v) TEMED
Laemmli-Laufpuffer (1x)	25 mM Tris/HCl pH 8,4; 200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
Laemmli-Probenpuffer (2x)	125 mM Tris/HCl pH 6,8; 2 % (w/v) SDS; 10 % Glycerin; 5 % β-Mercaptoethanol; 0,05 % Bromphenolblau
Puffer für Sammelgel	1,25 M Tris/HCl pH 6,8
Puffer für Trenngel	1,875 M Tris/HCl pH 8,8
SDS-Stammlösung	10 % SDS (w/v) in H_2O
APS-Stammlösung	10 % Ammoniumpersulfat in H2O, Lagerung bei –20 °C
Semi-dry-Transfer-Puffer	25 mM Tris pH 8,3; 192 mM Glycin; 20 % Methanol
Ponceau-S-Färbelösung	0,25 % Ponceau S; 40 % Methanol; 15 % Essigsäure; in H_2O

2.1.10 NÄHRMEDIEN

Alle Nährmedien wurden mit Millipore-gereinigtem Wasser angesetzt und für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Hitzeempfindliche Zusätze (v.a. Antibiotika) wurden separat sterilfiltriert und erst nach Abkühlung auf etwa 60-70 °C (bei Canavanin unter 60 °C) zugegeben. Nur für die Herstellung von festem Nährmedium für Platten wurden die angegebenen 1,5 % (*E. coli*) bzw. 1,8 % (*S. cerevisiae*) Agar zugegeben. Prozentangaben sind (w/v)-Angaben.

Anzucht von *E. coli*

LB	1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl; [1,5 % Agar]
LB+Amp	LB mit 100 µg/ml Ampicillin
LB+Kan	LB mit 50 µg/ml Kanamycin

Anzucht von *S. cerevisiae*

YPD	2% Pepton; 2% Glucose; 1 % Hefeextrakt; [1,8 % Agar]

YPD+G418	YPD mit 200 µg/ml G418
YPD+clonNAT	YPD mit 100 µg/ml Nourseothricin (clonNAT)
SC (*synthetic complete*)	2 % Glucose; 0,17 % *Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulfate*; 0,51 % Ammoniumsulfat; 1x Aminosäure-Nukleobasen-Mischung (680 mg auf 1 L; Tabelle 2.2); [1,8 % Agar] (Agar und Glucose wurden getrennt von den anderen Zutaten autoklaviert und die zwei Lösungen wurden nach dem Autoklavieren vereinigt.)
SC+5-FOA	SC mit zusätzlichen 50 mg/l Uracil und 1 g/l 5-FOA (*5-Fluoroorotic acid*)
SC-X (*drop-out*-Medium)	wie SC, aber in der Aminosäure-Nukleobasen-Mischung fehlt die entsprechende Aminosäure bzw. Nukleobase X
SC-Arg+Can	SC-Arg mit 40 µg/ml L-Canavanin
MSG-Ura (abgewandelt nach TONG & BOONE 2007)	2 % Glucose; 0,17 % *Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulfate*; 0,1 % MSG (Mononatriumglutamat); 1x Aminosäure-Nukleobasen-Mischung (680 mg auf 1 L; Tabelle 2.2); [1,8 % Agar] (Agar und Glucose wurden getrennt von den anderen Zutaten autoklaviert und die zwei Lösungen wurden nach dem Autoklavieren vereinigt.)
Super-SPO (Sporulationsmedium)	0,5 % Hefeextrakt; 306 mM (3 %) Kaliumacetat; 5 mM (0,09 %) Glucose; 1x Aminosäure-Nukleobasen-Mischung (680 mg für 1 L)
DM-Agar (Dissektionsmedium)	2 % Glucose; 0,5 % Pepton; 1 % Hefeextrakt; 0,3 % *beef extract*; 1x Aminosäure-Nukleobasen-Mischung; 2,5 % Agar

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der Aminosäure-Nukleobasen-Mischung für SC- und MSG-Medien. Die Endkonzentration bezieht sich auf das fertige Medium. Für einen Liter SC müssen 680 mg der vorgefertigten Mischung verwendet werden. Für *drop-out*-Medien werden separate Mischungen ohne Aminosäure/Nukleobase X vorbereitet.

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

2.1.11 KITS

Plasmidpräparation (Midi-Maßstab)	NucleoBond ®PC 100 – Macherey-Nagel, Düren
Plasmidpräparation (Mini-Maßstab)	peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I – PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

Gelextraktion und Reinigung von PCR-Produkten	peqGOLD Gel Extraction Kit – PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
DNA-Sequenzierung	BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit – Applied Biosystems (heute Marke von Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
Quantitative *real-time*-PCR	5x HOT FIREpol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX)– Solis Biodyne (Tartu, EST)
Western Blot-Immunodetektion	WesternBreeze® Chemiluminescent Western Blot Immunodetection Kit – Invitrogen (heute Marke von Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

2.1.12 LÄNGENSTANDARDS

2-Log DNA Ladder	NEB (New England Biolabs GmbH), Frankfurt am Main
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc.), Hercules, CA, USA

2.1.13 SOFTWARE, *ONLINE TOOLS* UND DATENBANKEN

Chromas©Lite	Version 2.6.6, Technelysium Pty. Ltd., South Brisbane, Australien
Chromas©Pro	Technelysium Pty. Ltd., South Brisbane, Australien
SnapGene® Viewer	Version 5.3.2 (und ältere), GSL Biotech LLC, Chicago, IL, USA
ChemDraw® Professional	Version 20.1.1.125, PerkinElmer Informatics, Inc., Waltham, MA, USA
CorelDRAW®X6	Version 16.1.0.843, Corel Corporation, Ottawa, Kanada
MultAlin (by Florence Corpet)	Online-Tool: http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html
Programm zur Mutationsratenberechnung	institutsintern, programmiert von Steffen Schmidt
SDS 2.4 (ABI 7900HT Software)	Version 2.4, Applied Biosystems (TM of Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
PyMOL™	Version 2.5.2, Schrödinger, LLC
PrimerBLAST	Online-Tool: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
QuikChange® Primer Design Program	Online-Tool von Stratagene (jetzt Agilent Technologies): https://www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp
Microsoft® Office 365	laufend aktualisiert, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Citavi	Version 6, Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
NCBI	Datenbank für Protein-, Nukleotid- und Genomsequenzen; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

RCSB Protein Data Bank (PDB)	Archiv experimentell bestimmter Proteinstrukturen; http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do
SGD	*Saccharomyces* Genome Database; Stanford University, Stanford, CA, USA; https://www.yeastgenome.org/

2.2 METHODEN – MPH1-PROJEKT

2.2.1 KULTIVIERUNG UND GENETISCHE MANIPULATION VON *ESCHERICHIA COLI*

2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Im Zuge dieser Arbeit wurde der *Escherichia* coli-Stamm DH5α für die Amplifikation von Plasmidvektoren verwendet. Die Anzucht von Flüssigkulturen erfolgte unter Selektivbedingungen in LB-Medium unter Schütteln bei 37 °C. 50 ml-Kulturen wurden in 100 ml-Kolben und Vorkulturen mit einem Volumen von 3 ml in Reagenzgläsern angesetzt. LB-(Selektiv-)Platten mit *E. coli*-Ausstrichen wurden bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.2 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Mit der von HANAHAN 1983 beschriebenen Rubidiumchlorid (RbCl)-Methode werden die von Natur aus nicht kompetenten *Escherichia coli*-Zellen durch Behandlung mit RbCl-enthaltenden Puffern in die Lage versetzt, (Plasmid-) DNA aus der sie umgebenden Flüssigkeit aufzunehmen.

50 ml auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium wurden mit 1 ml einer Übernachtkultur von DH5α inokuliert und für 2 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Nach 5 min auf Eis wurde die Kultur für 10 min bei 30.000 rpm und 4 °C in einer vorgekühlten Zentrifuge abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml eisgekühltem TFBI-Puffer resuspendiert und die Suspension 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 30.000 rpm, 4 °C) wurde das Zellpellet in 2 ml TFBII-Puffer aufgenommen und nach 15-minütiger Inkubation auf Eis in 100 µl-Aliquots aufgeteilt. Die Zellen wurden direkt für die Transformation verwendet oder bis zu ihrer Verwendung bei –80 °C aufbewahrt.

Für die Transformation wurde die benötigte Anzahl an Aliquots der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 3–10 µl (ca. 100–500 ng) der aufzunehmenden Plasmid-DNA wurden die Zellen für weitere 20 min auf Eis inkubiert, damit sich die DNA an die Zellen anlagern kann. Bei dem folgenden, 90-sekündigen Hitzeschock bei 42 °C kann die DNA in die Zellen gelangen. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 500 µl LB-Medium zugegeben und die Zellen wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert („Kur“ zur Expression der Selektionsmarker). Die Ansätze wurden anschließend entweder auf LB-Selektivplatten ausplattiert oder zum Animpfen von 50 ml LB-Selektivmedium verwendet.

2.2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.2.1 Fällung von DNA mit Hilfe von Ethanol

In Gegenwart einwertiger Kationen wie NH_4^+ fällt DNA bei Zugabe einer ausreichenden Menge Ethanol aus und kann durch Zentrifugation sedimentiert werden. Das Pellet kann anschließend in einem kleineren Volumen und/oder einem anderen Lösungsmittel resuspendiert werden. Außerdem können Salze und andere Verunreinigungen entfernt werden.

Zu der DNA-Lösung wurde $^1/_{10}$ ihres Volumens 7 M Ammoniumacetat und 3 Volumen 96 %iges Ethanol gegeben. Nach mindestens 1 h bei –20 °C wurde die DNA durch Zentrifugation (30 min, 13.000 rpm, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und die sedimentierte DNA mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation (wie oben) wurde das Pellet bei 37 °C getrocknet. Je nach weiterer Verwendung wurde das Pellet anschließend in H_2O oder Formamid (DNA-Sequenzierung, Seite 54) gelöst oder zunächst in getrockneter Form bei –20 °C gelagert (Transformation von *S. cerevisiae*, Seite 60).

2.2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die weitere Verwendung mussten die amplifizierten Plasmidvektoren wieder aus den *E. coli*-Zellen zurückgewonnen werden. Für analytische Zwecke wurden kleinere Plasmidmengen aus 3–5 ml-Kulturen gewonnen („Mini-Maßstab“). Die Extraktion erfolgte mit Hilfe des „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I“ der Firma PEQLAB nach dem Protokoll des Herstellers für *high copy*-Plasmide. Für die Transformation von *S. cerevisiae* und die Archivierung erfolgreich klonierter Plasmide wurde mit dem Kit „NucleoBond® PC 100“ (Macherey-Nagel) eine größere Menge Plasmid-DNA aus einer 50 ml-Kultur extrahiert („Midi-Maßstab“). Auch hier erfolgte die Durchführung nach den Angaben im Protokoll des Herstellers für *high copy*-Plasmide. Bei beiden Kits beruht die Extraktion der Plasmid-DNA auf alkalischer Lyse gefolgt von einer Anionen-Austausch-Chromatographie in den mitgelieferten Säulen. Bei der Midi-Präparation wird abschließend eine zusätzliche Isopropanol-Fällung der DNA durchgeführt.

2.2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration einer DNA-Lösung lässt sich durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmen. Ein Wert von A_{260} = 1 entspricht bei dsDNA einer Konzentration von 50 ng/µl und bei ssRNA 40 ng/µl.

Die Absorption einer geeigneten Verdünnung der DNA-Lösung wurde mit dem „NanoDrop 2000 Spektralphotometer“ (PEQLAB) bei 260 nm und 280 nm gegen das Verdünnungsmedium (H_2O) gemessen. Die Absorptionswerte sollten hierbei zwischen 0,1 und 0,8 liegen, da nur in diesem Bereich die Beziehung zwischen Konzentration und Absorption annähernd linear ist. Das Verhältnis A_{260}/A_{280} ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäure-Lösung und liegt für reine DNA- oder RNA-Lösungen bei 2,0. Üblicherweise wird ein Wert zwischen 1,8 und 1,9 erreicht.

2.2.2.4 Restriktionsspaltung, Dephosphorylierung und Ligation von DNA

Restriktionsendonukleasen vom Typ II schneiden die DNA innerhalb oder in unmittelbarer Nähe spezifischer Erkennungssequenzen. Dies wurde zur Herstellung rekombinanter DNA und zur Analyse der Identität von DNA-Molekülen genutzt. Alle Restriktionsspaltungen wurden nach den Angaben des Herstellers der jeweiligen Restriktionsenzyme durchgeführt.

Um unerwünschte Religationen zu vermeiden, wurden die DNA-Enden eines der zu ligierenden Fragmente direkt im Anschluss an die Restriktionsspaltung mit *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) dephosphoryliert. Die Ligation kann so nur über die Phosphatreste der 5'-Enden des separat gereinigten, zweiten Fragments stattfinden. Verbleibende Einzelstrangbrüche werden später *in vivo* ligiert. Dephosphorylierung und Hitzeinaktivierung der Phosphatase erfolgten nach Angaben des Herstellers der SAP.

Die T4-DNA-Ligase katalysiert ATP-abhängig die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-OH-Enden. Ligationen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Mit dem Ligationsansatz wurden anschließend chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (Seite 49).

2.2.2.5 PCR

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) können mit Hilfe passgenau designter Oligonukleotide (Primer) spezifische DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Als Matrize kann beispielsweise genomische DNA, ein Plasmid oder ein zuvor gewonnenes PCR-Produkt dienen. Durch zyklische Wiederholung von Denaturierung, Primer-*Annealing* und Elongation wird eine nahezu exponentielle Vermehrung des Fragments zwischen den Primern bewirkt. Über die Primer können zudem Punktmutationen oder nicht in der Matrize enthaltene, kurze Anhänge eingeführt werden.

Die PCR beruht auf dem Einsatz thermostabiler DNA-Polymerasen, die die wiederkehrende Denaturierung bei 95 °C überstehen. Die verschiedenen kommerziell erhältlichen thermostabilen DNA-Polymerasen unterscheiden sich vor allem in ihrer Genauigkeit. Die *Taq*-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) besitzt keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, also kein sogenanntes *proofreading*. Andere, auch oft als „*high fidelity*"-Polymerasen beworbene DNA-Polymerasen besitzen diese Aktivität und damit eine höhere Genauigkeit. Je nach Anwendung ist die Genauigkeit des PCR-Produkts mehr oder weniger bedeutend. In diesem Sinne wurde für PCR-Screens und Kolonie-PCRs die *Taq*-Polymerase (Thermo Scientic) eingesetzt, da hier die Produkte nicht weiterverwendet wurden. Für Klonierungen und PCRs zur Gewinnung von DNA-Fragmenten für die Transformation von *S. cerevisiae* ist die exakte Kopierung der Matrizensequenz entscheidend. Hier wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*; Thermo Scientific) oder eine vergleichbare Polymerase mit *proofreading*-Aktivität eingesetzt.

Jede PCR wurde als 50 µl-Reaktion nach den Vorgaben des Herstellers der eingesetzten Polymerase in einem PCR-Reaktionsgefäß mit Deckel angesetzt. Dabei enthielt jeder Ansatz standardmäßig 10 pmol jedes Primers. Die Reaktionen wurden, wenn nicht anders angegeben, für 30 Zyklen in einem Standard-Thermocycler (verschiedene Modelle) nach den Angaben des Herstellers der eingesetzten DNA-

Polymerase durchgeführt. *Annealing*-Temperatur und Elongationszeit wurden auf die spezifischen Primer bzw. die erwartete Produktlänge angepasst. Nach Abschluss der PCR wurden Proben der Reaktionsansätze mittels Agarosegelelektrophorese (siehe unten) analysiert.

2.2.2.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient zur Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Je nach Agaroseanteil unterscheidet sich der Größenbereich, innerhalb dessen die beste Trennung der Fragmente erreicht wird. Hier wurden 1–2 %ige Agarosegele für analytische und präparative Gelelektrophoresen verwendet. Bei einer analytischen Gelelektrophorese wurde eine Probe (meist 5 µl) auf das Gel aufgetragen, um z.B. den Erfolg einer PCR zu überprüfen. Mit präparativen Agarosegelen wurden durch Restriktionsspaltung gewonnene Fragmente isoliert und PCR-Produkte von Nebenprodukten getrennt. Dazu wurden die gesamten Spaltungs- bzw. PCR-Ansätze auf das Gel aufgetragen.

Es wurden 1–2 %ige (w/v) Agarosegele auf Basis von 1x TAE-Puffer verwendet. Die Gelmasse wurde zur Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid oder HDGreen™ versetzt. Das auspolymerisierte Gel wurde mit 1x TAE-Puffer überschichtet und mit den Proben sowie einem geeigneten Marker (Seite 48) beladen. Die Proben wurden zuvor mit $^{1}/_{5}$ Volumen „*6x Gel Loading Dye, Blue*“ (NEB) gemischt. Die Trennung erfolgte bei 70–90 V. Nach dem Lauf wurde das Gel auf einem UV-Schirm fotografiert.

2.2.2.7 Gelextraktion nach präparativer Agarosegelelektrophorese

Nachdem sie elektrophoretisch nach ihrer Größe getrennt wurden (siehe oben), können DNA-Fragmente aus dem Gel eluiert werden. Dafür wird die betreffende Bande zunächst auf dem UV-Schirm mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten.

Zur Elution der DNA-Fragmente im Anschluss an das Ausschneiden einer Bande aus einem präparativen Agarosegel wurde das „peqGOLD Gel Extraction Kit“ der Firma PEQLAB genutzt. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll „*Extraction of DNA from Agarose gels*“ des Herstellers.

2.2.2.8 Reinigung von PCR-Produkten

Bei PCR-Produkten ohne Nebenprodukte wurde auf eine präparative Gelelektrophorese mit anschließender Gelextraktion verzichtet. Stattdessen wurde für die Reinigung des PCR-Produktes von Primern und anderen Verunreinigungen direkt das „peqGOLD Gel Extraction Kit“ der Firma PEQLAB verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll „*Extraction of DNA from PCR reaction*“ des Herstellers.

2.2.2.9 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung, welche *E. coli*-Kolonien nach einer Transformation mit einem neu konstruierten Plasmid das korrekte Konstrukt in sich trugen, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. So reduziert sich die Anzahl unnötiger Plasmid-Präparationen für Testspaltungen und Sequenzierungen.

Vor der Selektivplatte wurden gewachsene *E. coli*-Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und jede Kolonie separat in 30 µl Wasser in einem PCR-Reaktionsgefäß resuspendiert. Von diesen 30 µl wurden 5 µl in einem Standard-PCR-Ansatz mit *Taq*-Polymerase (Seite 51) als Matrize eingesetzt, während die restlichen 25 µl bei 4 °C aufbewahrt wurden. Die Primer für die Kolonie-PCR wurden idealerweise so gewählt, dass nur bei geglückter Klonierung ein spezifisches Produkt entstand (z.B. ein Primer im Vektor, einer im Insert). Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese (Seite 52) analysiert und positive Klone wurden identifiziert. Bei positiven Klonen wurden die restlichen 25 µl der Zellsuspension zum Animpfen einer Übernachtkultur für die Vorbereitung einer Plasmid-Präparation verwendet.

2.2.2.10 Mutagenese mittels Überhangverlängerung

Im Zuge dieser Arbeit wurden mehrfach Punktmutationen in DNA-Sequenzen eingeführt (→ Klonierungen, Seite 55). In allen Fällen wurden die die Mutation tragenden Fragmente mittels Überhangverlängerung erzeugt. Bei dieser Methode werden in zwei separaten PCRs überlappende PCR-Produkte erzeugt, die in einer dritten Reaktion zu einem gemeinsamen Produkt zusammengefügt werden. Dieses kann dann beispielsweise über Restriktionsspaltung und Ligation (Seite 51) in einen Vektor inseriert werden. Die Punktmutationen werden in den ersten beiden PCRs durch Primer eingeführt, deren Sequenz den einzuführenden Mutationen entspricht. In PCR 3 werden die zuvor erzeugten Produkte zusammen mit den außen liegenden Primern der ersten PCR-Runden eingesetzt. Während der ersten Zyklen dienen die überlappenden Bereiche jeweils als Primer für die Vervollständigung zum „Volllängen-Produkt“, welches dann mit den anwesenden Primern amplifiziert wird. Die abschließende PCR wird auch als SOE-PCR bezeichnet (SOE = *splicing by overlap extension*). Die SOE-PCR funktioniert auch mit mehr als zwei Fragmenten. Bei der Klonierung von pRS306_Clb2-1-180-R25A_Rad51 (Seite 56) wurden drei PCR-Produkte zu einem Konstrukt verbunden. Die praktische Durchführung erfolgte jeweils entsprechend dem Protokoll für eine normale PCR (Seite 51). In allen Fällen wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase (Thermo Scientific™) für die Reaktionen eingesetzt.

2.2.2.11 Extraktion chromosomaler DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Um die chromosomale DNA der verwendeten Hefestämme als Matrize für PCRs einzusetzen, musste diese zuvor aus den Zellen extrahiert werden. Die extrahierte genomische DNA wurde für PCR-Screens zur Verifikation von genetischen Veränderungen (Seiten 62, 63 und 65), für PCRs zur Generierung von Sequenzierungs-*templates* (Seite 54) und für die quantitative *real-time*-PCR (Seite 57) verwendet.

10 ml einer Übernachtkultur wurden abzentrifugiert (3 min, 4000 rpm), das Pellet wurde in 1 ml H_2O resuspendiert und die Suspension in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach kurzer Zentrifugation in der Tischzentrifuge (5–10 s) wurde das Zellpellet zunächst in 500 µl SCE-Puffer resuspendiert und dann erneut kurz zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl SCE-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 25 µl 1 M DTT-Lösung und 5 µl Zymolyase® (40 mg/ml-Stammlösung) wurde die Mischung 1 h bei 37 °C inkubiert. Zymolyase® ist eine aus dem Bakterium *Arthrobacter luteus* isolierte Enzym-Mischung, die eine starke lytische Aktivität gegenüber den Zellwänden der Hefe besitzt. Die zurückbleibenden zellwandlosen Spheroblasten wurden anschließend für 3 min bei 3000 rpm abzentrifugiert und in 500 µl TES-Puffer

aufgenommen. Während der folgenden 30 min bei 60 °C löst das im TES-Puffer enthaltene Detergens SDS die Zellmembran auf und fördert die Denaturierung der Proteine. Die Zugabe von 170 µl 7 M Kaliumacetat und die einstündige Inkubation der Mischung auf Eis führen zu einer Ausfällung des SDS als Kaliumsalz, wobei die denaturierten Proteine mit ausfallen. Die ausgefällten Substanzen wurden abzentrifugiert (30 min, 13.000 rpm, 4 °C) und der die DNA enthaltende Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit dem 2-fachen Volumen Ethanol präzipitiert (Seite 50), wobei die Zugabe von Ammoniumacetat aufgrund der bereits zugegebenen Salze entfiel. Die gefällte, in Wasser gelöste genomische DNA wurde bei –20 °C gelagert. Für PCR-Screens wurde pro Ansatz 1 µl einer 1:50-Verdünnung der extrahierten genomischen DNA eingesetzt.

2.2.2.12 DNA-Sequenzierung

Mit Hilfe der DNA-Sequenzierung wurde die Sequenz wichtiger Plasmide, genomischer Allele und PCR-Produkte überprüft. So konnten eingeführte Mutationen bestätigt und zugleich unerwünschte, zufällig aufgetretene Mutationen ausgeschlossen werden. Als Matrize für die Sequenzierung dienten Plasmide oder PCR-Produkte, die mit dem „peqGOLD Gel Extraction Kit“ der Firma PEQLAB gereinigt worden waren (Seite 52).

Alle Sequenzierungen wurden unter Verwendung des „Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems) durchgeführt. Dieses Kit beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger (SANGER *et al.* 1977), verwendet aber im Gegensatz zur Originalmethode fluoreszenzmarkierte ddNTPs, die das Ansetzen der Reaktion in einem einzigen Gefäß erlauben. Die Sequenzierreaktionen erfolgten entsprechend den Vorgaben des Herstellers, wobei der Reaktionsansatz in Abweichung vom Protokoll des Herstellers mit weniger „BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix“ (BD) angesetzt wurde. Der verwendete Standard-Sequenzieransatz (10 µl) enthielt 1 µl BD, 2 µl BD-5x-Puffer, 5 µl H_2O (als Mastermix vorbereitet), sowie jeweils 1 µl *template* (300–500 ng) und 1 µl Primer (5 pmol/µl) in einem PCR-Reaktionsgefäß. Alle Ansätze wurden in einem Standard-Thermocycler diesem Programm unterzogen: 96 °C, 1 min; 29x (96 °C, 20 s; 50 °C, 15 s; 60 °C, 4 min); 4 °C, Pause.

Die Proben wurden anschließend mit Ethanol gefällt (Seite 50). Dazu wurden die 10 µl-Ansätze zusammen mit 90 µl H_2O in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, worin die Fällung durchgeführt wurde. Abweichend vom Protokoll auf Seite 50 wurden im ersten Schritt allerdings nur 220 µl 96 %iges EtOH zugegeben. Das getrocknete Pellet wurde schließlich in 10 µl Hi-Di-Formamid aufgenommen. Die Analyse der erhaltenen Abbruchfragmente erfolgte mittels Kapillarelektrophorese auf einem „3100-Avant Genetic Analyzer“ (Applied Biosystems™) durch Andreas Ohlenbusch im Labor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin (Universitätsmedizin Göttingen).

Die erhaltenen Chromatogramm-Dateien wurden mit dem Programm *Chromas© Lite* (Technelysium Pty. Ltd.) ausgewertet. Für überlappende Sequenzierungen wurden *Contigs* mit *Chromas©Pro* (Technelysium Pty. Ltd.) erstellt. Mit *MultAlin* (http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html) wurde abschließend ein Alignment der erhaltenen Sequenzen mit der Vergleichssequenz erstellt.

2.2.2.13 Klonierungen

pRS306_MPH1-2AQ-3EQ

Da das Plasmid pRS306_MPH1-2AQ-3EQ nicht aus Vorarbeiten übernommenen werden konnte, wurde es durch Spaltung und Ligation vorhandener pRS306_MPH1-mut-Derivate hergestellt. Dazu wurde das große Fragment eines *Eco*RI/*Pac*I-Doppelverdaus von pRS306_MPH1-3AQ-2EQ mit dem kleinen Fragment der *Eco*RI/*Pac*I-Spaltung von pRS306_MPH1-3EQ-2AQ ligiert. Die Restriktionsenzyme wurden so gewählt, dass nur die für das mittlere Motiv codierende Sequenz ausgetauscht wurde. Das Ligationsprodukt wurde zur Transformation von *E. coli* verwendet und mittels Kolonie-PCR und Restriktionsspaltung wurden positive Klone identifiziert. Vor der endgültigen Verwendung wurde die gesamte für Mph1 codierende Sequenz mittels Sequenzierung (Seite 54) überprüft.

pRS306_MPH1-T540A/S542A

Zur Erzeugung von pRS306_MPH1-T540A/S542A wurde mittels SOE-PCR (Seite 53) ein Fragment erzeugt, das die gewünschten Mutationen der *MPH1*-Sequenz und zusätzlich stille Mutationen zur Erzeugung einer *Pvu*I-Schnittstelle trägt (exakte Angabe der Mutationen siehe Tabelle 2.1; Primersequenzen siehe Seite 40). Die äußeren Primer wurden so gewählt, dass das Produkt der SOE-PCR die natürlich vorhandenen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bsu*36I und *Xba*I enthielt. Die neu eingeführte *Pvu*I-Schnittstelle erleichterte die Analyse des Erfolgs der Klonierung und den späteren Screen der transformierten Hefe-Stämme. Zunächst wurden zwei überlappende PCR-Produkte erzeugt: PCR 1 mit den Primern #919/#915 und PCR 2 mit den Primern #914/#924. Als Matrize diente jeweils das wt-*MPH1* enthaltende Plasmid pRS313_e9e6. Je 50–100 ng der gereinigten PCR-Produkte 1 und 2 wurden in einer SOE-PCR mit den Primern #919/#924 eingesetzt. Das SOE-PCR-Produkt wurde mit *Bsu*36I und *Xba*I gespalten und mit dem großen Fragment des *Bsu*36I/*Xba*I-Doppelverdaus von pRS306_MPH1-2EQ-AQ-2EQ ligiert. So wurden alle in pRS306_MPH1-2EQ-AQ-2EQ enthaltenen *MPH1*-Mutationen herausgeschnitten und durch ein *MPH1*-Fragment ersetzt, das nur die gewünschten, neuen Mutationen enthält. Das Ligationsprodukt wurde zur Transformation von *E. coli* verwendet und mittels Kolonie-PCR und Restriktionsspaltung wurden positive Klone identifiziert. Vor der endgültigen Verwendung wurde die gesamte für Mph1 codierende Sequenz mittels Sequenzierung (Seite 54) überprüft.

pRS306_MPH1-T540E/S542E

Zur Erzeugung von pRS306_MPH1-T540E/S542E wurde mittels SOE-PCR (Seite 53) ein Fragment erzeugt, das die gewünschten Mutationen der *MPH1*-Sequenz und zusätzlich stille Mutationen zur Erzeugung einer *Pfo*I-Schnittstelle trägt (exakte Angabe der Mutationen siehe Tabelle 2.1; Primersequenzen siehe Seite 40). Die äußeren Primer wurden so gewählt, dass das Produkt der SOE-PCR die natürlich vorhandenen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Eco*RI und *Pac*I enthielt. Zunächst wurden zwei überlappende PCR-Produkte erzeugt: PCR 1 mit den Primern #920/#917 und PCR 2 mit den Primern #916/#926. Als Matrize diente jeweils das wt-*MPH1* enthaltende Plasmid pRS313_e9e6. Je 50–100 ng der gereinigten PCR-Produkte 1 und 2 wurden in einer SOE-PCR mit den Primern #920/#926 eingesetzt. Das SOE-PCR-Produkt

wurde mit *Eco*RI und *Pac*I gespalten und mit dem großen Fragment des *Eco*RI/*Pac*I -Doppelverdaus von pRS306_MPH1-T540A/S542A ligiert. So wurde nur die Region um die Codons 540/542 ersetzt. Das Ligationsprodukt wurde zur Transformation von *E. coli* verwendet und mittels Kolonie-PCR und Restriktionsspaltung wurden positive Klone identifiziert. Vor der endgültigen Verwendung wurde die gesamte für Mph1 codierende Sequenz mittels Sequenzierung (Seite 54) überprüft.

pGIK43-R25A

Das Plasmid pGIK43 enthält das G2-*Tag*, darunter eine für die ersten 180 Aminosäuren von Clb2 codierende Sequenz (mit der Mutation L26A). Um ein nicht für den proteasomalen Abbau markierendes *Tag* zu konstruieren, wurde in dieser Sequenz zusätzlich die Mutation R25A eingeführt. Gleichzeitig wurde durch eine stille Mutation im Codon 26 eine *Pvu*II-Schnittstelle für die leichtere Analyse geschaffen:

Codon	24			25			26			27		
pGIK43	C	A	A	A	G	G	G	C	G	G	C	C
	Q			**R**			**A**			**A**		
R25A				G	C	X						
*Pvu*II-*site*					C	A	G	C	T	G		
pGIK43-R25A	C	A	A	G	C	A	G	C	T	G	C	C
	Q			**A**			**A**			**A**		

Mittels SOE-PCR (Seite 53) wurde ein Fragment erzeugt, das die gezeigten Mutationen trägt und die in pGIK43 enthaltenen Schnittstellen für *Bsr*GI und *Eco*RI beinhaltet (Primersequenzen siehe Seite 41): PCR 1 mit den Primern #938/#937 und PCR 2 mit den Primern #936/#913. Als Matrize diente jeweils pGIK43. Je 50–100 ng der gereinigten PCR-Produkte 1 und 2 wurden in einer SOE-PCR mit den Primern #938/#913 eingesetzt. Das SOE-PCR-Produkt wurde mit *Bsr*GI und *Eco*RI gespalten und mit dem großen Fragment eines *Bsr*GI/*Eco*RI-Doppelverdaus von pGIK43 ligiert. Das Ligationsprodukt wurde zur Transformation von *E. coli* verwendet und mittels Restriktionsspaltung wurden positive Klone identifiziert. Vor der weiteren Verwendung wurde die Sequenz des G2-*Tags* mittels Sequenzierung (Seite 54) überprüft.

pRS306_Clb2-1-180-R25A_Rad51

Um das genomische *RAD51* mittels *gene replacement* (Seite 65) mit der Sequenz für das Clb2-R25A-*Tag* versehen zu können, wurde der Vektor pRS306_Clb2-1-180-R25A_Rad51 konstruiert. Dieser enthält neben der für Rad51 codierenden Sequenz die flankierenden Sequenzen des *RAD51*-Lokus (800 bp *upstream* und 700 bp *downstream*). Direkt vor *RAD51* wurde die für die ersten 180 Aminosäuren von Clb2 codierende Sequenz mit der R25A-Mutation eingefügt, sodass ein offener Leserahmen entsteht, der für Rad51 mit N-terminalem Clb2-R25A-*Tag* codiert. Bei der Klonierung war zu beachten, dass das Plasmid in der 5‘-flankierenden Sequenz von *RAD51* eine geeignete Schnittstelle für die Linearisierung des Plasmids im Zuge des *gene replacements* tragen muss.

Die Klonierung erfolgte über eine SOE-PCR (Seite 53) mit drei Fragmenten (Schema in Abbildung 2.2; Primersequenzen siehe Seite 42). In PCR 1 und PCR 3 wurde mit den Primern #956/#957 bzw. #958/#959 die 5‘-flankierende Sequenz bzw. der offene Leserahmen von *RAD51* gefolgt von der 3‘-flankierenden

Sequenz amplifiziert. Als Matrize diente genomische DNA von *S. cerevisiae* (wt). Über die äußeren Primer wurden Schnittstellen für *Xba*I und *Xho*I eingeführt, um das SOE-PCR-Produkt später in pRS306 klonieren zu können. Bei PCR 2 wurde mit den Primern #954/#955 und pGIK43_R25A als Matrize exakt die für das Clb2-R25A-*Tag* codierenden 540 bp abgegriffen. Über die Primer wurden 20 bp große Bereiche eingeführt, die mit den Produkten von PCR 1 und PCR 2 so überlappen, dass bei der folgenden SOE-PCR die für das Clb2-R25A-*Tag* codierende Sequenz direkt vor dem Startcodon von *RAD51* eingefügt wurde. Die SOE-PCR erfolgte mit den Primern #956 und #959 unter Einsatz von 50–100 ng der gereinigten PCR-Produkte 1, 2 und 3. Das SOE-PCR-Produkt wurde mit *Xba*I und *Xho*I gespalten und mit dem großen Fragment des *Xba*I/*Xho*I-Doppelverdaus von pRS306 ligiert. Das Ligationsprodukt wurde zur Transformation von *E. coli* verwendet und mittels Kolonie-PCR und Restriktionsspaltung wurden positive Klone identifiziert.

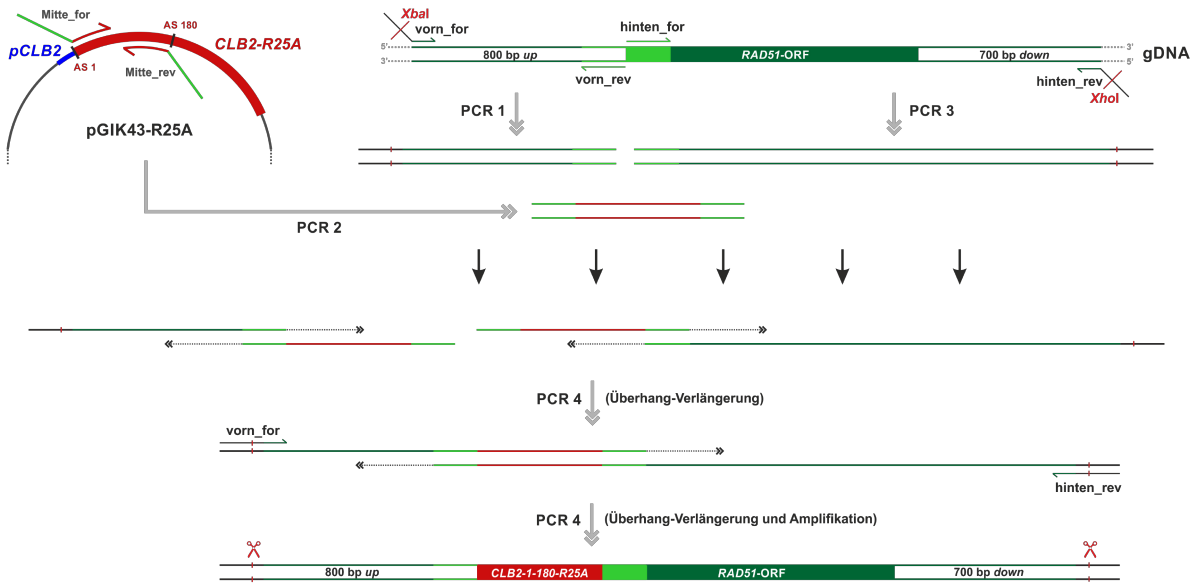


Abbildung 2.2: Schema der Konstruktion des Vektors pRS306_Clb2-1-180-R25A_Rad51 mittels SOE-PCR mit drei Fragmenten. Zunächst wurden die drei Fragmente in separaten PCRs hergestellt. Dabei wurden bei PCR 2 über die Primer Bereiche eingeführt, die Überlappungen mit den anderen PCR-Produkten erzeugen (hellgrün). Dadurch wurde bei der folgenden SOE-PCR die für das Clb2-R25A-*Tag* codierende Sequenz direkt vor dem Startcodon von *RAD51* eingefügt. Über die äußeren Primer wurden zudem Schnittstellen für *Xba*I und *Xho*I eingeführt, mit Hilfe derer das finale PCR-Produkt in pRS306 kloniert wurde.

2.2.2.14 Quantitative *real-time*-PCR

Die genomische Kopienzahl des KanKanMX4-Moduls verschiedener *S. cerevisiae*-Stämme wurde mit Hilfe quantitativer *real-time*-PCR (qPCR) bestimmt. Dazu wurde der „5x HOT FIREpol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX)“ der Firma Solis Biodyne eingesetzt. Dieser enthält mit EvaGreen® einen Farbstoff, der sich unter Änderung seines Absorptionsverhaltens in doppelsträngige DNA einlagert und so die Menge des während der PCR entstehenden Produktes in Echtzeit (*real-time*) nachverfolgen lässt. Mit ROX enthält der Mix zudem einen passiven Referenzfarbstoff, um das Reportersignal von EvaGreen® für jeden Versuchsansatz automatisch zu normalisieren. Das Design der PCR ist im Ergebnisteil (Abbildung 3.10; Seite 111f) genauer beschrieben.

Die qPCR-Primer wurden mit PrimerBLAST (NCBI) nach folgenden Vorgaben designt: (i) das Produkt sollte zwischen 75 und 200 bp groß sein, (ii) die Schmelztemperatur sollte bei etwa 60 °C liegen und (iii) die Primer sollten keine unspezifischen Produkte mit dem *S. cerevisiae*-Genom liefern (*Specificity check* gegen „*NCBI Chromosome Sequences (Organism limited to Saccharomyces cerevisiae)*"). Die Primersequenzen sind ab Seite 42 nachzulesen.

Die qPCR wurde in 384-*well*-Platten durchgeführt. So konnten alle zu vergleichenden Proben auf einer Platte gemessen werden. Für jedes Primerpaar wurde pro Platte eine Standardkurve mit gereinigtem PCR-Produkt zur Bestimmung der PCR-Effizienz mitgemessen. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe mit acht 1:10-Verdünnungen ausgehend von 500 amol des PCR-Produktes eingesetzt. Die *template*-Menge für die zu messenden Proben wurde so abgeschätzt, dass der C_t-Wert zwischen 15 und 20 und damit im mittleren Bereich der Standardkurve lag (das entsprach 0,5–2 amol *template*). Die Werte aller Standardkurven wurden als Duplikate, alle Proben unbekannter Kopienzahl in Triplikaten gemessen. Triplikate dienten dem eindeutigen Ausschluss von Ausreißern bei der Auswertung.

Zur Vorbereitung der Versuchsansätze wurden pro *well* 3 µl eines Mastermixes aus 2 µl „5x HOT FIREpol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX)" und 0,5 µl pro Primer (5 pmol) vorgelegt. Das jeweilige template wurde anschließend in einem Volumen von 7 µl zugegeben, sodass jeder Ansatz 10 µl enthielt. Die qPCR erfolgte mit dem „7900HT Fast Real-Time PCR System with 384-Well Block Module" (Applied Biosystems, TM of Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach folgendem Protokoll: 95 °C, 15 min; 40 x (95 °C, 15 s; 60 °C, 20 s; 72 °C, 20 s); 1 x Aufnahme der Schmelzkurve (95 °C, 15 s; 60 °C, 15 s; 95 °C, 15 s).

Die Analyse der Daten erfolgte mit der zum *Cycler* gehörigen Software SDS 2.4. Ansätze, bei denen die Schmelzkurve einen unsauberen *Peak* und damit Nebenprodukte oder Primer-Dimere anzeigte, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Bei einer PCR-Effizienz von 100 % hätte die zugehörige Standardkurve eine Steigung von –3,32. Für die gezeigten Daten wurden Effizienzen zwischen 81 % und (rechnerisch) 116 % erreicht. Der Determinationskoeffizient (R^2) der einbezogenen Standardkurven lag bei mindestens 0,97. Die Kontrolle ohne *template* (NTC) war nicht detektierbar.

Für die Berechnung der Kopienzahl wurde der Effizienzwert E (berechnet über $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$) der einzelnen Primerpaare sowie der Median der C_t-Werte der gemessenen Triplikate herangezogen. Die Berechnung erfolgte entsprechend der effizienzkorrigierten relativen Quantifizierung nach Pfaffl (PFAFFL 2001):

$$ratio = \frac{E_{reference}^{C_t(reference)}}{E_{target}^{C_t(target)}}(sample) \div \frac{E_{reference}^{C_t(reference)}}{E_{target}^{C_t(target)}}(calibrator)$$

Beispielhaft für YIplac211-KanKanMX4-Transformanten entspricht die Berechnung für die Kopienzahl des *URA3*-Allels dabei: (i) Normierung innerhalb jedes Stammes auf die LEU-PCR; (ii) Kalibrierung auf den Mittelwert fünf untransformierter Stämme in der Annahme, dass das URA:LEU-Allel-Verhältnis hier 1:1 ist:

$$\text{URA/LEU (Stamm X)} = \frac{E_{LEU}^{C_t(LEU)}}{E_{URA}^{C_t(URA)}}\text{(Stamm X)} \div \frac{E_{LEU}^{C_t(LEU)}}{E_{URA}^{C_t(URA)}}\text{(Mittelwert fünf untransformierter Stämme)}$$

Beispielhaft für YIplac211-KanKanMX4-Transformanten entspricht die Rechnung für die Kopienzahl des KanKanMX4-Moduls dabei: (i) Normierung innerhalb jedes Stammes auf die LEU-PCR; (ii) Kalibrierung auf den Stamm mit dem niedrigsten Wert für KanKan in der Annahme, dass hier eine einzelne Integration vorliegt und das KanKan:LEU-Verhältnis 1:1 beträgt:

$$\text{KanKan/LEU (Stamm X)} = \frac{E_{LEU}^{C_t(LEU)}}{E_{KanKan}^{C_t(KanKan)}}\text{(Stamm X)} \div \frac{E_{LEU}^{C_t(LEU)}}{E_{KanKan}^{C_t(KanKan)}}\text{(Stamm mit dem niedrigstem Wert)}$$

Für die Berechnung der KanKanMX4-Kopienzahl der pRS316-KanKanMX4 transformierten Stämme wurde der KanKan-Wert auf die LEU-PCR normiert und anschließend auf ein mitgeführtes Plasmid, das sowohl das KanKanMX4-Modul als auch den *LEU2*-Marker enthält, kalibriert.

2.2.3 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

2.2.3.1 Zellaufschluss von Hefezellen zur Proteinextraktion

50 ml-Übernachtkulturen wurden bei einer Zelldichte von 1–3 × 10^7 Zellen/ml geerntet (Zentrifugation für 5 min bei 2000 rpm) und einmal mit H_2O gewaschen. Die Zelllyse erfolgte mit Glaskügelchen in einem FastPrep-Apparat in 200 µl 1x Laemmli-Probenpuffer und 10 µl Sigma Protease-Inhibitor. Der erhaltene Gesamtzellextrakt wurde bei 4 °C für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der zellfreie Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden entweder direkt gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe unten) oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –20 °C aufbewahrt.

2.2.3.2 SDS-PAGE, Western Blot und immunochemische Detektion

Um G2-getaggte Proteine im Gesamt-Zelllysat (siehe oben) nachzuweisen, wurden die Proteine des Lysats zunächst mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Größe getrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und die G2-getaggten Proteine wurden mit einem Clb2-spezifischen Antikörper immunochemisch detektiert.

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE nach (LAEMMLI 1970) werden Proteine in Gegenwart des Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS), das heißt unter denaturierenden Bedingungen, nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Durch das diskontinuierliche System aus Sammel- und Trenngel wird eine scharfe Trennung erreicht, da die Proteine am Übergang zwischen Sammelgel und Trenngel konzentriert werden.

Vor der Auftragung auf das Gel wurden die Proben für 5 min bei 95 °C in Laemmli-Probenpuffer denaturiert. Die Auftrennung von jeweils 40 µl Proteinextrakt erfolgte auf einem 8 %igen Trenngel (mit 5 %igem Sammelgel) der Größe 12 x 18 cm bei 25–35 mA. Die Proteine wurden mit einem *semi-dry*-Verfahren in einem Elektroblotter auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (1:45 h bei 200 mA). Der Erfolg des Blots wurde durch Anfärben der Proteine auf der Membran mit Ponceau-S-Lösung überprüft. Anschließend erfolgte die immunochemische Detektion mit Hilfe des WesternBreeze®-Kits (Invitrogen) nach dem Protokoll des Herstellers: Hierbei wurden zunächst alle noch freien, proteinaffinen Bereiche geblockt (*Blocking*) und die gewaschene Membran dann in einer Lösung mit dem ersten Antikörper inkubiert (hier *rabbit polyclonal* anti-Clb2 (sc-9071); 1:300; über Nacht) und erneut gewaschen.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem sekundären Antikörper (hier *anti-rabbit*; 60 min), der den primären Antikörper erkennt und mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist. Zur Entwicklung des Blots wurde ein chemilumineszentes AP-Substrat zu der erneut gewaschenen Membran gegeben, dessen Umsetzung mit dem ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare) sichtbar gemacht wurde (hier 2 min Belichtung bei hoher Sensitivität).

2.2.4 KULTIVIERUNG UND GENETISCHE MANIPULATION VON *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

2.2.4.1 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Alle verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme waren Derivate des Stammes CEN.PK2-1C/-1D (Seite 35). Die Kultur erfolgte, sofern nicht anders angegeben, im jeweiligen Flüssigmedium (Seite 46) bei 30 °C im Inkubationsroller oder im Schüttler. Kleine Volumina wurden in Glas-Reagenzgläsern, größere Volumina in Erlenmeyerkolben angesetzt. Ausstriche auf Nährmediums-Platten (Seite 46) wurden in der Regel für 2–4 Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Für selektive Bedingungen wurde dem jeweiligen Nährmedium entweder ein toxischer Stoff zugesetzt (Selektion auf Resistenzmarker; z.B. *NAT*, das Resistenz gegen Nourseothricin vermittelt) oder eine essenzielle Aminosäuere oder Nukleobase fehlte dem Medium (Selektion auf Prototrophiemarker; z.B. *URA3*, das die Zellen prototroph für Uracil macht).

Für viele der im Folgenden beschriebenen Methoden war es wichtig, dass sich die Hefezellen in der exponentiellen Wachstumsphase (log-Phase; bis etwa 5×10^7 Zellen/ml) befanden. Hier teilen sich die Zellen mit maximaler Wachstumsrate. So durchlaufen sie regelmäßig alle Phasen des Zellzyklus und können beim Animpfen einer neuen Kultur direkt mit maximaler Teilungsrate weiterwachsen. Die Teilungsaktivität ist auch für die Untersuchung des Effekts DNA-schädigender Agenzien bzw. bei der Untersuchung replikationsabhängiger Prozesse zu beachten. Um die Zelldichte einer Kultur zu bestimmen, wurde die Zellzahl mit einer „Neubauer *improved*"-Zählkammer (Hämocytometer) bestimmt. Dabei wurden stets mindestens 200 Zellen gezählt, um den statistischen Fehler gering zu halten.

Die kurzfristige Aufbewahrung von Platten-Ausstrichen der Stämme erfolgte für wenige Wochen bei 4 °C. Langfristig wurden neu konstruierte Stämme bei –80 °C archiviert. Dazu wurden 1,5 ml einer Flüssigkultur vor dem Einfrieren mit 7 % (v/v) DMSO versetzt.

2.2.4.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Für die im Folgenden beschriebenen Methoden zur genetischen Manipulation von *S. cerevisiae* war es notwendig, DNA von außen in die Zellen einzuschleusen, also die Hefezellen zu transformieren. Da die Transformation mit linearer DNA (gereinigte PCR-Produkte oder linearisierte Plasmide) weniger effizient verläuft als die Transformation mit zirkulären Plasmiden, wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet.

Transformation mit linearer DNA zur chromosomalen Integration

Die Zellzahl einer Übernachtkultur des zu transformierenden Stammes wurde bestimmt und 50 ml YPD (mit 100 µg/ml Ampicillin zur Unterdrückung bakterieller Kontaminationen) wurden so angeimpft, dass die neue Kultur am nächsten Morgen eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml hatte. War dies der Fall, wurde die Kultur für 3 min bei 4000 rpm abzentrifugiert, das Zellpellet mit 20 ml sterilem Wasser gewaschen und die Zellen erneut sedimentiert (3 min, 4000 rpm). Das Zellpellet wurde in 1,5 ml frisch hergestelltem TE/LiAc (1x TE; 0,1 M LiAc) aufgenommen und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde kurz in der Tischzentrifuge abzentrifugiert (5–10 s) und die Zellen in 300 µl TE/LiAc resuspendiert. Das gespaltene Plasmid oder das erzeugte PCR-Produkt wurde im Vorfeld mit Ethanol gefällt und als trockenes Pellet bei –20 °C aufbewahrt. Das DNA-Pellet wurde nun frisch in einer möglichst kleinen Menge (10 µl pro Transformationsansatz) TE/LiAc resuspendiert. Die verwendete DNA-Menge lag zwischen 0,1 und 10 µg, je nach Herkunft der DNA und Ausbeute der PCR.

Für den Transformationsansatz wurden 200 µl der Zellsuspension mit 10 µl der einzuschleusenden DNA in TE/LiAc und 10 µl einer Carrier-DNA (10 mg/ml Lachssperma-DNA) vermischt und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen kurz resuspendiert und es wurde 1 ml frisch mit sterilem Wasser angesetztes PEG/LiAc (1x TE; 0,1 M LiAc; 40 % PEG 4000) zugegeben, die Mischung kurz umgeschwenkt und für weitere 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach kurzem Umschwenken erfolgte eine 45-minütige Inkubation bei exakt 42 °C im Wasserbad, während der die DNA von den Zellen aufgenommen werden sollte. Im Anschluss wurden die Zellen in der Tischzentrifuge (5 s) sedimentiert, in 1 ml TE resuspendiert, erneut kurz abzentrifugiert und in 1 ml YPD aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein Kulturröhrchen mit weiteren 9 ml YPD gegeben und für 3 h langsam bei 30 °C gerollt. Während dieser Kur kann die Integration der DNA in das Genom der Hefe geschehen und es besteht ausreichend Zeit zur Expression der Resistenz- oder Prototrophiemarker-Gene. Abschließend wurden die Zellen für 2 min bei 4000 rpm abzentrifugiert, das Pellet in 300 µl TE resuspendiert und die Zellen auf den jeweiligen Selektiv-Nährmedien ausplattiert. Die Platten wurden für 2–3 Tage bei 30 °C inkubiert und gewachsene Kolonien wurden auf Selektivmedium vereinzelt. Das weitere Vorgehen richtete sich nach dem jeweiligen Experiment.

Transformation mit zirkulären, episomalen Plasmiden

50 ml YPD wurden mit 1 ml einer Übernachtkultur des zu transformierenden Stammes angeimpft. und für 3–4 h im 30 °C-Schüttler inkubiert. Die Kultur wurde abzentrifugiert (jeweils 2 min, 4000 rpm), das Pellet zunächst mit 50 ml und nach der zweiten Zentrifugation mit 25 ml sterilem Wasser gewaschen. Nach erneuter Sedimentation wurden die Zellen in 1 ml sterilem H_2O aufgenommen und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde kurz in der Tischzentrifuge abzentrifugiert (5–10 s) und die Zellen erneut in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert.

Für den Transformationsansatz wurden ca. 1 µg der Plasmid-DNA, 10 µl Carrier-DNA (10 mg/ml Lachssperma-DNA), 36 µl 1 M LiAc und 240 µl 50 % PEG 4000 mit sterilem H_2O auf 360 µl ergänzt. Zu dieser Mischung wurden 100 µl der Zellsuspension gegeben und der gesamte Transformationsansatz

wurde durch Vortexen vermischt und für 40 min bei 42 °C im Heizblock inkubiert. Währenddessen wurde das Reaktionsgefäß etwa alle 15 min einmal invertiert, um die Zellen zu resuspendieren. Anschließend wurden die Zellen für 30 s in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand wurde möglichst vollständig entfernt. Die Zellen wurden in 1 ml sterilem Wasser aufgenommen und auf entsprechenden Selektiv-Platten ausplattiert. Nach 2–3 Tagen bei 30 °C wurden gewachsene Transformanten, wenn nötig, vereinzelt.

2.2.4.3 PCR-basierte Gendeletion und Verifikation der Deletion mittels PCR-*Screen*

Die für diese Arbeit konstruierten *S. cerevisiae*-Stämme mit *PSO2*-Deletion wurden mit Hilfe PCR-basierter Gendeletion nach WACH *et al.* (1994) hergestellt. Dabei wird das Zielgen im Genom der Hefe durch ein Markergen ersetzt. Der Austausch geschieht durch homologe Rekombination und wird dadurch provoziert, dass das Markergen vor der Transformation mit Hilfe einer PCR mit zum Zielgen homologen Flanken versehen wird. Abbildung 2.3 zeigt ein allgemeines Schema.

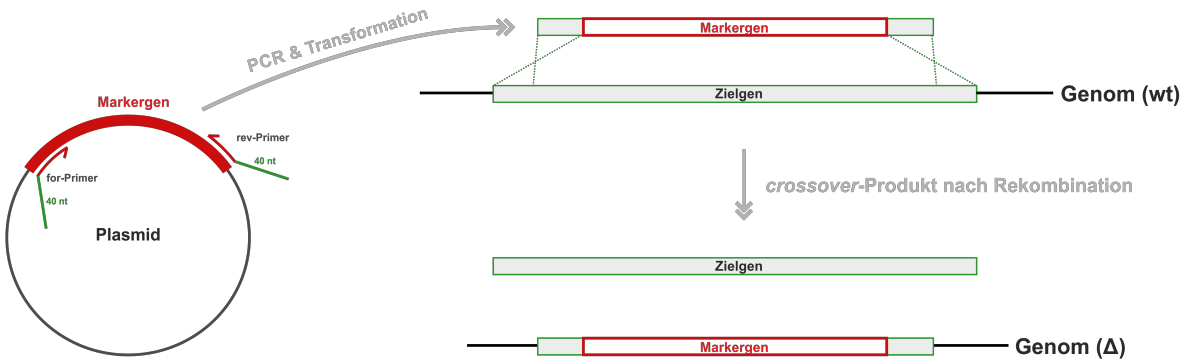


Abbildung 2.3: **Allgemeines Schema der PCR-basierten Gendeletion.** Über eine PCR werden zu den Enden des Zielgens homologe Bereiche an das Markergen angefügt. Zellen von *S. cerevisiae* werden mit dem erhaltenen PCR-Produkt transformiert. In einigen der Zellen kommt es zum Austausch des Zielgens gegen das Markergen über homologe Rekombination (grüne, gestrichelte Linien). Diese können anhand des nun im Genom vorhandenen Markergens selektiert werden. Der Verlust des Zielgens bzw. seine fast vollständige Disruption durch Einfügen der Markerkassette führen somit zu einer Deletionsmutante.

PSO2 wurde durch die KanMX4-Markerkassette ersetzt, die eine Resistenz gegenüber G418 vermittelt. Dieser Marker war noch in keinem der Stamm-Hintergründe, in dem die *PSO2*-Deletion vorgenommen wurde (wt, *mph1*Δ, *G2-MPH1*), vorhanden. Das Markergen wurde mittels PCR (Seite 51) mit dem Plasmid pFA6-KanMX4 als *template* amplifiziert. Dabei wurden über die Primer Sequenzen angefügt, die homolog zu den ersten bzw. letzten 40 bp des offenen Leserahmens des zu deletierenden Zielgens waren. Das Plasmid wurde zur Steigerung der Ausbeute der PCR zuvor mit *Not*I linearisiert. Das PCR-Produkt wurde mit Ethanol gefällt (Seite 50) und für die Transformation von *S. cerevisiae* verwendet (Seite 61). Zur Selektion von Zellen, in denen bei der Rekombination zwischen dem PCR-Produkt und dem Zielgen ein reziproker Austausch stattgefunden hat, wurden die Transformationsansätze nach der Kur auf YPD+G418 ausplattiert. Nach Vereinzelung der Transformanten wurde von mehreren Klonen genomische DNA extrahiert (Seite 53), um die Deletion per PCR-Screen zu überprüfen.

Jeder PCR-Screen bestand aus vier PCRs, die in Abbildung 2.4 schematisch dargestellt sind. Die „5'-*flank*-PCR" und die „3'-*flank*-PCR" liefern nur bei korrekter Integration des Markers in den Lokus des Zielgens ein Produkt. Die „*gene*-PCR" greift den gesamten Zielgen-Lokus ab und es ergeben sich beim wt-Allel und bei korrekter Deletion unterschiedliche Produktgrößen. Bei der vierten PCR, der „*intern*-PCR" handelt es sich um eine Kontrolle, ob das Zielgen tatsächlich nicht mehr in der genomischen DNA zu finden ist. Theoretisch wäre es möglich, dass das bei der homologen Rekombination am Zielgen-Lokus herausgeschnittene Zielgen ektopisch über NHEJ an einer zufälligen Stelle des Hefegenoms integriert wurde. In diesem Fall könnte die Transformante unter Umständen weiterhin das Zielgen exprimieren und wäre keine funktionale Nullmutante. Nur wenn die „*intern*-PCR" bei der genomischen DNA der zu prüfenden Transformanten kein Produkt liefert, kann die ektopische Integration ausgeschlossen werden. Nur Transformanten, die in allen PCRs des Screens das erwartete Ergebnis zeigten, wurden archiviert und in den weiteren Versuchen phänotypisch untersucht.

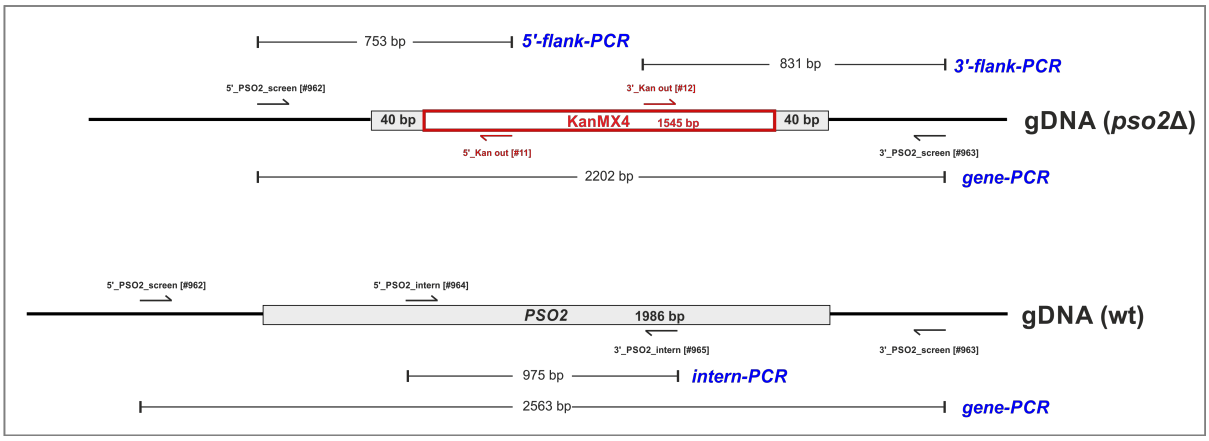


Abbildung 2.4: **Schema des PCR-Screens zur Überprüfung der mittels PCR-basierter Gendeletion hergestellten *PSO2*-Deletionsmutanten.** Die PCRs wurden mit genomischer DNA der zu testenden Stämme durchgeführt. „5'-*flank*-PCR" und „3'-*flank*-PCR" zeigen die korrekte Integration des Markers in den Lokus des Zielgens. Bei der „*gene*-PCR" ergeben sich beim wt-Allel und bei korrekter Deletion unterschiedliche Produktgrößen. Die „*intern*-PCR" schließt eine ektopische Integration des ausgeschnittenen Zielgens aus. Die genauen Primersequenzen sind auf Seite 42 nachzuschlagen.

2.2.4.4 PCR-basiertes *Tagging* und Überprüfung der Insertion mittels PCR-Screen

Analog zur PCR-basierten Gendeletion (Seite 62) erfolgte auch die Insertion des G2-*Tags* vor den offenen Leserahmen der Gene *MPH1*, *RAD5*, *RAD51*, *RAD52* und *RAD54* mit Hilfe einer Methode, die auf der Erzeugung eines PCR-Produkts mit zum Zielgen homologen Flanken und dessen Integration am Lokus des Zielgens über homologe Rekombination beruht.

Das G2-*Tag* wurde von KARRAS & JENTSCH 2010 beschrieben und vermittelt die Restriktion der Expression des getaggten Gens auf die G2/M-Phase. Das getaggte Gen wird unter die Kontrolle des Promotors des mitotischen Cyclins Clb2 von *S. cerevisiae* (p*CLB2*) gestellt, der spezifisch in der G2/M-Phase aktiv ist. Außerdem wird vor dem offenen Leserahmen des Zielgens *in frame* eine Sequenz eingefügt, die für die N-terminalen 180 Aminosäuren von Clb2 codiert (*CLB2_1-180*). Dieser Bereich des Clb2-Proteins enthält D- und KEN-Boxen, die den proteasomalen Abbau von Clb2 bzw. der erzeugten Fusionsproteine am Ende der G2/M-Phase vermitteln.

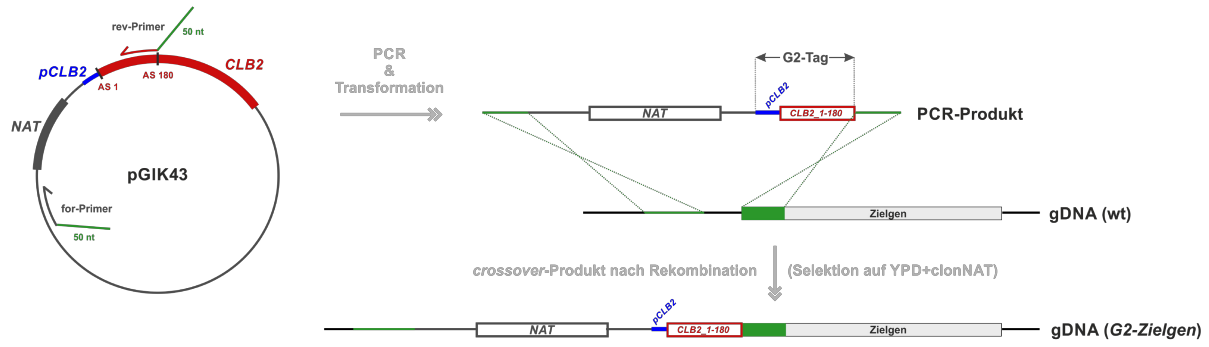


Abbildung 2.5: **Schema der PCR-basierten Insertion des G2-*Tags*.** Über eine PCR werden zum Zielgen homologe Bereiche an die G2-*Tag*-Insertionskassette angefügt. Der rev-Primer besitzt einen 5'-Überhang von 50 nt, die den ersten 50 nt des offenen Leserahmens (natürlich *reverse complement*) des Zielgens entsprechen. Der for-Primer trägt einen 5'-Überhang von 50 nt, die homolog zu den Positionen 80–31 *upstream* des Startcodons des Zielgens sind. Zellen von *S. cerevisiae* werden mit dem erhaltenen PCR-Produkt transformiert. In einigen der Zellen kommt es zum Austausch über homologe Rekombination (grüne, gestrichelte Linien). Diese können anhand des nun im Genom vorhandenen Markergens *NAT* selektiert werden. Die Insertion des G2-*Tags* führt dazu, dass unter Kontrolle des *CLB2*-Promotors (p*CLB2*) ein Fusionsprotein spezifisch in G2/M exprimiert wird.

Das G2-*Tag* wurde zusammen mit dem *NAT*-Resistenzgen in das Genom integriert (Abbildung 2.6). Die Integrationskassette aus *NAT* und G2-*Tag* lag auf dem Vektor pGIK43 vor, der von der Arbeitsgruppe von Prof. Stefan Jentsch (MPI für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt wurde. Über eine PCR wurde die Integrationskassette (2787 bp) mit *Pvu*I-gespaltenem pGIK43 als *template* amplifiziert. Dabei wurden an beiden Ende 50 bp lange Bereiche angefügt, die homolog zum gewünschten Insertionsort auf dem Hefechromosom waren. Für den bei der Insertion herausfallenden Teil des genomischen Lokus wurde eine Länge von nur 30 bp gewählt, um benachbarte Gene durch die Insertion möglichst nicht zu beeinträchtigen. Die mit Ethanol gefällten PCR-Produkte wurden für die Transformation von *S. cerevisiae* (Seite 61) eingesetzt und die Transformanten mit geglückter Insertion durch Plattierung auf YPD+ClonNAT selektiert. Nach Vereinzelung der Transformanten wurde von mehreren Klonen genomische DNA extrahiert (Seite 53), um die Insertion des *Tags* per PCR-Screen zu überprüfen.

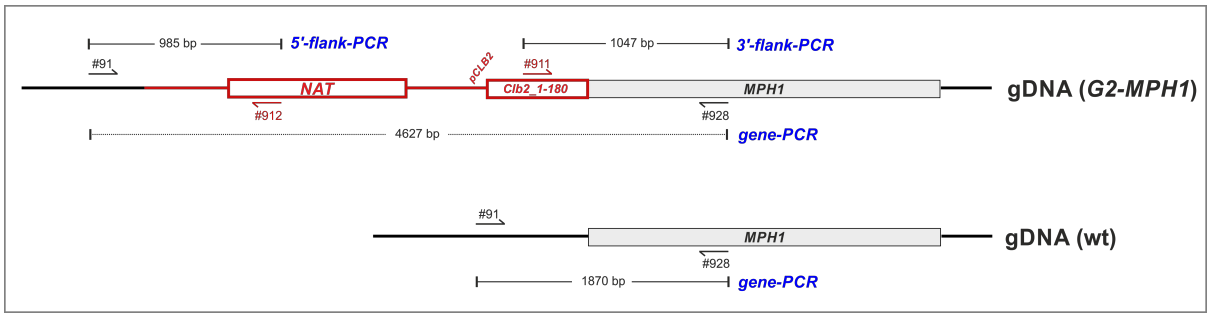


Abbildung 2.6: **Schematische Darstellung des PCR-Screens zur Überprüfung der Insertion des G2-*Tags* am Beispiel des *MPH1*-Lokus.** Die PCRs wurden mit genomischer DNA der zu testenden Stämme durchgeführt. „5'-*flank*-PCR" und „3'-*flank*-PCR" zeigen die korrekte Integration des *Tags* am Lokus des Zielgens. Bei der „*gene*-PCR" ergeben sich beim wt-Allel und bei korrekter Deletion unterschiedliche Produktgrößen. Primersequenzen: Seite 40f.

Jeder PCR-Screen bestand aus drei PCRs, die in Abbildung 2.6 exemplarisch für den *MPH1*-Lokus dargestellt sind. Die „5'-*flank*-PCR" und die „3'-*flank*-PCR" liefern nur bei korrekter Integration der *NAT*-G2-Kassette

am Lokus des Zielgens ein Produkt. Bei der „*gene*-PCR“ ergeben sich beim wt-Allel und bei korrekter Insertion unterschiedliche Produktgrößen, wobei das Produkt bei den G2-Stämmen aufgrund seiner Größe zumeist nicht amplifiziert wurde. Eine Übersicht über die Primerkombinationen und erwarteten Produktgrößen der PCR-Screens für alle konstruierten G2-Stämme ist in Tabelle 2.3 gezeigt. Nur Transformanten, die in allen PCRs des Screens das erwartete Ergebnis zeigten, wurden archiviert und in den weiteren Versuchen phänotypisch untersucht. Wenn möglich, wurden mehrere unabhängige Transformanten untersucht.

Tabelle 2.3: **Primerkombinationen und erwartete Produktgrößen der PCR-Screens für alle konstruierten G2-Stämme.** Alle Primersequenzen sind auf Seite 40f nachzulesen. Theoretisch liefern die *gene*-PCRs auch auf die genomische DNA der G2-Stämme ein Produkt, das jeweils 2757 bp länger ist als das Produkt bei einem wt-Lokus. Dieses wurde aber bei den gewählten PCR-Bedingungen nicht amplifiziert und ist für die Stamm-Überprüfung nicht relevant.

Stamm	„5‘-*flank*-PCR“ [G2]	„3‘-*flank*-PCR“ [G2]	„*gene*-PCR“ [wt]
G2-MPH1	#91/#912 985 bp	#911/#928 1047 bp	#91/#928 1870 bp
G2-RAD5	#109/#912 741 bp	#911/#108 2132 bp	#109/#108 2711 bp
G2-RAD51	#767/#912 643 bp	#911/#488 1031 bp	#767/#488 1372 bp
G2-RAD52	#976/#912 309 bp	#911/#202 575 bp	#976/#202 582 bp
G2-RAD54	#357/#912 322 bp	#911/#359 700 bp	#357/#359 720 bp

2.2.4.5 *Gene replacement* und zugehöriger PCR/Restriktionsverdau-Screen

Alle *S. cerevisiae*-Stämme mit *MPH1*-Allelen mit Mutationen an putativen Phosphorylierungsstellen sowie der Stamm mit dem *Clb2-R25A-RAD51*-Allel wurden mittels *gene replacement* konstruiert. Dabei wird das chromosomale Allel des betreffenden Gens gegen das mutante Allel ausgetauscht. Außer den gewünschten Veränderungen (hier Punktmutationen oder *Tags*) bleiben keine Rückstände der „gentechnischen Operation“, z.B. Markergene, im Chromosom zurück.

Für das *gene replacement* wird ein Vektor benötigt, der folgende Elemente beinhaltet:

- das ins Genom einzubringende Allel, flankiert von Regionen, die homolog zum chromosomalen Genlokus sind
- eine nur einmal im Plasmid vorhandene Restriktionsschnittstelle innerhalb dieser flankierenden Region, mit der das Plasmid linearisiert werden kann
- einen Marker, mit dem positive und negative Selektion möglich ist (hier *URA3*: die von *URA3* codierte Oritidin-5‘-phosphat-Decarboxylase vermittelt Uracil-Prototrophie, wandelt aber auch das Basenanalog 5-FOA in das toxische 5-Fluoro-Uridin um → Selektion auf Zellen mit *URA3* auf SC-Ura, Selektion auf Zellen ohne *URA3* auf SC+5-FOA möglich)
- keinen eukaryotischen Replikationsursprung (integratives Plasmid)

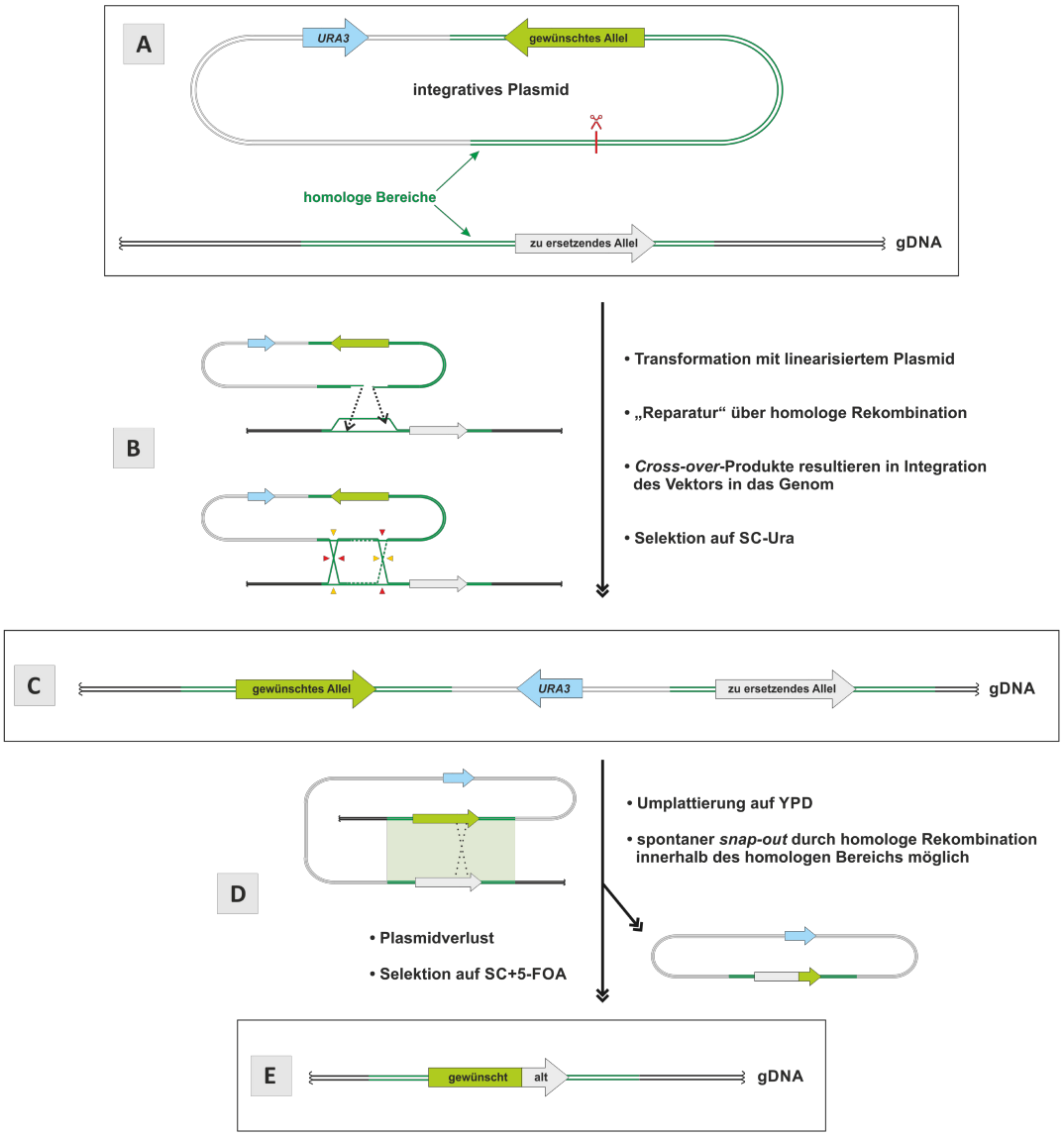


Abbildung 2.7: **Schema der *gene replacement*-Methode.** Der linearisierte Vektor trägt das gewünschte Allel flankiert von zum Zielort homologen Bereichen (A) und wird nach der Transformation über homologe Rekombination am Zielort integriert (B). Die resultierenden Zellen sind Uracil-prototroph (C). Bei Wegfall der restriktiven Kulturbedingungen geschieht in einigen Zellen durch homologe Rekombination zwischen dem eingeführten und dem im Ausgangsstamm vorhandenen Allel ein spontaner *snap-out*. Die herausgeschnittene Sequenz kann nicht autonom repliziert werden und geht verloren (D). Die resultierenden Zellen überleben im Gegensatz zu *URA3*-positiven Transformanten auf 5-FOA-haltigem Medium. Das Resultat (E) muss auf alle gewünschten Veränderungen überprüft werden, da der Übergang der beiden Allele an einer zufälligen Position innerhalb des homologen Bereichs liegt.

Der Ablauf des *gene replacements* ist in Abbildung 2.7 schematisch gezeigt. Das Plasmid wird in der flankierenden Sequenz gepalten und *S. cerevisiae* wird mit dem linearisierten Plasmid transformiert. Der Schnitt im Plasmid stellt einen Doppelstrangbruch dar, der von der zellulären Reparaturmaschinerie erkannt wird. Kommt es im Zuge der versuchten Reparatur zu einer homologen Rekombination mit dem chromosomalen Lokus des Zielgens, kann es zur Ausbildung einer doppelten *Holliday junction* kommen. Wird diese zu einem *crossover*-Produkt aufgelöst, kommt es zur Integration des gesamten Plasmids in das Chromosom. In diesem Fall können die resultierenden Zellen, auch nach einer Vereinzelung, auf SC-Ura

wachsen. Die Transformanten tragen in diesem Stadium sowohl das zuvor bereits vorhandene als auch das durch den Vektor eingebrachte Allel des Zielgens. Werden die Zellen für einige Tage auf nicht-selektivem Medium gehalten, kann es zu einem spontanen *snap-out* kommen. Dabei kommt es durch homologe Rekombination zwischen den beiden Allelen des Zielgens zu einem Verlust der zuvor inserierten Vektorsequenz. Da hierbei auch der *URA3*-Marker verloren geht, können Zellen mit *snap-out* auf 5-FOA-haltigem Medium selektiert werden. Da die homologe Rekombination an jeder beliebigen Stelle im Zielgen passieren kann, tragen die Zellen nach dem *snap-out* allerdings unterschiedlich große Anteile des ursprünglichen und des eingebrachten Allels. Die Anwesenheit aller gewünschten Veränderungen muss daher über geeignete Screening-Verfahren überprüft werden.

Konstruktion der Stämme mit *MPH1*-Mutationen an putativen Phosphorylierungsstellen

Das jeweilige Derivat des Vektors pRS306_MPH1-mut (vgl. Tabelle 2.1) wurde *Box*I-linearisiert zur Transformation von *S. cerevisiae* (Seite 61) eingesetzt. Die Stämme *MPH1-T540A/S542A* und *MPH1-T540E/S542E* wurden durch Transformation des Wildtyp-Stamms mit den jeweiligen pRS306-Derivaten erzeugt. Für die Stämme mit Mutationen an den anderen Phosphorylierungsmotiven wurden zunächst die Stämme *MPH1-5AQ* und *MPH1-5EQ* konstruiert. Im Folgenden wurden alle Stämme mit Alanin-Mutationen an den hinteren Motiven ausgehend von *MPH1-5AQ* und alle Stämme mit Glutamat-Mutationen an den hinteren Motiven ausgehend von *MPH1-5EQ* hergestellt. So wurde die Ausbeute positiver Klone erhöht, da bei dem oben beschriebenen *gene replacement* das Vorliegen des gewünschten Austausches nach dem *snap-out* umso unwahrscheinlicher ist, je weiter hinten im Gen die Veränderung liegt.

Tabelle 2.4: **PCR/Restriktionsverdau-Screen zur Überprüfung der Mutationen putativer Phosphorylierungsstellen in *MPH1*.** Angegeben ist die Primerkombination (Primersequenzen siehe Seite 39) zur Amplifizierung der Umgebung der Phosphorylierungsmotive, die zugehörige Größe des PCR-Produkts sowie die Restriktionsenzyme, die zur Überprüfung des Vorliegens der jeweiligen Mutation eingesetzt wurden. Die Spaltung des PCR-Produkts in Fragmente der angegebenen Größe zeigte demnach das Vorhandensein der jeweiligen Mutation an.

	Primerkombination **Größe des PCR-Produkts**	**Restriktionsenzym(e)**	**Fragmentgrößen nach Spaltung**
Vorderes Doppelmotiv	#920/#927 632 bp	2AQ: *Mlu*I 2EQ: *Nsi*I	66 bp + 566 bp 66 bp + 566 bp
TQ-Motiv	#921/#926 785 bp	AQ: *Nsb*I/*Fsp*I EQ: *Bpu*1102I/*Blp*I	216 bp + 569 bp 216 bp + 569 bp
Hinteres Doppelmotiv	#922/#925 834 bp	2AQ: *Sal*I 2EQ: *Pag*I/*Bsp*HI	257 bp + 577 bp 237 bp + 597 bp
T540/S542-Motiv	#921/#926 785 bp	A: *Pvu*I E: *Pfo*I	99 bp + 686 bp 141 bp + 644 bp

Die Selektion der Zellen mit Integrationen und die anschließende Selektion der *snap-out*-enthaltenden Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Von einigen 5-FOA-resistenten Kolonien wurde genomische DNA extrahiert (Seite 53) und auf das Vorhandensein aller gewünschten Mutationen überprüft. Dazu wurde eine Kombination aus PCR-Screen und Restriktionsverdau (Tabelle 2.4) angewendet: Zunächst wurde die

Region um die zu überprüfenden Mutationen mittels PCR amplifiziert (*Taq*-Polymerase; Seite 51). Da mit jeder Alanin- oder Glutamat-Mutation in direkter Nachbarschaft stille Mutationen zur Erzeugung einer neuen Restriktionsschnittstelle eingeführt worden waren, konnten die erhaltenen PCR-Produkte nun mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen analysiert werden. Abbildung 7.1 (im Anhang; Seite 172) zeigt den Screen beispielhaft an der Überprüfung des Stammes *MPH1-2AQ-EQ-2AQ*. Pro konstruiertem Stamm wurde bei einem Klon der gesamte offene Leserahmen von *MPH1* sequenziert (Seite 54). Die sequenzierten Klone wurden für die weitere phänotypische Untersuchung verwendet.

Konstruktion des Stammes *Clb2-R25A-RAD51*

Der Vektor pRS306_Clb2-1-180-R25A_Rad51 (Seite 56) wurde *Bam*HI-linearisiert zur Transformation von *S. cerevisiae* (Seite 61) eingesetzt. Die Selektion der Zellen mit Integrationen und die anschließende Selektion der *snap-out*-enthaltenden Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Von einigen 5-FOA-resistenten Kolonien wurde genomische DNA extrahiert (Seite 53) und auf das Vorhandensein des Clb2-1-180-R25A-*Tags* überprüft. Dazu wurde der in Abbildung 2.8 dargestellte PCR-Screen durchgeführt. Das entsprechend größere Produkt der „*gene*-PCR“ sowie das Auftreten des „3‘-*flank*-Produktes“ zeigen die erfolgreiche Integration des *Tags*. Drei unabhängige Transformanten mit integriertem *Tag* wurden für die phänotypischen Experimente verwendet.

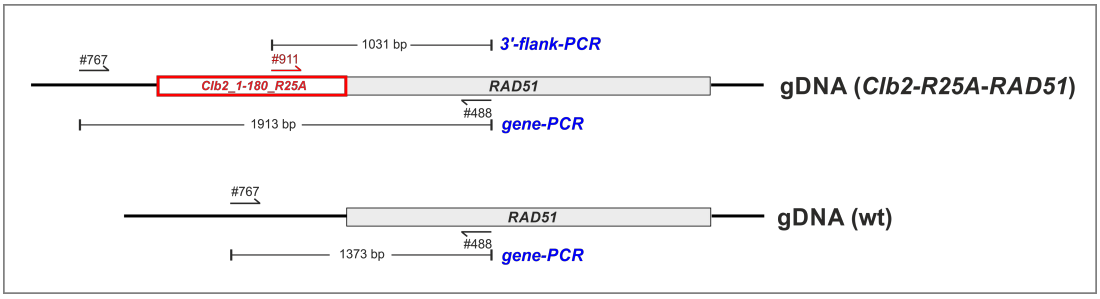


Abbildung 2.8: **PCR-Screen zur Überprüfung der Insertion des N-terminalen Clb2-1-180-R25A-*Tags* bei *RAD51*.** Bei korrekter Insertion des Tags liefert die „*gene*-PCR“ ein um die Länge der inserierten Sequenz größeres Produkt. Die „3‘-*flank*-PCR“ führt nur bei erfolgreicher Insertion zu einem Produkt. Primersequenzen sind auf Seite 40f nachzulesen.

2.2.4.6 Chromosomale Integration von YIplac211-KanKanMX4 bzw. YIplac128-KanKanMX4

Zur Vorbereitung der Untersuchung von Schwesterchromatid-Interaktionen durch Quantifizierung spontaner und 4NQO-induzierter Reversionen des KanKanMX4-Moduls (Seite 77 bzw. Seite 75) wurden die zu untersuchenden *S. cerevisiae*-Stämme mit dem Plasmid YIplac211-KanKanMX4 oder YIplac128-KanKanMX4 transformiert, welche beide in das Genom integrieren.

YIplac211-KanKanMX4 enthält neben dem KanKanMX4-Modul den Prototrophiemarker *URA3*. Wird das Plasmid vor der Transformation durch Restriktionsspaltung innerhalb des *URA3* linearisiert, kann es zur chromosomalen Integration des gesamten Plasmids am chromosomalen *ura3-52*-Lokus über homologe Rekombination kommen. Die Transformante besitzt nun ein chromosomales, funktionales *URA3* und ein chromosomales KanKanMX4-Modul. Da das Plasmid keinen eukaryotischen Replikationsursprung (ARS) besitzt, kann sich YIplac211-KanKanMX4 nicht episomal in den Hefezellen etablieren. Für YIplac128-

KanKanMX4 gilt dasselbe, allerdings wird hier das Plasmid über seinen *LEU2*-Marker am genomischen *leu2-3,112*-Lokus integriert.

Pro zu transformierendem Stamm wurden 2–4 µg Plasmid mit *Eco*RV (YIplac211-KanKanMX4) bzw. *Afl*II (YIplac128-KanKanMX4) im *URA3* bzw. im *LEU2* gespalten. Der Erfolg der Spaltung wurde überprüft und ein Aliquot des Spaltansatzes wurde für die Transformation der *S. cerevisiae*-Stämme eingesetzt. Dazu wurde das verkürzte Transformationsprotokoll (Seite 61) verwendet, allerdings erweitert um eine 2-stündige Kur bei 30 °C in YPD im Anschluss an die Transformation. Der Erfolg der Integration über homologe Rekombination wurde durch Ausplattierung auf SC-Ura bzw. SC-Leu überprüft. Gewachsene Kolonien wurden erneut auf Selektivmedium vereinzelt, um Zellen auszuschließen, die aus einer Transformante mit nicht-integriertem Plasmid hervorgegangen waren und nur das Ura3-Protein oder seine mRNA vererbt bekommen hatten.

Patches ausgewählter, vereinzelter Transformanten wurden auf YPD+G418 gestempelt, um zu überprüfen, ob das Plasmid vollständig in das Chromosom integriert wurde. Beim KanKanMX4-Modul kommt es in einer kleinen Anzahl der Zellen zu einer spontanen Reversion, wodurch das KanMX4 und damit die G418-Resistenz wiederhergestellt wird. Bildeten sich im *Patch* also einzelne, kleine Kolonien (Papillen), war dies der Nachweis, dass das KanKanMX4-Modul integriert wurde. Diese Stämme wurden für die weiteren Versuche genutzt und als Gefrierkultur archiviert. Theoretisch wäre es auch denkbar, dass bei der homologen Rekombination zwischen Plasmid und Chromosom kein *crossover*-Produkt (notwendig für die Integration des Plasmids) entstanden ist, sondern lediglich das Wildtyp-Allel des Prototrophiemarkers *URA3* bzw. *LEU2* über Genkonversion ins Chromosom eingeschleust wurde. In diesem Fall könnten sich aber auf YPD+G418 keine Papillen bilden. Transformanten ohne Papillen wurden daher ausgeschlossen. Auch Transformanten, die vollständig G418-resistente Kolonien bildeten, wurden ausgeschlossen, da in diesem Fall alle Zellen bereits eine Reversion des KanKanMX4-Moduls tragen und sie daher für die weiteren Versuche unbrauchbar gewesen wären.

2.2.4.7 Kreuzung von Hefestämmen zur Herstellung von Doppelmutanten

Der *S. cerevisiae*-Stamm *G2-MPH1 G2-RAD5* wurde durch Kreuzung der jeweiligen Einzelmutanten unterschiedlichen *mating types* (*MAT*a und *MAT*α) und anschließende Sporulation hergestellt, da die G2-*Tag*-Kassette nur mit dem Marker *NAT* vorlag.

Da sowohl *G2-MPH1* als auch *G2-RAD5* nur als haploider *MAT*a-Stamm vorlagen, wurde zunächst *G2-RAD5 MAT*α konstruiert (Seite 63; Phänotyp entsprach *MAT*a *G2-RAD5*). Um aus *G2-MPH1 MAT*a und *G2-RAD5 MAT*α diploide Zygoten zu erzeugen, wurden Abstriche frischer Plattenkulturen in einem Reaktionsgefäß mit Wasser gemischt, auf YPD ausgestrichen und nach 2 Tagen Inkubation bei 30 °C nochmals auf eine frische YPD-Platte umgestrichen. Eine Selektion der Zygoten war aufgrund des identischen *NAT*-Markers nicht möglich. Auf ein händisches Selektieren der Zygoten von den Haplonten wurde verzichtet. Nach zwei weiteren Tagen Inkubation der YPD-Platte bei 30 °C wurden 2 ml Super-SPO-Medium mit den gewachsenen Zellen (nun teilweise diploid) angeimpft und für mehrere Tage bei 30 °C inkubiert. Durch den akuten Nährstoffmangel werden die Diplonten durch das Super-SPO-Medium zur Meiose angeregt und

bilden *Asci* mit jeweils vier Sporen (Tetraden). Ab dem zweiten Tag wurde die Kultur auf das Vorhandensein von Tetraden mikroskopisch untersucht. Um die Tetraden zu dissektieren, wurden schließlich 100 µl der Kultur mit 1 µl Zymolyase® (40 mg/ml) versetzt und für etwa 10 min bei 30 °C inkubiert. Der Fortschritt des Verdaus der *Ascus*-Wände durch die in der Zymolyase®-Mischung enthaltenen Enzyme wurde mikroskopisch überprüft. Der Verdau wurde durch Zugabe von 1 ml *P-solution* gestoppt, die Zellen für 3 min bei 3000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml *P-solution* aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf eine Platte mit DM-Agar (Dissektiermedium) gegeben und mit einem Mikromanipulator wurden unter dem Dissektiermikroskop einzelne Tetraden isoliert und aufgebrochen. Die vier einzelnen Sporen wurden an vorgegebenen Stellen der DM-Platte abgelegt. Nach zwei Tagen bei 30 °C wurden die aus den Sporen gewachsenen Kolonien als *Patches* auf YPD und YPD+ClonNAT ausgestrichen. Die ClonNAT-resistenten Kolonien einer Tetrade mit nicht-parentalem Dityp (zweimal Doppelmutante *G2-MPH1 G2-RAD5*, zweimal wt) wurden zusätzlich mittels PCR-Screen (Tabelle 2.3, Seite 65) auf den gewünschten Genotyp überprüft (Abbildung 7.3; Seite 173). Zusätzlich wurde mit Testerstämmen der *mating type* der erhaltenen Stämme bestimmt.

2.2.5 METHODEN ZUR PHÄNOTYPISCHEN UNTERSUCHUNG VON *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Um die im Rahmen dieser Arbeit neu konstruierten *S. cerevisiae*-Stämme zu charakterisieren, wurden sie im Vergleich mit dem Wildtyp-Stamm CEN.PK2-1C und im Vergleich untereinander sowie mit bereits vorhandenen Mutanten den im Folgenden näher ausgeführten Tests unterzogen. Dabei bildeten zumeist die für *mph1*Δ beschriebenen Phänotypen die Grundlage. Methodisch lag der Schwerpunkt hier bei den im Labor von W. Kramer durch jahrelange Vorarbeiten etablierten Verfahren. Insbesondere die Methode der Untersuchung von Schwesterchromatid-Interaktionen mit Hilfe des KanKanMX4-Moduls wurde Anfang der 2000er-Jahre in diesem Labor von C. Rudolph entwickelt (RUDOLPH 2003, EDE *et al.* 2011).

Wirkmechanismen der verwendeten DNA-schädigenden Agenzien

Für die phänotypischen Untersuchungen wurden verschiedene DNA-schädigende Agenzien eingesetzt, die unterschiedliche Arten von Läsionen bewirken. Deren Wirkmechanismen werden im Folgenden kurz erläutert und sind in Abbildung 2.9 gegenübergestellt.

Methylmethansulfonat (MMS) überträgt als alkylierendes Agens Methylgruppen auf Basen innerhalb der DNA. Dabei ist N7-Methylguanin (Abbildung 2.9-i) mit etwa 82 % das am häufigsten vertretene Produkt gefolgt von N3-Methyladenin mit ca. 11 % (BERANEK 1990). N7-Methylguanin wirkt nicht direkt replikationsarretierend, während beim N3-Methyladenin die Methylgruppe die notwendige Interaktion des N3 mit der DNA-Polymerase stört und so das Fortkommen der Polymerase behindert. Darüber hinaus destabilisiert die Methylierung – insbesondere bei N7-Methylguanin – die N-glykosidische Bindung und begünstigt dadurch Basenverlust und damit die Entstehung von *AP-sites* (*apurinic/apyrimidinic sites*), welche wiederum replikationsarretierend wirken. Darüber hinaus kommt es – besonders bei hoher Schadensdichte – zu einer Ansammlung von BER-Intermediaten, wenn die Zelle versucht

Methylierungsschäden und *AP-sites* zu beseitigen. Trifft die Replikation auf die BER-Intermediate, entstehen indirekt Strangbrüche bzw. kollabierte Replikationsgabeln, die durch rekombinationsabhängige Prozesse repariert werden müssen. (WYATT & PITTMAN 2006)

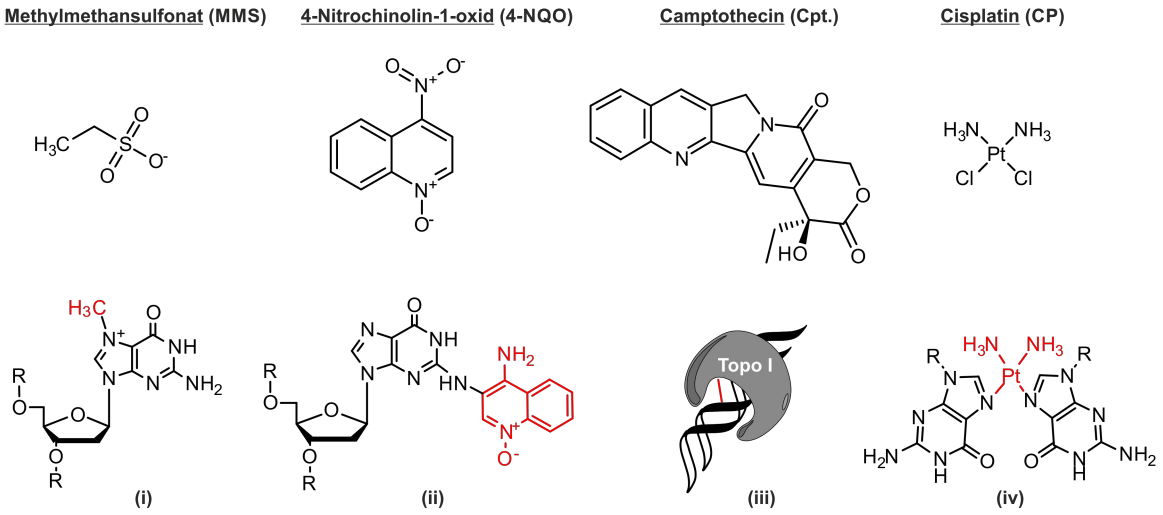


Abbildung 2.9: **Für phänotypische Untersuchungen von *S. cerevisiae* verwendete DNA-schädigende Agenzien und ihre jeweils typischen Produkte.** Methylmethansulfonat (MMS) ist ein methylierendes Agens, das Methylgruppen auf DNA-Basen übertragen kann. Dabei entsteht unter anderem N7-Methylguanin (i), welches etwa 80 % der Addukte darstellt. 4-NQO bildet nach metabolischer Aktivierung sperrige Addukte mit der DNA, z.B. mit einem Guanin-Nukleotid (ii). Camptothecin (Cpt.) inhibiert die Topoisomerase I (Topo I; iii) und führt dadurch indirekt zu Einzelstrangbrüchen in der DNA. Cisplatin (CP) kann als *interstrand crosslinker* gegenüberliegende Basen der DNA kovalent verbinden, z.B. zwei Guaninbasen innerhalb der Sequenz 5'-d(GC) (iv), erzeugt aber auch *intrastrand crosslinks* innerhalb der DNA. Details und Referenzen siehe Fließtext.

4-Nitrochinolin-1-oxid (4-NQO) bildet nach metabolischer Aktivierung sperrige Addukte mit den Basen der DNA (Abbildung 2.9-ii; TURESKY 1994), die die replikativen Polymerasen arretieren können. Darüber hinaus führt 4-NQO-Behandlung auch zu oxidativen Schäden, z.B. 8-Oxo-Guanin, und zu Strangbrüchen (YAMAMOTO *et al.* 1993, RAMOTAR *et al.* 1998).

Camptothecin (Cpt.; Abbildung 2.9-iii) führt indirekt zu DNA-Schäden, indem es die Topoisomerase I inhibiert. Topoisomerase I löst durch Veränderung der *linking number* strukturelle Spannungen innerhalb der DNA, wobei sie zwischenzeitlich einen Einzelstrangbruch erzeugt. Das nach Einführen des Einzelstrangbruchs gebildete kovalente Intermediat zwischen dem freien 3'-Ende der DNA und dem Enzym wird durch Camptothecin stabilisiert, was die Religation verhindert. Nach Entfernung der Topoisomerase I von der DNA bleibt ein Einzelstrangbruch zurück, der wiederum zu einer *run-off*-Synthese und damit zu einer kollabierten Replikationsgabel führen kann. Da Camptothecin spezifisch die Topoisomerase I inhibiert, wird es bzw. seine Derivate auch als Chemotherapeutikum eingesetzt. (BERGER 1998, POMMIER *et al.* 1998, POMMIER 2006)

Cis-Diammindichloridoplatin(II) (Cisplatin; CP) ist als *interstrand crosslinker* bekannt, also als eine Substanz, die die gegenüberliegenden Stränge der DNA kovalent verknüpft (Abbildung 2.9-iv). Allerdings machen die *interstrand crosslinks* (ICLs) nur 5–10 % der CP-DNA-Addukte aus. Die übrigen Produkte sind verschiedene Addukte zwischen CP und benachbarten Purinen innerhalb desselben DNA-Strangs

(*intrastrand crosslinks*). Alle CP-*crosslinks* verursachen extreme Verzerrungen der DNA-Struktur, was zu ihrer hohen Mutagenität beiträgt. (CORDA *et al.* 1993, RAJSKI & WILLIAMS 1998)

Hinweis zum Nährmedium

Die hohen Temperaturen beim Autoklavieren führen zwischen der Glucose und den Aminosäuren in der YPD-Mischung zu zufälligen Maillard-Reaktionen, deren Produkte mutagene Wirkung haben (KIM *et al.* 1991). Damit Art und Menge dieser Maillard-Produkte nicht die Untersuchungen verfälschen, wurde beim Einsatz von YPD darauf geachtet, alle innerhalb eines Experiments zu vergleichenden Kulturen bzw. Platten mit derselben Charge des Nährmediums herzustellen. Bei der Herstellung der synthetischen Medien konnten Glucose und Aminosäuren – im Gegensatz zum Hefeextrakt enthaltenden YPD – getrennt autoklaviert werden, um die Maillard-Reaktionen zu vermeiden.

2.2.5.1 Bestimmung der Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien mit dem *drop dilution assay*

Mit dem *drop dilution assay* wurde semiquantitativ die Sensitivität verschiedener *S. cerevisiae*-Stämme gegenüber den DNA-schädigenden Agenzien MMS, 4-NQO, Camptothecin und Cisplatin bestimmt. Bei diesem Experiment müssen die Zellen in Gegenwart der DNA-schädigenden Agenzien wachsen, da die Agenzien in den Agarplatten enthalten sind.

Dazu wurden YPD-Platten (92 oder 150 mm Durchmesser) ohne weitere Zusätze und mit verschiedenen Konzentrationen DNA-schädigender Agenzien hergestellt. Alle Platten für ein Experiment wurden frisch am Tag ihrer Verwendung aus derselben YPD-Charge gegossen. Dadurch wurden Schwankungen der beim Autoklavieren entstehenden mutagenen Substanzen ausgeschlossen und ein „Wegreagieren“ der Agenzien mit dem Medium, wie es bei längerer Lagerung der Platten auftreten kann, vermieden. Das jeweilige Agens wurde in der entsprechenden Menge nach dem Autoklavieren zugesetzt:

MMS (Endkonzentration in %)	0,02; 0,01; 0,0075; 0,005; 0,0025; 0,001
4-NQO (Endkonzentration in µg/ml)	0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,025; 0,01
Camptothecin (Endkonzentration in µg/ml)	50; 20
Cisplatin (Endkonzentration in µM)	450

Von allen zu untersuchenden Stämmen wurden 5 ml-Übernachtkulturen 1:5 mit YPD verdünnt und weitere 3–5 Stunden wachsen gelassen. Die Zelldichte jeder Kultur wurde bestimmt (Zählkammer; Seite 60), um jeweils eine Zellsuspension mit 1×10^7 Zellen/ml herzustellen. Von jeder Zellsuspension wurden anschließend drei 1:10-Verdünnungen erstellt, sodass von jedem Stamm vier Zellsuspensionen mit abnehmender Zelldichte vorlagen (1×10^7, 1×10^6, 1×10^5 und 1×10^4 Zellen/ml).

Für jeden Stamm wurden je 7 µl der vier Zellsuspensionen nebeneinander auf die vorbereiteten YPD-Platten getropft (Abbildung 2.10). Dabei diente die YPD-Platte ohne Zusätze der Überprüfung, ob einzelne Mutanten generell eine abweichende Wachstumsrate besaßen. Die zu vergleichenden Stämme wurden möglichst auf dieselben Platten getropft, wobei immer auch der Wildtyp-Stamm (meist in der obersten

Reihe) mit aufgetragen wurde. Alle Platten wurden für 2–4 Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend zur Dokumentation eingescannt. Die Sensitivität der untersuchten Stämme wurde anhand des Wachstums in Gegenwart der unterschiedlichen DNA-schädigenden Agenzien verglichen.

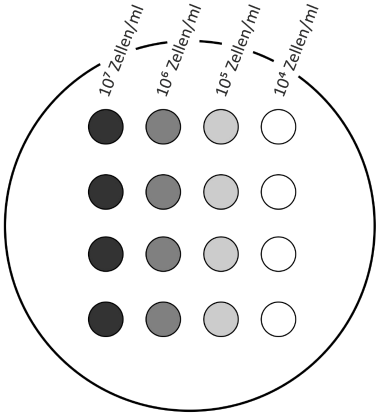


Abbildung 2.10: **"Tröpfelschema" für den *drop dilution assay* zur Bestimmung der Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien.** Die aufgetropfte Menge entspricht etwa 70.000, 7.000, 700 und 70 Zellen. Auf der gezeigten 92 mm-Platte können vier verschiedene Stämme aufgetragen werden. Auf einer 150 mm-Platte können bis zu zehn Stämme verglichen werden.

2.2.5.2 Messung spontaner Mutationsraten

Bei vielen Genen, deren Genprodukte an der DNA-Reparatur oder an der Umgehung von DNA-Schäden beteiligt sind, führt eine Deletion zu einer Veränderung der spontanen Mutationsrate, also der Wahrscheinlichkeit, mit der an einer zufälligen Stelle im Genom bis zur nächsten Zellteilung eine Mutation entsteht. Ist die spontane Mutationsrate erhöht, spricht man von einem sogenannten Mutatorphänotyp (zum Beispiel bei Deletion von *MPH1*, daher der Name).

Die Bestimmung der spontanen Mutationsrate erfolgte mit Hilfe des Canavanin-Vorwärtsmutations-systems. Arginin-prototrophe Hefen können Arginin zwar selbst herstellen, nehmen dieses aber bei Verfügbarkeit auch gern aus dem umgebenden Medium auf. Das Gen *CAN1* von *S. cerevisiae* codiert für die dafür zuständige Arginin-Permease, die sowohl die Aminosäure Arginin als auch ihr Strukturanalogon L-Canavanin in die Hefezellen transportiert. Gelangt L-Canavanin in die Zellen, inhibiert es die Enzyme des Arginin-Stoffwechsels und führt beim ribosomalen Einbau in Proteine zu aberranten Proteinen. L-Canavanin wirkt also toxisch, weshalb Hefezellen auf Canavanin-haltigem Medium nicht wachsen. Durch eine (spontane) Mutation in *CAN1*, die zum Verlust der Permease-Funktion führt, kann aber eine Canavanin-Resistenz erworben werden. So kann aus der Zahl Canavanin-resistenter Zellen einer Kultur näherungsweise auf die Zahl spontaner Mutationsereignisse rückgeschlossen werden.

Der Vergleich Canavanin-resistenter Zellen einer Kultur mit dem Lebendtiter, also der Gesamtzellzahl der Kultur, liefert allerdings lediglich eine Mutationsfrequenz. Die Mutationsrate muss mit einem statistischen Verfahren bestimmt werden und wurde hier nach der Medianmethode ermittelt (LEA & COULSON 1949). Da der Zeitpunkt der *CAN1*-Mutation großen Einfluss auf die sichtbare Mutationsfrequenz hat, ist es entscheidend, möglichst viele Parallelkulturen jedes zu untersuchenden Stammes anzusetzen. So führt beispielsweise ein frühes Mutationsereignis zu einer Vielzahl resistenter Zellen und damit zu einer

überrepräsentativen Mutationsfrequenz („*jackpot culture*“, LURIA & DELBRÜCK 1943). Damit solche Extremereignisse nicht direkt in die Berechnung eingehen, wird bei der Medianmethode nur eine Kultur betrachtet. Für gewöhnlich lässt sich in den Experimenten bei den meisten Kulturen eines Stammes eine relativ ähnliche Mutationsfrequenz feststellen, was dafür spricht, dass die Betrachtung der Mediankultur eine gute Näherung der tatsächlichen Mutationsrate ermöglicht.

Von allen zu testenden Stämmen (immer inklusive des Wildtyps) wurden jeweils elf parallele 7 ml-YPD-Kulturen mit jeweils 140 Zellen aus einer Übernachtkultur angesetzt. Die geringe Anfangszelldichte (hier 20 Zellen/ml) dient dem bestmöglichen Ausschluss bereits vorhandener *CAN1*-Mutanten. Um Unterschiede durch die Qualität des Mediums auszuschließen, wurden alle Kulturen mit derselben YPD-Charge angesetzt. Alle Kulturen wurden zunächst für einen Tag ohne Bewegung im 30 °C-Brutschrank inkubiert und dann weitere 3–4 Tage bis zum Erreichen der stationären Phase im 30 °C-Roller wachsen gelassen. Zur Bestimmung der Zahl der *CAN1*-Mutanten wurden von allen Kulturen 150 µl- und 25 µl-Aliquots auf L-Canavanin-haltigen SC-Arg+Can-Platten ausplattiert. Zusätzlich wurden von zwei willkürlich ausgewählten Kulturen pro Stamm geeignete Verdünnungen auf SC-Arg zur Bestimmung des Lebenstiters ausgestrichen. Dabei wird davon ausgegangen, dass der Lebendtiter in den elf Kulturen eines Stammes mit hinreichender Genauigkeit identisch ist. Alle Platten wurden für 3 Tage bei 30 °C inkubiert und die gewachsenen Kolonien wurden gezählt.

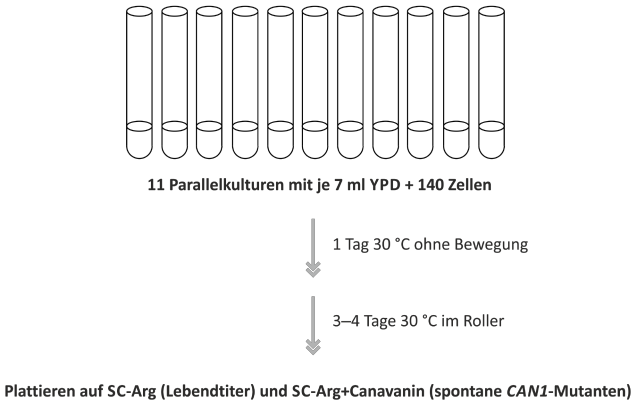


Abbildung 2.11: **Arbeitsablauf bei der Bestimmung spontaner Mutationsraten.** Mit Hilfe des *CAN1*-Vorwärtsmutationssystems wurden in 11 parallelen Kulturen die Mutationsfrequenzen ermittelt. Aus diesen wurde mittels der Methode des Medians (LEA & COULSON 1949) die Mutationsrate des jeweiligen Stammes abgeschätzt. Details siehe Text.

Aus der Gesamtzahl der *CAN1*-Mutanten der Mediankultur (r_0), der zugehörigen Gesamtzellzahl (n; bestimmt aus dem Lebendtiter) und der Anzahl der Parallelkulturen (N = 11) wurde mit einem von S. Schmidt erstellten Programm die Anzahl der zugrundeliegenden Mutationsereignisse (m), die Mutationsrate (m/n) sowie deren Standardabweichung bestimmt. Dem Programm liegen folgende Überlegungen von LEA & COULSON (1949) zugrunde:

(i) Zwischen der Gesamtzahl der Mutanten (r_0) und der Zahl an zugrundeliegenden Mutationsereignissen (m) existiert näherungsweise folgende Beziehung:

$$r_0 = 1{,}24 \cdot m + m \cdot \ln m$$

(ii) Nach Subtraktion von r_0 lässt sich m als einzige Nullstelle einer streng monoton steigenden Funktion betrachten. Dabei kann r_0 als Konstante angesehen werden. Ein Wert für m lässt sich durch Newtonsche Iteration ermitteln, da die Folge $m_{i+1} = m_i - \frac{m_i + m_i \cdot \ln m_i - r_0}{2{,}24 + \ln m}$ 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.

(iii) Die Standardabweichung von m (σ_m) errechnet sich nach: $\left(\frac{\sigma_m}{m}\right)^2 = \frac{1}{N} \cdot \frac{12{,}7}{(2{,}24 + \ln m)^2}$

Aus dem für die anzunehmenden Mutationsereignisse (m) erhaltenen Wert wurde abschließend die Mutationsrate (m/n) bestimmt. Die Mutationsraten aller parallel untersuchten Stämme eines Experimentes wurden zudem auf den mitgeführten Wildtyp bezogen.

2.2.5.3 Messung 4-NQO-induzierter Reversionsfrequenzen des KanKanMX4-Moduls

Das KanKanMX4-Modul bietet eine Möglichkeit zur Quantifizierung von Schwesterchromatid-Interaktionen, da diese zu einer Reversion der internen Sequenzduplikation und damit zur Wiederherstellung der G418-Resistenz führen können (RUDOLPH 2003, EDE 2009, EDE *et al.* 2011). Eine Inkubation mit DNA-schädigenden Agenzien, insbesondere 4-NQO, erhöht im Allgemeinen die Zahl der Revertanten, wobei *mph1*Δ im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich geringere Erhöhung zeigt (EDE *et al.* 2011).

Vor der Messung der Reversionsfrequenzen musste das KanKanMX4-Modul in die zu untersuchenden Stämme eingebracht werden. Dies geschah über chromosomale Integration von YIplac211-KanKanMX4 bzw. YIplac128-KanKanMX4 (Seite 68) oder über Transformation mit dem episomalen Plasmid pRS316-KanKanMX4 (Seite 61). Je nachdem, wie das KanKanMX4-Modul in die Hefezellen eingeschleust worden war, kamen unterschiedliche Nährmedien zum Einsatz. Die Anzucht und 4-NQO-Behandlung erfolgte bei chromosomaler Integration in SC-Ura (YIplac211-KanKanMX4) bzw. SC-Leu (YIplac128-KanKanMX4). Die abschließende Plattierung erfolgte hier auf YPD bzw. YPD+G418. Bei den Stämmen mit dem episomalen pRS316-KanKanMX4 erfolgten Anzucht, Behandlung und Plattierung auf MSG-Ura(+G418). Die selektiven Bedingungen sind bei pRS316-KanKanMX4 auch noch während des Wachstums der Kolonien notwendig, um eine Verfälschung des Lebendtiters durch Plasmidverlust zu vermeiden. Statt des sonst verwendeten SC-Mediums wurde MSG-Medium (Seite 46) verwendet, da das im SC enthaltene Ammoniumsulfat die Wirkung von G418 beeinflusst (TONG & BOONE 2007). Bis auf die unterschiedlichen Medien wurden alle Versuche identisch durchgeführt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird im Folgenden nur die Durchführung für Stämme mit YIplac211-KanKanMX4-Integration beschrieben.

Von allen zu untersuchenden Stämmen wurden 5 ml-Übernachtkulturen in SC-Ura angezogen. Am nächsten Tag wurde bei jeder Kultur die Zellzahl bestimmt und für jeden Stamm wurden 6 ml SC-Ura mit einer Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml angeimpft und für 1,5 h im 30 °C-Roller inkubiert. Zur Synchronisation der Zellen wurden 30 µl α-Faktor (2 mg/ml) zugegeben und die Kulturen wurden erneut für 1,5 h im 30 °C-Roller inkubiert. In dieser Zeit führt der α-Faktor zu einem G1-Arrest der Hefezellen. Das Oligopeptid wird natürlicherweise von Zellen des *mating types* α sezerniert, um benachbarte a-Zellen zur

Konjugation anzuregen, wozu unter anderem die vorübergehende Einstellung der Teilungsaktivität gehört. Mikroskopisch ist der α-Faktor-induzierte G1-Arrest an sogenannten *„Shmoos“* zu erkennen. Das sind hyphenartige, kleine Auswüchse, die vermutlich zur Überbrückung der Distanz zwischen den Konjugationspartnern dienen. Um den Abbau des α-Faktors in der Kultur auszugleichen, wurden zusätzlich 10 µl α-Faktor (2 mg/ml) zu den Kulturen gegeben und die Inkubation im 30 °C-Roller für eine weitere Stunde fortgesetzt. Nach mikroskopischer Bestätigung des G1-Arrests wurde der α-Faktor durch zweimaliges Waschen mit 10 ml sterilem H_2O entfernt, um den Arrest aufzuheben. Die gewaschenen Zellen wurden in 6,5 ml SC-Ura aufgenommen und in 6 Ansätze á 1 ml aufgeteilt. Zu jedem Ansatz wurde 1 ml SC-Ura mit einer definierten Menge 4-NQO gegeben, sodass sich folgende Endkonzentrationen ergaben:

0; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,24 µg/ml 4-NQO

Alle Ansätze wurden für mindestens 1:45 h bei 30 °C im Roller inkubiert. Die vorherige Synchronisation der Zellen in G1 bewirkt, dass die Zellen während der Inkubation mit 4-NQO genau eine S-Phase durchlaufen. Das Erreichen der G2-Phase wurde mikroskopisch überprüft (hantelförmige Zellen aus fast gleich großer Mutter- und Tochterzelle). Hatten noch nicht mindestens 95 % der Zellen G2 erreicht, wurde die Inkubation der Ansätze um höchstens 30 min verlängert. Die G2-Zellen wurden in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, für max. 1 min abzentrifugiert und zweimal mit je 2 ml sterilem H_2O gewaschen. Je nach seiner Größe wurde das Zellpellet in 300–600 ml SC-Ura resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt. Von allen Zellsuspensionen wurden anschließend Verdünnungen mit sterilem Wasser hergestellt und auf YPD bzw. YPD+G418 ausplattiert. Zur Bestimmung des Lebendtiters wurden je 100 µl der Verdünnungsstufen 1:1000, 1:5000 und 1:25.000 auf YPD plattiert. Zur Bestimmung der Zahl der KanKanMX4-Revertanten wurden je 100 µl der Verdünnungsstufen 1:5, 1:25 und 1:125 auf YPD+G418 plattiert. Alle Platten wurden für 2–3 Tage bei 30 °C inkubiert.

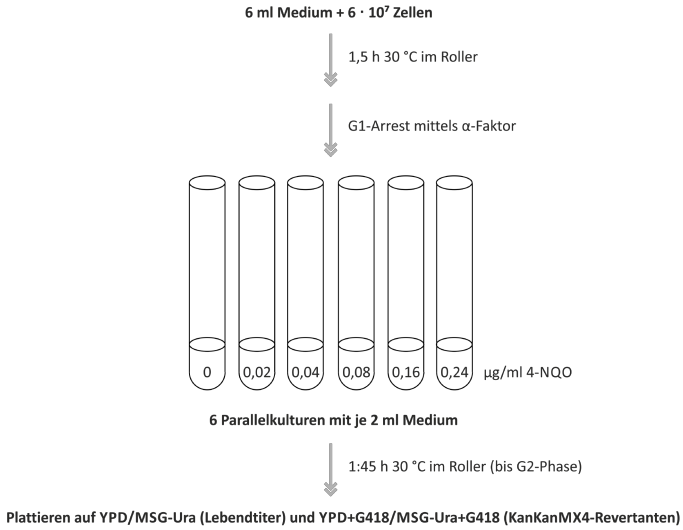


Abbildung 2.12: **Arbeitsablauf zur Bestimmung induzierter Reversionsfrequenzen des KanKanMX4-Moduls.** Die Zellen wurden durch einen α-Faktor-induzierten G1-Arrest synchronisiert, damit sie während der Inkubation mit dem DNA-schädigenden Agens 4-NQO genau eine S-Phase durchlaufen. Die Bestimmung der Reversionsfrequenzen erfolgte durch Vergleich der Zahl der Revertanten mit der Gesamtzahl der überlebenden Zellen. Details siehe Text.

Anhand der Koloniezahlen auf den YPD-Platten wurde der Lebendtiter und anhand der auf den G418-Platten gewachsenen Kolonien die Zahl der KanKanMX4-Revertanten berechnet. Die Zahl der Revertanten bezogen auf den Lebendtiter ergab für jeden Ansatz eine Reversionsfrequenz. Die Subtraktion des Hintergrunds an spontanen Reversionen (Wert des Ansatzes ohne 4-NQO) lieferte die durch 4-NQO induzierten Reversionsfrequenzen. Diese wurden gegen die 4-NQO-Konzentration aufgetragen. Für einige Experimente wurden zudem die einzelnen Werte der induzierten Reversionen auf die induzierten Reversionsfrequenzen des Wildtyps normiert und gemittelt.

Grundsätzlich wurde in jedem Experiment der Wildtyp mituntersucht und Vergleiche nur zwischen den Reversionsfrequenzen innerhalb eines Experimentes gezogen. Nur bei Ähnlichkeit der absoluten Werte der Reversionsfrequenzen wurden unabhängige Experimente gemittelt und die Standardabweichung angegeben. Wurden gemittelte Werte nachträglich auf den Wildtyp normiert, wurde die Standardabweichung der normierten Werte mittels Fehlerfortpflanzung berechnet.

2.2.5.4 Messung spontaner Reversionsraten des KanKanMX4-Moduls

Zwar liefert die Bestimmung der 4-NQO-induzierten Reversionsfrequenzen (Seite 75) auch einzelne Werte für spontane Reversionsfrequenzen ohne DNA-schädigendes Agens, eine exaktere Aussage über die Häufigkeit der spontanen Reversionen lässt sich aber anhand der Bestimmung der spontanen Reversionsrate treffen.

Die Bestimmung der spontanen Reversionsrate erfolgte dabei im Wesentlichen analog zur oben beschriebenen Bestimmung der spontanen Mutationsrate (Seite 73) nach der Medianmethode (LEA & COULSON 1949).

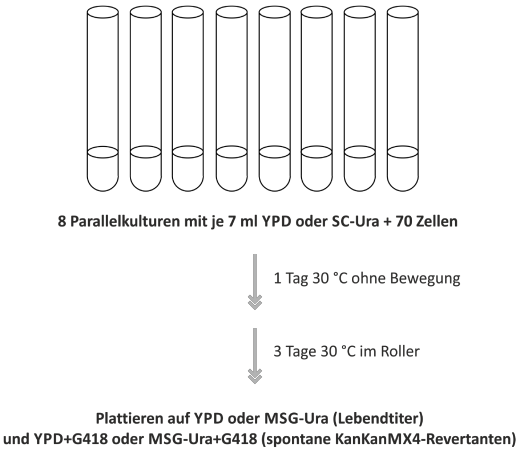


Abbildung 2.13: **Arbeitsablauf bei der Bestimmung spontaner Reversionsraten des KanKanMX4-Moduls.** In 8 parallelen Kulturen wurden die Reversionsfrequenzen des KanKanMX4-Moduls ermittelt. Aus diesen wurde mittels der Methode des Medians (LEA & COULSON 1949) die spontane Reversionsrate des jeweiligen Stammes abgeschätzt. Details siehe Text

Von allen zu testenden Stämmen (immer inklusive des Wildtyps) wurden jeweils acht parallele 7 ml-YPD-Kulturen mit jeweils 70 Zellen aus einer Übernachtkultur angesetzt (Anfangszelldichte 10 Zellen/ml, um Revertanten im Inokulat möglichst auszuschließen). Bei pRS316-KanKanMX4-haltigen Stämmen erfolgte

die Anzucht in SC-Ura. Alle Kulturen wurden zunächst für einen Tag ohne Bewegung im 30 °C-Brutschrank inkubiert und dann weitere 3–4 Tage bis zum Erreichen der stationären Phase im 30 °C-Roller wachsen gelassen. Zur Bestimmung der Zahl der KanKanMX4-Revertanten wurden von allen Kulturen 100 µl einer 1:5- und einer 1:50-Verdünnung auf YPD+G418 (bzw. MSG-Ura+G418 bei pRS316-KanKanMX4) ausplattiert. Zusätzlich wurden von zwei willkürlich ausgewählten Kulturen pro Stamm geeignete Verdünnungen auf YPD bzw. MSG-Ura zur Bestimmung des Lebenstiters ausgestrichen. Alle Platten wurden für 3 Tage bei 30 °C inkubiert und die gewachsenen Kolonien wurden gezählt.

Die Auswertung erfolgte wie für die Mutationsraten beschrieben – nur dass hier mit der Iteration die Reversionsrate aus der Anzahl der Revertanten ermittelt wurde – unter Zuhilfenahme des Programms von S. Schmidt (Seite 73f).

2.3 MATERIAL – FANCM-PROJEKT

2.3.1 PRIMÄRE UND IMMORTALISIERTE ZELLLINIEN (HUMAN)

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle
HEK293	immortalisierte embryonale Nierenzellen	AG Emmert
HeLa	Cervixkarzinomzellen	ATCC, Manassas, VA, USA
MRC5Vi	immortalisierte fetale Lungen-Fibroblasten	Sarah Sertic; AG Emmert
GM00637	SV40-transfizierte, immortalisierte Fibroblasten	AG Emmert
Wildtyp-Fibroblasten	aus Hautstanzen gesunder Spender generiert	AG Emmert
HCT116	Darmkrebs-Zelllinie	WANG *et al.* 2013
HCT116 FANCM$^{-/-}$ (Abbildung 2.14)	wie HCT116, aber mit rAAV-basiertem, homozygotem *knockout* von FANCM (Exon 2-Deletion; *frameshift*)	WANG *et al.* 2013

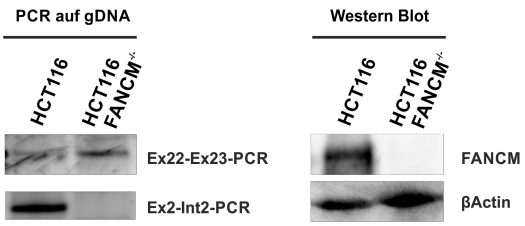


Abbildung 2.14: **Überprüfung der von Yucai Wang und Lei Li zur Verfügung gestellten HCT116 FANCM$^{-/-}$-Zelllinie.** Links: genomische DNA wurde extrahiert und die Deletion von Exon 2 mittels PCR bestätigt. Primer: Ex22-Ex23: #K91/#K92; Ex2-Int2: #K117/#K118 (Primersequenzen ab Seite 79). Rechts: Nachweis des FANCM-*knockouts* auf Proteinebene. Gesamtzelllysat wurde mit dem FANCM-spezifischen Antikörper AS99 untersucht.

2.3.2 PLASMIDE

Plasmid	Beschreibung und Verwendung	Quelle
pcDNA3	Vektor für Expression in Säugerzellen (CMV-Promotor; Neomycin-Resistenzgen; Amp-Resistenzgen)	Invitrogen, Waltham, MA, USA
pRS313-pMPH1-FANCM	Hefevektor, der die codierende Sequenz von *FANCM* enthält (diese wurde aus dem Original-pIRES-Vektor von MEETEI *et al.* 2005 kloniert)	S. Exner (Labor W. Kramer)
pcDNA3-FANCM (#271)	Vektor zur Expression von *FANCM-FL*	diese Arbeit
pcDNA3_FANCM_mcherry (#274)	codiert für FANCM-*mCherry*-Fusionsprotein	diese Arbeit
pcDNA3-FANCM669 (#244)	Vektor zur Expression von *FANCM-669*	A. Schürer
pcDNA3-FANCM669-3'UTR (#276)	Vektor zur Expression von *FANCM-669* mit den ersten 500 bp von Intron 11 hinter der codierenden Sequenz (potentielle 3'UTR)	diese Arbeit
pcDNA3-FANCM669-EGFP-6His (#255)	codiert für FANCM-669-EGFP-Fusionsprotein	diese Arbeit
pCMVluc	*Host Cell Reactivation Assay* („Firefly")	Promega, Mannheim
pRL-CMV	*Host Cell Reactivation Assay* („Renilla")	Promega, Mannheim

2.3.3 PRIMER (OLIGONUKLEOTIDE)

Alle Sequenzen sind in 5'-3'-Orientierung angegeben. Die Nummern beziehen sich auf die laborinterne Nummerierung und sind daher nur teilweise fortlaufend. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

#K1	5' FANCM_exon12	TGAGGCAAAGTAGCCTAAAGAA (22 nt)
#K3	5' FANCM_exon22	GCCTGCTGACTACCTTAATTGG (22 nt)
#K6	5' FANCM_exon10-new	TGAAACAGTTTCGTGACGGTGG (22 nt)
#K27	5' FANCM_exon2-new	GCTGCTGAAATAAAGTGTTTAG (22 nt)
#K28	3' FANCM_exon4-new	AAGCTCTATCTGCCCAATTAG (21 nt)
#K40	5'mut_FAM669_K_241	CTATCTTTTCCTATAGGGATGGAAAGTCCGTGAGCAAG (38 nt)
#K41	3'mut_FAM669_K_241	CTTGCTCACGGACTTTCCATCCCTATAGGAAAAGATAG (38 nt)
#K42	5'SOE_K	TTGAACACTTCAAGTCATGGAATGC (25 nt)
#K50	SOE_mCherry_1	TTACCAGATGATTCAAGTGAGG (22 nt)
#K51	SOE_mCherry_2	CTCCTCGCCCTTGCTCACTATATCAGATTTCAGTCTATCTTGGT (44 nt)
#K52	SOE_mCherry_3	ACCAAGATAGACTGAAATCTGATATAGTGAGCAAGGGCGAGGAG (44 nt)

#K53	SOE_mCherry_4	GTATAGACGCCGACGATAAG (20 nt)
#K56	CMV_forward	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG (21 nt)
#K57	5' FANCM_seq_ex14	GTGTGTGTTATTAACAGAGTGTCAG (25 nt)
#K58	5' FANCM_seq_ex14b	GACAATAATTCTGAACTCCAAGATC (25 nt)
#K59	5' FANCM_seq_ex16	GTGAAGTTGATTCTCCACTTC (21 nt)
#K60	5'seq_K27_K6	GTTATGAATTATTGCAGCAAATGGG (25 nt)
#K62	3'Intron11_gDNA	AAACTGAACTTGAGGCAATG (20 nt)
#K66	3'Intron5_SOE2	TTCACTACCTCCAGTTGCTC (20 nt)
#K71	5'-669-UTR_gDNA	TGTTTTTACAGATTTATAATCAGAGTCAGTC (31 nt)
#K72	3'-669-UTR_gDNA_NotI	TAGCATGCGGCCGCCTTGGTATTATCTTAGTACATTATCTTCAGC (45 nt)
#K81	qPCR_A_for_Ex11_a	AGCCTTCTCGGAACTTGCAG (20 nt)
#K82	qPCR_A_for_Ex11_b	CCACGAATGGTTCCTGATGGA (21 nt)
#K83	qPCR_A_rev	TGCATGTGTCAAATGCAAAATTTATTTAC (29 nt)
#K84	qPCR_N_for_a	GCCAGGTCTTAGGCAACCAA (20 nt)
#K85	qPCR_N_rev_a	ACCCATCTGTCTAGGAGCTATCC (23 nt)
#K86	qPCR_N_for_b	CCAAGGTACCTGGCTCTGTT (20 nt)
#K89	qPCR_F_for_b	CCCAGAAGAGCCCAATTCGT (20 nt)
#K90	qPCR_F_rev_b	GAAGGACCTGCCTGTTACTTGA (22 nt)
#K91	qPCR_E_for_a	ATGTGTCACCAGTTTTCATCTGTG (24 nt)
#K92	qPCR_E_rev_a	GCCTTCTGATGAGTTACTTGTGC (23 nt)
#K93	qPCR_E_for_b	TGGTATTCATGTTCCAACAGTGGT (24 nt)
#K94	qPCR_E_rev_b	TCCTCAGCCTTCTGATGAGTTAC (23 nt)
#K95	qPCR_B_for_a	CTTGTCCCGCTGCTGAAATA (20 nt)
#K96	qPCR_B_rev_a	TACCTGGTGTGGCACTTAGAG (21 nt)
#K99	qPCR_C_for_a	CTCTAAGTGCCACACCAGGTA (21 nt)
#K105	qPCR_I_for_a	ACATTGCCTCAAGTTCAGTTTTC (23 nt)
#K106	qPCR_I_rev_a	GCCTATAAAATGGCGGCATCG (21 nt)
#K108	qPCR_I_rev_b	GCAAAGGATGATCTTGCCACA (21 nt)
#K109	qPCR_O_for_a	AACGAAAGTGAAGATGACGAGA (22 nt)
#K112	qPCR_O_rev_b	AATCTGCGCTTTTTGACAGCA (21 nt)
#K113	cDNA_for_1	CGTGGGGCTCAAGTATCTCC (20 nt)

#K117	Yucai Wang_FME2F	TGGTGCAGTAAGAGAGTGCTTT (22 nt)
#K118	Yucai Wang_FMI2R	CTATGGCCTACAAAGGCTTTCA (22 nt)
#K119	qPCR_M_for_c	CCTGGAGAGCTGGGAAAACA (20 nt)
#K120	qPCR_M_rev_c	TCATAAAGCAGAAAGATGCCCT (22 nt)
#K123	qPCR_M_for_e	CAGCAAAGTTGGAAGGGAGG (20 nt)
#K124	qPCR_M_rev_e	AGATGAAGACCTACTACCGCAG (22 nt)
#K125	qPCR_M_for_f	ATTTGCCATGTAAGGGCAGT (20 nt)
#K126	qPCR_M_rev_f	AGCCAATCTGAACCATCTCCTC (22 nt)
#K127	qPCR_M_for_g	CAGTGGCCCCGTTTACTCAG (20 nt)
#K128	qPCR_M_rev_g	TTACTCCCTTTGCAGGGTGC (20 nt)
#K151	qPCR_X_for	TGAGGCAAAGTAGCCTAAAGAA (22 nt)
#K152	qPCR_X_rev	AGAAGAAAACTGAACTTGAGGCA (23 nt)
#K153	qPCR_Y_for	CTGGGTGACAGAGTTTGAATGG (22 nt)
#K154	qPCR_Y_rev	ATCTCTTTAATTTCATCACTGTCCCT (26 nt)
#K155	qPCR_Z_for	TGCCTCAAGTTCAGTTTTCTTCT (23 nt)
#K156	qPCR_Z_rev	AACATCTGAGGGGTTCTGGC (20 nt)
#K157	qPCR_V_for	AGTAACAGGCAGGTCCTTCA (20 nt)
#K158	qPCR_V_rev	TCGCTGCAAGTTCCGAGAAG (20 nt)
#K159	qPCR_W_for	AGTATTTAAGTGGATCGGGGTTT (23 nt)
#K160	qPCR_W_rev	AGGACCTGCCTGTTACTTGA (20 nt)
#K161	qPCR_P_for_a	GACACAGCAGATCGAGGCTT (20 nt)
#K162	qPCR_P_rev_a	CAGCGGGACAAGCTCCTCTA (20 nt)
#K163	qPCR_P_for_b	CTTCATGGCCCCAACGAAAC (20 nt)
#K165	Ex5 hinter EcoRV_rev	GTTTTTCCTAAACTGATCTCTTGCC (25 nt)
#K167	Intron10_beginning_rev	TCAAATTGTGTTTCTGCAGCTCTAC (25 nt)
#K171	FL_3'UTR_rev	CTTTGAAAACCCCATCTTGAGC (22 nt)
#K172	FANCM_5'UTR	GGATATCTGACAGAAGCCTTCG (22 nt)
#K174	Intron11_rev_neu_1	AAACAAGAAATATTATATCAAGATACGACCTG (32 nt)
#K175	Intron11_rev_neu_2	CTTTTCTAAACTTTATGGAGAACATTCTCTG (31 nt)
#K176	Intron11_rev_neu_3	ACAAATGGCTACCTCAATTACCAG (24 nt)
#K177	Intron11_rev_neu_4	GTATGACAACAGTGGAACAAACAG (24 nt)

#K178	Intron4_beginning_rev	CCTGTTAGCTGAAATAATTCAATTACCAG (29 nt)
#K179	Intron18_beginning_rev	ACCTTTAAGGTCTAGTTTCATTAAAAACTG (30 nt)
#K180	GA_BoxI_for	CATCAGCCAATTATTAGAGTAATGACTT (28 nt)
#J194	3‘ pcDNA3 screen	ACAGATGGCTGGCAACTAGAAG (22 nt)
	anchored Oligo(dT)$_{20}$	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN (22 nt)
	GAPDH-qPCR-Primer	QT00079247 (Qiagen, Hilden)

2.3.4 ENZYME

Thermo Scientific (Marke von Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)	Restriktionsendonukleasen
	T4 DNA Ligase
	Taq-DNA-Polymerase (*recombinant*)
	Pfu-DNA-Polymerase
	Phusion® *High-Fidelity* DNA Polymerase
	Shrimp Alkaline Phosphatase
	Affymetrix™ ExoSAP-IT™ für PCR Product Clean-up
New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)	Restriktionsendonukleasen

2.3.5 ANTIKÖRPER

Primäre Antikörper

Antigen (Bereich)	**Antikörper**	**Wirt**	**Hersteller**	**Verdünnung**
FANCM (N-terminal 1-50)	ab95014	*rabbit*	Abcam, Cambridge, UK	1:5000 (WB) 1:500 (IF)
FANCM (N-terminal 15-25)	sc-70277	*goat*	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:200 (WB)
FANCM (N-terminal 641-660)	AS60	*rabbit*	A. Ciccia/S. West	1:1000 (WB)
FANCM (1190-1273)	AS61	*rabbit*	MEETEI *et al.* 2005	1:500 (WB)
FANCM (C-terminal)	AS99	*rabbit*	Wojciech Niedzwiedz	1:200 (WB)
FANCD2	NB100-182SS	*rabbit*	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA	1:10000 (WB)
GFP	11 814 460 001	*mouse*	Roche, Basel, Schweiz	1:1000 (WB)
β-Actin	A5441	*mouse*	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:5000 (WB)

Sekundäre Antikörper

Antigen	Antikörper	Wirt	Hersteller	Verdünnung
rabbit-IgG	Alexa-Fluor® 488 goat anti-rabbit	*goat*	Dianova, Hamburg	1:800 (IF)

2.3.6 GERÄTE

Alle Experimente wurden mit Standard-Laborgeräten durchgeführt, die den jeweiligen Anforderungen entsprachen. Geräte, die nicht der Standardausstattung entsprachen oder von besonderer Bedeutung für das Gelingen der Versuche waren, werden bei der jeweiligen Methode, bei der sie Verwendung fanden, explizit aufgeführt.

2.3.7 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Alle Verbrauchsmaterialien wurden von gängigen Herstellern, u.a. Greiner Bio-One (Frickenhausen) und Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht) nach Standard-Labormaßstäben eingekauft. Glaswaren wurden zumeist von der Schott AG (Mainz) oder Brand (Wertheim) bezogen.

2.3.8 CHEMIKALIEN

Entsprechend Kapitel 2.1.8 (Seite 44), und zusätzlich:

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose	PAA, Cölbe
Fetal Bovine Serume (FBS)	Biochrom AG, Berlin
Penicillin-Streptomycin (100x)	PAA, Cölbe
G418 Sulfate Cell Culture Tested	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Trioxsalen (T6731)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aqua *ad iniectabilia* (für qPCR)	Braun, Melsungen
cOmplete™ Mini EDTA-freier Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim
HDGreen™	Intas, Göttingen
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI 1:1200	Vector Laboratories, Burlingham, CA, USA
Protein A/G PLUS Agarose Immunoprecipitation Reagent: sc-2003	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

2.3.9 PUFFER UND LÖSUNGEN

Entsprechend Kapitel 2.1.9 (Seite 45) und zusätzlich:

PBS-Tween	0,05 % (v/v) tween20 in PBS
3,7 % PFA	3,7 % (w/v) PFA (zum Lösen basischer pH-shift durch Zugabe von NaOH)
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1 % SDS; 0,5 % Natrium-deoxycholat; 1,0 % NP-40; frisch dazu: cOmplete-Protease-Inhibitor und 1 mM PMSF
MS-Probenpuffer	2,7 % Acetonitril; 0,1 % Methansäure; in H_2O
2x CP-Puffer	6 mM NaCl; 1 mM Na2 HPO_4; 1 mM NaH_2PO_4
Cisplatin-Stammlösung	25 mM in DMF (Dimethylformamid; –20°C)
Trioxsalen-Stammlösung	1,75 mM in Ethanol (–20 °C)
50x alkalischer Agarosegelpuffer	1,5 M NaOH; 50 mM EDTA
2x Probenpuffer für alkalische Gele	16 % (w/v) Saccharose; Spatelspitze Bromkresolgrün; in 2x alkalischem Agarosegelpuffer
Neutralisierungspuffer für alkalische Gele	1 M Tris (pH 7,6); 1,5 M NaCl

2.3.10 NÄHRMEDIEN FÜR HUMANE ZELLKULTUR

DMEM-komplett	DMEM mit 10 % (v/v) FBS und 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin
Einfriermedium	40 % DMEM; 40 % (v/v) FBS; 20 % (v/v) DMSO

2.3.11 KITS

Entsprechend Kapitel 2.1.11 (Seite 47) und zusätzlich:

Isolierung genomischer DNA	QIAamp DNA Blood Kit– Qiagen, Hilden
Total-RNA-Isolierung	RNeasy Mini Kit – Qiagen, Hilden
	RNase free DNase Set – Qiagen, Hilden
polyA-RNA-Isolierung	Dynabeads™ Oligo $(dT)_{25}$ – Invitrogen (Marke von Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
cDNA-Synthese	RevertAid H Minus First Strand cDNA synthesis Kit – Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Transfektion humaner Zellen	Attractene Transfection Reagent – Qiagen, Hilden
pJET-Klonierung	CloneJET PCR Cloning Kit – Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA
MTT *assay*	CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT) – Promega, Mannheim
HCR *assay*	Dual-Luciferase® Reporter Assay System – Promega, Mannheim
Expressionsanalyse	RNA from 20 different healthy human tissues – Ambion®, Huntingdon, UK

2.3.12 LÄNGENSTANDARDS

Gene Ruler 100 bp/1 kb DNA ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc.), Hercules, CA, USA
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 bis 250 kDa	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

2.3.13 SOFTWARE, *ONLINE TOOLS* UND DATENBANKEN

Entsprechend Kapitel 2.1.13 (Seite 48), und zusätzlich:

Ensembl	Datenbank für Protein-, Nukleotid- und Genomsequenzen von Vertebraten; https://www.ensembl.org/
ENA (*European Nucleotide Archive*)	Datenbank für Nukleotidsequenzen https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home

2.4 METHODEN – FANCM-PROJEKT

2.4.1 KULTIVIERUNG UND GENETISCHE MANIPULATION VON *ESCHERICHIA COLI*

Entspricht Kapitel 2.2.1 (Seite 49f).

2.4.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Folgende Methoden wurden entsprechend Kapitel 2.2.2 durchgeführt:

- **Fällung von DNA mit Hilfe von Ethanol** (Seite 50)
- **Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*** (Seite 50)
- **Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren** (Seite 50)
- **Restriktionsspaltung, Dephosphorylierung und Ligation von DNA** (Seite 51)
- **Agarosegelelektrophorese** (Seite 52)
- **Reinigung von PCR-Produkten** (Seite 52)
- **Kolonie-PCR** (Seite 52)
- **Mutagenese mittels Überhangverlängerung** (Seite 53)
- **DNA-Sequenzierung** (Seite 54)

2.4.2.1 Isolierung genomischer DNA aus menschlichen Zellen

Genomische DNA als Matrize für die (q)PCR wurde aus Zellpellets von ca. 1×10^7 Zellen mit Hilfe des QIAamp® DNA Blood Kit (Qiagen) isoliert. Die Durchführung erfolgte entsprechend des Protokolls „*Isolation of genomic DNA from Tissues*“ des Handbuchs des Herstellers.

2.4.2.2 Isolierung von RNA aus humanen Zellen

Aus Zellpellets von ca. 1×10^7 Zellen wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) Total-RNA nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die als optional angegebene *on-column* DNase-Behandlung wurde mit dem RNase free DNase Set (Qiagen) durchgeführt, um genomische DNA abzubauen, da diese das Ergebnis der späteren Expressionsanalysen mittels (q)PCR verfälschen könnte. Die Konzentration der RNA wurde bestimmt (Seite 50) und die Proben bis zur Verwendung bei –80 °C aufbewahrt.

In einigen Fällen wurde ausgehend von 75 µg Total-RNA die Fraktion der polyA-RNA (mRNA) mit Hilfe der magnetischen Dynabeads™ Oligo $(dT)_{25}$ (Invitrogen) isoliert. Vorbereitung, mRNA-Isolierung und Regeneration der Dynabeads™ erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Konzentration der RNA wurde erneut bestimmt (Seite 50) und die Proben bis zur Verwendung bei –80 °C aufbewahrt.

2.4.2.3 *Complementary* DNA (cDNA)-Synthese

Die isolierte RNA (siehe oben) wurde mit Hilfe des Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) nach Hersteller-Angaben in cDNA umgeschrieben. Pro 20 µl-Ansatz wurden 2,5 µg Total-RNA oder 50 ng polyA-RNA eingesetzt. Als Primer wurde alternativ *random hexamer primer* (Bestandteil des Kits) oder *anchored* Oligo$(dT)_{20}$ (Sigma-Aldrich, als Oligonukleotid bestellt) verwendet. Während der Inkubation von 60 min bei 42 °C synthetisiert die Reverse Transkriptase einen zur RNA komplementären DNA-Strang, die cDNA. Der im Ansatz enthaltene RiboLock-RNase-Inhibitor wurde durch zehnminütige Inkubation bei 75 °C inaktiviert, um anschließend einen Verdau des RNA-templates vornhemen zu können. Dazu wurden zu den 20 µl-Ansätzen jeweils 20 µl H_2O und 1 µl RNaseA (1 mg/ml) gegeben und diese für 30 min bei 37 °C und anschließend für 10 min bei 95 °C inkubiert. Alle Proben wurden kurz abzentrifugiert und bis zur Verwendung für die (q)PCR bei –20 °C gelagert. Als Kontrolle wurden identische Ansätze ohne Zugabe der Reversen Transkriptase (–RT) parallel mitgeführt.

2.4.2.4 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) wurde entsprechend Kapitel 2.2.2.5 (Seite 51) durchgeführt. Je nach Anwendung wurde die PCR für Klonierungen, als Kolonie-PCR, zur Genotypisierung oder zur Expressionsanalyse eingesetzt. Bei der Expressionsanalyse diente cDNA (siehe oben) als Matrize. Als Kontrollen wurden hier geeignete Plasmide als Positivkontrolle sowie genomische DNA und –RT-Ansätze als Negativ-Kontrolle mitgeführt.

Für die Amplifikation des gesamten *FANCM*-Transkripts (vgl. Seite 144) wurde eine *touchdown*-PCR durchgeführt. Dabei wird die *annealing*-Temperatur während der ersten zehn Zyklen schrittweise reduziert, um eine spezifischere Amplifikation zu erreichen. Die *touchdown*-PCR wurde mit der Phusion®

High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) auf einem Sensoquest Labcycler mit einer *ramp rate* von 4 °C/s durchgeführt. Dabei wurde folgendes Programm verwendet: 98 °C, 20 s; [98 °C, 10 s; 71 °C → 62 °C (1 °C/Zyklus), 20 s; 72 °C, ca. 40 s/kb] × 10; [98 °C, 10 s; 61 °C, 20 s; 72 °C, ca. 40 s/kb] × 35; 72 °C, 10 min; 4 °C Pause. Wie bei allen anderen PCRs wurden die Produkte anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (Seite 52) analysiert.

2.4.2.5 Quantitative *real-time*-PCR

Die Expression verschiedener *FANCM*-Transkriptvarianten wurde mit Hilfe quantitativer *real-time*-PCR (qPCR) bestimmt. Dazu wurde der „5x HOT FIREpol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX)“ der Firma Solis Biodyne eingesetzt (vgl. Seite 57). Die jeweils amplifizierten Bereiche für einzelne Fragestellungen sind im Ergebnisteil genau angegeben. In Tabelle 2.5 sind alle in dieser Arbeit gezeigten Primerpaare aufgelistet. Die Primersequenzen sind ab Seite 79 nachzulesen. Die Primer wurden mit PrimerBLAST (NCBI) nach folgenden Vorgaben designt: (i) das Produkt sollte zwischen 75 und 200 bp groß sein, (ii) die Schmelztemperatur sollte bei etwa 60 °C liegen und (iii) die Primer sollten keine unspezifischen Produkte mit dem *Homo sapiens*-Transkriptom bzw. Genom liefern.

Tabelle 2.5: **Aufschlüsselung der Primerkombinationen für die quantitative *real-time*-PCR zur Amplifikation verschiedener *FANCM*-Transkriptvarianten.** Int = Intron; Ex = Exon. Primersequenzen siehe Seite 79ff.

Name	Region	Primer
A	Ex11-Int11	#K82/#K83
B	Ex2-Ex3	#K95/#K96
E	Ex22-Ex23	#K93/#K94
F	Ex10-Ex11	#K89/#K90
I	Ex12-Ex13	#K105/#K106
M_c	Int12	#K119/#K120
M_e	Int4	#K123/#K124
M_f	Int18	#K125/#K126

Name	Region	Primer
M_g	Int10	#K127/#K128
N	Int11 (Ex11b)	#K84/#K85
P_a	Ex1-Ex2	#K161/#K162
V	Ex11	#K157/#K158
W	Int10-Ex11	#K159/#K160
X	Ex12	#K151/#K152
Y	Int11-Ex12	#K153/#K154
Z	Ex12-Int12	#K155/#K156

Die qPCR wurde in 384-*well*-Platten durchgeführt. So konnten möglichst viele zu vergleichende Proben auf einer Platte gemessen werden. Für jedes Primerpaar wurde pro Platte eine Standardkurve mit gereinigtem PCR-Produkt zur Bestimmung der PCR-Effizienz mitgemessen. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe mit acht 1:10-Verdünnungen ausgehend von 500 amol des PCR-Produktes eingesetzt. Es wurde jeweils 0,5 µl der zu messenden cDNAs als *template* eingesetzt, was etwa 30 ng umgeschriebener Total-RNA entspricht. Zur Kalibrierung wurden geeignete linearisierte Plasmide oder genomische DNA mitgeführt, wobei jeweils etwa 0,5 amol *template* eingesetzt wurden, um einen mittleren C_t-Wert zu erreichen. Alle Proben wurden als Duplikate gemessen.

Zur Vorbereitung der Versuchsansätze wurden pro *well* 3 µl eines Mastermixes aus 2 µl „5x HOT FIREpol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX)“ und 0,5 µl pro Primer (5 pmol) vorgelegt. Das jeweilige template wurde anschließend in einem Volumen von 7 µl zugegeben, sodass jeder Ansatz 10 µl enthielt. Die qPCR erfolgte mit dem „7900HT Fast Real-Time PCR System with 384-Well Block Module” (Applied Biosystems, TM of Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach folgendem Protokoll: 95 °C, 15 min; 40 x (95 °C, 15 s; 60 °C, 20 s; 72 °C, 20 s); 1 x Aufnahme der Schmelzkurve (95 °C, 15 s; 60 °C, 15 s; 95 °C, 15 s).

Die Analyse der Daten erfolgte mit der zum *Cycler* gehörigen Software SDS 2.4. Ansätze, bei denen die Schmelzkurve einen unsauberen *Peak* und damit Nebenprodukte oder Primer-Dimere anzeigte, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Bei einer PCR-Effizienz von 100 % hätte die zugehörige Standardkurve eine Steigung von –3,32. Für die gezeigten Daten wurden Effizienzen zwischen 93 % und (rechnerisch) 106 % erreicht. Der Determinationskoeffizient (R^2) der einbezogenen Standardkurven lag bei mindestens 0,994. Die Kontrolle ohne *template* (NTC) und die (–RT)-Kontrollen waren nicht detektierbar oder hatten einen C_t-Wert über 34.

Für die Berechnung der Expression wurde der Effizienzwert E (berechnet über $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$) der einzelnen Primerpaare sowie der Mittelwert der C_t-Werte der gemessenen technischen Duplikate herangezogen. Die Berechnung erfolgte als relative Quantifizierung normiert auf die *GAPDH*-Expression der jeweiligen Probe oder als relative Quantifizierung der *FANCM*-Transkriptvarianten untereinander. Sofern möglich erfolgte zudem eine Kalibrierung auf ein *template*, von dem alle PCR-Produkte amplifiziert werden konnten. Zu diesem Zweck wurden linearisierte Plasmide (#271 und #276) sowie genomische DNA für jedes Primerpaar bei jeder Messung mitgeführt.

2.4.2.6 Klonierungen

Klonierungen in pJET1.2/blunt

PCR-Produkte mit *blunt ends*, wie sie bei der Verwendung von *proofreading*-fähigen Polymerasen entstehen, wurden teilweise zur Sequenzierung oder weiteren Klonierung in pJET1.2/blunt integriert. Die Durchführung entsprach dabei der Empfehlung des Herstellers des CloneJET PCR Cloning Kits (Thermo Scientific).

pcDNA3-FANCM (#271)

Das mittlere (4659 bp) Fragment eines *Box*I/*Not*I-Doppelverdaus von pRS313-pMPH1-FANCM wurde mit dem großen Fragment der *Box*I/*Not*I-Spaltung von pcDNA3-FANCM669 (#244) ligiert.

pcDNA3_FANCM_mcherry (#274)

Aus Vorarbeiten existierte ein Vektor, bei dem die ersten elf Exons von *FANCM* (codieren für die ersten 668 Aminosäuren) *in frame* mit *mCherry* vorlagen (pcDNA3-FANCM669-noK-mCherry). Über eine SOE-PCR (Seite 53) wurde die für *mCherry* codierende Sequenz aus diesem Vektor *in frame* mit dem 3‘-Ende der für FANCM-FL codierenden Sequenz fusioniert (Primersequenzen ab Seite 79). Die äußeren Primer wurden so gewählt, dass das Produkt der SOE-PCR Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Hpa*I und *Not*I enthielt.

Zunächst wurden zwei überlappende PCR-Produkte erzeugt: PCR 1 mit den Primern #K50/#K51 mit Plasmid #271 als Matrize und PCR 2 mit den Primern #K52/#K53 mit dem Plasmid pcDNA3-FANCM669-noK-mCherry als Matrize. Je 50–100 ng der gereinigten PCR-Produkte 1 und 2 wurden in einer SOE-PCR mit den Primern #K50/#K54 eingesetzt. Das SOE-PCR-Produkt wurde mit *Hpa*I und *Not*I gespalten und mit dem großen Fragment des *Hpa*I/*Not*I -Doppelverdaus von Plasmid #271 (pcDNA3-FANCM) ligiert.

pcDNA3-FANCM669-3'UTR (#276)

Die potenzielle 3'UTR von *FANCM-669* entspricht dem Beginn von Intron 11 von *FANCM*. Um die 3'UTR in den Vektor #244 (pcDNA3-FANCM669) zu integrieren, wurde der Bereich von genomischer DNA amplifiziert und in den Vektor hineinligiert. Dazu wurde mit den Primern #K71/#K72 eine PCR mit genomischer DNA als Matrize durchgeführt, die Exon 11 und die ersten 500 bp von Intron 11 amplifiziert. In Exon 11 befindet sich eine *Ppu*MI-Schnittstelle und mit #K72 wurde eine *Not*I-Schnittstelle eingeführt. Das PCR-Produkt wurde mit PpuMI und *Not*I gespalten und mit dem großen Fragment eines *Ppu*MI/*Not*I-Doppelverdaus des Vektors #244 ligiert.

pcDNA3-FANCM669-EGFP-6His (#255)

Aus Vorarbeiten existierte ein Vektor, bei dem die ersten elf Exons von *FANCM* (codieren für die ersten 668 Aminosäuren) *in frame* mit *EGFP-6His* vorlagen (pcDNA3-FANCM669-noK-EGFP-6His). Über eine SOE-PCR (Seite 53) wurde das für das fehlende Lysin669 codierende Codon eingefügt (Primersequenzen ab Seite 79). Die äußeren Primer wurden so gewählt, dass das Produkt der SOE-PCR die natürlich vorhandenen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Box*I und *Not*I enthielt. Zunächst wurden zwei überlappende PCR-Produkte erzeugt: PCR 1 mit den Primern #K42/#K41 und PCR 2 mit den Primern #K40/#J194. Als Matrize diente jeweils das Plasmid pcDNA3-FANCM669-noK-EGFP-6His. Je 50–100 ng der gereinigten PCR-Produkte 1 und 2 wurden in einer SOE-PCR mit den Primern #K42/#J194 eingesetzt. Das SOE-PCR-Produkt wurde mit *Box*I und *Not*I gespalten und mit dem großen Fragment des *Box*I/*Not*I -Doppelverdaus von pcDNA3-FANCM669-noK-EGFP-6His ligiert.

Bei allen beschriebenen Klonierungen wurden die Ligationsprodukte zur Transformation von *E. coli* verwendet und mittels Kolonie-PCR und Restriktionsspaltung wurden positive Klone identifiziert. Vor der endgültigen Verwendung wurde die gesamte für die jeweiligen *FANCM*-Varianten codierende Sequenz mittels Sequenzierung (Seite 54) überprüft.

2.4.3 BIOCHEMISCHE METHODEN

2.4.3.1 Herstellung von Gesamtzelllysaten menschlicher Zellen

Um spezifische Proteine mittels Western Blot immunochemisch detektieren zu können, wurden zunächst Gesamtzelllysate der zu untersuchenden Zellen hergestellt. Dazu wurden die Zellen entsprechend Kapitel 2.4.4.1 (Seite 91) vom Kulturgefäß abgelöst und Zellpellets von je 1×10^7 Zellen für die Lyse eingesetzt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 200 µl PBS mit PMSF und Protease-Inhibitor (cOmplete™ Mini EDTA-freier Protease-Inhibitor-Cocktail, Roche) resuspendiert. Durch

dreimaliges abwechselndes Einfrieren der Zellsuspensionen in flüssigem Stickstoff und Auftauen auf Eis wurden die Zellen zerstört. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (10 min; 14.000 rpm; 4 °C) sedimentiert und der die löslichen Zellbestandteile enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Alle Proben wurden mit Laemmli-Probenpuffer und PBS auf ein Endvolumen von 500 µl (Endkonzentration 1×Laemmli) gebracht und 5 min bei 95 °C inkubiert. Zähflüssiges Lysat wurde durch mehrmaliges Aufziehen durch eine 24G-Kanüle geschert und nochmals für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Proben wurden direkt für die SDS-PAGE eingesetzt oder bei –20 °C aufbewahrt.

2.4.3.2 SDS-PAGE, Western Blot und immunochemische Detektion

Um Proteine spezifisch vor dem Hintergrund des Gesamt-Zelllysats (siehe oben) nachzuweisen, wurden die Proteine des Lysats zunächst mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; vgl. Seite 59) nach ihrer Größe getrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und die nachzuweisenden Proteine mit einem spezifischen Antikörper immunochemisch detektiert.

Vor der Auftragung auf das Gel wurden die Proben für mindestens 5 min bei 95 °C in Laemmli-Probenpuffer denaturiert. Die Auftrennung von jeweils 20 oder 40 µl Proteinextrakt erfolgte auf einem 7,5 oder 12,5 %igen Trenngel (mit 5 %igem Sammelgel) der Größe 12 x 18 cm (oder auf Minigelen im Mini-PROTEAN Tetra Cell-System; Bio-Rad Laboratories, Munich) bei 20–35 mA. Als Marker wurde ein *prestained* Protein-Marker verwendet. Die Proteine wurden mit einem *semi-dry*-Verfahren in einem Elektroblotter (Bio-Rad Trans-Blot Turbo-System) auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Erfolg des Blots wurde durch Anfärben der Proteine auf der Membran mit Ponceau-S-Lösung überprüft. Anschließend erfolgte die immunochemische Detektion mit Hilfe des WesternBreeze®-Kits (Invitrogen) nach dem Protokoll des Herstellers: Hierbei wurden zunächst alle noch freien, proteinaffinen Bereiche geblockt (*Blocking*) und die gewaschene Membran dann über Nacht bei 4 °C in einer Lösung mit dem ersten Antikörper (Seite 82) geschwenkt. Anschließend erfolgte nach dem Waschen der Membran die Inkubation mit einem sekundären Antikörper (*anti-rabbit, anti-mouse* oder *anti-goat*; 60 min, Raumtemperatur), der den primären Antikörper erkennt und mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist. Zur Entwicklung des Blots wurde ein chemilumineszentes AP-Substrat zu der gewaschenen Membran gegeben, dessen Umsetzung mit dem ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare) sichtbar gemacht wurde. Falls eine *loading control* benötigt wurde, wurde zusätzlich β-Aktin detektiert.

2.4.3.3 Immunpräzipitation und massenspektrometrische Analyse

Um FANCM-669 und FANCM anhand spezifischer Peptide nachzuweisen, wurde eine massenspektrometrische Analyse versucht. Damit die Peptide nicht vor dem Hintergrund des gesamten Proteoms der menschlichen Zellen detektiert werden mussten, wurde zunächst eine Immunpräzipitation mit dem FANCM-spezifischen Antikörper ab95014 durchgeführt. Da ab95014 ein N-terminales Epitop erkennt, bindet er auch FANCM-669.

Für die Immunpräzipitation wurden HEK293- und HeLa-Zellen vor der vollständigen Konfluenz geerntet und mit RIPA-Puffer lysiert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz) nach dem Protokoll des Herstellers. Je 1 ml Zelllysat und 1 µg Antikörper wurden für eine Stunde bei 4 °C rotiert und nach Zugabe der Protein A/G-Agarose-*beads* über Nacht bei 4 °C rotieren gelassen. Die durch Zentrifugation sedimentierten *beads* wurden am nächsten Tag viermal mit RIPA gewaschen und schließlich zur Elution der gebundenen Proteine mit 40 µl Laemmli-Probenpuffer aufgekocht. Ein Aliquot des Eluats wurde mittels Western Blot auf Anwesenheit der Proteine untersucht. Der Rest des Eluats wurde vollständig mittels SDS-PAGE (siehe oben) aufgetrennt und die Bereiche, in denen FANCM und FANCM-669 zu erwarten waren, wurden ausgeschnitten. Alle Gelstücke bzw. die darin enthaltenen Proteine wurden anschließend mit Trypsin verdaut und die FANCM-669 enthaltenden Gelstücke zusätzlich mit LysC. Verdau und massenspektrometrische Untersuchung erfolgten durch Oliver Valerius und seine MitarbeiterInnen in der Abteilung für molekulare Mikrobiologie und Genetik (Institut für Mikrobiologie und Genetik). Als Vergleich für das spezifische, C-terminale LysC-Fragment von FANCM-669 diente ein synthetisch erzeugtes Oligopeptid gleicher Aminosäuresequenz (SSIFSYRDGK; Thermo Fisher Scientific Biopolymers), das gelöst in MS-Probenpuffer ebenfalls zur Analyse abgegeben wurde. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden auch Gesamtzelllysate (Seite 89) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Gelstücke auf FANCM-669-Höhe ausgeschnitten. Die Proteinfragmente nach LysC-Verdau wurden zwischen FANCM-669-überexprimierenden Zellen und nicht veränderten HEK293- oder HCT116-Zellen verglichen.

2.4.4 KULTIVIERUNG UND GENETISCHE MANIPULATION VON HUMANEN ZELLEN

2.4.4.1 Kultivierung primärer Fibroblasten und immortalisierter Zelllinien

Alle Zellen wurden adhärent in T175-Kulturflaschen (175 cm^2) mit 20 ml DMEM-komplett (mit 10 % FBS und 1 % Penicillin-Streptomycin) oder für funktionale Analysen in geeigneten Kulturgefäßen im Inkubator unter befeuchteter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Spätestens bei Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen geerntet, indem zunächst das Medium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gespült und die Zellen dann durch Inkubation mit 4 ml Trypsin/EDTA (ca. 5 min) vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst wurden. Die Trypsinisierung wurde durch Zugabe von 10 ml DMEM-komplett gestoppt und die Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 1.000 rpm sedimentiert. Das Zellpellet wurde in DMEM-komplett oder PBS resuspendiert und für das Anlegen von Gefrierkulturen (Seite 92) oder für die DNA-, RNA- oder Proteinextraktion (Seite 86 und 89) verwendet oder die Zellen wurden erneut ausgesät. Für funktionale Analysen wurden die Zellen gezählt (siehe unten) und in definierter Zellzahl in geeigneten Kulturgefäßen (96/24/6-*well*-Platten oder Kulturschalen) ausgesät. Zur weiteren Kultivierung wurden neue T175-Flaschen mit 10–50 % Konfluenz angesetzt (entspricht einem *Splitting* von 1:10 bei immortalisierten Zellen und 1:2 bei primären Fibroblasten).

2.4.4.2 Zellzahlbestimmung

Zur Aussaat definierter Zellzahlen oder für den Einsatz definierter Zellzahlen für die RNA- oder Proteinisolierung musste die Zellzahl im Anschluss an die Ablösung der adhärenten Zellen durch

Trypsin/EDTA (siehe oben) bestimmt werden. Dazu wurden 10 µl der resuspendierten Zellen mit 90 µl Trypan-Blau gemischt und 10 µl dieser Mischung unter das Deckglas einer Neubauer *improved*-Zählkammer pipettiert. Vier große Quadrate á 0,1 mm^3 (0,1 µl) wurden unter dem Mikroskop ausgezählt, wobei stark blau gefärbte, tote Zellen nicht mitgezählt wurden. Die gezählte Zahl multipliziert mit 2500 und dem Verdünnungsfaktor 10 ergibt die Zellzahl pro Milliliter.

2.4.4.3 Anlegen von Gefrierkulturen und Rekultivierung eingefrorener Zellen

Für die langfristige Lagerung und bei primären Zelllinien auch besonders zur Konservierung früher Passagen wurden Zellen nach dem Ablösen aus den Zellkulturflaschen (siehe oben) in einem kleinen Volumen DMEM-komplett resuspendiert und mit dem gleichen Volumen Einfriermedium versetzt. Jeweils 1 ml wurde in ein vorgekühltes Kryoröhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden über Nacht in einem speziellen Kryo-Container bei –80 °C gelagert, wobei die Zellen kontrolliert mit 1 °C/min abgekühlt werden. Am nächsten Tag wurden die Zellen für die langfristige Lagerung bei –196 °C in einen Tank mit flüssigem Stickstoff einsortiert.

Um Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden einzelne Kryoröhrchen auf Eis aufgetaut und sofort nach dem Auftauen mit 10 ml DMEM-komplett verdünnt, um die DMSO-Konzentration zu reduzieren. Die Zellen wurden sedimentiert (5 min; 1.000 rpm) und in einem geeigneten Volumen DMEM-komplett aufgenommen, um sie in einer Zellkulturflasche auszusähen. Das Medium wurde am folgenden Tag erneuert, um tote Zellen und restliches DMSO zu entfernen.

2.4.4.4 Transiente Transfektion

Für einige funktionale Analysen wurden Plasmide in die Zellen eingebracht, damit die Zellen vorübergehend ein bestimmtes Protein produzieren. Bei der transienten Transfektion erfolgt keine Selektion auf eine Integration des Plasmids in die chromosomale DNA, weshalb die Plasmide nach kurzer Zeit verloren gehen und die Proteinkonzentration meist nach drei Tagen wieder abnimmt. Um die Plasmide in die Zellen einzuschleusen, wurde das „Attractene Transfection Reagent“ (Qiagen) nach den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Es handelt sich hierbei um ein nicht-liposomales Lipid, das Komplexe mit der einzubringenden DNA bildet, die von den Zellen über die Zellmembran aufgenommen werden können.

Am Tag vor der Transfektion wurden 900.000 Zellen in 100 mm-Kulturschalen (oder 30.000 Zellen/*well* in 24-*well*-Platten für den HCR; Seite 95) ausgesät. Für die Transfektion wurden 4 µg (250 ng) Plasmid-DNA mit DMEM auf ein Volumen von 300 µl (60 µl) gebracht. Nach Zugabe von 15 µl (0,6 µl) Attractene wurde die Mischung sofort gründlich gevortext und dann für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit frischem DMEM überschichtet und die Attractene-DNA-Mischung tropfenweise über die mit Zellen bewachsene Fläche verteilt. Nach 5–6 Stunden Inkubation im Zellkultur-Inkubator (37 °C; 5 % CO_2) wurde das Medium gegen frisches DMEM-komplett ausgetauscht. Nach zwei bis drei Tagen im Inkubator wurden die transfizierten Zellen für die jeweiligen Experimente eingesetzt.

2.4.4.5 Stabile Transfektion

Bei einer stabilen Transfektion mit einem pcDNA3-Derivat erfolgt eine Selektion von Zellen, bei denen der Vektor an einer zufälligen Stelle ins Genom der transfizierten Zellen integriert wurde. Dabei handelt es sich um ein seltenes Ereignis, aber da der Vektor in eukaryotischen Zellen Resistenz gegenüber G418 vermittelt, kann auf Zellen mit spontaner Integration durch Zugabe von G418 zum Kulturmedium selektiert werden. Die Generierung einer stabil *FANCM-669* exprimierenden HEK293-Zelllinie erfolgte im Wesentlichen anhand des Handbuches des Anbieters des Vektors (Invitrogen).

HEK293-Zellen wurden mit *Pvu*I-linearisiertem pcDNA3-FANCM669 (#244) transfiziert (Seite 92) und zwei Tage in DMEM-komplett kultiviert. Für die folgenden vier Wochen wurden die Zellen in DMEM-komplett mit 1,5 mg/ml G418 gehalten, wobei das Medium alle drei Tage erneuert wurde. Nachdem fast alle Zellen abgestorben waren, bildeten die wenigen überlebenden Zellen resistente Kolonien und bewuchsen schließlich die Kulturschalen konfluent. Die Zellen wurden in DMEM-komplett ohne G418 überführt, es wurden Gefrierkulturen angelegt (Seite 92) und die Zellen wurden mittels Western Blot (Seite 90) auf die stabile Expression überprüft. Die polyklonale Zelllinie wurde als „FANCM-669 OE“ (OE = *overexpression*) für funktionale Analysen verwendet.

2.4.5 FUNKTIONALE ANALYSEN AN HUMANEN ZELLEN

2.4.5.1 GFP/*mCherry*-Mikroskopie

Um die subzelluläre Lokalisation von FANCM-669 und FANCM zu untersuchen, wurden Fusionsproteine mit GFP bzw. *mCherry* transient in immortalisierten Zellen exprimiert. GFP ist *das green fluorescent protein* der Qualle *Aequorea victoria*, welches autokatalytisch ein Fluorophor aus drei seiner Aminosäuren bildet und bei Anregung mit Licht passender Wellenlänge grün fluoresziert. *mCherry* ist eine Abwandlung des DsRed-Proteins aus *Discosoma*-Seeanemonen und wird ebenso als optischer Marker für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Aufgrund ihrer geringen Größe haben GFP und *mCherry* meist keine negativen Auswirkungen auf die Funktion der mit ihnen fusionierten Proteine.

HEK293 und HeLa-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 20.000 Zellen/*well* in 24-*well*-Platten auf runde Deckgläser ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 250 ng pcDNA3-FANCM669-EGFP-6His (#255) bzw. 250 ng pcDNA3-FANCM-mCherry (#274) transfiziert (Seite 92). Nach 48 h wurden die Zellen auf den Deckgläsern dreimal mit PBS gewaschen und dann mit 3,7 % PFA für 20 min fixiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläser mit „Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI“ auf Objektträger gegeben und am Rand mit klarem Nagellack fixiert. Bilder wurden unter dem Mikroskop Axio Imager M1 (Zeiss) der AG Schön der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie mit 400facher Vergrößerung aufgenommen.

2.4.5.2 Immunfluoreszenz

Die Analyse der subzellulären Lokalisation eines Proteins kann auch indirekt über die Detektion mit einem spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörper erfolgen. Zwar müssen die Zellen hierzu fixiert werden,

dafür können auch endogene Proteine ohne unter Umständen die Funktion beeinträchtigende (GFP-) *Tags* nachgewiesen werden. In der Praxis erfolgt die Detektion des Zielproteins zumeist mit einem primären Antikörper, der dann wiederum mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper erkannt wird. Letzterer kann dann unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Für die Analyse wurden die zu untersuchenden Zellen mit einer Zelldichte von 20.000 Zellen/*well* auf runde Deckgläschen in einer 24-*well*-Platte ausgesät. Für HCT116 wurden die Gläschen zuvor mit Poly-L-Lysin vorbehandelt, damit die Zellen besser anhaften können. Nach einem Tag Wachstum in der 24-*well*-Platte wurden die Zellen, wo nötig, mit 250 ng des betreffenden Plasmids transfiziert (Seite 92) und für weitere zwei Tage im Inkubator wachsen gelassen. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen und mit 3,7 % PFA (mit 0,1 % Triton-X-100, um die Zellmembran durchlässig zu machen) für 20 min fixiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurde mit 10 % FBS in PBS geblockt (30 min; 37 °C) und wieder dreimal mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem primären FANCM-Antikörper ab95014 (1:500 in PBS mit 5 % FBS) erfolgte für 30 min bei 37 °C, wonach dreimal mit PBS-Tween gewaschen wurde. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper Alexa-Fluor® 488 goat anti-rabbit (1:500 in PBS mit 5 % FBS für 30 min bei 37 °C). Nach abschließendem gründlichem Waschen (dreimal PBS-Tween und zweimal PBS) wurden die Deckgläschen mit „Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI“ auf Objektträger gegeben und mit klarem Nagellack fixiert. Aufnahmen wurden unter dem Mikroskop Axio Imager M1 (Zeiss) der AG Schön der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie mit 400facher Vergrößerung aufgenommen.

2.4.5.3 Bestimmung der Überlebensrate mit dem MTT-*assay*

Zur Bestimmung der Überlebensrate nach Inkubation humaner Zellen mit DNA-schädigenden Agenzien wurde die Anzahl überlebender Zellen mit Hilfe des kolorimetrischen CellTiter 96® Non-radioactive Cell Proliferation Assay (MTT-*assay*; Promega) bestimmt. Der *assay* beruht auf dem membrangängigen Farbstoff MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid], der in lebenden Zellen zu einem unlöslichen, blauen Formazan reduziert wird. Durch Zugabe einer „*Stop solution*“ (enthält DMSO oder SDS in verdünnter Salzsäure) wird das Formazan in Lösung gebracht und die Farbintensität der Lösung kann durch Messung der Absorption bei 570 nm quantifiziert werden. Die gemessene Absorption ist proportional zur Zahl überlebender Zellen.

Die praktische Durchführung erfolgte nach Hersteller-Empfehlung. Dazu wurden die zu untersuchenden Zellen mit einer Zelldichte von 3.000 Zellen/*well* in 96-*well*-Platten ausgesät und einen Tag im Inkubator (37 °C; 5 % CO_2) anwachsen gelassen. Für jede Bedingung wurden parallel vier *wells* vorgesehen. Am nächsten Tag wurde das Medium durch DMEM-komplett mit unterschiedlichen Konzentrationen eines DNA-schädigenden Agens (vgl. Seite 70) ersetzt und die Zellen für etwa 48 h in Anwesenheit der Agenzien inkubiert. Zusätzlich wurde die Toxizität der jeweiligen Lösungsmittel der DNA-schädigenden Agenzien geprüft. Die Bestrahlung mit UVC (Hoefer UVC 500 Ultraviolet Crosslinker mit 254 nm-Lampen) erfolgte mit der angegebenen Intensität in PBS, wonach frisches Medium zugegeben wurde und die Zellen ebenfalls weitere 48 h wachsen gelassen wurden. Nach der Zugabe des MTT-Substrats wurden die Platten für

weitere 4 Stunden in den Inkubator gestellt, bevor die Reaktion abgestoppt wurde. Die Platten wurden lichtgeschützt über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen und am nächsten Tag wurde die Absorption bei 570 nm mit einem Elisa Reader (Tecan) gemessen. Die Überlebensrate ergibt sich aus der jeweiligen Absorption bezogen auf den Absorptionswert ohne DNA-schädigende Agenzien.

2.4.5.4 *Host Cell Reactivation Assay* (HCR)

Der *Host Cell Reactivation Assay* (HCR) ist ein Reportergen-*assay*, mit dem die Reparaturkapazität von Zellen verglichen werden kann. Das Prinzip beruht auf der Transfektion der zu vergleichenden Zellen mit einem beschädigten Reporterplasmid, von welchem die Zellen nur nach erfolgreicher DNA-Reparatur das Reportgen exprimieren können und somit einen messbaren *readout* ermöglichen. Der HCR wurde ursprünglich zur Messung der NER-Kapazität anhand der Fähigkeit zur Reparatur UV-bestrahlter Plasmide entwickelt (PROTIĆ-SABLJIĆ & KRAEMER 1985) und wird seitdem in abgewandelter Form unter anderem für die diagnostische Unterscheidung der *Xeroderma pigmentosum*-Komplementationsgruppen verwendet (*reviewed* in LEHMANN *et al.* 2018b).

Die in meinem Labor etablierte Form des HCR beruhte auf dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). Hier werden die Zellen gleichzeitig mit zwei Reporterplasmiden cotransfiziert, von denen eines für die Firefly-Luciferase und das andere für die Renilla-Luciferase codiert (Abbildung 2.15). Während das Firefly-Plasmid (pCMV-Luc) außerhalb der Zellen mit UVC bestrahlt wird und zur Messung der Reparaturkapazität dient, fungiert das Renilla-Plasmid (pRL-CMV) als interne Kontrolle der Transfektions- und Expressionseffizienz. Bei Bedarf kann ein drittes Plasmid cotransfiziert werden, um Komplementationseffekte zu untersuchen. Die Expression beider Luciferasen kann mit Hilfe der im Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) enthaltenen Substratlösungen aufeinanderfolgend im gleichen *well* bestimmt werden. Die Reparaturkapazität („% Reparatur“) berechnet sich aus dem Verhältnis der Firefly-Aktivität mit und ohne vorausgegangene Schädigung des Firefly-Plasmids (jeweils normiert auf die Renilla-Expression):

$$\text{Reparatur (\%)} = \frac{\text{Mittelwert}\left(\frac{\text{Firefly behandelt}}{\text{Renilla}}\right)}{\text{Mittelwert}\left(\frac{\text{Firefly unbehandelt}}{\text{Renilla}}\right)} \times 100\ \%$$

Für diese Arbeit wurde eine Behandlung zur Einführung von *interstrand crosslinks* in das Firefly-Plasmid etabliert. Dazu wurde das Plasmid mit *cis*-Diammindichloridoplatin(II) (Cisplatin; CP) bzw. 4,5‘,8-Trimethylpsoralen (Trioxsalen; TMP) behandelt. Während Cisplatin spontan *crosslinks* ausbildet, muss TMP durch zusätzliche Bestrahlung mit UVA-Licht aktiviert werden. Bei Cisplatin sind etwa 5–10 % der gebildeten Addukte *interstrand crosslinks*, während TMP+UVA bei bis zu 30 % aller Addukte gegenüberliegende Stränge kovalent verbindet (*reviewed* in WILSON & SEIDMAN 2010). Mit Hilfe der ICL-enthaltenden Plasmide kann die ICL-Reparaturkapazität abgeschätzt werden. Zu beachten ist hierbei, dass pCMV-Luc keinen eukaryotischen Replikationsursprung trägt. Die beobachtete Reparatur ist also nicht replikationsabhängig, aufgrund der für den *readout* notwendigen Transkription des Firefly-Gens aber unter Umständen transkriptionsabhängig.

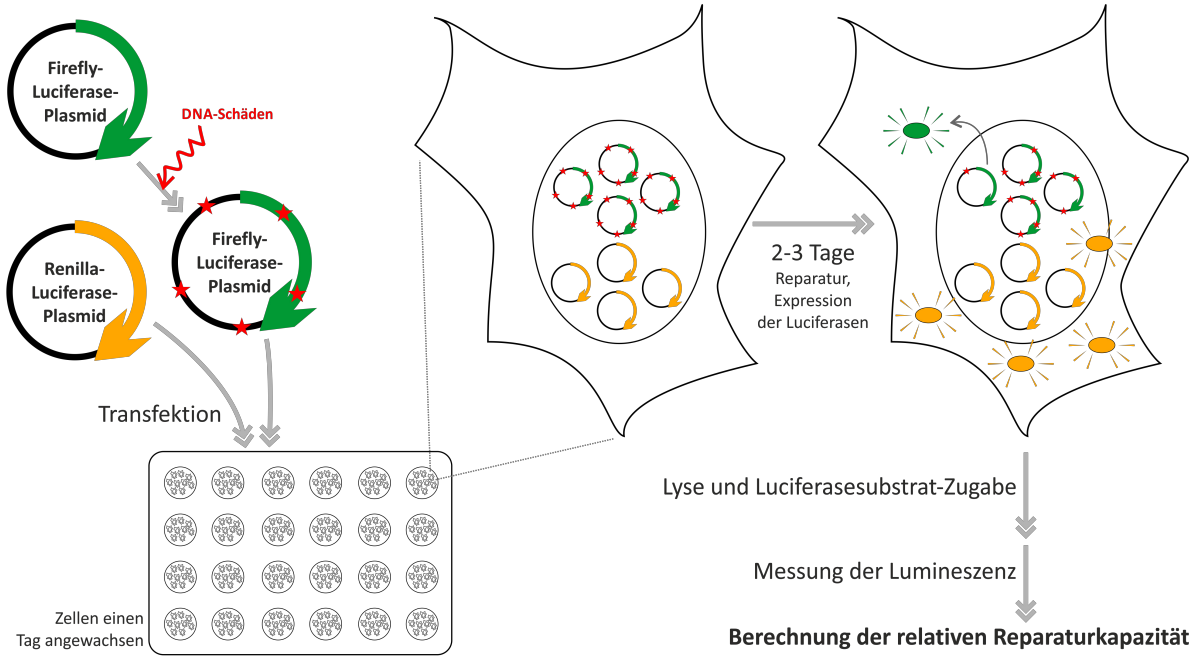


Abbildung 2.15: **Prinzip des *Host Cell Reactivation Assay* (HCR)**. Tag 1: Aussaat von Zellen in 24-*well*-Platten. Tag 2: Transfektion mit behandeltem oder unbehandeltem Firefly-Reporterplasmid sowie Renilla-Plasmid zur Normalisierung. Optional Cotransfektion eines Plasmids zur Expression einer Transkriptvariante (Komplementationsplasmid). Tag 4 oder 5: Lyse der Zellen und Messung der Luciferase-Aktivität mit dem Glomax® Discover System (Promega). Je besser die Zellen die DNA-Schäden im Firefly-Gen reparieren konnten, desto höher ist die Firefly-Expression und demzufolge die Aktivität der entsprechenden Luciferase.

Plasmid-Behandlung

Für die *crosslinker*-Behandlung wurden jeweils 20 µg pCMV-Luc in einem Volumen von 500 µl über Nacht mit CP (in 1x CP-Puffer nach SHIVJI *et al.* 2006) oder TMP (in H_2O) lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. CP bzw. TMP wurden dabei in molaren Verhältnissen (Plasmid:*crosslinker*) zwischen 1:60 und 1:120 eingesetzt. Am nächsten Tag wurden die mit TMP behandelten Proben in 5 µl-Tropfen auf einer Petrischale mit 1 J/cm² UVA (UVA Crosslinker BIO-Link BLX 365; LTF Labortechnik) bestrahlt und anschließend wieder vereinigt. Alle Proben wurden mit Ethanol gefällt (Seite 50) und in 20 µl H_2O gelöst. Als Kontrolle wurden auch Proben nur mit TMP (ohne UVA) bzw. nur mit UVA (ohne TMP) behandelt. Von allen Plasmid-Lösungen wurde die Konzentration bestimmt (Seite 50).

Visualisierung der ICLs mittels alkalischer Agarosegelelektrophorese

Um die kovalente Verknüpfung der beiden Stränge des Reporterplasmids nach CP- bzw. TMP+UVA-Behandlung zu überprüfen, wurden Proben der Plasmide linearisiert und unter alkalischen Bedingungen auf einem Agarosegel aufgetrennt (CHEN *et al.* 2003). Die alkalischen Bedingungen denaturieren die dsDNA. Liegt mindestens ein *interstrand crosslink* vor, können die Stränge nicht getrennt werden und die DNA läuft wesentlich langsamer durch das Gel (*bandshift*).

Etwa 1 µg behandelter und unbehandelter pCMV-Luc-Plasmide wurde mit *Xba*I gespalten und mit alkalischem Agarosegel-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden auf einem 1 %igen Agarosegel mit alkalischem Agarosegelpuffer für etwa 10 h bei 20–30 V aufgetrennt. Das Gel wurde dreimal mit

destilliertem Wasser gewaschen, für 50 min in Neutralisierungspuffer eingelegt, erneut gewaschen, für 35 min in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und nach kurzer Entfärbung in H_2O auf dem UV-Schirm fotografiert.

HCR-assay

Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 30.000 Zellen/*well* in 24-*well*-Platten ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit insgesamt 250 ng Plasmid-DNA transfiziert (Seite 92): 100 ng Firefly-Plasmid (pCMV-Luc; behandelt oder unbehandelt) + 50 ng Renilla-Plasmid (pRL-CMV) + 100 ng pcDNA3 oder Komplementationsplasmid. Jede Bedingung wurde in Triplikaten angesetzt (je drei *well*s mit identischer Plasmidmischung transfiziert). Nach zwei bis drei Tagen im Inkubator wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 80 µl Lysepuffer (Dual-Luciferase® Reporter Assay System; Promega) für 45 min bei Raumtemperatur lysiert. Die Lysate wurden in 96-*well*-Platten (Glomax™ 96 Microplate) überführt und die Expression der Firefly- und Renilla-Luciferase halbautomatisch mit den Lumineszenz-Substraten des Dual-Luciferase® Reporter Assay System mit dem Glomax® Discover System (Promega) gemessen. Die Enzymaktivität (gemessene Lumineszenz in *relative light units*; RLU) wurde genutzt, um die relative Reparaturkapazität zu berechnen (siehe oben).

3 ERGEBNISSE – MPH1-PROJEKT

Die möglichst fehlerfreie Erhaltung der Erbinformation trotz der widrigen Umstände, die Umweltgifte, reaktive Zellmetabolite und an der DNA ablaufende Prozesse mit sich bringen, ist Grundvoraussetzung für das langfristige Überleben einer Zelle und ihrer Nachkommen. Die homologe Rekombination (HR) dient der Vermeidung von Mutationen unter anderem während der Reparatur von Doppelstrangbrüchen und beim Umgang mit Replikationsarresten sowie daraus folgenden Einzelstranglücken. Mph1 ist neben dem anti-rekombinogenen Srs2 und dem BLM-Homolog Sgs1 eine der an diesen Rekombinationsprozessen beteiligten Helikasen in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Zu Beginn meiner Arbeit im Jahr 2012 war noch vergleichsweise wenig über Mph1 bekannt und viele der gewonnen Erkenntnisse stammten aus genetischen Interaktionsstudien der Arbeitsgruppe um W. Kramer. Demnach spielte Mph1 vorrangig eine Rolle bei der fehlerfreien Umgehung replikationsarretierender Läsionen mittels homologer Rekombination, indem es Rad51-vermittelte Rekombinationsintermediate, die sogenannten *D-loops* auflöst und dadurch die Bildung von *crossover*-Produkten verhindert (SCHÜRER *et al.* 2004, EDE *et al.* 2011). Diese Funktion konnte und kann allerdings nicht alle der für die Deletionsmutante *mph1*Δ beschriebenen Phänotypen erklären. Während der folgenden zehn Jahre hat sich die Zahl der Veröffentlichungen zum Thema Mph1 etwa verfünffacht. Weitere Funktionen bei der mitotischen und meiotischen Rekombination, bei der Stabilität von Telomerregionen und beim Umgang mit Replikationsstress wurden aufgedeckt (vgl. Kapitel 1.3.2; Seite 33). Die meisten dieser Funktionen sind Abwandlungen desselben Themas, der Auflösung von *D-loops* oder *D-loop*-ähnlichen Strukturen. Aber auch die definierte Rückwärtsbewegung der Replikationsgabel unter Hybridisierung der Tochterstränge, die sogenannte *fork regression*, wird für Mph1 als *in vivo* relevante Funktion diskutiert.

Trotz oder gerade wegen der Vielzahl neuer Erkenntnisse ist und bleibt Mph1 aber „*perhaps the least well understood of the HR-related helicases*“ (CRICKARD & GREENE 2019). In diesem Sinne hoffe ich, dass meine etwas aus der Zeit gefallenen Ergebnisse doch noch einen kleinen Beitrag zum Verständnis dieser Helikase leisten können. [2]

3.1 *FINE-TUNING* VON MPH1 DURCH PHOSPHORYLIERUNG?

Helikasen zeigen *in vitro* häufig ein breites Substratspektrum, das allerdings nicht ihren biologisch relevanten Aufgaben entsprechen muss. In der Zelle liegt die DNA nicht als stationärer Doppelstrang, sondern aufgrund der an ihr ablaufenden Prozesse wie Transkription und Replikation in komplexen, dynamischen Strukturen vor. Es wäre fatal, wenn die zellulären Helikasen unkontrolliert auf diese transienten DNA-Intermediate treffen würden. Dies zeigt sich bei Mph1 zum Beispiel daran, dass eine

[2] Alle in diesem Kapitel beschriebenen Experimente wurden in den Jahren 2012/13 geplant und durchgeführt. Lediglich die qPCRs in Kapitel 3.2.3 wurden 2016 durchgeführt.

Überexpression zu einer massiven Erhöhung von spontanen Mutationen und zu *gross chromosomal rearrangements* führt (BANERJEE *et al.* 2008, ANG *et al.* 2016).

Regulatorischer Einfluss kann zum Beispiel durch die gezielte Rekrutierung, Aktivierung oder Inhibierung mittels Protein-Protein-Interaktionen oder posttranslationalen Modifikationen ausgeübt werden. Proteine der *DNA damage response* werden oft schadensabhängig von den Kinasen des *DNA damage checkpoint* phosphoryliert, um ihren Einsatz auf die Situationen zu begrenzen, in denen sie zur genomischen Stabilität beitragen, anstatt dieser zu schaden. Die Phosphorylierung von Proteinen an den Seitenketten von Serin, Threonin oder Tyrosin ist aufgrund ihrer Vielseitigkeit und leichten Umkehrbarkeit eine der häufigsten regulatorischen Modifikationen in der Zelle. Durch die Einführung einer zweifach negativen Ladung wird die Oberfläche des Proteins verändert, was intramolekular zu Konformationsänderungen und intermolekular zu veränderten Interaktionsmustern mit anderen Proteinen oder dem DNA-Substrat führen kann. Bezogen auf Mph1 könnte eine differenzielle Phosphorylierung verschiedener Reste im gleichen Molekül ein *fine-tuning* der Aktivität am Substrat ermöglichen, was zum Beispiel die Abstimmung der für Mph1 postulierten Aktivitäten am *D-loop* erklären könnte. Vor diesem Hintergrund sollte in diesem Teil der Arbeit eine mögliche Regulation von Mph1 durch Phosphorylierung untersucht werden.

Dazu sollten zunächst anhand einer phänotypischen Analyse von Mph1-Mutanten mit Aminosäureaustauschen an putativen Phosphorylierungsstellen wichtige Reste identifiziert werden. Interessante Varianten sollten dann in Bezug auf veränderte Protein-Protein-Interaktionen und ihre biochemische Aktivität untersucht werden, um den regulatorischen Mechanismus genauer zu verstehen. Außerdem sollte nach Möglichkeit die verantwortliche Kinase identifiziert werden.

3.1.1 RATIONAL UND VORARBEITEN

Die Hypothese, dass Mph1 durch Phosphorylierung reguliert wird, stützte sich auf verschiedene Vorarbeiten:

(i) Die Transkription von *MPH1* wird nicht zellzyklusabhängig reguliert (SCHELLER *et al.* 2000), was eine posttranslationale Regulierung umso notwendiger macht.

(ii) Da die *D-loop*-auflösende Wirkung nicht alle Phänotypen von *mph1*Δ erklären kann, wurde eine weitere Funktion vor oder zu Beginn der *D-loop*-Bildung vorgeschlagen. So könnte Mph1 den *D-loop* stabilisieren oder die Verlängerung des 3'-Endes im *D-loop* erleichtern (EDE *et al.* 2011). Diese teils gegensätzlichen Aktivitäten am gleichen Substrat bedürften vermutlich einer besonderen Abstimmung, z.B. durch Phosphorylierung.

(iii) Es besteht eine synergistische Interaktion zwischen *mph1*Δ und dem *DNA damage checkpoint*. Insbesondere die Doppelmutante *mph1*Δ *mec1*Δ (Letalität aufgehoben durch zusätzliche *SML1*-Deletion) zeigt eine drastisch erhöhte Sensitivität gegenüber MMS und 4-NQO (SCHÜRER 2003). Allerdings besteht keine genetische Interaktion mit *rad53*Δ, weshalb eine direkte Phosphorylierung durch die Kinase Mec1 (ATR) als wahrscheinlicher angenommen wurde als der Umweg über die Effektorkinase Rad53 (SCHÜRER 2003).

(iv) Mph1 ist im Western Blot als Doppelbande detektierbar, die sich zwar nach Inkubation mit DNA-schädigenden Agenzien kaum verändert, aber ein schwaches Signal mit einem Antikörper gegen phosphorylierte Aminosäurereste liefert (SCHÜRER 2003).

(v) In einem *high throughput*-Screen wurde in Anwesenheit von DNA-Schäden eine Phosphorylierung von T540 und S542 gefunden (ALBUQUERQUE *et al.* 2008).

Die minimale Konsensussequenz für eine Phosphorylierung durch Mec1 (ATR) oder Tel1 (ATM) ist ein Serin oder Threonin, auf welches ein Glutamin folgt (KIM *et al.* 1999). Von diesen [S/T]Q-Motiven besitzt Mph1 fünf: zwei SQ-Motive im vorderen Bereich, ein einzelnes TQ-Motiv im Anschluss an die Helikase-Domäne sowie zwei weitere SQ-Motive im hinteren Bereich (Abbildung 3.1). Das hinterste SQ-Motiv besitzt zudem eine sehr gute Übereinstimmung mit einer erweiterten Konsensussequenz für ATM/ATR-Phosphorylierung (MATSUOKA *et al.* 2007). Die Motive sind nur in nah verwandten Hefen konserviert, aber nicht bis in höhere Eukaryoten (nicht gezeigt).

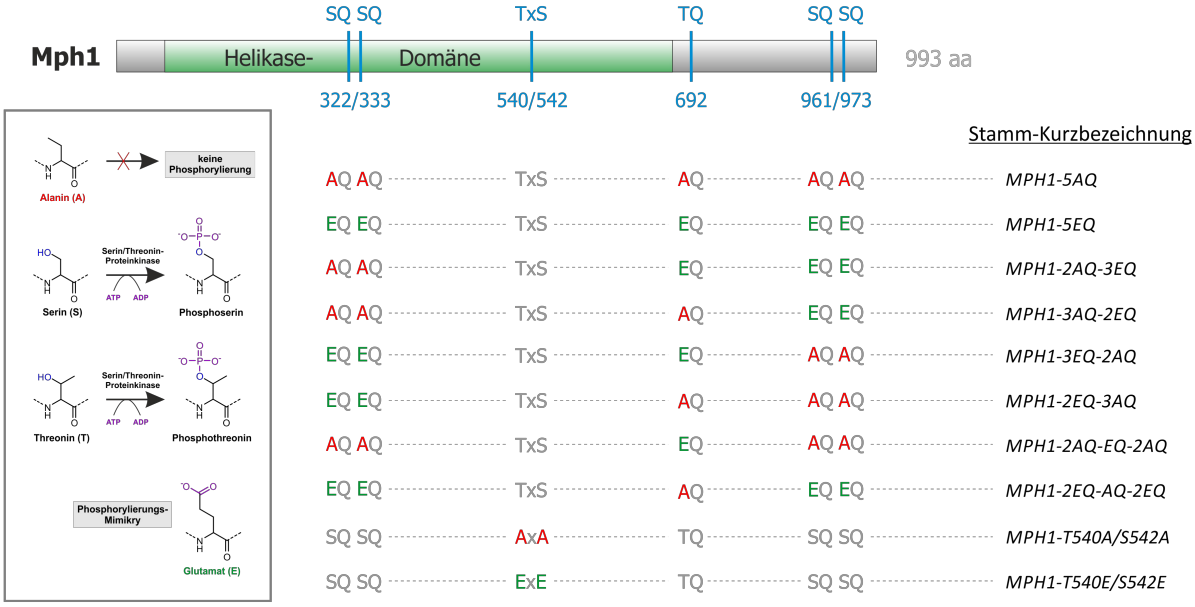


Abbildung 3.1: **Übersicht über die untersuchten Mph1-Varianten mit Aminosäureaustauschen zu Alanin oder Glutamat an putativen Phosphorylierungsstellen.** Oben: Lage der potenziell phosphorylierten Reste relativ zur Helikase-Domäne. Links: biochemische Grundlage der Alanin- und Glutamat-Mutagenese als Simulierung eines dephosphorylierten bzw. phosphorylierten Zustands. Rechts: Aufschlüsselung der vorgenommenen Austausche und im Folgenden verwendete Kurzbezeichnung der zugehörigen *S. cerevisiae*-Stämme. Die genauen Mutationen auf DNA-Ebene sind in Tabelle 2.1 (Seite 39) aufgeführt.

Für die Mutagenese wurden die fünf [S/T]Q-Motive sowie die von ALBUQUERQUE *et al.* 2008 beschriebenen Stellen T540 und S542 ausgewählt. Es wurde der klassische Ansatz gewählt, bei dem ein Austausch gegen Alanin, das kein Substrat für Kinasen darstellt, einen dephosphorylierten Zustand simuliert, während der Austausch gegen das einfach negativ geladene Glutamat eine Phosphorylierung vortäuschen soll (Phosphorylierungs-Mimikry; Abbildung 3.1). Benachbarte Reste wurden dabei jeweils gleich modifiziert, um die Anzahl der Mutanten handhabbarer zu halten. Bei interessanten Phänotypen hätte eine Mutagenese einzelner Reste in einem zweiten Schritt erfolgen können. Insgesamt wurden zehn in Abbildung 3.1 dargestellte Mph1-Varianten untersucht, die unterschiedliche Kombinationen von Alanin- und Glutamat-

Austauschen trugen. Um auszuschließen, dass es sich bei etwaigen phänotypischen Unterschieden um Auswirkungen eines unterschiedlichen Expressionsniveaus handelt, wurden die Mph1-Varianten nicht von einem Plasmid in *mph1*Δ exprimiert, sondern das endogene *MPH1* wurde mittels *gene replacement* (Seite 65) durch ein verändertes *MPH1*-Allel ersetzt. Die daraus resultierenden Hefestämme exprimieren die Phosphorylierungsmutante also unter Kontrolle des endogenen *MPH1*-Promotors. Die im Folgenden verwendeten Kurzbezeichnungen der Stämme sind Abbildung 3.1 zu entnehmen.

Sieben der acht [S/T]Q-Varianten waren bereits im Vorfeld im Labor von W. Kramer hergestellt und phänotypisch untersucht worden (Hinz und Wuttke, unveröffentlicht). Hierbei hatten sich Effekte gezeigt, die aber kein konsistentes Bild ergaben. Zudem gab es Zweifel an der Identität mindestens eines der Stämme, weshalb die Stammkonstruktion für diese Arbeit neu begonnen und um weitere Varianten ergänzt wurde. Die Plasmide mit den *MPH1*-Varianten wurden durch Sequenzierung überprüft, teilweise neu kloniert und bisher nicht vorhandene Varianten mittels SOE-PCR erzeugt (Seite 55).

3.1.2 STAMMKONSTRUKTION UND PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG

Alle zehn in Abbildung 3.1 aufgelisteten Stämme mit *MPH1*-Phosphorylierungsvarianten wurden als Derivate des *S. cerevisiae* Wildtyp-Stammes CEN.PK2-1C erfolgreich hergestellt (Seite 67). Die Überprüfung der Stämme auf die gewünschten Mutationen erfolgte zunächst mittels eines PCR-Restriktionsverdau-Screens (Seite 67), dessen Ergebnis exemplarisch für den Stamm *MPH1-2AQ-EQ-2AQ* im Anhang (Abbildung 7.1; Seite 172) gezeigt ist. Pro Stamm wurde bei mindestens einem Klon die gesamte codierende Sequenz von *MPH1* sequenziert (Seite 54), um zusätzliche, spontan aufgetretene Mutationen auszuschließen. Nur sequenzierte Klone wurden für die phänotypische Analyse verwendet.

Für einen groben Überblick wurde zunächst die spontane Mutationsrate aller Stämme sowie die Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien bestimmt. Die Bestimmung der spontanen Mutationsrate erfolgte mit Hilfe des *CAN1*-Vorwärtsmutationssystems nach der Medianmethode von LEA & COULSON (1949; Seite 73). Wie Tabelle 3.1 zu entnehmen ist, zeigt die *MPH1*-Deletionsmutante den beschriebenen Mutatorphänotyp (SCHELLER *et al.* 2000), während keine der Phosphorylierungsmutanten eine signifikant vom Wildtyp abweichende Mutationsrate aufweist. Durch eine leicht erhöhte absolute Mutationsrate des Wildtyps beim ersten Experiment erscheinen die relativen Werte der ersten fünf Varianten erniedrigt. Betrachtet man aber die absoluten Werte aller Varianten, ergeben sich keine nennenswerten Unterschiede.

Die Sensitivität gegenüber MMS und 4-NQO wurde mittels *drop dilution assay* ermittelt (Seite 72). Dabei werden Aliquots abnehmender Zelldichte auf Agarplatten mit gifthaltigem Medium getropft und in Anwesenheit des DNA-schädigenden Agens wachsen gelassen. Nach zwei bis vier Tagen wird anhand des erfolgten Wachstums die Sensitivität der Stämme verglichen. MMS (Methylmethansulfonat) ist ein alkylierendes Agens, das DNA-Basen methyliert und dadurch indirekt auch AP-Stellen in der DNA verursacht. 4-NQO (4-Nitrochinolin-1-oxid) bildet nach metabolischer Aktivierung sperrige Addukte mit DNA-Basen. Alle diese Läsionen können unter anderem einen Arrest der replikativen Polymerase bewirken (vgl. Seite 70). Wie in Abbildung 3.2 zu erkennen ist, zeigte erneut keine der Phosphorylierungsmutanten

einen auffälligen Phänotyp. Die Sensitivität entspricht in allen Fällen der des Wildtyps bzw. ist so wenig von dieser verschieden, dass dieser semiquantitative Test den Unterschied nicht zeigen kann. Die Deletionsmutante *mph1*Δ zeigt die beschriebene MMS- und 4-NQO-Sensitivität (SCHELLER *et al.* 2000). Die Sensitivität gegenüber dem Strangbrüche verursachenden Topoisomerase-Inhibitor Camptothecin (vgl. Seite 70) wurde ebenfalls getestet. Hier zeigte sich bei 50 µg/ml weder für *mph1*Δ noch für die Varianten eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Sensitivität (nicht gezeigt).

Tabelle 3.1: Einfluss der Aminosäureaustausche an potentiellen Phosphorylierungsstellen von Mph1 auf die spontane Mutationsrate im *CAN1*-Vorwärtsmutationssystem, ermittelt nach der Medianmethode (LEA & COULSON 1949). Die absoluten Werte sind mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben. Die Nummer getrennter Experimente ist als Index angegeben. Die Normierung („Faktor") erfolgte auf den im gleichen Experiment untersuchten Wildtyp-Stamm (CEN.PK2-1C).

Stamm	Mutationsrate	Faktor
wt	$3{,}23 \times 10^{-7} \pm 0{,}43 \times 10^{-7}$	**1** [1]
	$1{,}92 \times 10^{-7} \pm 0{,}27 \times 10^{-7}$	**1** [2]
mph1Δ	$1{,}99 \times 10^{-6} \pm 0{,}29 \times 10^{-6}$	**6,15** [1]
	$2{,}35 \times 10^{-6} \pm 0{,}25 \times 10^{-6}$	**12,27** [2]
MPH1-T540A/S542A	$2{,}67 \times 10^{-7} \pm 0{,}35 \times 10^{-7}$	**0,83** [1]
MPH1-T540E/S542E	$2{,}08 \times 10^{-7} \pm 0{,}32 \times 10^{-7}$	**0,64** [1]
MPH1-5EQ	$2{,}65 \times 10^{-7} \pm 0{,}36 \times 10^{-7}$	**0,82** [1]

Stamm	Mutationsrate	Faktor
MPH1-5AQ	$2{,}28 \times 10^{-7} \pm 0{,}31 \times 10^{-7}$	**0,71** [1]
MPH1-2EQ-AQ-2EQ	$1{,}87 \times 10^{-7} \pm 0{,}27 \times 10^{-7}$	**0,58** [1]
MPH1-3AQ-2EQ	$2{,}05 \times 10^{-7} \pm 0{,}29 \times 10^{-7}$	**1,07** [2]
MPH1-2AQ-3EQ	$2{,}32 \times 10^{-7} \pm 0{,}33 \times 10^{-7}$	**1,21** [2]
MPH1-3EQ-2AQ	$2{,}02 \times 10^{-7} \pm 0{,}29 \times 10^{-7}$	**1,05** [2]
MPH1-2EQ-3AQ	$2{,}36 \times 10^{-7} \pm 0{,}33 \times 10^{-7}$	**1,23** [2]
MPH1-2AQ-EQ-2AQ	$2{,}18 \times 10^{-7} \pm 0{,}30 \times 10^{-7}$	**1,14** [2]

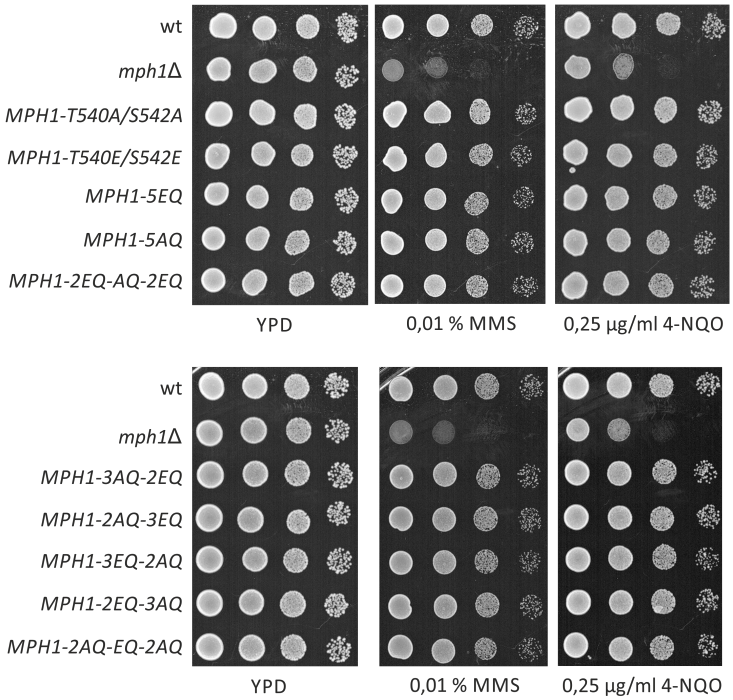


Abbildung 3.2: **Sensitivitäten gegenüber MMS und 4-NQO für alle konstruierten *S. cerevisiae*-Stämme mit Mutationen an putativen Mph1-Phosphorylierungsstellen im Vergleich zum Wildtyp (wt; CEN.PK2-1C) und zur *MPH1*-Deletionsmutante (*mph1*Δ).** Die jeweiligen Stämme wurden in Tropfen á 70.000, 7.000, 700 und 70 Zellen auf die Platten getropft (Seite 72). Für jede Platte ist die im Medium enthaltene Konzentration des DNA-schädigenden Agens angegeben.

Dass bis hierher keine der Mutationen an putativen Phosphorylierungsstellen einen erkennbaren Phänotyp erkennen ließ, erlaubte zwei Interpretation. Entweder wird Mph1 nicht entscheidend durch Phosphorylierung reguliert oder die betrachteten Phänotypen sind nicht sensitiv genug bzw. bilden nicht den Vorgang ab, der durch die Phosphorylierung beeinflusst wird.

Mit dem KanKanMX4-Modul lag ein im Labor von W. Kramer entwickeltes, sensitives System zur Untersuchung von Schwesterchromatid-Interaktionen vor (Seite 75; RUDOLPH 2003, EDE *et al.* 2011). Schwesterchromatid-Interaktionen geschehen unter anderem bei der HR-abhängigen Stranginvasion im Rahmen der Doppelstrangbruchreparatur und der fehlerfreien Umgehung von Replikationsproblemen. Beim KanKanMX4-Modul führt eine Interaktion mit dem Schwesterchromatid in einigen Fällen zur Reversion einer künstlich eingeführten, direkten Sequenzwiederholung innerhalb des KanMX4-Markers und damit zur Resistenz der Zellen gegenüber G418, was die Ereignisse quantifizierbar macht (ausführlichere Beschreibung des Systems im nächsten Kapitel). Das Modul wird im Vorfeld der Messung in das Genom der zu testenden Stämme integriert (Seite 68). Die Reversionsfrequenz steigt dosisabhängig, wenn die Zellen mit DNA-schädigenden Agenzien behandelt werden (im Folgenden „induzierte Reversionen"; EDE *et al.* 2011). Für *mph1*Δ wurde im Vergleich zum Wildtyp eine starke Reduktion der durch DNA-schädigende Agenzien induzierten Reversionsfrequenz festgestellt (EDE *et al.* 2011). Aufgrund dieses spezifischen Phänotyps sollten sich bei der Betrachtung der induzierten Reversionen in den Phosphorylierungsmutanten phänotypische Unterschiede zeigen, insofern die Aktivität von Mph1 am *D-loop* durch Phosphorylierung beeinflusst wird.

Alle zu testenden Stämme wurden mit dem KanKanMX4-Modul transformiert und die induzierten Reversionsfrequenzen wurden für erste Varianten bestimmt (Seite 75). Als DNA-schädigendes Agens wurde 4-NQO gewählt, da dieses im Vergleich zu MMS und Camptothecin zur größten Reduktion der Reversionsfrequenz bei *mph1*Δ führt (EDE *et al.* 2011). Zellen einer logarithmisch wachsenden Kultur wurden mit α-Faktor in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert und anschließend in Medium mit der angegebenen Konzentration 4-NQO für die Dauer eines Zellzyklus inkubiert. Verdünnungen der gewaschenen Zellen wurden zur Bestimmung der Lebendzellzahl auf Vollmedium und zur Bestimmung der Reversionsfrequenz auf Medium mit G418 plattiert. Die induzierte Reversionsfrequenz ergibt sich nach Abzug der spontanen Reversionsfrequenz (ermittelt aus den Ansätzen ohne DNA-schädigendes Agens). Bei der Betrachtung der ersten Messungen zeigte sich allerdings eine große Diskrepanz zu den Literaturdaten, die auf einer nicht erklärlichen Variabilität zwischen den Kurven unabhängiger KanKanMX4-Transformanten genetisch identischer Stämme zu beruhen schien. Abbildung 3.3 zeigt exemplarisch eine Messung, bei der die induzierte Reversionsfrequenz von *mph1*Δ deutlich über der des Wildtyps liegt, was dem oben erwähnten Phänotyp diametral entgegensteht. Dass dies nicht auf eine generelle Streuung der Werte zurückzuführen ist, lässt sich an dem zumeist dosisabhängig ansteigenden Kurvenverlauf erkennen.

Vergleichbare Diskrepanzen zwischen theoretisch genetisch identischen Stämmen waren in der Vergangenheit bereits ein paar Mal aufgetreten, es war aber nicht möglich gewesen, eine exakte Ursache auszumachen (EDE 2009; Wuttke, unveröffentlicht; W. Kramer, persönliche Kommunikation). Da es für die Interpretierbarkeit der Daten unerlässlich ist, dass sichtbare Unterschiede allein auf die bekannten

genetischen Unterschiede (hier z.B. das Vorliegen nicht phosphorylierbarer Reste) zurückzuführen sind, habe ich die Problematik im Folgenden systematisch untersucht. Dies war nicht nur im Hinblick auf verwertbare Daten bezüglich der Mph1-Phosphorylierungsmutanten von Interesse, sondern auch, da einige der Hypothesen in Arbeiten vorangegangener Jahre auf Daten des KanKanMX4-Systems beruhten. Die Untersuchung der möglichen Mph1-Phosphorylierung wurde zunächst unterbrochen, da unklar war, inwiefern die für die Charakterisierung wichtige Methode zur Analyse der Schwesterchromatid-Interaktionen weiterhin zur Verfügung stehen würde.

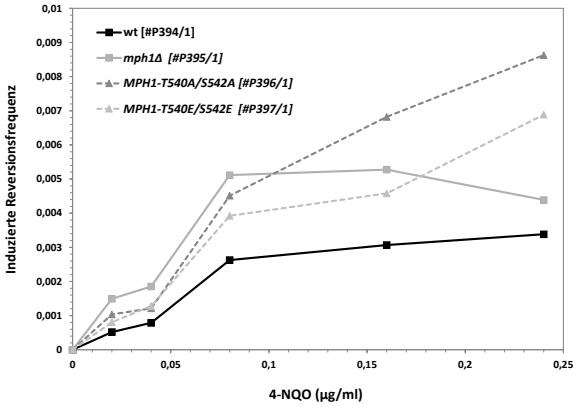


Abbildung 3.3: **Durch 4-NQO-Behandlung induzierte Reversionsfrequenzen von YIplac211-KanKanMX4-Transformanten der Stämme CEN.PK2-1C wt, *mph1Δ*, *MPH1-T540A/S542A* und *MPH1-T540E/S542E*.** Gezeigt sind die Daten eines repräsentativen Experiments (Seite 75). Die verwendeten Transformanten sind nicht identisch mit den im nächsten Kapitel untersuchten Stämmen, sondern wurden durch eine unabhängige Transformation hergestellt.

3.2 DIE REVERSIONEN IN DER REVISION

3.2.1 HINTERGRUND DES KANKANMX4-SYSTEMS

Nach einem Arrest der replikativen Polymerase kann das Primerende entweder mit Hilfe fehlerbehafteter Transläsionssynthese oder fehlerfrei durch Interaktion mit dem Schwesterchromatid verlängert werden (vgl. Abbildung 1.4; Seite 18). Während Auswirkungen der Transläsionssynthese anhand einer erhöhten Anzahl von Punktmutationen nachgewiesen werden können, ist der Nachweis einer Interaktion zwischen Schwesterchromatiden nicht trivial, da sie genetisch identisch sind. Es bedarf eines Systems, welches die Schwesterchromatid-Interaktion in ein messbares Signal umsetzt. In Anlehnung an ein ähnliches System für *Escherichia coli* wurde dazu von C. Rudolph das KanKanMX4-Modul für die Untersuchung der Stabilität von Sequenzduplikationen in *S. cerevisiae* entwickelt (Abbildung 3.4; RUDOLPH 2003). Innerhalb des KanMX4-Markers, der für ein Protein codiert, das in der Hefe Resistenz gegenüber G418 vermittelt, wurde ein 266 bp langes Fragment verdoppelt, sodass eine direkte Sequenzwiederholung entsteht (daher der Name KanKanMX4). Die Sequenzwiederholung führt zu einer Verschiebung des Leserasters, weshalb KanKanMX4 keine Resistenz gegenüber G418 vermittelt. Erst eine vollständige Deletion einer der Wiederholungen führt zur Reversion der Verdopplung und damit zur Wiederherstellung der Resistenz, was als sichtbarer *readout* verwendet wird.

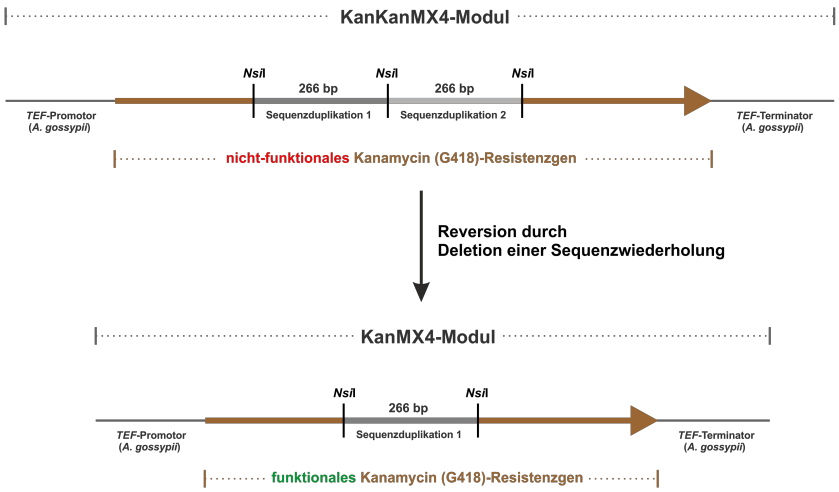


Abbildung 3.4: **Schematische Darstellung des KanKanMX4-Moduls zur Messung von Schwesterchromatid-Interaktionen.** Das Modul besteht aus der KanMX4-Kassette, bei der innerhalb des Kanamycin-Resistenzgens das in Grautönen dargestellte 266 bp-*Nsi*I-Fragment durch interne Klonierung verdoppelt wurde. Die interne Verdopplung führt zu einer Verschiebung des Leserasters, weshalb das KanKanMX4-Modul keine Resistenz gegenüber G418 vermittelt. Kommt es innerhalb der Zellen zu einer kompletten Deletion einer der Sequenzduplikationen, wird die ursprüngliche Sequenz des Kanamycin-Resistenzgens wiederhergestellt (Reversion) und die Zellen sind resistent gegen G418. Abbildung nach EDE *et al.* 2011.

Zur Deletion einer Wiederholung der Sequenzduplikation kann es in der Zelle durch verschiedene Mechanismen kommen. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass sowohl spontane als auch durch DNA-schädigende Agenzien induzierte Reversionen des KanKanMX4-Moduls vollständig abhängig von Rad52 und mehrheitlich abhängig von Rad51 sind (EDE *et al.* 2011). Damit scheidet einfaches *primer template slippage*, also ein Verrutschen des Primers auf der Matrize während der Replikation, als Ursache der Reversionen aus. Auch *single strand annealing* nach einem Doppelstrangbruch, was abhängig von Rad52, nicht aber von Rad51 ist (vgl. Abbildung 1.2-v; Seite 7), ist maximal für eine kleine Anzahl Reversionen verantwortlich. Es werden folglich nur Ereignisse detektiert, die auf Rad51-abhängiger homologer Rekombination basieren und eine Interaktion mit dem Schwesterchromatid beinhalten. Daher ist die Methode geeignet zur Detektion von Schwesterchromatid-Interaktionen.

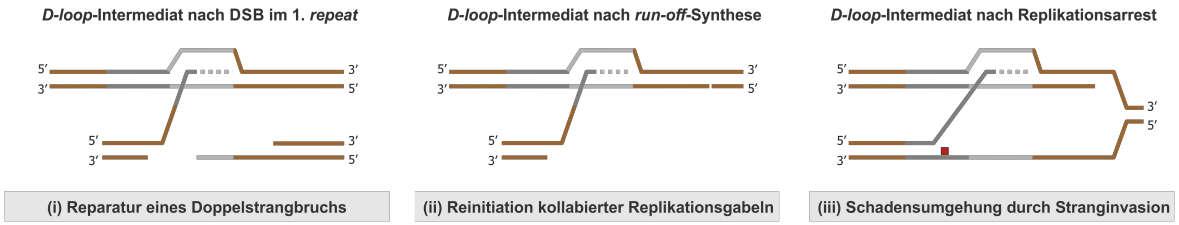


Abbildung 3.5: **Möglichkeiten der Deletion eines *repeats* einer Sequenzwiederholung durch Rad51-abhängige Prozesse.** In allen Fällen folgt die spätere Deletion aus einer Invasion des ersten *repeats* in den zweiten *repeat* des Schwesterchromatids, wo das invadierte 3‘-Ende verlängert wird. **(i)** Doppelstrangbruchreparatur mittels homologer Rekombination. Nach der Verlängerung im *D-loop* kann die Reparatur über *strand displacement* oder eine doppelte *Holliday junction* erfolgen (vgl. Abbildung 1.2-ii/iii; Seite 7). **(ii)** Reinitiation einer kollabierten Replikationsgabel nach *run-off*-Synthese oder Schnitt durch eine Endonuklease. **(iii)** Fehlerhafte Invasion nach Replikationsarrest, auch möglich im Zuge des *gap fillings*. Gezeigt ist *strand invasion*, die fehlerhafte Paarung kann aber auch nach *gap invasion* erfolgen (vgl. Abbildung 1.4; Seite 18). Nach Rehybridisierung mit dem ursprünglichen *template* bildet sich im Gegenstrang ein *loop*. Die Deletion manifestiert sich dann im Zuge der Reparatur dieser *loop*-Struktur bzw. bei der nächsten Replikationsrunde.

Abbildung 3.5 zeigt beispielhaft, wie es durch fehlerhafte Invasion in die zweite Sequenzduplikation zu einer Deletion einer Sequenzwiederholung kommen kann. Dabei ist es unerheblich, ob der auslösende Schaden spontan oder durch Behandlung mit einem DNA-schädigenden Agens entstanden ist. Letzteres erhöht lediglich die Frequenz der gezeigten Ereignisse. Während mit anderen etablierten Systemen zur Messung von Schwesterchromatid-Interaktionen wie dem *his3*-Δ5'/*his3*-Δ3'-Modul (FASULLO & DAVIS 1987) vermutlich vor allem *crossover*-Ereignisse detektiert werden, kann das KanKanMX4-System besser Ereignisse detektieren, bei denen die Intermediate über Auflösung des *D-loops* prozessiert wurden (EDE *et al.* 2011).

Neben der Untersuchung von *mph1*Δ wurde das KanKanMX4-Modul im Labor von W. Kramer für die Analyse weiterer Gene mit Beteiligung an der Umgehung replikationsarretierender Schäden genutzt (u.a. EDE 2009). Dabei traten wie im vorigen Kapitel erwähnt in Einzelfällen Unterschiede bei den induzierten Reversionsfrequenzen zwischen theoretisch genetisch identischen Stämmen auf. C. Ede beschreibt in seiner Dissertation beispielsweise Diskrepanzen zwischen unabhängigen YIplac211-KanKanMX4-Transformanten einer *REV3*-Deletionsmutante (EDE 2009, Seite 78ff). So zeigten einige Transformanten eine im Vergleich zum Wildtyp höhere induzierte Reversionsfrequenz, während andere eine stark erniedrigte Frequenz aufwiesen. Als Erklärung wurde ein gehäuftes Auftreten von Hintergrundmutationen in *rev3*Δ vermutet.

3.2.2 SYSTEMATISCHE UNTERSUCHUNG SPONTANER UND INDUZIERTER REVERSIONEN IN UNABHÄNGIGEN KANKANMX4-TRANSFORMANTEN

Da sich, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, auch bei meinen Messungen von Schwesterchromatid-Interaktionen mit dem KanKanMX4-Modul ähnliche Effekte zeigten, wollte ich die Ursache dieses Phänomens finden. Dazu wurden systematisch folgende Ansätze verfolgt:

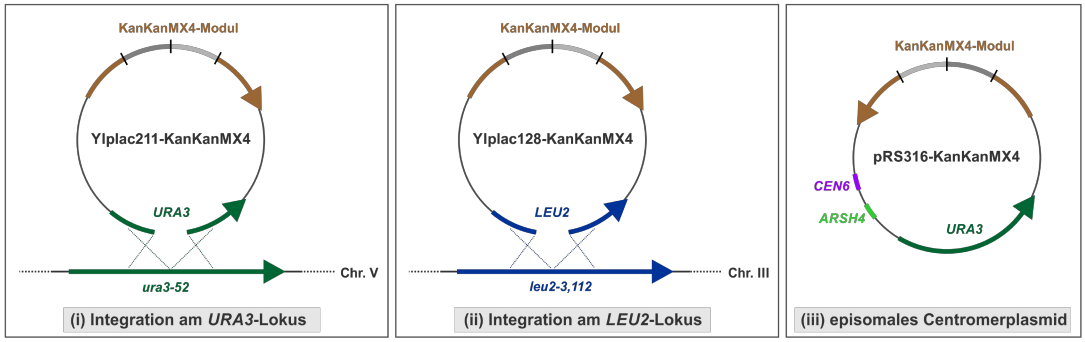


Abbildung 3.6: **Drei Möglichkeiten zum Einbringen des KanKanMX4-Moduls in *S. cerevisiae*. (i)** Das KanKanMX4-Modul wird als Teil des integrativen Plasmids YIplac211-KanKanMX4 am chromosomalen *URA3*-Lokus Uracil-auxotropher Stämme (*ura3-52*) integriert. Um die Integration über homologe Rekombination (angedeutet durch die Kreuze) auszulösen, wird das Plasmid vor der Transformation im *URA3*-Marker geschnitten. Transformanten mit Integration sind Uracil-prototroph. **(ii)** Das KanKanMX4-Modul wird als Teil des integrativen Plasmids YIplac128-KanKanMX4 am chromosomalen *LEU2*-Lokus Leucin-auxotropher Stämme (*leu2-3,112*) integriert. Um die Integration über homologe Rekombination auszulösen, wird das Plasmid vor der Transformation im *LEU2*-Marker geschnitten. Transformanten mit Integration sind Leucin-prototroph. **(iii)** Das KanKanMX4-Modul liegt nach der Transformation episomal als Teil des autonom replizierbaren Centromerplasmids pRS316-KanKanMX4 in den Hefezellen vor. CEN6/ARSH4 = Centromer/eukaryotischer Replikationsursprung.

- Generierung unabhängiger KanKanMX4-Transformanten und parallele Analyse
- Bestimmung spontaner Reversionsraten und 4-NQO-induzierter Reversionsfrequenzen
- Vereinzelung der Transformanten und erneute Analyse, um zu sehen, ob die Effekte innerhalb der Klone stabil sind
- Verwendung dreier verschiedener Vektoren zur Einschleusung des KanKanMX4-Moduls in die Hefezellen (Abbildung 3.6) zum Ausschluss eines lokusspezifischen Effekts: chromosomale Integration am *URA3*- bzw. *LEU2*-Lokus mit einem YIplac-Derivat oder episomales Modul nach Transformation mit dem Vektor pRS316-KanKanMX4

Untersuchungen mit dem integrativen Plasmid YIplac211-KanKanMX4

Zunächst wurden Zellen des Wildtyps, der *MPH1*-Deletionsmutante sowie der Phosphorylierungsvarianten *MPH1-5AQ* und *MPH1-5EQ* mit dem Vektor YIplac211-KanKanMX4 transformiert (Seite 68), wobei es zu einer chromosomalen Integration des KanKanMX4-Moduls am *URA3*-Lokus kommt. Für die erhaltenen Transformanten wurde die 4-NQO-induzierte Reversionsfrequenz (Seite 75) sowie die spontane Reversionsrate (Seite 77) bestimmt. Zwar beinhaltet die Bestimmung der induzierten Reversionsfrequenzen auch einzelne Datenpunkte für spontane Reversionsfrequenzen ohne DNA-schädigendes Agens, die Bestimmung der spontanen Reversionsrate anhand von acht Parallelkulturen nach der Medianmethode (LEA & COULSON 1949) ermöglicht aber eine exaktere, vergleichbarere Angabe der tatsächlichen Häufigkeit spontaner Reversionsereignisse. In die Experimente mit einbezogen wurden als Gefrierkultur aufbewahrte, von C. Ede hergestellte YIplac211-KanKanMX4-Transformanten des Wildtyps und *mph1*Δ (im Folgenden bezeichnet als wt (E) und *mph1*Δ (E)), bei denen es sich vermutlich um die Stämme handelt, die für die in EDE *et al.* 2011 publizierten Daten verwendet wurden. Anhand der gesammelten, in Abbildung 3.7 und Tabelle 3.2 präsentierten Daten ergeben sich folgende Beobachtungen:

(i) Die absoluten Messwerte der induzierten Reversionsfrequenzen sowie die relativen Beziehungen sind bei wiederholter Untersuchung gleicher Stämme über mehrere Experimente konstant (vgl. gemittelte Kurvenverläufe in Abbildung 3.7-i).

(ii) Die „alten“ Stämme zeigen den publizierten Phänotyp: *mph1*Δ (E) zeigt im Vergleich zu wt (E) eine starke Reduzierung der induzierten Reversionsfrequenzen (Abbildung 3.7-i).

(iii) Bei den neuen Transformanten zeigt *mph1*Δ zwar eine Reduktion der induzierten Reversionsfrequenzen im Vergleich zum Wildtyp, diese ist aber deutlich geringer (Abbildung 3.7-i). Dies liegt zum einen an einer höheren Frequenz der Deletionsmutante im Vergleich zu *mph1*Δ (E) und zum anderen an einer deutlich niedrigeren Frequenz des Wildtyps im Vergleich zu wt (E).

(iv) Parallel untersuchte, unabhängige Transformanten (I/II) von *MPH1-5EQ* zeigen drastische Unterschiede im Kurvenverlauf bei den induzierten Reversionsfrequenzen (Abbildung 3.7-ii; rot).

(v) Die spontanen Reversionsraten weisen ebenfalls deutliche Unterschiede auf (Tabelle 3.2). Bei genetisch verschiedenen Stämmen kann dies natürlich einen Phänotyp darstellen. Auffällig und zunächst nicht erklärbar sind aber die Daten für *MPH1-5EQ* (I) und *MPH1-5EQ* (II), die sich um den Faktor 10 unterscheiden.

(vi) Die unter (v) beschriebenen Unterschiede der spontanen Reversionsraten sind stabil innerhalb der Nachkommen der unabhängigen Transformanten, wie die Analyse je dreier Vereinzelungen zeigt (Tabelle 3.2). Die Unterschiede scheinen also nach der Transformation genetisch festgelegt.

(vii) Es existiert eine deutliche Korrelation zwischen den spontanen Reversionsraten und dem Kurvenverlauf der induzierten Reversionsfrequenzen: je höher die spontane Reversionsrate, desto höher der Kurvenverlauf. Alle Reversionsereignisse scheinen also um einen vergleichsweise konstanten Faktor erhöht zu sein. Besonders deutlich wird dies erneut am Vergleich von *MPH1-5EQ* (I) und *MPH1-5EQ* (II) in Abbildung 3.7-ii (rot).

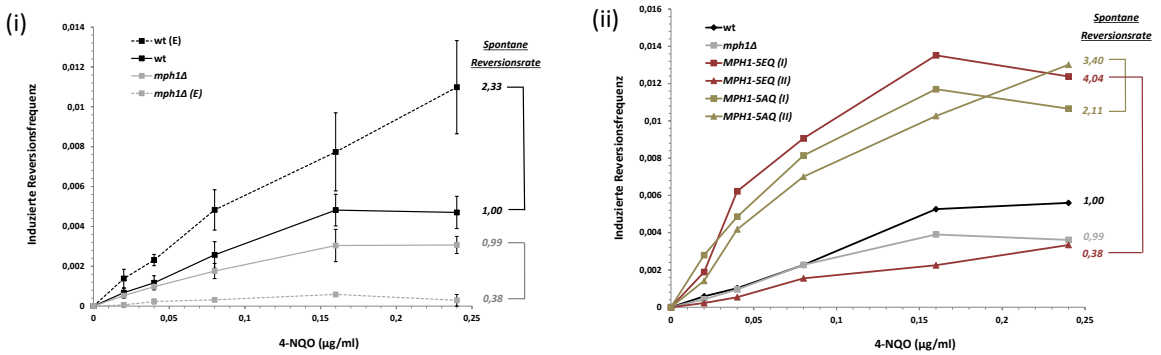


Abbildung 3.7: **Durch 4-NQO-Behandlung induzierte Reversionsfrequenzen von YIplac211-KanKanMX4-Transformanten verschiedener CEN.PK2-1C-Stämme** (Seite 75). Rechts neben der Grafik sind jeweils die zugehörigen, separat ermittelten, spontanen Reversionsraten angegeben (Daten aus Tabelle 3.2). Gleiche Farben zeigen genetisch (theoretisch) identische Stämme an. **(i)** Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD aus unabhängigen Experimenten mit denselben Transformanten von wt, wt (E), *mph1*Δ und *mph1*Δ (E) [n = 4; n = 3; n = 3; n = 2]. **(ii)** Daten eines repräsentativen Experiments, in dem die induzierten Reversionsfrequenzen je zweier unabhängiger Transformanten der Stämme *MPH1-5AQ* und *MPH1-5EQ* mit denen des Wildtyps und von *mph1*Δ verglichen wurden.

Tabelle 3.2: **Spontane Reversionsraten verschiedener YIplac211-KanKanMX4-Transformanten, ermittelt nach der Medianmethode** (LEA & COULSON 1949; Seite 77). Für *MPH1-5AQ* und *MPH1-5EQ* wurden jeweils zwei unabhängige Transformanten untersucht (I–II). Vom Wildtyp (wt; CEN.PK2-1C) sowie von den zwei *MPH1-5EQ*-Isolaten wurden zudem je drei Vereinzelungen getestet (VE 1–VE 3; graue Daten). Die absoluten Werte sind mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben. Die Normierung („Faktor") erfolgte auf den Wildtyp-Wert der ersten Messung.

Stamm	spontane Reversionsrate	Faktor
wt	$2{,}37 \times 10^{-5} \pm 0{,}25 \times 10^{-5}$	**1**
wt – VE 1	$1{,}91 \times 10^{-5} \pm 0{,}20 \times 10^{-5}$	**0,80**
wt – VE 2	$1{,}81 \times 10^{-5} \pm 0{,}19 \times 10^{-5}$	**0,76**
wt – VE 3	$2{,}24 \times 10^{-5} \pm 0{,}24 \times 10^{-5}$	**0,95**
wt (E)	$5{,}51 \times 10^{-5} \pm 0{,}53 \times 10^{-5}$	**2,33**
mph1Δ	$2{,}34 \times 10^{-5} \pm 0{,}25 \times 10^{-5}$	**0,99**
***mph1Δ* (E)**	$9{,}10 \times 10^{-6} \pm 1{,}11 \times 10^{-6}$	**0,38**
***MPH1-5AQ* (I)**	$4{,}99 \times 10^{-5} \pm 0{,}63 \times 10^{-5}$	**2,11**
***MPH1-5AQ* (II)**	$8{,}06 \times 10^{-5} \pm 0{,}77 \times 10^{-5}$	**3,40**

Stamm	spontane Reversionsrate	Faktor
***MPH1-5EQ* (I)**	$9{,}57 \times 10^{-5} \pm 0{,}97 \times 10^{-5}$	**4,04**
MPH1-5EQ (I) – VE 1	$1{,}05 \times 10^{-4} \pm 0{,}10 \times 10^{-4}$	**4,43**
MPH1-5EQ (I) – VE 2	$7{,}87 \times 10^{-5} \pm 0{,}95 \times 10^{-5}$	**3,32**
MPH1-5EQ (I) – VE 3	$9{,}13 \times 10^{-5} \pm 0{,}86 \times 10^{-5}$	**3,85**
***MPH1-5EQ* (II)**	$8{,}98 \times 10^{-6} \pm 1{,}03 \times 10^{-6}$	**0,38**
MPH1-5EQ (II) – VE 1	$7{,}69 \times 10^{-6} \pm 0{,}89 \times 10^{-6}$	**0,32**
MPH1-5EQ (II) – VE 2	$8{,}44 \times 10^{-6} \pm 0{,}97 \times 10^{-6}$	**0,36**
MPH1-5EQ (II) – VE 3	$7{,}21 \times 10^{-6} \pm 0{,}84 \times 10^{-6}$	**0,30**

Es gibt also offenbar einen genetisch stabilen Unterschied zwischen unabhängigen YIplac211-KanKanMX4-Transformanten, der spontane und induzierte Reversionen gleichermaßen erhöht.

Untersuchung mit dem integrativen Plasmid YIplac128-KanKanMX4

Um auszuschließen, dass es sich bei dem beobachteten Effekt um ein lokusspezifisches Phänomen am *URA3*-Lokus handelt, wurden spontane Reversionsraten und induzierte Reversionsfrequenzen zusätzlich für Transformanten bestimmt, bei denen das KanKanMX4-Modul am *LEU2*-Lokus integriert wurde. Dazu wurde das Plasmid YIplac128-KanKanMX4 genutzt. Ein ortspezifischer Unterschied könnte dadurch bedingt sein, dass das in CEN.PK2-1C für die Uracil-Auxotrophie verantwortliche Allel *ura3-52* ein inseriertes Ty1-Element (stabiles Transposon; ROSE & WINSTON 1984) enthält, welches möglicherweise Einfluss auf die Rekombination in der näheren Umgebung nehmen könnte. Dahingegen enthält das Allel *leu2-3,112* lediglich Punktmutationen, die nicht mit rekombinatorischen Ereignissen interferieren sollten.

Tabelle 3.3: **Spontane Reversionsraten von jeweils drei unabhängigen YIplac128-KanKanMX4-Transformanten (I–III) der Stämme CEN.PK2-1C (wt), *mph1Δ* und *MPH1-5EQ*, ermittelt nach der Medianmethode** (LEA & COULSON 1949; Seite 77). Die absoluten Werte sind mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben. Die Normierung („Faktor") erfolgte auf wt (III).

Stamm	spontane Reversionsrate	Faktor
wt (I)	$2{,}78 \times 10^{-5} \pm 0{,}30 \times 10^{-5}$	**1,15**
wt (II)	$7{,}48 \times 10^{-5} \pm 0{,}71 \times 10^{-5}$	**3,10**
wt (III)	$2{,}41 \times 10^{-5} \pm 0{,}25 \times 10^{-5}$	**1**
***mph1Δ* (I)**	$7{,}92 \times 10^{-5} \pm 0{,}81 \times 10^{-5}$	**3,28**
***mph1Δ* (II)**	$8{,}23 \times 10^{-5} \pm 0{,}80 \times 10^{-5}$	**3,41**
***mph1Δ* (III)**	$4{,}08 \times 10^{-5} \pm 0{,}41 \times 10^{-5}$	**1,69**

Stamm	spontane Reversionsrate	Faktor
***MPH1-5EQ* (I)**	$8{,}97 \times 10^{-5} \pm 0{,}91 \times 10^{-5}$	**3,72**
***MPH1-5EQ* (II)**	$7{,}87 \times 10^{-5} \pm 0{,}81 \times 10^{-5}$	**3,26**
***MPH1-5EQ* (III)**	$6{,}18 \times 10^{-5} \pm 0{,}65 \times 10^{-5}$	**2,56**

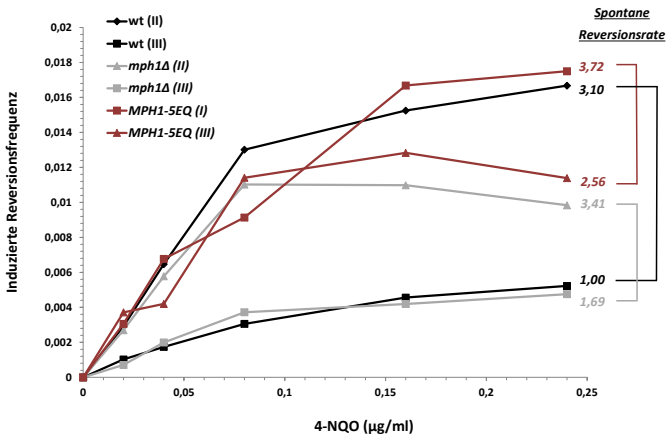


Abbildung 3.8: **Durch 4-NQO-Behandlung induzierte Reversionsfrequenzen von YIplac128-KanKanMX4-Transformanten verschiedener CEN.PK2-1C-Stämme** (Seite 75). Gezeigt sind die Daten eines repräsentativen Experiments, in dem die induzierten Reversionsfrequenzen je zweier unabhängiger Transformanten des Wildtyps sowie der Stämme *mph1Δ* und *MPH1-5EQ* gemessen wurden. Rechts neben der Grafik sind die zugehörigen, separat ermittelten, spontanen Reversionsraten angegeben (Daten aus Tabelle 3.3).

Exemplarisch wurden je zwei bzw. drei unabhängige YIplac128-KanKanMX4-Transformanten für den Wildtyp, *mph1*Δ und *MPH1-5EQ* untersucht. Anhand der Ergebnisse der Bestimmung der spontanen Reversionsraten und der induzierten Reversionsfrequenzen in Tabelle 3.3 und Abbildung 3.8 lässt sich konstatieren, dass sich die Anzahl der Reversionsereignisse auch bei Insertion des KanKanMX4-Moduls am *LEU2*-Lokus in ähnlicher Weise verhält wie im vorangegangenen Abschnitt für den *URA3*-Lokus beschrieben: unabhängige Transformanten unterscheiden sich in der Anzahl der Reversionsereignisse und die Höhe der spontanen Reversionsrate korreliert mit der Frequenz induzierter Reversionen. Abbildung 3.8 verdeutlich noch einmal anschaulich das Problem: bei nur einer zufällig ausgesuchten Transformante pro Stammhintergrund hätte sich jede mögliche relative Beziehung zwischen wt, *mph1*Δ und *MPH1-5EQ* ergeben können.

Untersuchung mit dem episomalen Plasmid pRS316-KanKanMX4

Statt das KanKanMX4-Modul über homologe Rekombination in ein Chromosom zu integrieren, kann es auch auf einem episomalen Centromerplasmid in die Zellen eingebracht werden. Dies hat jedoch den Nachteil, dass die Schwesterchromatid-Interaktionen nicht in ihrer „natürlichen Umgebung“ beobachtet werden, was die Aussagekraft erhaltener Ergebnisse schmälert. Trotzdem wurde auch für das Centromerplasmid pRS316-KanKanMX4 geschaut, inwiefern die Anzahl der Reversionen abhängig von der Auswahl der Transformanten ist. Dazu wurden exemplarisch für den Wildtyp, *mph1*Δ und *MPH1-5EQ* je zwei unabhängige Transformanten aus Einzelkolonien und ein Transformanten-Pool (keine Vereinzelung nach der Transformation) untersucht. Tabelle 3.4 ist zu entnehmen, dass die Streuung der Werte für die spontanen Reversionsraten im Vergleich zum integrativen System geringer erscheint. Die absoluten Werte liegen allerdings um den Faktor zehn über den Reversionsraten an den chromosomalen Loci. Trotzdem verdeutlichen die in Abbildung 3.9 aufgetragenen induzierten Reversionen, dass auch in diesem Fall die zufällige Auswahl einzelner Klone das Ergebnis verändern kann: während bei den gepoolten Transformanten *MPH1-5EQ* einen Kurvenverlauf ähnlich dem von *mph1*Δ zeigt, liegt die induzierte Reversionsfrequenz der isolierten Transformante über der des Wildtyps.

Tabelle 3.4: **Spontane Reversionsraten von pRS316-KanKanMX4-Transformanten der Stämme CEN.PK2-1C (wt), *mph1*Δ und *MPH1-5EQ*, ermittelt nach der Medianmethode** (LEA & COULSON 1949; Seite 77). Untersucht wurde jeweils ein Pool von Transformanten sowie zwei Vereinzelungen (I–II). Die absoluten Werte sind mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben. Die Normierung („Faktor“) erfolgte auf wt (Pool).

Stamm	spontane Reversionsrate	Faktor
wt (Pool)	$1{,}27 \times 10^{-4} \pm 0{,}13 \times 10^{-4}$	**1**
wt (I)	$1{,}41 \times 10^{-4} \pm 0{,}14 \times 10^{-4}$	**1,11**
wt (II)	$2{,}34 \times 10^{-4} \pm 0{,}23 \times 10^{-4}$	**1,85**
***mph1Δ* (Pool)**	$1{,}87 \times 10^{-4} \pm 0{,}19 \times 10^{-4}$	**1,47**
***mph1Δ* (I)**	$1{,}19 \times 10^{-4} \pm 0{,}13 \times 10^{-4}$	**0,94**
***mph1Δ* (II)**	$1{,}02 \times 10^{-4} \pm 0{,}11 \times 10^{-4}$	**0,81**

Stamm	spontane Reversionsrate	Faktor
***MPH1-5EQ* (Pool)**	$1{,}43 \times 10^{-4} \pm 0{,}15 \times 10^{-4}$	**1,12**
***MPH1-5EQ* (I)**	$1{,}88 \times 10^{-4} \pm 0{,}19 \times 10^{-4}$	**1,48**
***MPH1-5EQ* (II)**	$1{,}29 \times 10^{-4} \pm 0{,}13 \times 10^{-4}$	**1,02**

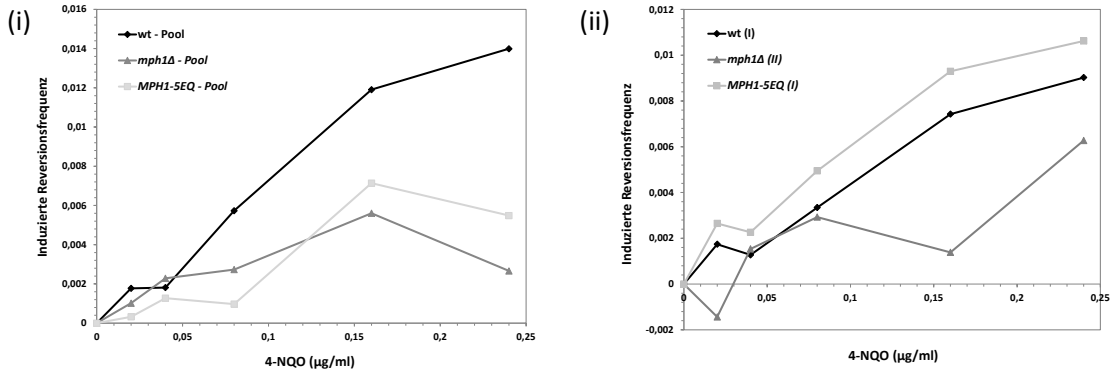


Abbildung 3.9: **Durch 4-NQO-Behandlung induzierte Reversionsfrequenzen von pRS316-KanKanMX4-Transformanten verschiedener CEN.PK2-1C-Stämme** (Seite 75). Gezeigt sind jeweils die Daten eines repräsentativen Experiments. **(i)** Für die Messung wurde jeweils ein Pool von Transformanten eingesetzt, d.h. alle auf Selektivmedium gewachsenen Zellen eines Ausstrichs nach der Transformation wurden vereinigt. **(ii)** Für die Messung wurde jeweils ein durch Vereinzelung gewonnener Klon verwendet.

Es ist zu vermuten, dass einzelne Transformanten mehrere Plasmide aufgenommen und stabil etabliert haben und daher eine höhere Anzahl an Reversionsereignissen zeigen als die Vergleichsstämme mit nur einem Plasmid pro Zelle. Unklar ist, wie oft dies geschieht und inwiefern das Poolen der Transformanten den Effekt vollständig ausgleichen kann, also ob die gepoolten Zellpopulationen im Mittel eine ähnliche Plasmid-Kopienzahl enthalten. Nur in diesem Fall wären mit den Zellpopulationen gewonnene Daten verwertbar. Es lässt sich als Nebenbeobachtung bereits festhalten, dass es nachweislich zu vermeiden ist, bei *assays*, die auf der Transformation mit episomalen Plasmiden beruhen und keine interne Kontrolle beinhalten, von Einzelklonen auszugehen.

3.2.3 EINFLUSS DER KOPIENZAHL DES KANKANMX4-MODULS

Während es bei einem Centromerplasmid-basierten System relativ naheliegend ist, dass die Aufnahme mehrerer KanKanMX4-Plasmide zu einer erhöhten Anzahl detektierter Ereignisse führen kann, wird bei der chromosomalen Integration eines Plasmids meist wie selbstverständlich von einer einzelnen Insertion ausgegangen. Dass es bei der Plasmid-Integration über homologe Rekombination aber erwiesenermaßen in vielen Fällen zu multiplen Insertionen in Form von Tandems am Ziellokus kommt, ist eine zu wenig beachtete Tatsache. J. Szostak und T. Orr-Weaver haben bereits vor über 40 Jahren beschrieben, dass in 50 % der Transformanten das Integrat aus zwei bis fünf Kopien der in die Zellen eingebrachten Plasmide besteht (SZOSTAK & WU 1979, ORR-WEAVER *et al.* 1981, ORR-WEAVER & SZOSTAK 1983). Dabei handelt es sich vermutlich um das Ergebnis eines einzelnen Integrationsereignisses, bei dem ein Multimer aus mehreren Plasmiden mit dem genomischen Lokus rekombiniert (PLESSIS & DUJON 1993). Daraus ergab sich die Hypothese, dass die beobachteten, vererbbaren Unterschiede der unabhängigen Transformanten mit chromosomaler KanKanMX4-Integration auf einer unterschiedlichen Anzahl integrierter Module beruhen.

Entwicklung einer quantitativen *real-time*-PCR (qPCR) zur Bestimmung der Kopienzahl

Um die Kopienzahl des KanKanMX4-Moduls im Genom der in Abschnitt 3.2.2 untersuchten *S. cerevisiae*-Stämme zu bestimmen, wurde das in Abbildung 3.10 erläuterte System für eine qPCR geplant:

- URA-PCR: spezifisch für *URA3* und *ura3-52*
- LEU-PCR: spezifisch für *LEU2* und *leu2-3,112*
- KanKan-PCR: spezifisch für nicht revertiertes KanKanMX4-Modul

Dabei dient der Lokus, an dem keine Integration stattfindet, jeweils zur internen Normierung. Bei einer einfachen Integration verdoppelt sich aufgrund der homologen Rekombination zwischen genomischem Markerallel und linearisiertem Plasmid die Kopienzahl das Markerallels und zusätzlich sollte das KanKanMX4-Modul in einfacher Kopienzahl nachweisbar sein. Bei mehrfacher Integration erhöht sich jeweils die zu erwartende Kopienzahl entsprechend dem Schema in Abbildung 3.11.

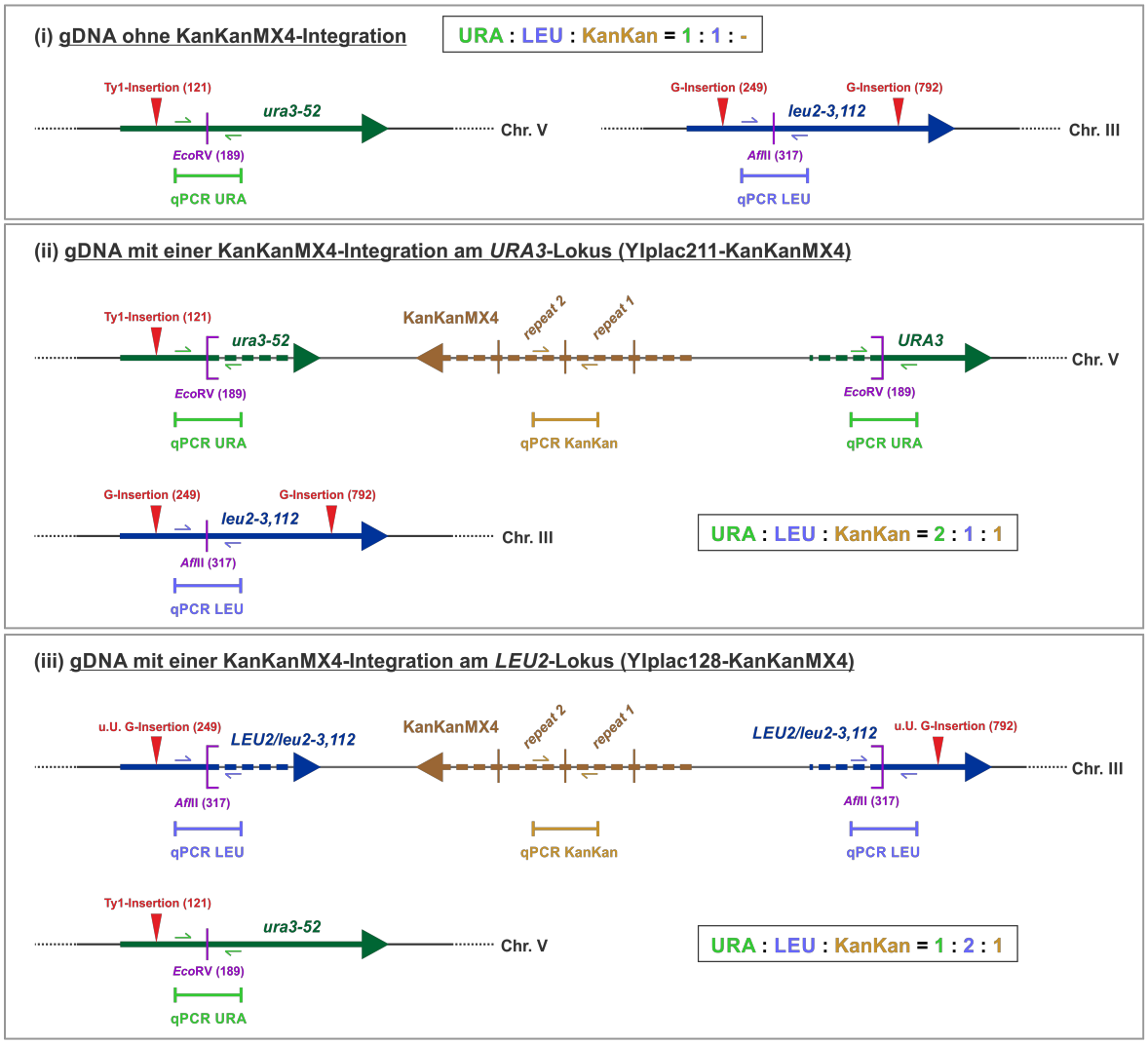


Abbildung 3.10: **Schematische Darstellung der chromosomalen *URA3*- und *LEU2*-Loci im Genom von *S. cerevisiae* ohne (i) und mit Integration des KanKanMX4-Moduls (ii; iii).** Für alle drei Situationen sind die Primer (Halbpfeile) und zu amplifizierenden Bereiche der qPCR zur Bestimmung der Zahl der KanKanMX4-Integrationen angegeben. In den Kästen ist das theoretisch zu erwartende Verhältnis der Kopienzahl dargestellt. Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Afl*III und *Eco*RV markieren jeweils das Zentrum der homologen Rekombination bei der Integration der YIplac-Derivate, welche vor der Transformation mit dem jeweiligen Enzym geschnitten wurden. **(i)** Der Stamm CEN.PK2-1C ist Uracil- und Leucin-auxotroph aufgrund der nicht-funktionalen Allele *ura3-52* und *leu2-3,112*. Während bei *ura3-52* eine etwa 6 kb große Ty1-Insertion zur Zerstörung des offenen Leserahmens führt, finden sich bei *leu2-3,112* zwei einzelne Guanin-Insertionen, die jeweils einen *frameshift* bedingen. Da die qPCR-Primer keinen Unterschied zwischen Wildtyp- und mutanten Allelen machen, sollte die qPCR das 1:1-Verhältnis der Kopienzahl zwischen *URA3*- und *LEU2*-Lokus abbilden. Die KanKan-PCR zur Detektion des KanKanMX4-Moduls sollte hier kein Produkt liefern. **(ii)** Situation nach

einfacher Integration von YIplac211-KanKanMX4 am *URA3*-Lokus. Bei einem *ura3-52*- und einem *URA3*-Allel sollte die URA-PCR nun die doppelte Kopienzahl im Vergleich zu untransformierten Zellen anzeigen, während zudem eine Kopie des KanKanMX4-Moduls nachweisbar sein sollte. **(iii)** Situation nach einfacher Integration von YIplac128-KanKanMX4 am *LEU2*-Lokus. Die LEU-PCR sollte hier die doppelte Kopienzahl im Vergleich zu untransformierten Zellen anzeigen, während zudem eine Kopie des KanKanMX4-Moduls nachweisbar sein sollte. Da die Transformanten auf SC-Leu selektiert werden, ist es auf mindestens einer Seite der Integration durch Genkonversion zur Reversion des *frameshifts* gekommen, wodurch ein funktionales *LEU2* wiederhergestellt wurde.

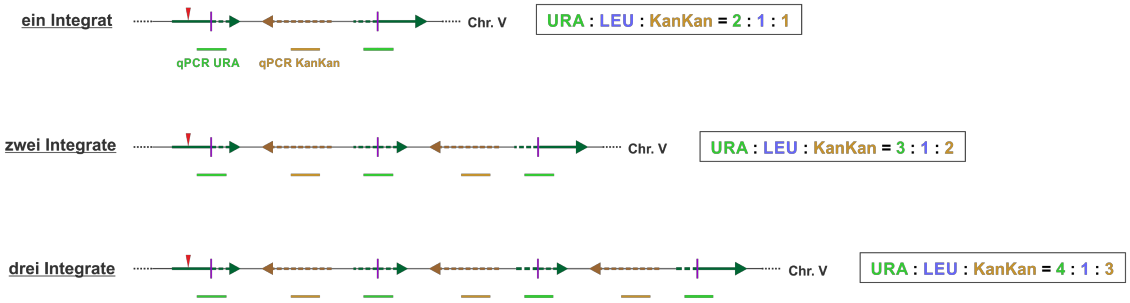


Abbildung 3.11: **Schematische Darstellung des chromosomalen *URA3*-Lokus nach Integration von ein, zwei oder drei YIplac211-KanKanMX4-Plasmiden.** Theoretisch sollte jede vollständige Integration die Kopienzahl des KanKanMX4-Moduls sowie der *URA3*-Allele um eins erhöhen, sodass es zu den angegebenen Verhältnissen käme. Diese sollten durch die geplante qPCR darstellbar sein. Für den *LEU2*-Lokus wäre nach mehrfacher YIplac128-KanKanMX4-Integration derselbe Zusammenhang für die KanKanMX4- und *LEU2*-Kopienzahl zu erwarten (nicht gezeigt). Farben und Darstellung gemäß Abbildung 3.10.

Die Kopienzahl chromosomaler KanKanMX4-Module variiert stark zwischen den Transformanten

Von den in Kapitel 3.2.2 phänotypisch untersuchten Stämmen wurde genomische DNA isoliert und die Kopienzahl des KanKanMX4-Moduls sowie des Markerallels des Insertionsortes relativ zum nicht an der Integration beteiligten Lokus mit Hilfe der im vorigen Abschnitt beschriebenen qPCR bestimmt (Seite 57).

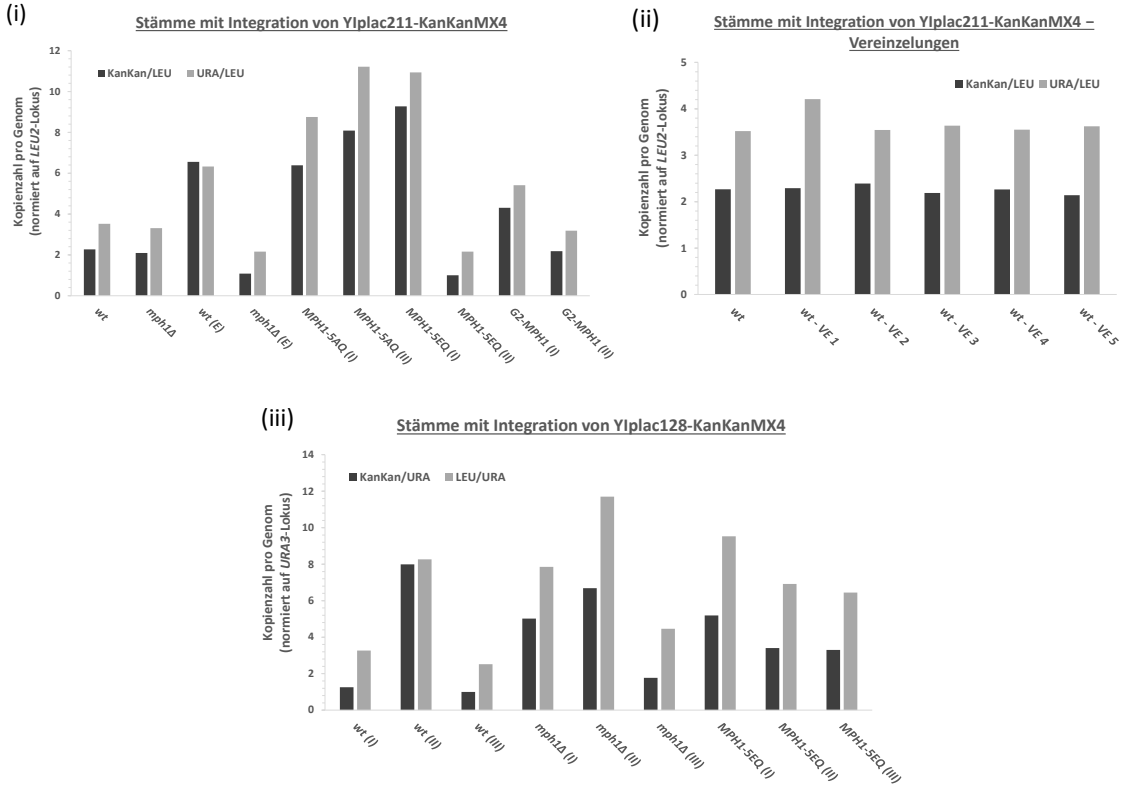


Abbildung 3.12: **Ergebnis der quantitativen *real-time*-PCR zur Bestimmung der genomischen Kopienzahl des KanKanMX4-Moduls in verschiedenen YIplac211-KanKanMX4 bzw. YIplac128-KanKanMX4-Transformanten.** Die Stämme entsprechen den bereits in Kapitel 3.2.2 phänotypisch untersuchten Isolaten (*G2-MPH1* wird in Kapitel 3.3.2 erläutert). Von allen Stämmen wurde genomische DNA isoliert und als *template* für die in Abbildung 3.10 (Seite 112) dargestellte qPCR (Seite 57) eingesetzt. Dargestellt ist jeweils die Kopienzahl pro Genom, berechnet als relative Quantifizierung mit dem nicht in die Integration involvierten Lokus als interne Normierung und einem untransformierten Stamm bzw. einem Stamm mit nur einer Integration als Kalibrierung (Details siehe Seite 57). **(i; ii)** Stämme mit YIplac211-KanKanMX4-Integration: Kopienzahl des KanKanMX4-Moduls und des *URA3*-Lokus relativ zum *LEU2*-Lokus. Für (ii) wurden fünf Vereinzelungen der Wildtyp-Transformante untersucht. **(iii)** Stämme mit YIplac128-KanKanMX4-Integration: Kopienzahl des KanKanMX4-Moduls und des *LEU2*-Lokus relativ zum *URA3*-Lokus.

Anhand der in Abbildung 3.12 dargestellten Auswertung der qPCR lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

(i) Die Kopienzahl des KanKanMX4-Moduls unterscheidet sich sowohl bei der Integration am *URA3*-Lokus als auch bei der Integration am *LEU2*-Lokus stark zwischen den getesteten Stämmen (Abbildung 3.12-i/iii). Es wurden zwischen einer und neun Kopien detektiert, wobei jegliche Kopienzahl vertreten ist.

(ii) Die Kopienzahl des Markerallels am Integrationslokus bestätigt als interne Kontrolle das Vorliegen von Mehrfach-Integrationen (Abbildung 3.12-i/iii). Besonders für YIplac211-KanKanMX4 liegt die Kopienzahl fast immer entsprechend den Erwartungen (vgl. Abbildung 3.11) etwa um eins höher als die des KanKanMX4-Moduls.

(iii) Die Kopienzahl bleibt bei Vereinzelungen eines Stammes konstant (Abbildung 3.12-ii), die Anzahl der Integrationen scheint also nach der Transformation festgelegt.

Die KanKanMX4-Kopienzahl korreliert mit der spontanen Reversionsrate

Beim Vergleich der KanKanMX4-Kopienzahl und der spontanen Reversionsrate der getesteten Stämme zeigt sich eine eindeutige Korrelation (Abbildung 3.13): je mehr Integrationen passiert sind, desto höher ist auch die spontane Reversionsrate. Da oben bereits die Korrelation zwischen spontaner und induzierter Reversionsfrequenz festgestellt wurde, korreliert demnach auch der Kurvenverlauf der induzierten Reversionsfrequenzen mit der Anzahl der integrierten Plasmide. Dabei scheint es einen annähernd linearen Zusammenhang zu geben. Es ist aber nicht möglich, die Kurven der induzierten Reversionsfrequenzen unabhängiger KanKanMX4-Transformanten gleicher Ausgangsstämme durch einfache Division durch die Anzahl der Integrationen zur Deckung zu bringen (nicht gezeigt).

Die multiple Integration des KanKanMX4-Plasmids im Chromosom der Hefe ist nach den vorliegenden Daten als Ursache der in früheren Arbeiten und im Rahmen dieser Arbeit festgestellten Unterschiede zwischen unabhängigen Transformanten anzusehen. Da es sich bei den mehrfachen Integrationen nicht um Einzelfälle handelt, sondern die einfache Integration – zumindest in den hier getesteten Stämmen – die Ausnahme darstellt, ist davon auszugehen, dass auch in der Vergangenheit einige der mit dem KanKanMX4-Modul untersuchten Stämme mehrfache Integrationen enthielten. Dies würde zumindest einen Teil der mit diesem System erhaltenen Ergebnisse in Frage stellen. Außerdem stellt sich die Frage, inwiefern die Methode zukünftig zur Messung von Schwesterchromatid-Interaktionen einsetzbar bleibt.

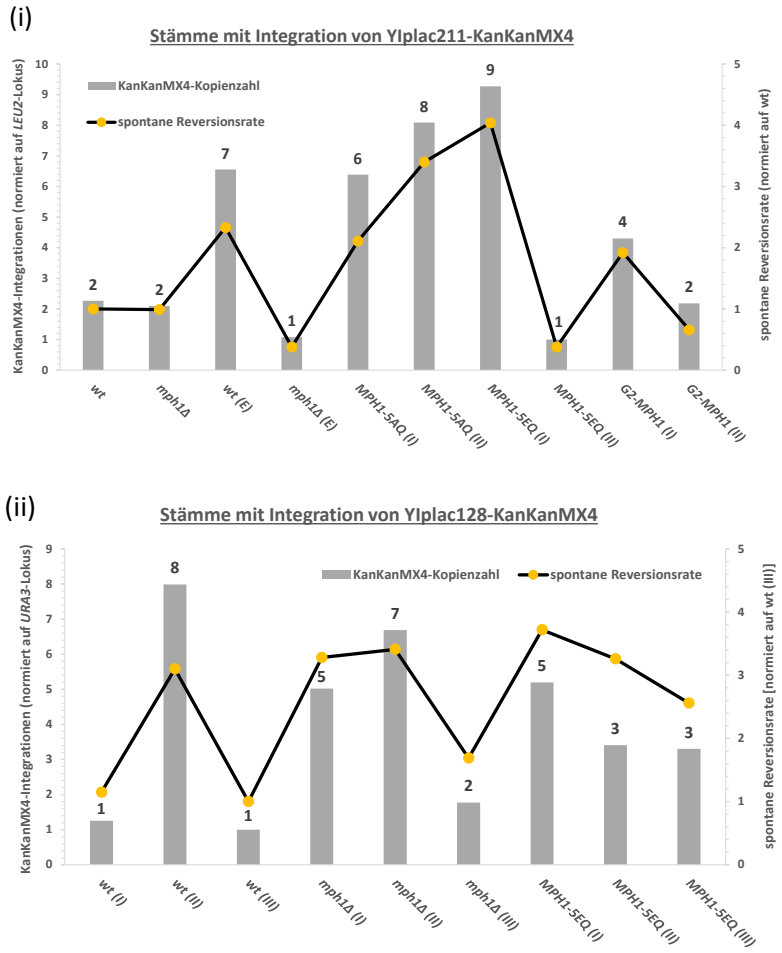


Abbildung 3.13: **Korrelation der Anzahl der KanKanMX4-Integrationen mit der spontanen Reversionsrate des jeweiligen Stammes.** Die Werte der Kopienzahl des KanKanMX4-Moduls entsprechen den in Abbildung 3.12 gezeigten Daten. Die spontanen Reversionsraten wurden Tabelle 3.2 (für i) bzw. Tabelle 3.3 (für ii) entnommen.

Einzelklone mit erhöhter KanKanMX4-Kopienzahl treten auch beim episomalen System auf

Um die Vermutung zu überprüfen, dass auch beim episomalen System die höhere Anzahl an Reversionsereignissen bei einzelnen Transformanten durch die Dosis des KanKanMX4-Moduls bedingt wird, wurde auch die KanKanMX4-Kopienzahl einzelner Klone nach Transformation mit pRS316-KanKanMX4 bestimmt. Dazu wurden die in Abbildung 3.10 vorgestellten PCR-Primer verwendet. Das Plasmid pRS316-KanKanMX4 enthält den *URA3*-Marker und das KanKanMX4-Modul jeweils in einfacher Kopie (vgl. Abbildung 2.1, Seite 38), während der chromosomale *LEU2*-Lokus zur Normierung genutzt werden kann. Wildtyp-Zellen wurden mit 2 bzw. 10 µg pRS316-KanKanMX4 transformiert, auf Selektivmedium gewachsene, einzelne Kolonien gepickt und chromosomale DNA einschließlich der episomalen Vektoren extrahiert. Das Ergebnis der quantitativen *real-time*-PCR (Details siehe Seite 57) ist in Abbildung 3.14 gezeigt. Die Streuung der Werte ist besonders bei 2 µg Plasmid gering. Lediglich zwei der 15 Transformanten enthalten deutlich mehr als zwei Plasmide pro Zelle. Bei einer Menge von 10 µg Plasmid gibt es mehr Ausreißer nach oben. Dies bestätigt, dass eine Vereinzelung die Gefahr der zufälligen Auswahl eines Klons mit einer erhöhten Plasmidzahl birgt, was auch den Unterschied zwischen Einzelklon und Transformanten-Pool in Abbildung 3.9 erklären könnte. Nach den vorliegenden Daten wäre nach

Transformation mit 2 µg Plasmid ohne Vereinzelung von einer hinlänglich homogenen Zellpopulation auszugehen, um die Reversionsfrequenzen verschiedener Stämme miteinander vergleichen zu können.

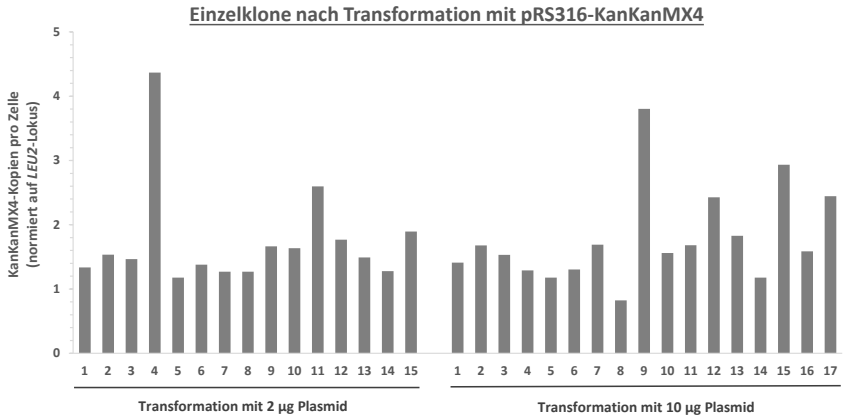


Abbildung 3.14: **Ergebnis der quantitativen *real-time*-PCR zur Bestimmung der Kopienzahl des KanKanMX4-Moduls in unabhängigen pRS316-KanKanMX4-Transformanten.** pRS316-KanKanMX4 wird nicht ins Genom integriert, die KanKanMX4-Kopienzahl entspricht also der Anzahl episomaler Plasmidkopien pro Zelle. Die Transformation wurde einmal mit 2 µg und einmal mit 10 µg Plasmid-DNA durchgeführt und es wurde die angegebene Anzahl von Einzelklonen untersucht. Von allen Klonen wurde genomische DNA inklusive episomaler Plasmide isoliert und als *template* für die in Abbildung 3.10 (Seite 112) dargestellte qPCR (Seite 57) eingesetzt. Dargestellt ist die Kopienzahl pro Zelle, berechnet als relative Quantifizierung mit dem nicht auf pRS316-KanKanMX4 enthaltenen *LEU2*-Lokus als interne Normierung und isolierten Plasmiden als Kalibrierung (Details siehe Seite 57).

3.2.4 ÜBERPRÜFUNG DES *mph1*Δ-PHÄNOTYPS

Für die *MPH1*-Deletionsmutante wurde anhand des KanKanMX4-Moduls eine Reduktion der 4-NQO-induzierten Reversionen auf durchschnittlich 10 % im Vergleich zum Wildtyp beschrieben, was eine der Grundlagen für die Postulierung einer zusätzlichen Funktion von Mph1 beim Aufbau oder bei der Stabilisierung von *D-loops* war (EDE *et al.* 2011). Diese starke Reduktion konnte von mir im Rahmen dieser Arbeit nur mit den alten Transformanten, nicht aber mit neuen KanKanMX4-Transformanten reproduziert werden (vgl. Abbildung 3.7-i bzw. Abbildung 3.15). Ich konnte zeigen, dass diese Diskrepanz zumindest teilweise durch eine unterschiedliche Kopienzahl des KanKanMX4-Moduls aufgrund multipler Integration des linearisierten Vektors erklärbar ist: während wt (E) sechs KanKanMX4-Kopien enthält, weist *mph1*Δ (E) nur eine Kopie auf (vgl. Abbildung 3.13-i). Eine höhere KanKanMX4-Dosis führt mutmaßlich zu mehr detektierbaren Reversionsereignissen und verfälscht den phänotypischen Unterschied, der rein durch das Fehlen von Mph1 verursacht wird.

Um zu überprüfen, ob und in welchem Umfang die Deletion von *MPH1* tatsächlich eine Reduktion induzierter Reversionsereignisse verursacht, müssten idealerweise Isolate mit je einer einzigen KanKanMX4-Integration verglichen werden. Entsprechende Transformanten befanden sich nicht unter den getesteten Stämmen, die YIplac211-KanKanMX4-Transformanten des Wildtyps und von *mph1*Δ enthielten allerdings jeweils zwei Integrationen, was sie auf Grundlage der vorhandenen Daten am geeignetsten für einen Vergleich macht. Abbildung 3.15 zeigt den Vergleich der mit den alten und neuen Transformanten gewonnenen Daten, wobei die induzierten Reversionsfrequenzen zunächst auf den Wildtyp normiert und anschließend gemittelt wurden. C. Ede hat anhand zahlreicher Messungen zeigen

können, dass die induzierten Reversionsfrequenzen bei chromosomaler Integration des KanKanMX4-Moduls unabhängig von der 4-NQO-Konzentration im Vergleich zum Wildtyp immer etwa um den gleichen Faktor verschieden sind (EDE 2009). Dies ist auch für die hier ermittelten Daten der Fall. Somit kann der Mittelwert der normierten induzierten Reversionsfrequenzen als Kennwert für eine Mutante dienen (Abbildung 3.15-iv). Während die Reduktion auf rund 6 % in etwa dem publizierten Wert entspricht, reduziert sich der Wert bei den neuen Transformanten mit jeweils zwei KanKanMX4-Integrationen nur auf etwa 72 % des Wildtyp-Niveaus.

Auch mit dem episomalen System wurde bei Verwendung des Transformanten-Pools eine geringere Reduktion der induzierten Reversionsereignisse detektiert. Die in Abbildung 3.9-i (Seite 111) enthaltenen Werte entsprechen einer mittleren Reduktion auf 59 ± 40 % im Vergleich zum Wildtyp. Unter Vorbehalt der hohen Streuung, die mit dem episomalen System einhergeht, unterstützt dieser Wert die Annahme, dass die Deletion von *MPH1* zu einer geringeren Reduktion der 4-NQO-induzierten Reversionsfrequenz führt als bisher angenommen.

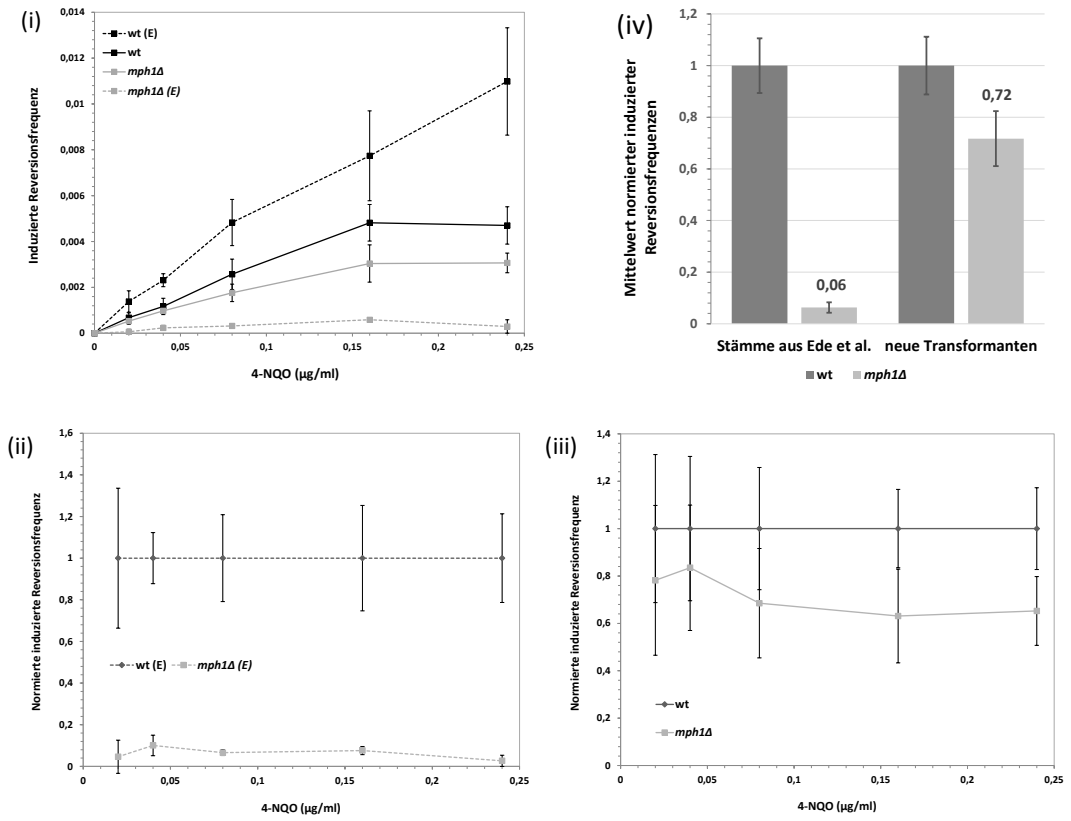


Abbildung 3.15: Vergleich des mit den alten (EDE *et al.* 2011) und des mit den neuen Transformanten ermittelten Phänotyps der *mph1*Δ-Mutante bezüglich der 4-NQO-induzierten Reversionsfrequenz. Nach den in Abschnitt 3.2.3 gezeigten Daten enthalten wt und *mph1*Δ jeweils zwei KanKanMX4-Integrationen, während wt (E) und *mph1*Δ (E) sechs bzw. eine Plasmidkopie im Genom tragen. **(i)** Gezeigt sind die Mittelwerte aus unabhängigen Experimenten mit denselben Transformanten von wt, wt (E), *mph1*Δ und *mph1*Δ (E) [n = 4; n = 3; n = 3; n = 2]. Entspricht Abbildung 3.7-i. **(ii)** Darstellung der auf den Wildtyp [wt (E)] normierten induzierten Reversionsfrequenzen von *mph1*Δ (E). **(iii)** Darstellung der auf den Wildtyp (wt) normierten induzierten Reversionsfrequenzen von *mph1*Δ. **(iv)** Mittlere normierte induzierte Reversionsfrequenz im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp. Alle Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD).

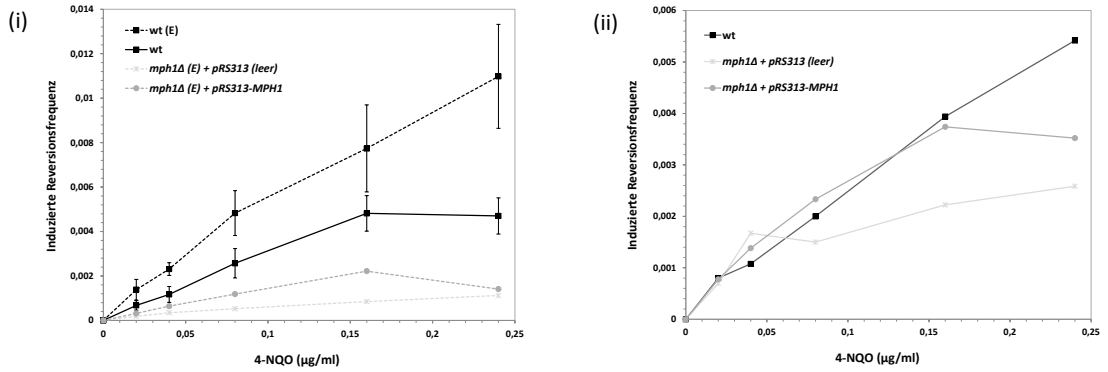


Abbildung 3.16: **Durch 4-NQO-Behandlung induzierte Reversionsfrequenzen von YIplac211-KanKanMX4-Transformanten (Seite 75): Komplementation des *mph1*Δ-Phänotyps. (i)** Daten eines repräsentativen Experiments, in dem versucht wurde, den Phänotyp von *mph1*Δ (E) zu komplementieren. Dazu wurde *mph1*Δ (E) im Vorfeld mit pRS313-MPH1 bzw. dem zugehörigen Leervektor transformiert. pRS313-MPH1 enthält die codierende Sequenz von *MPH1* unter Kontrolle des endogenen *MPH1*-Promotors. Für wt (E) sind die Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Messungen gezeigt. Für den Wildtyp sind die Mittelwerte ± SD aus vier unabhängigen Messungen (eine davon aus dem beschriebenen Experiment) gezeigt. **(ii)** Daten eines repräsentativen Experiments, in dem versucht wurde, den Phänotyp von *mph1*Δ zu komplementieren. Dazu wurde *mph1*Δ im Vorfeld mit pRS313-MPH1 bzw. dem zugehörigen Leervektor transformiert.

Zur Überprüfung dieser Annahme wurde versucht, die jeweilige Reduktion der induzierten Reversionsfrequenz durch Expression von *MPH1* von einem Plasmid zu komplementieren. Wie Abbildung 3.16 zeigt, konnte die starke Reduktion der alten Transformante *mph1*Δ (E) nur geringfügig ausgeglichen werden (Abbildung 3.16-i), während der Phänotyp der neuen Transformante von *mph1*Δ mit Ausnahme der höchsten 4-NQO-Konzentration komplementiert wurde (Abbildung 3.16-ii). Dies stützt die Vermutung, dass die beschriebene starke Reduktion der induzierten Reversionsfrequenz nicht allein auf das Fehlen von Mph1 zurückzuführen ist.

Für die spontane Reversionsrate konnte ich keinen Unterschied zwischen dem Wildtyp und *mph1*Δ mit jeweils zwei Integrationen von YIplac211-KanKanMX4 feststellen (vgl. Tabelle 3.2).

Weitere Untersuchungen an Stämmen mit nur einer Integration des Moduls sowie mit anderen DNA-schädigenden Agenzien konnten im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr durchgeführt werden.

Die festgestellten Zweifel am Ausmaß der durch das Fehlen von Mph1 verursachten Reduktion von Schwesterchromatid-Interaktionen verlangen zum einen nach einer Neubewertung einzelner für *mph1*Δ beschriebener Phänotypen bezüglich Details der postulierten Funktion von Mph1. Zum anderen bedeuteten die neuen Befunde den Wegfall des sensitiven KanKanMX4-*assays* mit einem starken *mph1*Δ-Phänotyp zur Untersuchung der Mph1-Phosphorylierungsmutanten.

3.3 IST MPH1 IN DER S-PHASE ENTBEHRLICH?

Nicht reparierte DNA-Schäden können bei der Replikation zu einem Arrest oder einem Kollaps der Replikationsgabel führen (vgl. Seite 11). Wie in Kapitel 1.2.2.3 (Seite 12) beschrieben, verfügt jede Zelle über einen ganzen Werkzeugkasten von Schadenstoleranzmechanismen, die für einen geordneten Abschluss der Replikation und die „Übergabe“ intakter Chromosomen an die Tochterzellen notwendig sind.

3.3.1 KÖNNEN WIR DAS VERSCHIEBEN?

Nicht alle Replikationsprobleme müssen an der Replikationsgabel abschließend gelöst werden. Das *repriming* erlaubt es der Zelle in vielen Fällen, die Replikation jenseits arretierender Läsionen fortzusetzen und zurückbleibende einzelsträngige DNA-Bereiche postreplikativen Prozessen zu überlassen. Die *RAD6*/*RAD18*-abhängige postreplikative Reparatur (PRR) hat ihren Namen ursprünglich erhalten, weil die beteiligten Faktoren für die Beseitigung genau solcher Einzelstranglücken in den Replikationsprodukten nach UV-Bestrahlung notwendig waren (RUPP *et al.* 1971, LEHMANN 1972, DI CAPRIO & COX 1981, PRAKASH 1981). Mit der Entdeckung der Unterteilung der PRR in fehlerbehaftete Transläsionssynthese und fehlerfreie Schadensumgehung durch *template switch* ging die vorherrschende Meinung zu Modellen über, die die Schadenstoleranzprozesse – zumindest für Arreste des *leading strands* – direkt an der Replikationsgabel platzierten. Dazu trug bei, dass als Mechanismus der fehlerfreien PRR vor allem *fork regression* postuliert und die Regulation der PRR durch die differentielle Ubiquitinierung der replikativen *sliding clamp* PCNA entschlüsselt wurde (HOEGE *et al.* 2002, STELTER & ULRICH 2003).

Die Kehrtwende zurück zur ursprünglichen Vorstellung der zeitlichen und räumlichen Trennung der PRR von der Replikation markieren zwei Publikationen aus dem Jahr 2010, die beschreiben, dass die *RAD6*/*RAD18*-abhängigen Prozesse nicht nur entkoppelt von der Replikationsgabel stattfinden, sondern sogar entkoppelt von der gesamten Replikation erst in der G2-Phase ablaufen können (DAIGAKU *et al.* 2010, KARRAS & JENTSCH 2010). Die Hypothese des postreplikativen *gap fillings* als vorherrschender Mechanismus wurde weiter gestützt durch die Beobachtung, dass sich bei moderater Schadensdichte lokale Cluster einzelsträngiger DNA (RPA-Foci) räumlich getrennt von replikationsaktiven Bereichen im Zellkern nachweisen lassen, die durch TLS oder rekombinationsabhängige Mechanismen aufgelöst werden (WONG *et al.* 2020).

Dennoch gibt es Prozesse, die nicht oder nur schwer vorstellbar von der Replikationsgabel zu trennen sind. Dazu gehört die Reinitiation kollabierter Replikationsgabeln durch homologe Rekombination und die Umstrukturierung der Replikationsgabel durch *fork regression*. Bei beiden Prozessen wird eine Beteiligung von Mph1 diskutiert. Ich wollte daher testen, ob *S. cerevisiae* während der S-Phase auf Mph1 angewiesen ist oder ob sich die Expression von *MPH1* folgenlos auf die G2/M-Phase begrenzen lässt. Dazu wurde das von KARRAS & JENTSCH (2010) entwickelte „G2-*Tag*“ genutzt.

3.3.2 G2-*TAG*: BEGRENZUNG DER EXPRESSION AUF DIE G2/M-PHASE

Das „G2-*Tag*“ wurde von KARRAS & JENTSCH (2010) entwickelt, um die Expression ausgesuchter Gene auf die G2/M-Phase begrenzen zu können. Es nutzt den Promotor und die ersten 180 Aminosäuren des mitotischen Cyclins Clb2 von *S. cerevisiae*, das für den Übergang von der G2- in die M-Phase zuständig ist (Abbildung 3.17). Der *CLB2*-Promotor (p*CLB2*) ist zellzyklusspezifisch vom Beginn der G2-Phase bis in die M-Phase aktiv. Zusätzlich enthält der N-terminale Teil von Clb2 drei Degrons (D-Box und KEN1/2), die für den Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Abbau des Proteins am Ende der Mitose bis in die G1-Phase verantwortlich sind. Der Promotor und die für die ersten 180 Aminosäuren codierende Sequenz werden *in frame* vor dem offenen Leserahmen des Zielgens am genomischen Lokus eingefügt. Eine L26A-Mutation

innerhalb der Clb2-Sequenz zerstört die NES (*nuclear export sequence*) und verhindert so, dass die Zielproteine aus dem Kern exportiert werden. Gene, die mit dem G2-*Tag* versehen wurden, werden im Folgenden als G2-Allele (z.B. *G2-MPH1*) bezeichnet, die zugehörigen Proteine z.B. als G2-Mph1. Die entsprechenden Hefestämme werden nach den enthaltenen G2-Allelen benannt.

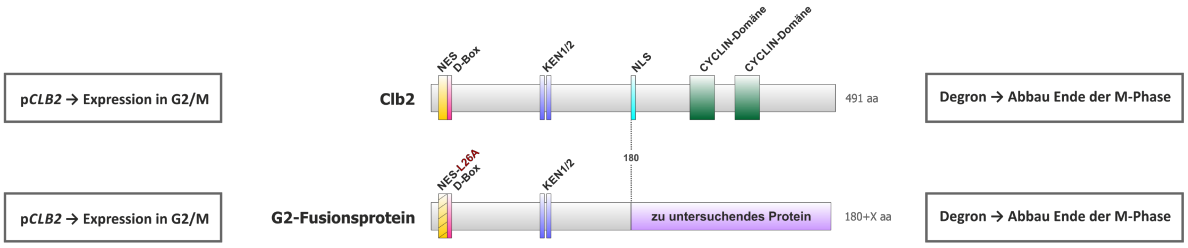


Abbildung 3.17: **Schematische Darstellung des G2-*Tags* zur Restriktion eines Zielproteins auf die G2/M-Phase.** Der Promotor des mitotischen Cyclins Clb2 vermittelt die Expression des Gens in der G2/M-Phase und die D- und KEN-Boxen vermitteln zusätzlich proteasomalen Abbau am Ende der Mitosephase. NES = *nuclear export sequence*; NLS = *nuclear localization sequence*; D-Box = *destruction box*; KEN steht für die entsprechenden Aminosäuren in der Konsensussequenz.

Mit Hilfe des G2-*Tags* wurde aufgezeigt, dass eine Restriktion der Expression von Genen der postreplikativen Reparatur auf die G2/M-Phase normale Schadenstoleranz vermittelt (KARRAS & JENTSCH 2010): die Allele *G2-REV3* (Rev3 ist Bestandteil von Pol ζ) und *G2-RAD30* wurden stellvertretend für die Transläsionssynthese und *G2-UBC13*, *G2-RAD5* und *G2-SGS1* als Bestandteile der fehlerfreien PRR untersucht. In allen Fällen konnte die spezifische Expression ab Beginn der G2-Phase und der zügige Abbau des Proteins am Ende der M-Phase gezeigt werden. In weiterführenden Studien wurde das G2-*Tag* wiederholt erfolgreich eingesetzt (KARRAS *et al.* 2013, GONZALEZ-HUICI *et al.* 2014, MENOLFI *et al.* 2015).

3.3.3 UNTERSUCHUNG VON *G2-MPH1* SOWIE G2-ALLELEN VON GENEN DER HOMOLOGEN REKOMBINATION

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Gene *MPH1* und *RAD5* sowie mehrere Gene der homologen Rekombination mit dem G2-*Tag* versehen und die entsprechenden Hefestämme phänotypisch untersucht.

Auswahl der zu untersuchenden Gene

MPH1: Für Mph1 wurde eine Beteiligung an einem Rad51-abhängigen Weg der fehlerfreien Schadenstoleranz unabhängig von der *RAD18*/*RAD6*-abhängigen PRR postuliert (SCHÜRER *et al.* 2004). Es wurde vermutet, dass die *D-loop*-auflösende Wirkung hier eine Rolle spielt. Da Mph1 *in vitro* auch *fork regression* katalysieren kann, wird auch diese Aktivität immer wieder in Modellen ins Spiel gebracht. In diesem Zusammenhang ist es spannend herauszufinden, ob Mph1 während der S-Phase von der Zelle benötigt wird, oder ob analog zur PRR auch die Aktivität von Mph1 ohne Folgen auf die G2/M-Phase verschoben werden kann.

RAD5: Rad5 hat drei wichtige Funktionen im Zusammenhang mit der Toleranz gegenüber DNA-Schäden während der Replikation. Zum einen ist Rad5 als E3-Ubiquitinligase gemeinsam mit dem Ubc13-Mms2-Heterodimer an der Poly-Ubiquitinierung von PCNA als Signal für fehlerfreie PRR beteiligt (HOEGE *et al.*

2002, STELTER & ULRICH 2003). Darüber hinaus kann Rad5 aber auch durch eine direkte Interaktion mit Rev1 die Transläsionssynthese fördern (KUANG *et al.* 2013, XU *et al.* 2016). *In vitro* kann Rad5 zudem ähnlich wie Mph1 *fork regression* katalysieren (BLASTYÁK *et al.* 2007). *G2-RAD5* diente hier als Kontrolle, da dieses Allel ebenfalls von KARRAS & JENTSCH (2010) untersucht wurde. Zudem sollte die genetische Interaktion von *G2-RAD5* und *G2-MPH1* untersucht werden.

Homologe Rekombination: Die Proteine der homologen Rekombination sind für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen, aber auch für den Umgang mit Replikationsproblemen zuständig (vgl. Seite 6, 14 und 16). Dabei spielen sie sowohl an *one-ended* DSBs im Zusammenhang mit kollabierten Replikationsgabeln als auch als Mediatoren des *template switch* beim *gap filling* eine entscheidende Rolle. Es ist anzunehmen, dass einige dieser Funktionen in der S-Phase essenziell sind. Daher sollten die entsprechenden G2-Allele kein normales Überleben der Zellen ermöglichen und damit als Kontrolle des G2-*Tags* dienen können. Bezogen auf Mph1 sind die zu erwartenden Ergebnisse zudem relevant, da Mph1 bei der Schadenstoleranz in einem Rad51-abhängigen Weg arbeitet.

RAD51: Rad51 ist die Rekombinase, die einzelsträngige DNA bindet, ein helikales Nukleoproteinfilament mit dieser bildet und die Suche nach einer homologen Sequenz sowie den Strangaustausch katalysiert. Rad51 ist essenziell für alle Formen der homologen Rekombination außer dem *single strand annealing*. (*reviewed* in SYMINGTON *et al.* 2014)

RAD52: Rad52 interagiert mit RPA und Rad51 und vermittelt so die Ausbildung des Rad51-Nukleoproteinfilaments, indem es RPA von der ssDNA verdrängt und Rad51 rekrutiert. Rad52 ist für alle Wege der homologen Rekombination essenziell. (*reviewed* in SYMINGTON *et al.* 2014)

RAD54: Rad54 ist eine DNA Translokase und stimuliert die *D-loop*-Bildung, kann aber auch Rad51 von dsDNA entfernen. Damit ermöglicht es vermutlich die Verlängerung des invadierten 3'-Endes im *D-loop*, indem es Pol δ ermöglicht zu binden. Außerdem vermittelt Rad54 *chromatin remodelling*. (*reviewed* in SYMINGTON *et al.* 2014, CRICKARD & GREENE 2019)

Konstruktion der *S. cerevisiae*-Stämme mit G2-Allelen

Alle Stämme mit einzelnen G2-Allelen wurden ausgehend von CEN.PK2-1C durch PCR-basiertes *Tagging* hergestellt (Seite 63). Dabei wird das G2-*Tag* mitsamt einem Markergen unter Hinzufügen von zum Zielgen homologen Flanken per PCR amplifiziert und zur Transformation der Hefezellen eingesetzt. Das *Tag* wird dann in einigen Zellen über homologe Rekombination vor der codierenden Sequenz des Zielgens inseriert und es kann auf die Anwesenheit des Markers selektiert werden. Mehrere unabhängige Klone wurden mittels des auf Seite 63f beschriebenen PCR-Screens verifiziert (Ergebnis für je einen verwendeten Klon siehe Abbildung 7.3; Seite 173). Für *G2-MPH1*, *G2-RAD5* und *G2-RAD51* wurden exemplarisch Zellextrakte auf die Anwesenheit der getaggten Proteine analysiert (Seite 59). Mit einem Clb2-spezifischen Antikörper konnten in allen drei Extrakten Banden der korrekten Größe der Fusionsproteine detektiert werden (nicht gezeigt). Eine Detektion der Fusionsproteine in synchronisierten Zellen über einen ganzen Zellzyklus konnte leider nicht durchgeführt werden. Es ist aber aufgrund der zahlreichen publizierten Anwendungsbeispiele nicht davon auszugehen, dass die Restriktion der Expression nicht funktioniert hat.

Die Restriktion von Mph1 auf die G2/M-Phase ermöglicht normale Schadenstoleranz

Für *G2-MPH1* und *G2-RAD5* wurden zunächst die Sensitivitäten gegenüber MMS, 4-NQO und Camptothecin (vgl. Seite 70) bestimmt. Wie in Abbildung 3.18 zu erkennen ist, zeigen die Deletionsmutanten *mph1*Δ und *rad5*Δ die erwartete Sensitivität gegenüber MMS und 4-NQO, wobei *rad5*Δ die stärkere Reaktion zeigt. Demgegenüber zeigt weder *G2-RAD5* noch *G2-MPH1* ein im Vergleich zum Wildtyp geringeres Wachstum in Gegenwart der verwendeten DNA-schädigenden Agenzien. Keiner der getesteten Stämme ist sensitiv gegenüber Camptothecin.

Die Allele *G2-RAD5* und *G2-MPH1* haben ebenfalls keine Auswirkungen auf die spontane Mutationsrate (Tabelle 3.5). Die spontane Mutationsrate wurde mit Hilfe des *CAN1*-Vorwärtsmutationssystems bestimmt (Seite 73). Die Mutante *mph1*Δ zeigt den beschriebenen Mutatorphänotyp und auch *rad5*Δ zeigt die für diese Deletionsmutante beschriebene leichte Erhöhung spontaner Mutationen. Dass die erhöhte Anzahl spontaner Mutationen sowohl bei *mph1*Δ als auch bei *rad5*Δ abhängig von der Transläsionssynthese ist, also eine zusätzliche Mutation eines Gens der Transläsionssynthese (z.B. *rev3*Δ) den Mutatorphänotyp supprimiert (LIEFSHITZ *et al.* 1998, SCHELLER *et al.* 2000), bedeutet ein Ausweichen der Schadenstoleranz auf Transläsionspolymerasen bei Fehlen von Rad5 bzw. Mph1. Die im Vergleich zum Wildtyp konstante Anzahl spontaner Mutationsereignisse bei Restriktion der Expression von *RAD5* oder *MPH1* auf die G2/M-Phase bedeutet demnach, dass auch bei Fehlen von Mph1 oder Rad5 während der S-Phase kein Ausweichen auf fehlerbehaftete Transläsionssynthese stattfindet, sondern der fehlerfreie *bypass* problemlos erst in der G2-Phase passieren kann. Dies entspricht den Beobachtungen von KARRAS & JENTSCH (2010) für Rad5 und weitere Proteine der PRR.

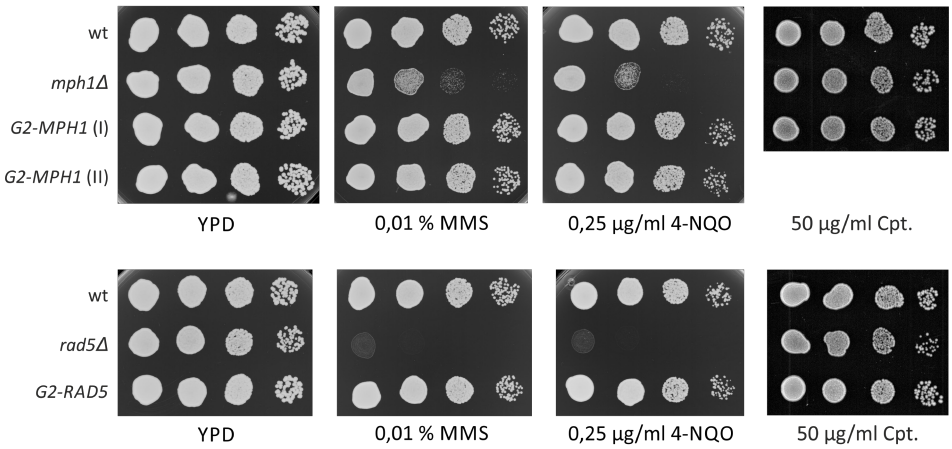


Abbildung 3.18: **Sensitivitäten der Stämme *G2-MPH1* und *G2-RAD5* gegenüber MMS, 4-NQO und Camptothecin (Cpt.)** im Vergleich zum Wildtyp (wt; CEN.PK2-1C) und zur jeweiligen Deletionsmutante. Für *G2-MPH1* wurden zwei unabhängige Isolate (I/II) untersucht. Die jeweiligen Stämme wurden in Tropfen á 70.000, 7.000, 700 und 70 Zellen auf die Platten getropft (Seite 72). Für jede Platte ist die im Medium enthaltene Konzentration des DNA-schädigenden Agens angegeben.

Tabelle 3.5: **Einfluss einzelner G2-Allele auf die spontane Mutationsrate im *CAN1*-Vorwärtsmutationssystem, ermittelt nach der Medianmethode** (LEA & COULSON 1949). Die absoluten Werte sind mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben. Die Nummer getrennter Experimente ist als Index angegeben. Die Normierung („Faktor") erfolgte auf den im gleichen Experiment untersuchten Wildtyp-Stamm.

Stamm	Mutationsrate	Faktor
wt	$2{,}05 \times 10^{-7} \pm 0{,}29 \times 10^{-7}$	**1** [1]
	$2{,}67 \times 10^{-7} \pm 0{,}37 \times 10^{-7}$	**1** [2]
mph1Δ	$2{,}55 \times 10^{-6} \pm 0{,}27 \times 10^{-6}$	**12,43** [1]
G2-MPH1	$2{,}07 \times 10^{-7} \pm 0{,}29 \times 10^{-7}$	**1,01** [1]
rad5Δ	$3{,}51 \times 10^{-7} \pm 0{,}50 \times 10^{-7}$	**1,71** [1]
G2-RAD5	$2{,}28 \times 10^{-7} \pm 0{,}31 \times 10^{-7}$	**1,11** [1]

Stamm	Mutationsrate	Faktor
rad51Δ	$4{,}36 \times 10^{-6} \pm 0{,}46 \times 10^{-6}$	**21,29** [1]
G2-RAD51	$3{,}22 \times 10^{-6} \pm 0{,}35 \times 10^{-6}$	**15,72** [1]
rad52Δ	$4{,}59 \times 10^{-6} \pm 0{,}52 \times 10^{-6}$	**17,16** [2]
G2-RAD52	$1{,}69 \times 10^{-6} \pm 0{,}20 \times 10^{-6}$	**6,32** [2]

Eine *G2-MPH1 G2-RAD5*-Doppelmutante zeigt keine erhöhte Sensitivität gegenüber DNA-Schäden

Die Doppelmutante *mph1Δ rad5Δ* ist wie auch andere Doppelmutanten von *MPH1* und der fehlerfreien PRR deutlich sensitiver gegenüber MMS und 4-NQO als die jeweiligen Einzelmutanten, was ein Argument für die Einordnung von Mph1 in einen fehlerfreien Weg der Schadensumgehung unabhängig von der PRR ist (SCHÜRER *et al.* 2004). In einer *G2-MPH1 G2-RAD5*-Doppelmutante sind weder der Rad5-abhängige Weg noch Mph1 während der S-Phase verfügbar. Falls in den G2-Einzelmutanten die Wege jeweils füreinander einspringen, sollte sich bei der Doppelmutante ein Phänotyp zeigen. Das gleiche gilt auch, falls Rad5 und Mph1 (partiell) redundante Funktionen im Zuge einer *fork regression* besäßen.

Um dies zu überprüfen, wurde die Doppelmutante *G2-MPH1 G2-RAD5* mittels Kreuzung eines *MAT*α-Stamms mit *G2-RAD5*-Allel und eines *MAT*a-Stamms mit *G2-MPH1*-Allel hergestellt (Seite 69). Die Sensitivität gegenüber MMS und 4-NQO wurde für die Nachkommen zweier Sporen bestimmt (Abbildung 3.19). Das gleichzeitige Fehlen von Rad5 und Mph1 während der S-Phase sorgt nicht für eine erhöhte Sensitivität gegenüber den getesteten DNA-schädigenden Agenzien. Die fehlende Sensitivität der Einzelmutanten beruhte also nicht auf einer Übernahme der Funktion durch das jeweils andere Protein bzw. den jeweils anderen Weg der Schadenstoleranz, sondern auf der Verschiebbarkeit der Aktivität von Rad5 und Mph1 in die G2-Phase.

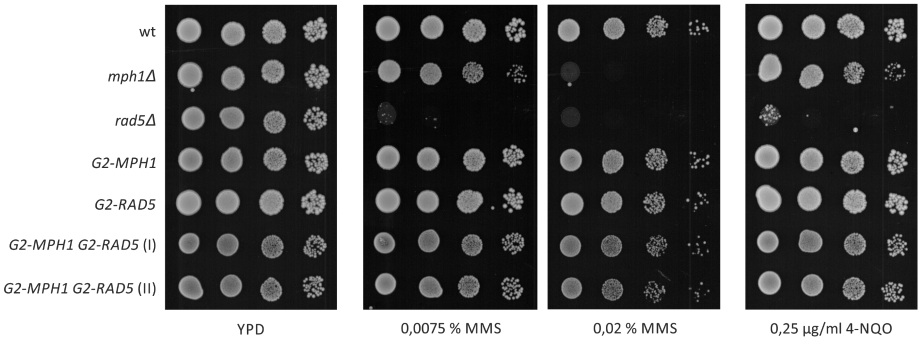


Abbildung 3.19: **Sensitivität der Doppelmutante *G2-MPH1 G2-RAD5* gegenüber MMS und 4-NQO** im Vergleich zum Wildtyp (wt; CEN.PK2-1C), den jeweiligen Deletionsmutanten und den G2-Einzelmutanten. Die Isolate I–II von *G2-MPH1 G2-RAD5* stammen von zwei verschiedenen Sporen der Kreuzung ab. Die jeweiligen Stämme wurden in Tropfen á 70.000, 7.000, 700 und 70 Zellen auf die Platten getropft (Seite 72). Für jede Platte ist die im Medium enthaltene Konzentration des DNA-schädigenden Agens angegeben.

G2-Allele der homologen Rekombination erlauben keine normale Schadenstoleranz

Wie bereits erläutert, ist anzunehmen, dass die Mechanismen der homologen Rekombination während der S-Phase gebraucht werden. Stellvertretend wurden die Allele *G2-RAD51*, *G2-RAD52* und *G2-RAD54* untersucht. Abbildung 3.20 zeigt das Ergebnis der Bestimmung der Sensitivität gegenüber MMS, 4-NQO und Camptothecin mittels *drop dilution assay*. Erwartungsgemäß wachsen die Stämme *G2-RAD51* und *G2-RAD52* in Anwesenheit der DNA-schädigenden Agenzien schlechter als der Wildtyp. Die Sensitivität von *G2-RAD51* entspricht dabei in allen drei Fällen der der Deletionsmutante *rad51*Δ. Bei *RAD52* erscheint die Deletionsmutante *rad52*Δ sensitiver als das zugehörige G2-Allel, wobei *rad52*Δ bereits auf YPD ein leicht eingeschränktes Wachstum zeigt. Interessanterweise können die *G2-RAD54*-Zellen in Gegenwart von MMS und Camptothecin normal wachsen. Gegenüber 4-NQO zeigt *G2-RAD54* eine deutliche Sensitivität, die aber um mehrere Größenordnungen unter der der Deletionsmutante *rad54*Δ liegt. Für *G2-RAD51* und *G2-RAD52* wurde auch die spontane Mutationsrate bestimmt (Tabelle 3.5; Seite 123). In beiden Fällen zeigt sich eine erhöhte Mutationsrate, die aber – besonders bei *G2-RAD52* – unter der der zugehörigen Deletionsmutante liegt.

Während Rad54 die meisten überlebenswichtigen Funktionen demnach auch beschränkt auf die G2/M-Phase ausüben kann, führt die Restriktion von Rad52 und Rad51 auf die G2/M-Phase zu erhöhter Sensitivität und Mutationsrate. Bezüglich Rad54 könnte es allerdings sein, dass das Rad54-Paralog Rdh54 aufgrund partieller funktionaler Redundanz (CHI *et al.* 2006) einige der Funktionen übernimmt. Dies würde bedeuten, dass Rad54 in der S-Phase zu Rdh54 redundant ist, in der G2-Phase aber nicht, da ansonsten Rdh54 die Funktion auch in der Deletionsmutante erfüllen könnte.

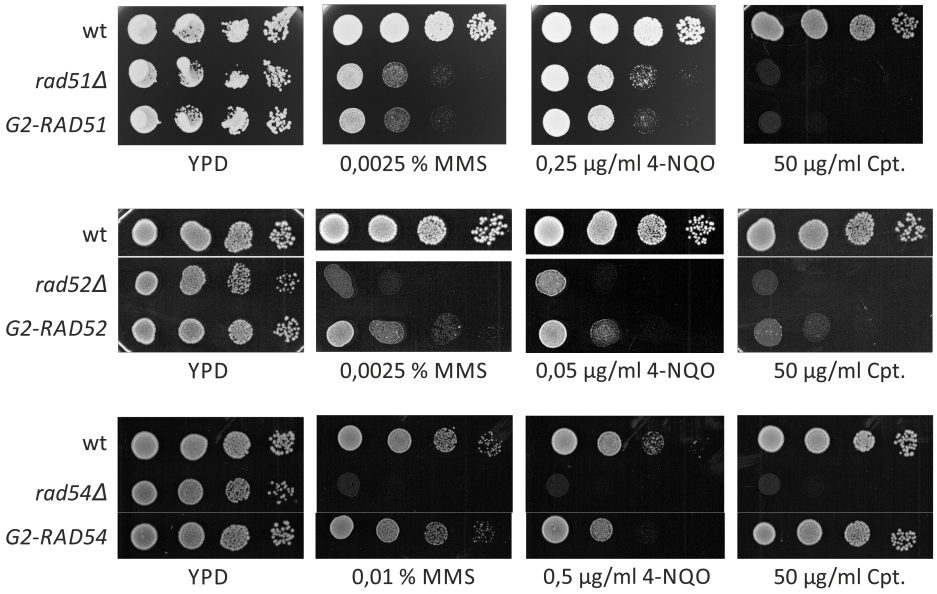


Abbildung 3.20: **Sensitivitäten der Stämme *G2-RAD51*, *G2-RAD52* und *G2-RAD54* gegenüber MMS, 4-NQO und Camptothecin (Cpt.)** im Vergleich zum Wildtyp (wt; CEN.PK2-1C) und zur jeweiligen Deletionsmutante. Die jeweiligen Stämme wurden in Tropfen á 70.000, 7.000, 700 und 70 Zellen auf die Platten getropft (Seite 72). Die Daten zu den drei jeweils zu vergleichenden Stämmen stammen immer von einer Platte. Zuschnitte ergeben sich aus dem Herausschneiden genetisch und phänotypisch identischer Stämme. Für jede Platte ist die im Medium enthaltene Konzentration des DNA-schädigenden Agens angegeben.

Ein funktionsloses N-terminales Clb2-*Tag* stört die Rad51-Funktion ebenfalls

Zwar entsprach die hohe Sensitivität von *G2-RAD51* und *G2-RAD52* den Erwartungen, allerdings wäre es gerade bei Rad51, das helikale Filamente ausbildet, denkbar, dass das 180 Aminosäuren große G2-*Tag* die Proteinfunktion stört. Bei den publizierten Phänotypen der G2-Allele der PRR-Gene stellte sich diese Frage nie, da alle stets Wildtyp-Verhalten zeigten, das *Tag* also ebenso wenig Einfluss auf die Funktion hatte wie die Restriktion auf die G2/M-Phase.

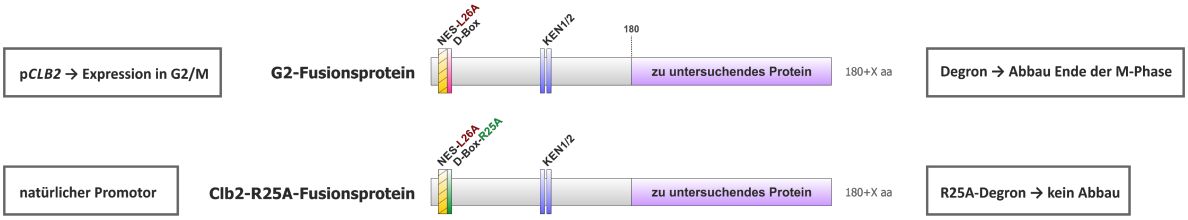


Abbildung 3.21: **Schematische Darstellung des Clb2-R25A-*Tags* als Abwandlung des G2-*Tags*.** Das Clb2-R25A-Protein wird unter Kontrolle des endogenen Promotors des Zielgens produziert. Die R25A-Mutation in der N-terminalen Clb2-Sequenz verhindert den proteasomalen Abbau des Fusionsproteins am Ende der Mitosephase. NES = *nuclear export sequence*; NLS = *nuclear localization sequence*; D-Box = *destruction box*; KEN steht für die entsprechenden Aminosäuren in der Konsensussequenz.

Um den Einfluss des N-terminalen *Tags* auf Rad51 zu testen, wurde eine Abwandlung des G2-*Tags* entwickelt (Abbildung 3.21). Diese enthält nicht den Clb2-Promotor, sondern es werden lediglich die ersten 180 Aminosäuren von Clb2 N-terminal an das Zielprotein angehängt. Dabei wurde eine zusätzliche R25A-Mutation eingeführt, um den proteasomalen Abbau am Ende der Mitosephase zu inhibieren (Seite 56). Der Austausch betrifft das Arginin der D-Box-Konsensussequenz RxxL und verhindert die Interaktion mit der Untereinheit Cdc23 des *anaphase promoting complex* (APC), wodurch die Ubiquitinierung und der davon abhängige proteasomale Abbau nicht stattfindet (AMON 1994, MEYN III *et al.* 2002). Das *Tag* mit nicht-funktionalem Degron wurde Clb2-R25A-*Tag* genannt. Die für das Clb2-R25A-*Tag* codierende Sequenz wurde mittels *gene replacement in frame* vor dem codierenden Bereich von *RAD51* platziert (Seiten 65 und 68; PCR-Screen: Abbildung 7.3; Seite 173). Auf diese Weise wird Clb2-R25A-Rad51 unter Kontrolle des endogenen *RAD51*-Promotors gebildet und ist durchgehend vorhanden.

Die Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien sowie die spontane Mutationsrate des *Clb2-R25A-RAD51*-Stammes wurde im Vergleich zu *G2-RAD51* betrachtet (Abbildung 3.22; Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: **Einfluss des G2-*Tags* und des Clb2-R25A-*Tags* auf die spontane Mutationsrate von *RAD51*-Varianten im *CAN1*-Vorwärtsmutationssystem, ermittelt nach der Medianmethode** (LEA & COULSON 1949). Die absoluten Werte sind mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben. Die Normierung („Faktor") erfolgte auf den im gleichen Experiment untersuchten Wildtyp-Stamm.

Stamm	Mutationsrate	Faktor
wt	$2{,}67 \times 10^{-7} \pm 0{,}37 \times 10^{-7}$	**1**
rad51Δ	$3{,}33 \times 10^{-6} \pm 0{,}37 \times 10^{-6}$	**12,44**
G2-RAD51	$2{,}18 \times 10^{-6} \pm 0{,}25 \times 10^{-6}$	**8,17**
Clb2-R25A-RAD51	$2{,}48 \times 10^{-6} \pm 0{,}27 \times 10^{-6}$	**9,26**

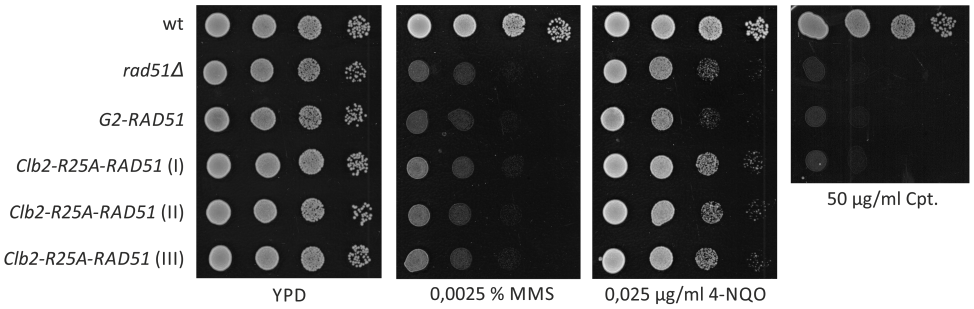


Abbildung 3.22: **Sensitivität von *Clb2-R25A-RAD51* gegenüber MMS, 4-NQO und Camptothecin** im Vergleich zum Wildtyp (wt; CEN.PK2-1C), der Deletionsmutante *rad51*Δ und *G2-RAD51*. Es wurden drei unabhängige Transformanten (I–III) von *Clb2-R25A-RAD51* untersucht. Die jeweiligen Stämme wurden in Tropfen á 70.000, 7.000, 700 und 70 Zellen auf die Platten getropft (Seite 72). Für jede Platte ist die im Medium enthaltene Konzentration des DNA-schädigenden Agens angegeben.

Das funktionslose Clb2-R25A-*Tag* erhöht die spontane Mutationsrate in gleichem Maße wie das G2-*Tag*. Auch die Sensitivität von *Clb2-R25A-RAD51* ist stark erhöht und bewegt sich im Bereich der Deletionsmutante *rad51*Δ. Vermutlich stört das N-terminale *Tag* tatsächlich die Filamentbildung und unterbindet damit die homologe Rekombination weitgehend. Demnach können die für *G2-RAD51* beobachteten Phänotypen nicht allein auf die Restriktion der Expression auf die G2/M-Phase bezogen werden.

3.3.4 UNTERSUCHUNG VON *G2-MPH1* IM KONTEXT DER *INTERSTRAND CROSSLINK*-REPARATUR

Wie in Abschnitt 1.2.4.3 (Seite 28) bereits erwähnt, wurde aufgrund der Resultate zweier unabhängiger experimenteller Herangehensweisen im Jahre 2012 eine Beteiligung von Mph1 an der Reparatur von *interstrand crosslinks* (ICLs) als Teil eines „prototypischen Fanconi-Anämie-Weges“ postuliert (DAEE *et al.* 2012, DAEE & MYUNG 2012, MCHUGH *et al.* 2012, WARD *et al.* 2012a). Diese Aufgabe von Mph1 versteckt sich hinter zumindest teilweise redundanten Wegen, wodurch die Deletionsmutante *mph1*Δ nicht sensitiv gegenüber *interstrand crosslinkern* ist. DAEE *et al.* zeigen, dass die Überexpression von Mph1 Wildtyp-Zellen vor der Anhäufung unreparierter Doppelstrangbrüche nach Behandlung mit bestimmten *interstrand crosslinkern* schützt. Sie schlagen schließlich ein Modell vor, in dem Mph1 abhängig von Rad5-abhängiger PCNA-Ubiquitinierung ICL-arretierte Replikationsgabeln mittels *fork regression* vor dem Auseinanderbrechen und vor erratischer homologer Rekombination schützt. WARD *et al.* gehen in ihrem Modell ebenfalls davon aus, dass Mph1 an ICL-arretierte Replikationsgabeln rekrutiert wird und dort möglicherweise *fork regression* katalysieren kann. Dieser alternative, S-Phasen-spezifische Weg der ICL-Reparatur wird aber nur relevant, wenn die normalerweise für die ICL-Reparatur zuständige Exonuklease Pso2 fehlt. Mph1 bildet einen Komplex mit Mgm101 und dem *mismatch*-Reparaturfaktor MutSα und rekrutiert als Ersatz für Pso2 die Exonuklease Exo1, die im Anschluss an die Inzisionen der NER-Endonukleasen ein Substrat für die Transläsionssynthese und die abschließende homologe Rekombination schafft. In Abwesenheit von Pso2 und Mph1 häufen sich in der Zelle kollabierte Replikationsgabeln an, die

aufgrund der ICLs unreparierbare *one-ended* Doppelstrangbrüche darstellen und vermutlich die Ursache der synergistisch erhöhten ICL-Sensitivität der Doppelmutante *mph1*Δ *pso2*Δ sind (MCHUGH *et al.* 2012).

Die beschriebenen Modelle führten mich zu der Hypothese, dass bei Vorliegen einer S-Phasen-spezifischen Funktion von Mph1 bei der ICL-Reparatur, die ICL-Sensitivität von *G2-MPH1 pso2*Δ ebenfalls erhöht sein müsste. Wenn die Hauptfunktion von Mph1 bei Fehlen von Pso2 der Schutz ICL-arretierter Replikationsgabeln wäre, sollte die Restriktion von Mph1 auf die G2/M-Phase in *pso2*Δ-Zellen zu deutlich mehr toxischen Intermediaten und damit erhöhter Sensitivität führen.

Zur Untersuchung der genetischen Interaktion von *pso2*Δ mit dem *G2-MPH1*-Allel wurden die entsprechenden *PSO2*-Deletionsmutanten ausgehend von CEN.PK2-1C, *mph1*Δ und *G2-MPH1* mit Hilfe PCR-basierter Gendeletion (Seite 62; PCR-Screen siehe Seite 172) hergestellt. Die Sensitivität wurde mittels *drop dilution assay* ermittelt, wobei Cisplatin als *interstrand crosslinker* eingesetzt wurde. Etwa 5–10 % der durch Cisplatin verursachten DNA-Addukte verbinden die Basen gegenüberliegender Stränge, der Rest sind *intrastrand crosslinks* (vgl. Seite 70). Abbildung 3.23-i zeigt zur Kontrolle, dass *pso2*Δ keine erhöhte Sensitivität gegenüber MMS und 4-NQO aufweist und auch die Sensitivität von *mph1*Δ nicht weiter erhöht. Im Gegensatz dazu ist *pso2*Δ sensitiv gegenüber Cisplatin, während die Einzelmutante *mph1*Δ hier kein reduziertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp zeigt (Abbildung 3.23-ii). Die Doppelmutante *mph1*Δ *pso2*Δ weist den von WARD *et al.* beschriebenen synergistischen Effekt auf. Dahingegen zeigt *G2-MPH1 pso2*Δ erstaunlicherweise die gleiche Sensitivität wie die *pso2*Δ-Einzelmutante.

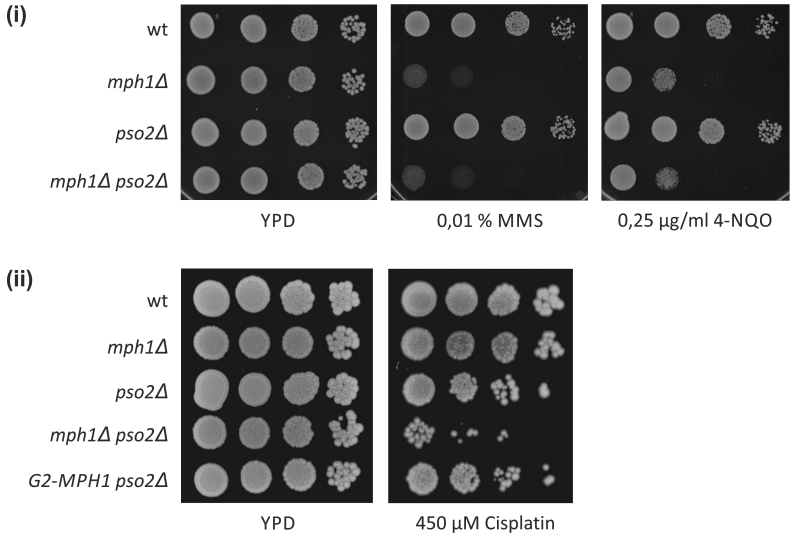


Abbildung 3.23: **(i) Sensitivität der Doppelmutante *mph1*Δ *pso2*Δ gegenüber MMS und 4-NQO** im Vergleich zum Wildtyp (wt; CEN.PK2-1C) und den jeweiligen Einzelmutanten. **(ii) Sensitivität der Doppelmutanten *mph1*Δ *pso2*Δ und *G2-MPH1 pso2*Δ gegenüber dem *interstrand crosslinker* Cisplatin** im Vergleich zum Wildtyp (wt; CEN.PK2-1C) und den jeweiligen Einzelmutanten. Die jeweiligen Stämme wurden in Tropfen á 70.000, 7.000, 700 und 70 Zellen auf die Platten getropft (Seite 72). Für jede Platte ist die im Medium enthaltene Konzentration des DNA-schädigenden Agens angegeben.

4 ERGEBNISSE – FANCM-PROJEKT

Das menschliche Genom enthält etwa 20.000 proteincodierende Gene, aber das Proteom besteht aus fünf- bis zehnmal so vielen verschiedenen Proteinen (SCOTTI & SWANSON 2016). Gemeint sind hier nicht die vielfältigen posttranslationalen Modifikationen, die das Proteom zusätzlich diversifizieren, sondern konkrete Unterschiede in der Primärstruktur. Proteine unterschiedlicher Aminosäuresequenz, die vom gleichen Gen codiert werden, werden als Isoformen bezeichnet. Isoformen sind das Produkt der Translation unterschiedlicher Transkriptvarianten. Die Unterschiede auf der mRNA-Ebene sind wiederum das Produkt alternativer Prozessierung der Transkripte eines Gens. Hier spielen vor allem das alternative Spleißen und die alternative Polyadenylierung eine entscheidende Rolle.

Alternatives Spleißen

Beim Spleißen werden die nicht-codierenden Introns aus dem primären Transkript entfernt und die codierenden Exons zusammengefügt (*reviewed* in SCOTTI & SWANSON 2016). Dabei findet zunächst ein nukleophiler Angriff des Adenosins der *branchpoint*-Sequenz innerhalb eines Introns auf die 5‘-Spleißstelle (5‘ss) am Ende des vorigen Exons unter Ausbildung einer Lassostruktur statt. Beim folgenden Angriff der 5’ss auf die 3’ss am Beginn des folgenden Exons wird die Exon-Exon-Verbindung geschaffen und das Intron freigesetzt. *Branchpoint*, 5’ss und 3’ss sind jeweils durch Konsensussequenzen festgelegt und werden von den Spleißosomen, großen RNA-Protein-Komplexen erkannt, die den Vorgang des Spleißens katalysieren.

Bei 90–95 % der proteincodierenden Gene des Menschen findet ein alternatives Spleißen der Transkripte statt (PAN *et al.* 2008, WANG *et al.* 2008), was durch *cis*- und *trans*-regulatorische Elemente reguliert wird. Dabei werden zum Beispiel einzelne Exons ausgelassen (*exon skipping*), Introns verbleiben im reifen Transkript (*intron retention*) oder es werden alternative Spleißstellen verwendet, sodass Exons länger oder kürzer sind als in anderen Transkriptvarianten. Das alternative Spleißen ist im menschlichen Organismus besonders für die gewebsspezifische Expression unterschiedlicher Isoformen verantwortlich (WANG *et al.* 2008). Die komplexe Regulierung ist anfällig gegenüber kleinsten Veränderungen, weshalb manchmal schon Punktmutationen in relevanten Sequenzmotiven genügen, um pathogene Spleißvarianten und daraus folgende ernste Erkrankungen hervorzurufen (SCOTTI & SWANSON 2016).

Alternative Polyadenylierung

Reife eukaryotische mRNAs tragen an ihrem 3‘-Ende einen Poly(A)-Schwanz. Dieser ist nicht auf der DNA codiert, sondern entsteht durch endonukleolytisches Schneiden der mRNA und die nachfolgende Aktivität der Poly(A)-Polymerase, ausgelöst durch Sequenzelemente innerhalb des Transkripts. Häufig existieren innerhalb eines Gens mehrere Polyadenylierungssignale (PAS), sodass unterschiedlich lange Transkripte gebildet werden können. Diese alternative Polyadenylierung geschieht am häufigsten innerhalb der 3’UTR und hat hier große regulative Bedeutung für die Stabilität und die Lokalisierung der mRNA, verändert aber in diesem Fall nicht die Proteinsequenz. Zur Expression von Isoformen kommt es, wenn alternative PAS

verwendet werden, die vor dem terminalen Exon, zum Beispiel innerhalb eines Introns, liegen. In diesem Fall wird ein kürzeres Transkript und in der Folge ein kürzeres Protein gebildet. Auch die alternative Polyadenylierung kann sich zwischen verschiedenen Zelltypen stark unterscheiden. Die kürzeren Isoformen erfüllen dabei in einigen Fällen eine andere Funktion, üben dominant-negative Effekte aus oder wirken regulativ auf die Genexpression (*reviewed* in TIAN & MANLEY 2017).

Die Frage nach der biologischen Relevanz

Informationen über mögliche Transkriptvarianten sind für beinahe alle menschlichen Gene in gängigen Datenbanken (u.a. NCBI, Ensembl) verfügbar. Die Informationen beruhen teilweise auf experimentellen (Hochdurchsatz-) Daten, zu einem Großteil aber auch auf bioinformatischen Vorhersagen aufgrund verfügbarer Sequenzierungsdaten. Eine solche Datenbankrecherche zeigt demnach, was (mindestens) möglich ist, verrät aber wenig bis gar nichts über die biologische Relevanz der einzelnen Transkriptvarianten.

Bei bioinformatischen Vorhersagen stellt sich zunächst die Frage, ob die entsprechenden Varianten überhaupt in Zellen nachgewiesen werden können. Bei allen experimentell nachgewiesenen Transkripten stellt sich zudem die Frage, ob es sich (i) um eine reguliert produzierte zelluläre Komponente mit biologischer Relevanz oder (ii) um ein zufälliges Nebenprodukt der niemals vollständig akkurat arbeitenden Genexpressionsmaschinerie handelt. Die Beantwortung dieser Frage wird durch den fließenden Übergang zwischen (i) und (ii) erschwert. Allerdings können auch Varianten, die in gesunden Zellen lediglich Nebenprodukte darstellen, im pathologischen Rahmen medizinisch relevant werden. So weisen viele Krebszellen eine fehlerhafte Regulierung des alternativen Spleißens und der alternativen Polyadenylierung auf (SCOTTI & SWANSON 2016, TIAN & MANLEY 2017), was zur vermehrten Produktion alternativer Transkripte und Proteine führt. Ein gut untersuchtes Beispiel ist die spontane Spleißvariante *ARV7* des Androgenrezeptors (AR), die in bestimmten therapieresistenten Prostatakarzinomen vermehrt produziert wird. Das endogen nachweisbare Proteinprodukt von *ARV7* kann weiterhin die Transkription aktivieren, reagiert aber aufgrund des Fehlens der Ligandenbindungsstelle weder auf physiologische Regulation noch auf therapeutisch eingesetzte AR-Antagonisten (*reviewed* in WADOSKY & KOOCHEKPOUR 2017).

Isoformen von DNA-Reparaturproteinen

Die korrekte Abstimmung der DNA-Reparatur- und Schadenstoleranzmechanismen ist essenziell für die Erhaltung der genomischen Integrität. Isoformen von DNA-Reparaturproteinen können wichtig für die Abstimmung der Prozesse in unterschiedlichen Zelltypen oder Zellzyklusphasen sein. Eine Deregulation der mRNA-Prozessierung kann wiederum zur Expression dominant-negativer Varianten führen, die die Reparaturkapazität der Zellen reduzieren und so zur Tumorprogression beitragen. Andererseits können reparaturaktive Varianten das Ansprechen auf DNA-schädigende Chemotherapeutika beeinflussen. Daher besteht die Möglichkeit, dass einzelne spontane Transkriptvarianten von DNA-Reparaturgenen als Biomarker für die Charakterisierung von Krebszellen relevant sind. In diesem Zusammenhang wurden

beispielsweise Varianten der NER-Gene *XPC*, *XPF* und *XPG* beschrieben (KHAN *et al.* 2002, LEHMANN *et al.* 2018a).

Auch im Zusammenhang mit der Reparatur von *interstrand crosslinks* (ICLs) wurden spontane Transkriptvarianten beschrieben. Ein gut untersuchtes Beispiel ist eine Spleißvariante von *FANCE*, einer Komponente des Fanconi-Anämie (FA)-*core complex* (vgl. Abbildung 1.6; Seite 25), der Exon 4 fehlt (*FANCE-Δ4*), was zu einer *in frame*-Deletion von 69 Nukleotiden führt. Das verkürzte Protein kann die Aktivierung des FA-Wegs und die daraus folgende ICL-Reparatur nicht nur nicht auslösen, sondern hat zudem einen negativen Einfluss auf die Reparatur (BOUFFARD *et al.* 2015). Für FANCL, die E3-Ubiquitinligase-Untereinheit des FA-*core complex*, wurde ebenfalls eine dominant-negativ wirkende Spleißvariante beschrieben, deren Proteinprodukt FANCL im Cytoplasma zurückhält und dessen Abbau fördert (ZHANG *et al.* 2010).

Für FANCM wurden vielfältige Funktionen innerhalb und außerhalb des Fanconi-Anämie-Wegs beschrieben (vgl. Kapitel 1.3.1; Seite 30). In Datenbanken (v.a. NCBI, Ensembl) sind mehrere alternative *FANCM*-Transkripte gelistet (vgl. Tabelle 4.1; Seite 145), deren biologische Relevanz aber bisher nicht überprüft wurde. Neben der Möglichkeit pathologisch relevanter Aspekte sollte im Rahmen meiner Arbeit vor allem die Möglichkeit einer Aufgabenteilung zwischen Isoformen untersucht werden. Dabei stand aufgrund vorangegangener Experimente zunächst eine potenziell durch alternative Polyadenylierung entstehende Transkriptvariante im Fokus, die aufgrund der Codierung für ein auf 669 Aminosäuren verkürztes Protein *FANCM-669* genannt wurde.

4.1 UNTERSUCHUNG DER TRANSKRIPTVARIANTE *FANCM-669*

Das verkürzte Transkript *FANCM-669* (NM_001308134.2; ENST00000556036.5) wurde ursprünglich bei der Analyse einer cDNA-Bibliothek ausgehend vom Transkriptom menschlicher Hodenzellen (*testis*) gefunden [cDNA-Klon IMAGE:5270515; BC036056 (ENA); STRAUSBERG *et al.* 2002, OTA *et al.* 2004]. *FANCM-669* umfasst nur die ersten 11 der 23 Exons des Volllängen-Transkripts (*FANCM* oder *FANCM-FL;* NM_020937.4), gefolgt von den ersten 29 Nukleotiden von Intron 11 und einer poly(A)-Sequenz (Abbildung 4.1). Da innerhalb dieses Bereichs eine Konsensussequenz für ein Polyadenylierungssignal (PAS) vorliegt, wurde vermutet, dass *FANCM-669* aus der fakultativen Nutzung dieser Signalsequenz resultiert und somit eine auf alternativer Polyadenylierung beruhende Transkriptvariante darstellt.

FANCM-669 codiert für eine C-terminal stark verkürzte Isoform von FANCM, deren erste 668 Aminosäuren mit denen des Volllängen-Proteins übereinstimmen. Der Intron 11 entsprechende Bereich des Transkripts codiert für ein FANCM-669-spezifisches Lysin, das gleichzeitig die terminale Aminosäure darstellt. Damit umfasst FANCM-669 die gesamte Helikase-Domäne, aber keine der weiter C-terminal gelegenen Interaktionsdomänen. FANCM-669 ähnelt also in Bezug auf die Domänenstruktur dem Ortholog aus *S. cerevisiae* Mph1, wobei FANCM-669 im Gegensatz zu Mph1 die Möglichkeit zur Interaktion mit dem MHF1/2-Komplex fehlt.

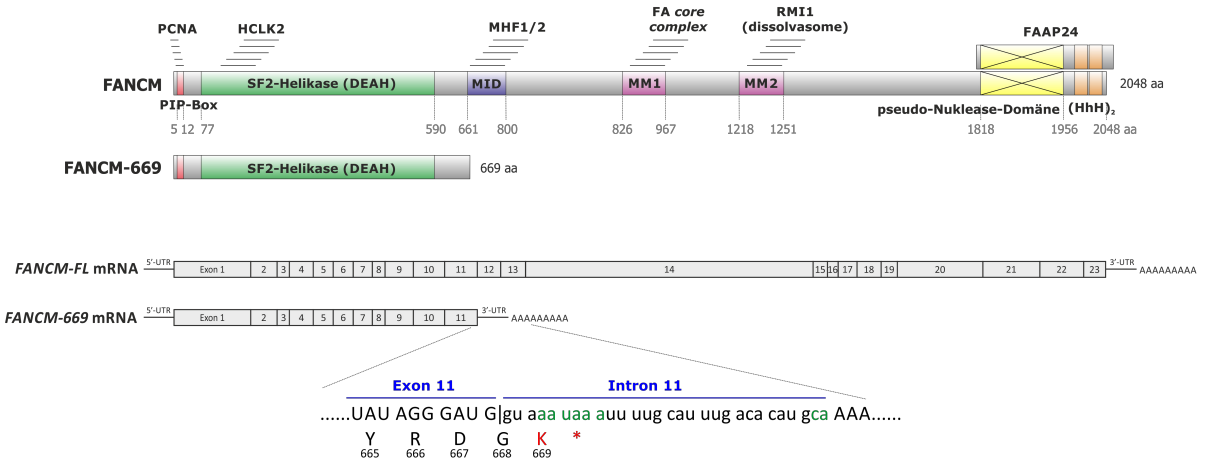


Abbildung 4.1: **Unterschiede zwischen FANCM and FANCM-669 auf mRNA- und Proteinebene**. Das Transkript *FANCM-669* (nach BC036056) enthält nur die ersten 11 der 23 Exons von *FANCM* (*FANCM-FL* = *FANCM full length*) und endet mit den ersten 29 Nukleotiden von Intron 11 gefolgt von einem poly(A)-Schwanz. Vermutlich entsteht *FANCM-669* in der Zelle durch alternative Polyadenylierung: das potenzielle Polyadenylierungssignal ist durch grüne Schrift markiert. Das von *FANCM-669* codierte Protein entspricht an den ersten 668 Position der Aminosäuresequenz von FANCM. Es folgt, codiert von der Intron 11-Sequenz, ein für FANCM-669 spezifisches Lysin als terminale Aminosäure, da das nächste Codon ein Stopcodon ist. FANCM-669 enthält damit die komplette Helikase-Domäne, aber keine der weiter C-terminal gelegenen Interaktionsstellen.

Zu Beginn dieser Arbeit gab es bereits einige unveröffentlichte Vorarbeiten rund um *FANCM-669*, die die Hypothese stützten, dass es sich um eine biologisch relevante Transkriptvariante handelt:

(i) Mit Hilfe von RT-PCR konnten auf Grundlage der poly(A)-RNA-Fraktion von HeLa-Zellen *FANCM669*-spezifische Produkte amplifiziert werden und mittels *real-time*-PCR wurde ermittelt, dass das verkürzte Transkript fast viermal so häufig im Transkriptom vorhanden ist wie das Volllängen-Transkript (S. Lehmann, unveröffentlicht).

(ii) Im Western Blot konnte mit einem FANCM-spezifischen Antikörper in der nukleären Proteinfraktion von HeLa-Zellen eine Bande bei der erwarteten Größe von FANCM-669 nachgewiesen werden – allerdings bei einem hohen Hintergrund unspezifischer Banden (S. Lehmann, unveröffentlicht).

(iii) FANCM-669 wurde heterolog produziert und biochemisch untersucht, wobei sich Unterschiede zu Mph1 und auch zu FANCM ergaben. FANCM-669 zeigte *in vitro* keine Helikase-Aktivität und konnte *Holliday junctions* und DNA-Triplex-Substrate nicht auflösen. Hingegen konnte eine starke *D-loop*-auflösende Wirkung beobachtet werden (SCHÜRER *et al.* unveröffentlicht). Auch COULTHARD *et al.* 2013 konnten zeigen, dass das verkürzte Protein eine durch Bindung an *fork structured* DNA stimulierte ATPase-Aktivität besitzt. In beiden Fällen wurde die Aktivität, wie auch für FANCM bekannt, durch Mutation des Walker I-Motivs (K117R; GKT zu GRT) unterbunden.

(iv) Die Expression von *FANCM-669* kann die 4-NQO-Sensitivität von *S. cerevisiae mph1*Δ partiell komplementieren (SCHÜRER *et al.* unveröffentlicht).

Aus diesen Befunden war die Hypothese abgeleitet worden, dass es sich bei FANCM-669 um eine biologisch relevante Isoform handelt, die in der Zelle andere Funktionen bzw. nur einen Teil der Funktionen von FANCM besitzt. Aufgrund der fehlenden Interaktionsmöglichkeit mit dem FA *core complex* spielt FANCM-

669 vermutlich keine Rolle bei der ICL-Reparatur, sondern könnte ähnlich wie das Hefe-Ortholog Mph1 an der fehlerfreien Schadensumgehung bei Replikationsproblemen beteiligt sein. Dies wurde als Arbeitshypothese für meine Experimente zunächst übernommen.

Ausgehend davon sollten zwei Fragen beantwortet werden:

1. Sind *FANCM-669* und sein Proteinprodukt in menschlichen Zellen nachweisbar? Wenn ja, gibt es zelltypspezifische Unterschiede und/oder wird die Expression bei Replikationsstress induziert?
2. Gibt es *in vivo* funktionelle Unterschiede zwischen FANCM-669 und FANCM?

Damit sollten die Vorarbeiten zu *FANCM-669* zu einem runden Abschluss gebracht werden.

4.1.1 DIE SUCHE NACH FANCM-669 IN TRANSKRIPTOM UND PROTEOM

Grundvoraussetzung für eine Funktion von *FANCM-669* in menschlichen Zellen ist, dass sowohl das Transkript als auch das von diesem codierte Protein im Transkriptom bzw. im Proteom nachweisbar sind.

Detektion von *FANCM-669* im Transkriptom

Zum spezifischen Nachweis der Transkriptvariante *FANCM-669* wurde das von A. Schürer und S. Lehmann entwickelte RT-PCR-System für die systematische Untersuchung verschiedener Zelllinien, Gewebe und Bedingungen erweitert und für die Quantifizierung der Transkripte mittels *real-time*-PCR angepasst. Da die Ergebnisse zu einer Erweiterung der Suche auf andere *FANCM*-Transkriptvarianten führten, werden die (q)PCR-Analysen gemeinsam in Kapitel 4.2 (ab Seite 141) vorgestellt. Bezüglich *FANCM-669* ergab sich bei den PCR-Analysen kein Hinweis auf ein durch alternative Polyadenylierung verkürztes Transkript. Es wurden aber Hinweise auf einen geringen Anteil an Transkripten mit einer *intron retention* von Intron 11 gefunden. Ein solches durch alternatives Spleißen verursachtes Transkript würde denselben Übergang zwischen Exon 11 und Intron 11 enthalten wie der in Abbildung 4.1 gezeigte BC036056-Klon, also auch für FANCM-669 codieren. Im Gegensatz zur Variante mit poly(A)-Schwanz wäre die *intron retention*-Variante allerdings ein Substrat für den *Nonsense-mediated mRNA decay* (NMD), da hier das *FANCM-669*-Stopcodon nicht innerhalb des letzten Exons liegt. NMD ist ein Kontrollmechanismus, der den Abbau von Transkripten mit verfrühten Stopcodons vermittelt, um die Zelle vor potentiell schädlichen Produkten aberranter Spleißprozesse zu schützen (BEHM-ANSMANT *et al.* 2007). Erkannt werden die verfrühten Stopcodons durch ihre Lage *upstream* von Exon-Exon-Verbindungen, die nach dem Spleißen zunächst durch spezielle Proteinkomplexe markiert sind. Sind nach der ersten Translationsrunde nicht alle dieser Komplexe von der mRNA verschwunden, kann dies den NMD auslösen (SHYU *et al.* 2008).

Egal ob das codierende Transkript durch alternative Polyadenylierung oder alternatives Spleißen erzeugt wird, stellt sich in beiden Fällen die Frage, ob FANCM-669 im Proteom enthalten ist.

Detektion von FANCM-669 im Proteom

Die Suche nach FANCM-669 wurde auf Proteinebene mittels Western Blot und massenspektrometrischer Analyse fortgesetzt.

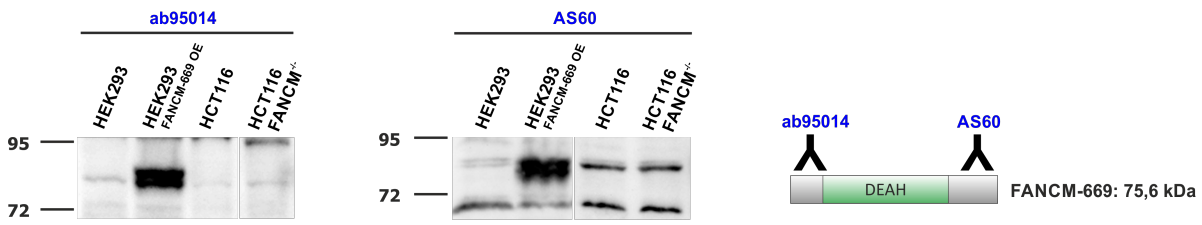


Abbildung 4.2: **Immunochemische Detektion von FANCM-669 in Gesamtzelllysaten.** Es wurden identische Mengen des Lysats mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und immunochemisch analysiert (Seite 89/90). Die Zellen wurden vor der vollständigen Konfluenz geerntet. AS60 und ab95014 erkennen Epitope im N-terminalen Bereich von FANCM, sollten also FANCM-669 detektieren können (Seite 82). HEK293 FANCM-669 OE: Zelllinie mit stabiler Überexpression von *FANCM-669*. Größe der Markerbanden in kDa.

Für den immunochemischen Nachweis von FANCM-669 wird ein Antikörper benötigt, der ein Epitop im N-terminalen Bereich von FANCM erkennt. Allgemein bestand bei FANCM das Problem, dass vor allem die kommerziell erhältlichen Antikörper eine Vielzahl unspezifischer Banden detektieren (vgl. Abbildung 7.4; Seite 173), was die Zuordnung einzelner Banden zu FANCM-Isoformen erschwert. Abbildung 4.2 zeigt die Analyse des Gesamtzelllysats (Seite 89) von HEK293- und HCT116-Zellen mit zwei verschiedenen N-terminal bindenden FANCM-Antikörpern. Zum Vergleich wurde das Gesamtzelllysat einer polyklonalen HEK293-Linie mit stabiler Überexpression von *FANCM-669* aufgetragen. Zur Erzeugung von HEK293 FANCM-669 OE (*overexpression*) wurden HEK293-Zellen mit pcDNA3-FANCM669 transfiziert und auf Zellen mit stabiler Integration des Vektors durch Wachstum in Gegenwart von G418 selektiert (Seite 93). Außerdem stand mit HCT116 FANCM$^{-/-}$ eine homozygote FANCM-*knockout*-Zelllinie zur Verfügung (WANG *et al.* 2013). HCT116 FANCM$^{-/-}$ besitzt eine rAAV-vermittelte Deletion von Exon 2, die zudem zu einem *frameshift* führt, weshalb die Zellen nur eine funktionslose, auf 181 Aminosäuren verkürzte FANCM-Variante produzieren, sofern das Transkript nicht zuvor durch NMD abgebaut wird (vgl. Abbildung 2.14; Seite 78). Anhand von Abbildung 4.2 lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

(i) *FANCM-669* bildet bei Überexpression in HEK293-Zellen ein stabiles Protein.

(ii) Überexprimiertes FANCM-669 wird deutlich von beiden Antikörpern in Form einer Doppelbande erkannt.

(iii) Es lässt sich immunochemisch kein endogenes FANCM-669 im Gesamtzelllysat der getesteten Zellen detektieren, denn die auf Höhe der Doppelbande detektierten Banden

   a. liegen nicht auf derselben Höhe (ab95014 im Vergleich zu AS60).

   b. sind auch in FANCM-*knockout*-Zellen in gleicher Stärke vorhanden wie in HCT116.

   Es handelt sich demnach um unspezifische Banden, die zum jeweiligen Hintergrund gehören und nicht auf FANCM-Varianten zurückzuführen sind. Dies gilt vermutlich auch für die in der Vergangenheit FANCM-669 zugeordneten Banden, wo keine FANCM-defiziente Zelllinie als Vergleich zur Verfügung stand.

Neben der immunochemischen Detektion bietet eine massenspektrometrische (MS) Analyse die Möglichkeit, das Proteom sensitiver und spezifischer auf die Anwesenheit bestimmter Isoformen zu untersuchen, sofern diese spezifische Peptide enthalten (zum Beispiel bei *prostate specific antigen* (PSA)-

Isoformen: VÉGVÁRI *et al.* 2010). Beim *peptide mass fingerprinting* werden die Proteine vor der massenspektrometrischen Untersuchung mit einer Protease gespalten, wodurch jedes Protein eine einzigartige Peptid-Mischung und damit auch ein einzigartiges MS-Spektrum aufweist. Damit Isoformen voneinander unterschieden werden können, muss bei der Spaltung mindestens ein unterschiedliches Fragment gebildet werden, das zudem noch einzigartig vor dem Hintergrund der zu untersuchenden Probe ist. Bei FANCM-669, das sich nur durch seinen C-Terminus von FANCM unterscheidet, ist dies der Fall (Abbildung 4.3). Die standardmäßig verwendete Protease Trypsin schneidet C-terminal von Arginin und Lysin, würde also am C-Terminus von FANCM-669 nur zu einem unspezifischen drei Aminosäuren großen Fragment führen. Wird das Protein aber mit LysC gespalten, das nur C-terminal von Lysinresten spaltet, ergibt sich ein zehn Aminosäuren großes Peptid (SSIFSYRDGK), welches weder in FANCM-FL noch in einem anderen bekannten menschlichen Protein als LysC-Spaltprodukt entsteht (*NCBI protein BLAST*®). Mit Hilfe dieses Peptides sollte der Nachweis von endogenem FANCM-669 sowie idealerweise nachfolgend eine Quantifizierung von FANCM-669 in unterschiedlichen Proben erfolgen. Die MS-Analysen wurden in Kooperation mit der Gruppe um Oliver Valerius (Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen) durchgeführt.

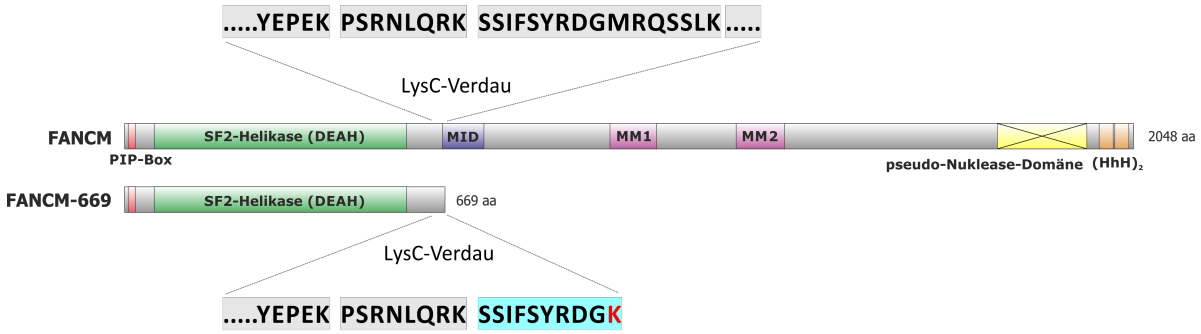


Abbildung 4.3: **Möglichkeit zum massenspektrometrischen Nachweis von FANCM-669 über ein spezifisches Fragment nach LysC-Verdau.** Das teilweise von der Intron 11-Sequenz codierte, C-terminale Fragment von FANCM-669 (hellblau hinterlegt) entsteht weder beim LysC-Verdau von FANCM noch als Fragment eines anderen bekannten menschlichen Proteins und könnte als spezifischer Nachweis für die kurze Isoform dienen.

Die spezifische C-terminale Sequenz wurde als synthetisches Peptid gekauft und als Referenzprobe massenspektrometrisch untersucht, um die Elutionszeit bei der vorgeschalteten Chromatographie und das zu erwartende Masse-Ladungsverhältnis im MS-Spektrum für die spätere Probenanalyse exakter eingrenzen zu können. In der Folge wurden verschiedene Proben von HeLa-, HEK293- und HCT116-Zellen untersucht (Seite 90). Um den Hintergrund möglichst gering zu halten, wurden im Anschluss an eine SDS-PAGE Gelstücke rund um die für FANCM-669 erwartete Größe ausgeschnitten und für die Analysen verwendet. Es wurde sowohl das Eluat einer Immunpräzipitation mit dem FANCM-Antikörper ab95014 als auch Gesamtzelllysat getestet. Allerdings konnte das FANCM-669-spezifische Peptid weder nach dem *pulldown* mit ab95014 noch in einer der Gesamtzelllysat-Fraktionen detektiert werden. Als Positivkontrolle wurde das Lysat der FANCM-669 überexprimierenden Zelllinie (HEK293 FANCM-669 OE) untersucht. Hier konnte das Peptid an der erwarteten Stelle des Spektrums ohne posttranslationale Modifikationen detektiert werden (nicht gezeigt). Weiter einschränkend muss erwähnt werden, dass

parallel untersuchte Proben im Bereich der für FANCM-FL erwarteten Größe nach Trypsin-Verdau keinen Nachweis des Volllängen-Proteins vor dem Hintergrund des Gesamtzelllysats erlaubten. Da FANCM-669 vermutlich – wenn überhaupt – ähnlich niedrig exprimiert wird wie FANCM, könnte die Menge der kurzen Isoform lediglich unterhalb der Nachweisgrenze der durchgeführten Experimente liegen.

Ähnlich wie die zuvor besprochene immunochemische Detektion lieferte die MS-Analyse folglich keinen Hinweis auf die Existenz von endogen produziertem FANCM-669 im Proteom menschlicher Zellen. Ein Ausschluss seiner Existenz ist wiederum selbstverständlich nicht möglich, da es generell zu niedrig, nur unter anderen Bedingungen oder nur in anderen Zelltypen exprimiert werden könnte. Zum damaligen Zeitpunkt erschienen weitere Versuche in diese Richtung nicht zielführend. Vielleicht könnte man heute, einige Jahre später, durch verbesserte Analysemethoden ein zufriedenstellenderes Ergebnis erreichen.

Zusammenfassend muss konstatiert werden, dass weder ein alternativ polyadenyliertes *FANCM-669*-Transkript noch das Proteinprodukt FANCM-669 im Transkriptom bzw. im Proteom unter den getesteten Bedingungen nachgewiesen werden konnte.

4.1.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION VON FANCM-669

Unabhängig davon, ob FANCM-669 unter normalen physiologischen Bedingungen eine Funktion übernimmt, ist die funktionale Untersuchung des Proteins von Interesse. Wie bereits erläutert, könnte FANCM-669 sowohl von einem Transkript mit alternativer Polyadenylierung in Intron 11 als auch von einem Transkript mit *intron retention* von Intron 11 exprimiert werden. Da sowohl alternative Polyadenylierung als auch alternatives Spleißen in einigen Formen von Krebszellen unregulierter ablaufen und daher mehr aberrante Transkripte auftreten (SCOTTI & SWANSON 2016, TIAN & MANLEY 2017), könnte *FANCM-669* unter pathologischen Bedingungen relevant werden. Im vorigen Kapitel konnte bereits gezeigt werden, dass von einem für FANCM-669 codierenden Vektor in menschlichen Zellen ein stabiles Protein exprimiert wird. Daher ist davon auszugehen, dass auch die Translation eines endogenen *FANCM-669*-Transkripts zur Produktion eines stabilen Proteins führen würde. Im Falle eines dominant-negativen Effekts könnte die verkürzte Variante die Tumorprogression erleichtern oder Einfluss auf die Wirksamkeit chemotherapeutischer Behandlungen haben.

Subzelluläre Lokalisation von FANCM-669

Um eine Rolle bei der Erhaltung der genomischen Integrität auszuüben und vermutlich auch, um diese negativ zu beeinflussen, müsste das Protein aller Wahrscheinlichkeit nach im Kern vorliegen. Um die subzelluläre Lokalisation zu untersuchen, wurden HeLa- und HEK293-Zellen transient mit dem Vektor pcDNA3-FANCM669-EGFP-6His transfiziert (Seite 92) und nach 48 Stunden zur Herstellung eines Gesamtzelllysats geerntet (Seite 89) oder für die fluoreszenzmikroskopische Analyse fixiert (Seite 93). Die immunochemische Detektion nach SDS-PAGE (Abbildung 4.4-i) bestätigt die Expression des FANCM-669-eGFP Fusionsproteins. Das Fusionsprotein zeigt allerdings keine nukleäre Lokalisation, sondern befindet sich im Cytoplasma (Abbildung 4.4-ii/iii). Zunächst überraschenderweise zeigte auch das zur Kontrolle untersuchte FANCM-*mCherry*-Fusionsprotein keine Lokalisation im Zellkern (Abbildung 4.4-iv).

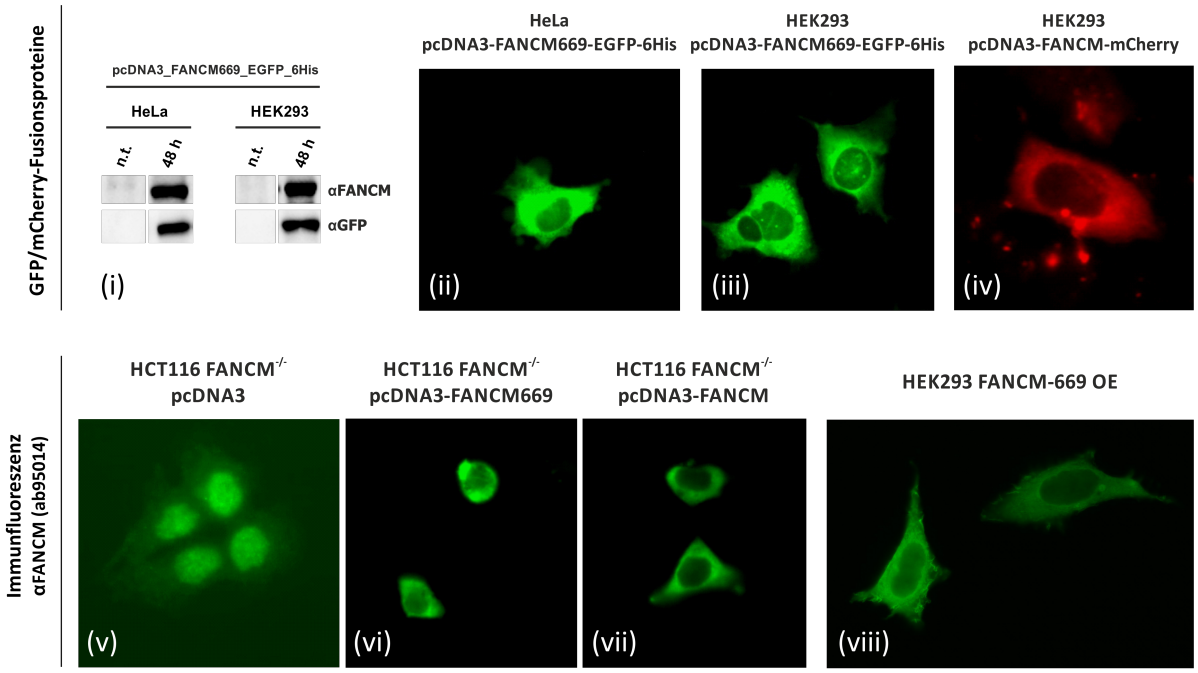


Abbildung 4.4: Subzelluläre Lokalisation von FANCM-669 und FANCM bei (transienter) Überexpression. (i) Immunochemische Detektion der FANCM-669-eGFP-Fusionsproteine nach SDS-PAGE von Gesamtzelllysat bei transienter Überexpression für 48 h in HeLa und HEK293 (αFANCM = ab95014). **(ii/iii)** Fluoreszenzmikroskopische Visualisierung von FANCM-669-eGFP bei transienter Überexpression (48 h) in HeLa (ii) und HEK293 (iii). **(iv)** Fluoreszenzmikroskopische Visualisierung von FANCM-*mCherry* bei transienter Überexpression (48 h) in HEK293. **(v–viii)** Immunochemische Detektion mit ab95014 (αFANCM, N-terminal)/Alexa-Fluor® 488 und fluoreszenzmikroskopische Visualisierung. HCT116 FANCM$^{-/-}$ wurden transient mit Leervektor (v; höhere Belichtungszeit), pcDNA3-FANCM669 (vi) oder pcDNA3-FANCM (vii) transfiziert und nach 48 h fixiert und analysiert. HEK293 mit stabiler Integration von pcDNA3-FANCM669 wurden ohne weitere Transfektion fixiert und untersucht. Zu allen Bildern wurden auch DAPI-Aufnahmen gemacht, um die Lage des Zellkerns zu bestätigen (nicht gezeigt): bei (v) entspricht die höchste Fluoreszenz der Lage des Kerns, bei allen anderen Aufnahmen entspricht der Kern dem Ort der geringsten Fluoreszenzintensität. Methodische Details: Seite 90, 92, 93 und 93.

Um auszuschließen, dass die fehlende nukleäre Lokalisation durch das Anhängen des GFP- bzw. *mCherry*-Proteins verursacht wurde, wurde die Lokalisation zusätzlich mittels Immunfluoreszenz mit dem N-terminal bindenden FANCM-Antikörper ab95014 überprüft. Dazu wurde HCT116 FANCM$^{-/-}$ transient mit einem Leervektor, pcDNA3-FANCM669 oder pcDNA3-FANCM transfiziert, nach 48 Stunden fixiert und zuerst mit dem FANCM-Antikörper und anschließend mit einem sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper inkubiert (Seite 93). Außerdem wurden die stabil FANCM-669 exprimierenden HEK293-Zellen (HEK293 FANCM-669 OE) fixiert und auf die gleiche Weise behandelt. Wie in Abbildung 4.4-vi–viii zu sehen, befinden sich auch hier die überexprimierten Proteine nicht im Kern, sondern im Cytoplasma, was die Ergebnisse mit den Fusionsproteinen bestätigt. Interessanterweise zeigen die FANCM-defizienten Zellen bei Transfektion mit dem Leervektor (Abbildung 4.4-v) ein nukleäres Signal, das aber nur bei längerer Belichtungszeit sichtbar ist. Entweder sind einige der von ab95014 zusätzlich zu FANCM erkannten Proteine (vgl. Abbildung 7.4; Seite 173) im Kern lokalisiert oder das N-terminale „Restprotein“ von 181 Aminosäuren wird in den *knockout*-Zellen stabil produziert. Allerdings wäre in diesem Fall eine Kernlokalisation überraschend. Dieser Befund hat aber keine Auswirkungen auf die Auswertung von

Abbildung 4.4-vi/vii, da hier die Fluoreszenzintensität aufgrund der Überexpression so hoch ist, dass der Hintergrund im Kern keine Rolle spielt.

Die Ergebnisse bedeuten aber nicht, dass weder FANCM noch FANCM-669 im Kern zu finden ist. Für FANCM ist die Kernlokalisation und die Bindung an das Chromatin vielfach beschrieben. Allerdings ist die Kernlokalisation offenbar von der Interaktion mit FAAP24 (vgl. Abbildung 1.9; Seite 30) über die beiden Proteinen gemeinsame $(HhH)_2$-Domäne abhängig (YANG *et al.* 2013). Die Autoren zeigen, dass ohne diese Interaktion das jeweils überexprimierte Protein im Cytoplasma vorliegt und nur bei gleichzeitiger Überexpression von *FANCM* und *FAAP24* beide kernlokalisiert vorliegen. Bezogen auf die vorliegenden Ergebnisse hat dies mehrere Auswirkungen:

(i) Bei der Überproduktion von FANCM in den Zellen liegt demnach vermutlich nur eine physiologisch normale Menge des Proteins im Zellkern vor, nämlich genau so viel wie FAAP24-Interaktionspartner zur Verfügung stehen. Der Rest verbleibt im Cytoplasma. Durch Co-Expression von *FAAP24* sollte sich die Lokalisation in den Kern verschieben. Für Komplementationsstudien in HCT116 FANCM$^{-/-}$ würde dies bedeuten, dass keine „FANCM-Überschwemmung" im Kern stattfindet, was die Komplementation erleichtern sollte.

(ii) FANCM-669 kann aufgrund der nicht vorhandenen C-terminalen Domänen nicht mit FAAP24 interagieren. Dies bedeutet entweder, dass FANCM-669 generell im Cytoplasma vorliegt, was sowohl einen dominant-negativen Effekt als auch eine Funktion bei der Schadenstoleranz unwahrscheinlicher machen würde. Oder die nukleäre Lokalisation kann neben FAAP24 auch durch andere Interaktionspartner beeinflusst werden. Hier wären Co-Lokalisationsstudien mit gleichzeitiger Überexpression von FANCM(-669) und möglichen Interaktionspartnern von Interesse.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass FANCM bei Überexpression vermutlich nur in physiologischen Mengen in den Kern gelangt und FANCM-669 vermutlich nicht kernlokalisiert ist.

Einfluss der Überexpression von *FANCM-669* auf die Sensitivität gegenüber DNA-Schädigung

Trotz fehlender Kernlokalisation könnte FANCM-669 auch schädliche Einflüsse im Cytoplasma auslösen, wenn es zum Beispiel mit FANCM dimerisieren und dieses im Cytoplasma zurückhalten würde. Wie bereits erwähnt, wurde ein solcher Effekt für eine Isoform von FANCL beschrieben (ZHANG *et al.* 2010) und für FANCE-Δ4 vermutet (BOUFFARD *et al.* 2015). Um abschätzen zu können, ob FANCM-669 dominant-negative Effekte auslöst, wurde die Überlebensrate *FANCM-669*-überexprimierender Zellen der Zelllinie HEK293 FANCM-669 OE nach Behandlung mit verschiedenen DNA-schädigenden Agenzien ermittelt. FANCM-defiziente Zellen sind unter anderem sensitiv gegenüber dem *interstrand crosslinker* Cisplatin (CP), dem Topoisomeraseinhibitor Camptothecin, dem methylierenden Agens MMS und UV-Strahlung (SINGH *et al.* 2009, YAN *et al.* 2010, WANG *et al.* 2013). Bei einer Beeinflussung der Funktionalität von FANCM durch FANCM-669 sollte die Überlebensrate der Zellen bei Überexpression von *FANCM-669* geringer sein.

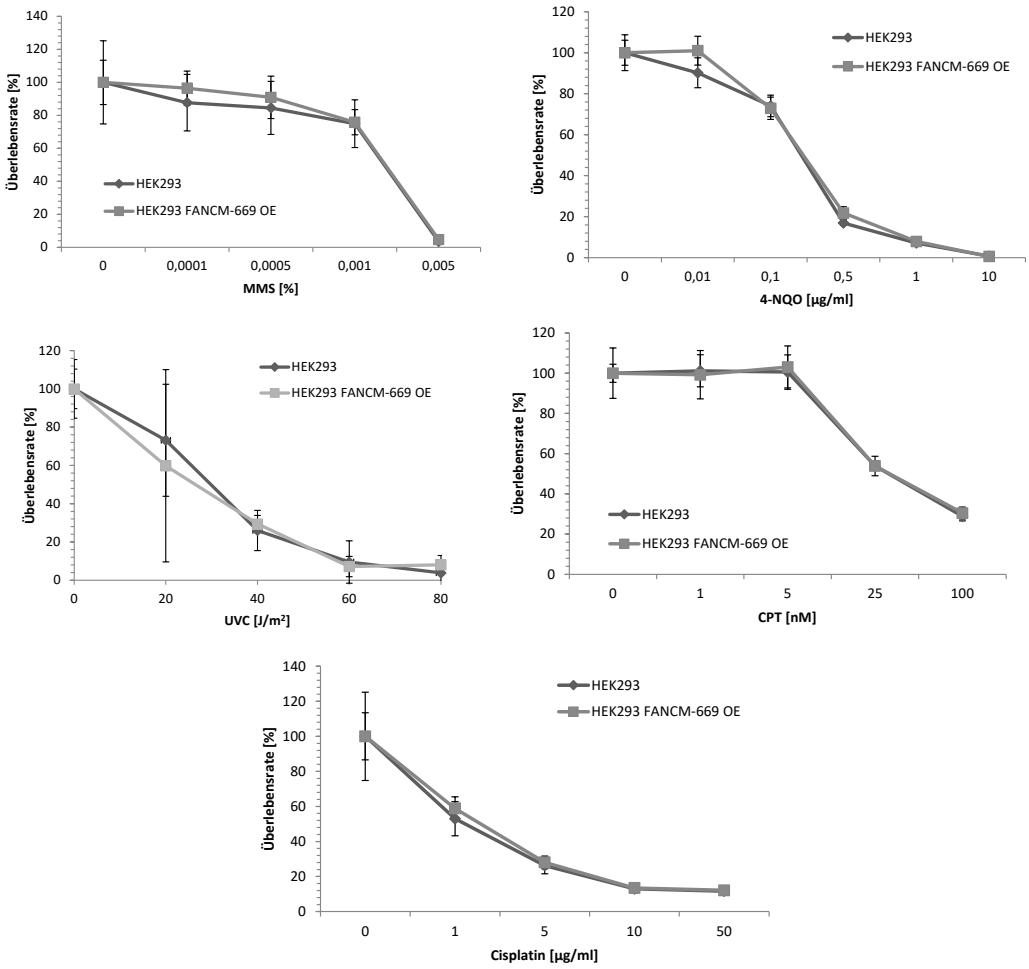


Abbildung 4.5: **Überlebensrate von HEK293-Zellen nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien mit und ohne Überexpression von *FANCM-669* (MTT *assay*).** Die Zellen wurden für 48 h in Anwesenheit der angegebenen DNA-schädigenden Agenzien (vgl. Seite 70) inkubiert oder mit UVC bestrahlt und im Anschluss für 48 h wachsen gelassen. Die Bestimmung der Zahl überlebender Zellen erfolgte durch Messung der Stoffwechselaktivität durch den kolorimetrischen MTT *assay* (Seite 94). HEK293 FANCM-669 OE-Zellen exprimieren stabil die verkürzte FANCM-Isoform (vgl. Abbildung 4.2; Seite 133). Fehlerbalken entsprechen ±SD.

Die Zellen wurden mit UVC bestrahlt und anschließend 48 Stunden wachsen gelassen oder für 48 Stunden in Anwesenheit von MMS, 4-NQO, Camptothecin oder Cisplatin im Medium inkubiert. Der Anteil überlebender Zellen wurde mit dem kolorimetrischen MTT *assay* (Seite 94) bestimmt. Wie in Abbildung 4.5 zu erkennen ist, verändert die Überexpression von *FANCM-669* in Bezug auf keine der getesteten Behandlungen die Überlebensrate der Zellen. Es gibt daher keinen Hinweis auf einen dominant-negativen Effekt von FANCM-669. Auch die Hypothese einer wichtigen Funktion dieser Isoform bei der Schadenstoleranz erscheint nun einmal mehr unwahrscheinlich. So bewirkt zum Beispiel eine Überexpression von *MPH1* in Hefezellen eine Erhöhung spontaner Mutationen und *gross chromosomal rearrangements* (BANERJEE *et al.* 2008). Würde FANCM-669, wie ursprünglich postuliert, eine Mph1-ähnliche Funktion ausüben, sollte auch dessen Überexpression einen sichtbaren Effekt haben.

Komplementation eines ICL-Reparaturdefekts FANCM-defizienter Zellen

Die FANCM-defizienten Zellen HCT116 FANCM$^{-/-}$ zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber *interstrand crosslinkern* und weiteren DNA-schädigenden Agenzien, eine reduzierte Funktionalität des FA-Wegs zur Reparatur von *interstrand crosslinks* (detektiert durch die Bestimmung des Levels von FANCD2-Ubiquitinierung), ein vermehrtes Auftreten von Schwesterchromatidaustauschen und eine Reduktion der replikationsunabhängigen ICL-Reparaturkapazität (WANG *et al.* 2013). In Bezug auf eine mögliche Funktion von FANCM-669 von besonderem Interesse war die reduzierte replikationsunabhängige ICL-Reparaturkapazität, da dieser Phänotyp als einziger der genannten Effekte als unabhängig von FAAP24 beschrieben wurde (WANG *et al.* 2013). Die Autoren zeigen zudem, dass die Funktion von FANCM bei der replikationsunabhängigen ICL-Reparatur unabhängig vom FA *core complex* ist, aber abhängig von der Translokaseaktivität. Sie vermuten, dass die Funktion von FANCM bei der ICL-Reparatur in der G1/G0-Phase in einer indirekten Rekrutierung für die ICL-Reparatur essenzieller Faktoren (gezeigt für Endonuklease-Komplex XPF/ERCC1, NER-Hilfsfaktor XPA und die Transläsionspolymerase REV1) durch eine Umgestaltung des Substrates durch die Translokaseaktivität besteht (WANG *et al.* 2013).

Könnte also FANCM-669 diese spezielle Funktion für FANCM übernehmen bzw. entsprechend der anfänglichen Arbeitshypothese unabhängiger Funktionen sogar allein dafür verantwortlich sein? In der Theorie sprach zunächst wenig dagegen, da die Interaktionsmotive für FAAP24 und den FA *core complex* nicht benötigt werden und FANCM-669 eine funktionsfähige Translokasedomäne besitzt. Daher wurde untersucht, inwiefern FANCM-669 den Defekt in der replikationsunabhängigen Reparatur komplementieren kann.

Bei WANG *et al.* 2013 wurde die Reparaturkapazität mit einem *Host Cell Reactivation Assay* (HCR) bestimmt. Dabei wurden die Zellen mit einem Plasmid mit einem lokalisierten ICL im Promotor eines Luciferase-Reportergens transfiziert. Die Reparaturkapazität ergibt sich aus dem Vergleich der Luciferase-Aktivität zwei Tage nach der Transfektion, die umso höher ausfällt je mehr Reparatur stattgefunden hat. Da das Reporterplasmid keinen Replikationsursprung besitzt, findet die Reparatur nur replikationsunabhängig statt. Der Schaden kann aber transkriptionsabhängig erkannt werden (vgl. Abbildung 1.7; Seite 27). Möglicherweise spielt FANCM(-669) hier eine Rolle bei der Auflösung von RNA-DNA-Hybriden (*R-loops*), eine Funktion, die für FANCM auch in anderen Zusammenhängen beschrieben wurde (SCHWAB *et al.* 2015).

Zur Untersuchung der Komplementation durch FANCM-669 habe ich den in meinem Labor (AG Emmert) etablierten HCR zur Messung der NER-Kapazität anhand der Fähigkeit zur Reparatur UV-bestrahlter Plasmide für die Untersuchung ICL-geschädigter Plasmide erweitert (Seite 95). Zur Einführung der ICLs wurde das Firefly-Luciferase-Reporterplasmid mit *cis*-Diammindichloridoplatin(II) (Cisplatin; CP) bzw. 4,5‘,8-Trimethylpsoralen (Trioxsalen; TMP) behandelt. CP bildet spontan *crosslinks*, während TMP durch zusätzliche Bestrahlung mit UVA-Licht aktiviert werden muss. Bei Cisplatin sind etwa 5–10 % der gebildeten Addukte ICLs, während für TMP+UVA die ICL-Quote bei bis zu 30 % liegt (*reviewed* in WILSON & SEIDMAN 2010). Wie bei WANG *et al.* 2013 ist die zu beobachtende Reparatur nicht replikationsabhängig, aber unter Umständen transkriptionsabhängig. Das einzusetzende molare Verhältnis zwischen Reporterplasmid und *crosslinker* wurde so ausbalanciert, dass die Plasmide mindestens einen ICL

aufwiesen (vgl. alkalisches Agarosegel in Abbildung 4.6-i), die Zellen aber noch in der Lage waren, die Schäden teilweise zu reparieren und zu einem angemessenen *readout* der Reportergenexpression zu führen (Abbildung 4.6-ii; vgl. z.B. SCHÄFER *et al.* 2013 bzgl. UVC-HCR).

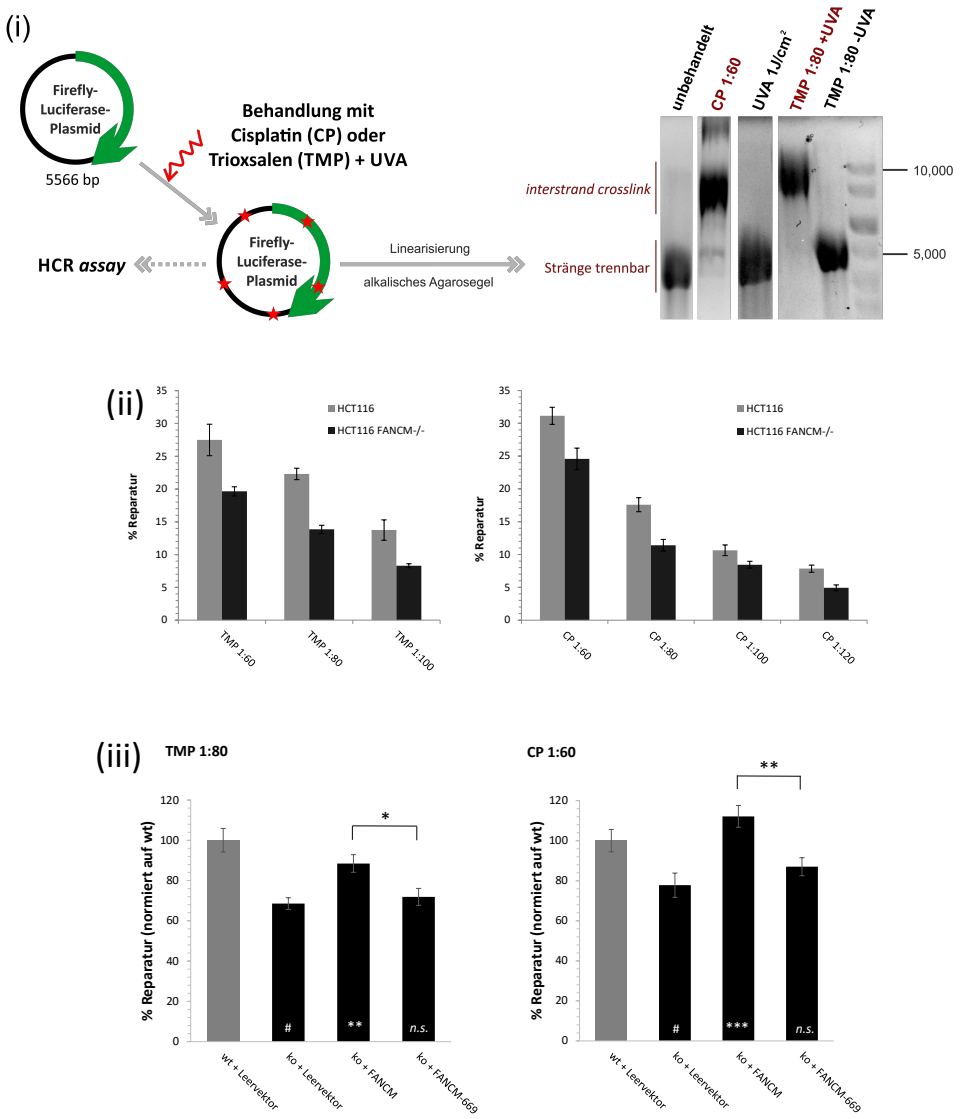


Abbildung 4.6: **Etablierung des *Host Cell Reactivation Assay* (HCR) mit ICL-enthaltenden Plasmiden und Komplementation eines Defekts in der replikationsunabhängigen Reparatur in FANCM$^{-/-}$-Zellen. (i)** Für den HCR wurden Firefly-Luciferase-Plasmide (pCMV-Luc) mit Cisplatin (CP) bzw. Trioxsalen (TMP) und UVA behandelt (Seite 96). Der *bandshift* auf dem alkalischen Agarosegel (Seite 96) bestätigt, dass nur CP- und TMP+UVA-Behandlung zu einer kovalenten Verknüpfung der Stränge geführt und mindestens einen *interstrand crosslink* (ICL) pro Plasmid hervorgerufen haben. Das Verhältnis gibt das molare Verhältnis von Vektor zu *crosslinker* an. Markerbanden in nt. **(ii)** Relative Reparatur der mit unterschiedlicher Dosis behandelten Reporterplasmide in HCT116 und HCT116 FANCM$^{-/-}$ 48 h nach transienter Cotransfektion mit pCMV-Luc und einem unbehandelten Renilla-Luciferase-Plasmid (Seite 95f). Die relative Reparaturkapazität berechnet sich aus der Reportergenaktivität (Firefly-Luciferase) verglichen mit der Transfektion unbehandelten Reporterplasmids. Alle Werte wurden zuvor auf die interne Kontrolle, die Aktivität des cotransfizierten Renilla-Luciferase-Reporters normalisiert. Gezeigt sind Mittelwerte der Triplikate aus einem Experiment ±SD. **(iii)** Versuch der Komplementation der in (ii) sichtbaren Defekte der replikationsunabhängigen Reparatur von CP- und TMP+UVA-induzierten Schäden durch transiente Cotransfektion von HCT 116 FANCM$^{-/-}$ mit pcDNA3-FANCM oder pcDNA3-FANCM669 (wt = HCT116 und ko = HCT116 FANCM$^{-/-}$). Die Reparaturkapazität der HCT116-Zellen wurde zum besseren Vergleich auf 100 % gesetzt und die Werte für die *knockout*-Zellen entsprechend normiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten ±SEM. Angegebene Signifikanzwerte (t-Test für unabhängige Stichproben): n.s. p>0,05, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Werte in den Balken: Vergleich mit ko+Leervektor; Werte über den vertikalen Linien: Vergleich ko+FANCM-669 zu ko+FANCM.

Die Ergebnisse des HCR zeigen erwartungsgemäß eine dosisabhängige Verringerung der Reparaturkapazität mit steigender *crosslinker*-Dosis, da die Schadensdichte steigt, was die Zelle vor höhere Herausforderungen stellt (Abbildung 4.6-ii). Zudem konnte der von WANG *et al.* 2013 beschriebene Defekt in FANCM-defizienten Zellen in ähnlichem Ausmaß reproduziert werden (Abbildung 4.6-ii/iii), obwohl auf die Einführung eines lokalisierten ICLs verzichtet wurde. Auch eine zumindest partielle Komplementation des Defekts durch FANCM konnte sowohl für CP als auch für TMP+UVA beobachtet werden (Abbildung 4.6-iii). Die erfolgreiche Komplementation spricht im Übrigen für die zuvor aufgestellte Hypothese, dass trotz fehlender Kernlokalisation in den fluoreszenzmikroskopischen Bildern zumindest ein physiologischer Anteil des Proteins über Interaktion mit FAAP24 in den Kern gelangt. Bei Expression von *FANCM-669* in den FANCM-defizienten Zellen fand hingegen keine Komplementation statt (Abbildung 4.6-iii). FANCM-669 kann demnach die Funktion von FANCM bei der replikationsunabhängigen ICL-Reparatur nicht ausüben. Dies ist konsistent mit den vorherigen Hinweisen auf fehlende Relevanz der verkürzten Variante.

Der für die Untersuchung der ICL-Reparatur etablierte HCR konnte allerdings in der Folge von meiner Kollegin J. Lehmann erfolgreich für die Untersuchung von XPF und XPG eingesetzt werden (LEHMANN *et al.* 2017, LEHMANN *et al.* 2018a).

Zusammenfassend lässt sich bezüglich der funktionalen Analysen zu FANCM-669 feststellen, dass das Protein zwar stabil in menschlichen Zellen produziert werden kann, es aber vermutlich nicht in den Zellkern gelangt. Zudem konnte weder ein negativer noch ein positiver Effekt des verkürzten Proteins auf die getesteten Phänotypen beobachtet werden.

4.2 RT-PCR: WER SUCHET, DER FINDET…ETWAS ANDERES

Es begann mit der Suche nach dem potenziell durch alternative Polyadenylierung verkürzten Transkript *FANCM-669*. Es endete mit einer Auswahl anderer, möglicherweise interessanter Transkriptvarianten.

4.2.1 SPEZIFISCHER NACHWEIS VON *FANCM-669* MITTELS (q)RT-PCR?

Ausgehend von der ursprünglichen Fragestellung, ob sich das in einer cDNA-Bibliothek aus *testis*-mRNA aufgetauchte, verkürzte *FANCM*-Transkript *FANCM-669* (vgl. Abbildung 4.1; Seite 131) im Transkriptom menschlicher Zellen nachweisen lässt und ob es in bestimmten Geweben oder unter bestimmten Bedingungen stärker exprimiert wird, wurde ein qRT-PCR-System (quantitative Reverse Transkriptase-PCR) zum spezifischen Nachweis von *FANCM-669* entwickelt. Dieses orientierte sich zunächst an den Vorarbeiten von A. Schürer und S. Lehmann (vgl. Seite 130f). Das Problem bei einem spezifischen Nachweis von *FANCM-669* besteht prinzipiell darin, dass es keine Sequenz gibt, die einzigartig für diese Variante ist. Zwar existiert der Übergang von Exon 11 zu Intron 11, der so im reifen Volllängen-Transkript nicht vorkommt, der gleiche Übergang existiert aber in genomischer DNA und vor allem in an dieser Stelle ungespleißter mRNA. Es wurde das in Abbildung 4.7 gezeigte System aus drei Primerpaaren verwendet, bei dem sich sowohl aus PCR A (Übergang Exon 11 zu Intron 11; 3'UTR von *FANCM-669*) als auch aus der Differenz von PCR F und PCR I die relative Menge eines verkürzten Transkriptes ableiten lassen sollte.

Für diese und alle folgenden Analysen wurde zunächst RNA aus Zellen der angegebenen Zelllinien extrahiert und in cDNA umgeschrieben (Seite 86). Es wurden sowohl immortalisierte Zelllinien als auch primäre Fibroblasten untersucht. Gerade in Krebszelllinien wie HCT116 sollten alternative Transkripte häufiger sein, was die Detektion erleichtern sollte. Da *FANCM* auf Transkriptionsebene nicht zellzyklusspezifisch reguliert ist (MJELLE *et al.* 2015), wurden unsynchronisierte Zellen vor der vollständigen Konfluenz geerntet und für die RNA-Extraktion eingesetzt. Sofern nicht anders angegeben, wurde für die cDNA-Synthese Total-RNA und *anchored*-Oligo(dT)-Primer verwendet. Die qPCR erfolgte in 384-*well*-Platten mit dem HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix (Seite 87). Die relative Expression wurde durch Normierung auf die *GAPDH*-Expression der jeweiligen Probe effizienzkorrigiert berechnet. Zudem wurde eine Kalibrierung der Werte auf ein Kontroll-*template* (linearisiertes Plasmid oder gDNA) vorgenommen.

Abbildung 4.7 zeigt auf den ersten Blick ein in sich stimmiges Ergebnis eines Versuchs der *FANCM-669*-Quantifizierung für drei verschiedene Zelllinien. Der Anteil an *FANCM-669* ist zwar sehr gering, aber das Transkript ist nachweisbar und PCR A sowie die Berechnung der Differenz aus PCR F und PCR I ergeben zumeist beide einen Anteil von etwa 5 % *FANCM-669* an allen detektierten *FANCM*-Transkripten.

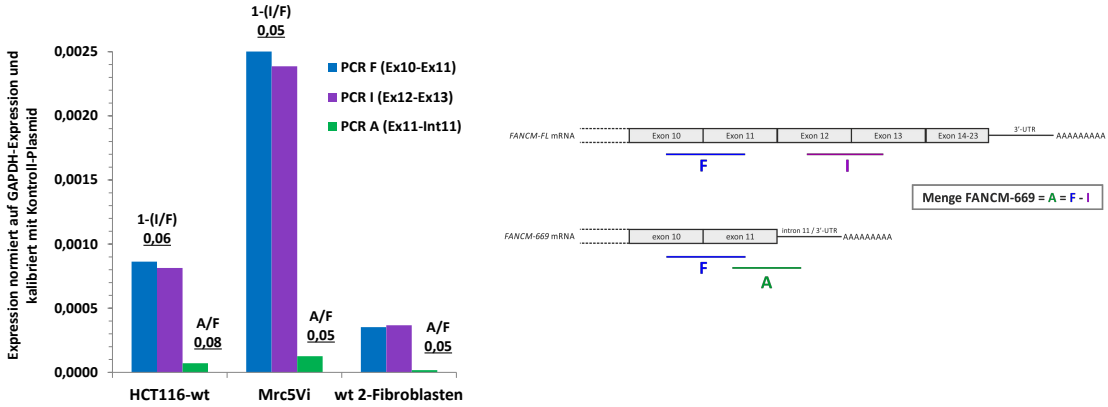


Abbildung 4.7: ***Real-time*-RT-PCR zur Quantifizierung der verkürzten Transkriptvariante *FANCM-669*.** Aus Zellen der angegebenen Linien wurde Total-RNA isoliert, mit *anchored*-Oligo(dT)-Primer in cDNA umgeschrieben und als *template* für die qPCR eingesetzt (Seite 86/87). Es wurden die drei rechts schematisch gezeigten Produkte amplifiziert. Unter der Annahme, dass es ein durch alternative Polyadenylierung verkürztes Transkript (*FANCM-669*) gibt, entspricht die Menge an Produkt F der Gesamtmenge an *FANCM*-Transkripten, Produkt I entsteht nur mit dem Volllängen-Transkript und PCR A ist spezifisch für *FANCM-669*, da einer der Primer in der 3'UTR (Beginn von Intron 11) bindet. Da sich die Menge an *FANCM-669*-Transkript hierbei sowohl aus PCR A als auch aus der Differenz von Produkt F und I ergibt, ist eine interne Kontrolle vorhanden. Links ist das Ergebnis der Quantifizierung, jeweils normiert auf die *GAPDH*-Expression angegeben. Der relative Anteil von *FANCM-669* an allen *FANCM*-Transkripten ergibt sich aus dem Quotienten A/F oder aus 1–(I/F). Die jeweiligen Ergebnisse sind angegeben, sofern sie positive Werte annahmen. Gezeigt sind Daten einer repräsentativen Messung mit Duplikaten. Primerpaare für alle PCR-Produkte in Tabelle 2.5 (Seite 87); Primersequenzen Seite 79f.

Die Werte der auf *GAPDH* normierten Expression erscheinen sehr niedrig. Bei einer Anzahl von *GAPDH*-Transkripten in einer Größenordnung von 1.000–2.000 pro Zelle (WHITE *et al.* 2011) entspräche die Expression von *FANCM* in HCT116-Zellen 1–2 Transkripten pro Zelle, was für ein niedrig exprimiertes Gen durchaus nicht unwahrscheinlich ist (MARINOV *et al.* 2014). Bei seltenen Transkripten liegt auch die Wahrscheinlichkeit höher, dass sie bei der Extraktion der RNA verloren gehen oder nicht vollständig revers

transkribiert werden und daher in der qPCR nicht detektiert werden können. Allerdings bedeutet dies, dass *FANCM-669* statistisch nur in jeder zehnten bis zwanzigsten Zelle aufträte. Tatsächlich waren auch die C_t-Werte der PCR A mit Werten im Bereich von 30 sehr hoch, damit allerdings immer noch im linearen Bereich der Standardkurve (bis etwa C_t=32 bestimmt). Zudem war PCR A in den –RT-Proben nicht nachweisbar, was für eine spezifische Amplifizierung in den +RT-Proben spricht.

Zweifel an der Spezifität der PCR zum Nachweis von *FANCM-699* kamen allerdings aufgrund von mitgeführten Kontrollen auf, die eine Region weiter hinten in Intron 11 amplifizierten, die nicht Teil der potenziellen 3'UTR von *FANCM-669* ist. Diese Intron-PCR wies in fast allen Messungen durchschnittlich Expressionswerte in der gleichen Höhe wie die „*FANCM-669*-spezifische" PCR A auf (nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob das vermeintliche *FANCM-669*-Produkt tatsächlich von ungespleißten Transkripten herrührt, wurde die Region rund um Intron 11 systematisch untersucht (Abbildung 4.8-i).

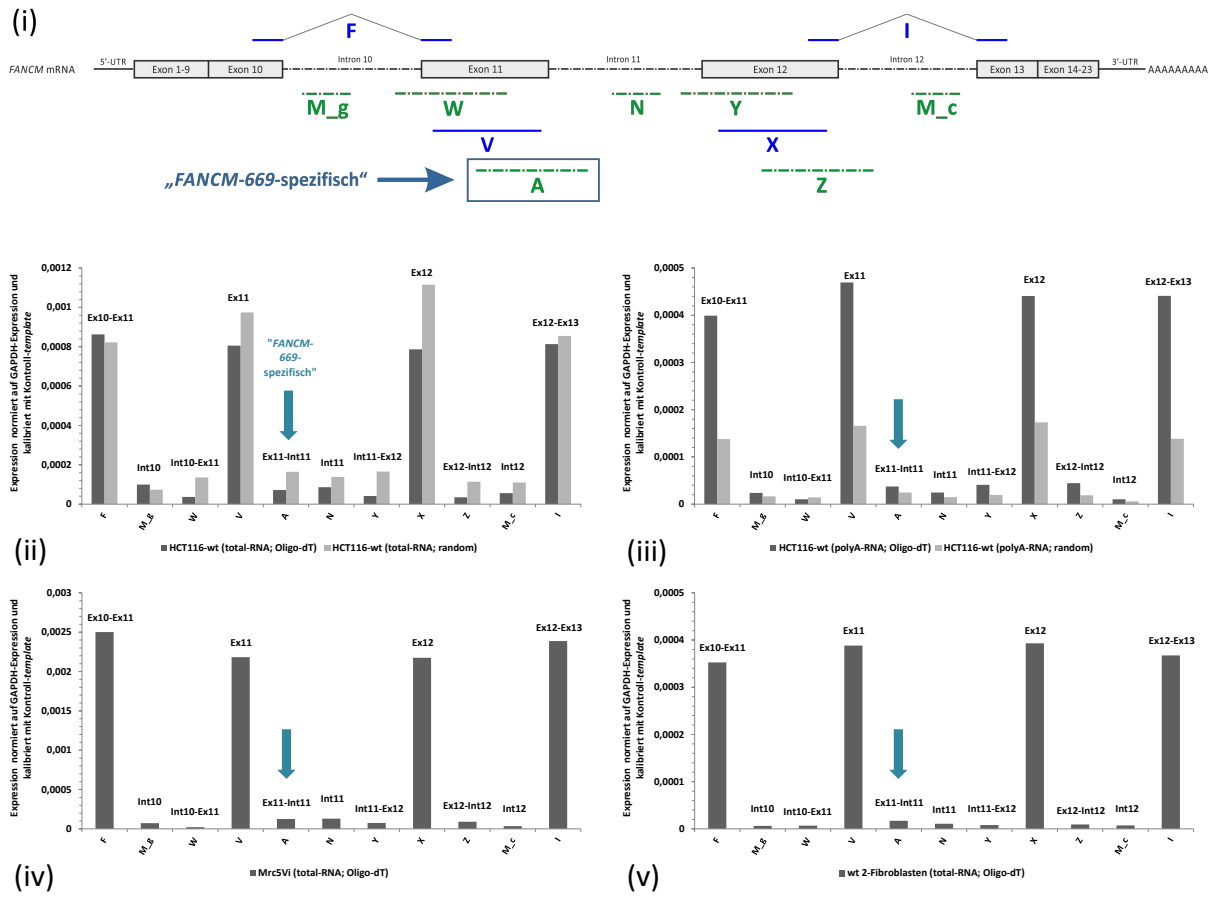


Abbildung 4.8: ***Real-time*-RT-PCR zur Quantifizierung verschiedener Produkte rund um Intron 11 der *FANCM*-mRNA. (i)** Schematische Darstellung der *FANCM*-mRNA mit potenzieller *intron retention* von Intron 10, 11 und 12 und den in der qPCR amplifizierten Bereichen. Blau: Produkte, bei denen beide Primer in Exons binden. Grün: Produkte, bei denen mindestens ein Primer in einem intronischen Bereich bindet. PCR A entspricht der theoretisch *FANCM-669*-spezifischen PCR aus Abbildung 4.7. **(ii–v)** Aus Zellen der angegebenen Linien wurde Total-RNA isoliert, für (iii) zusätzlich poly(A)-RNA angereichert, mit *anchored*-Oligo(dT)-Primer oder *random hexamer*-Primer in cDNA umgeschrieben und als *template* für die qPCR eingesetzt (Seite 86/87). Das Ergebnis der Quantifizierung ist jeweils normiert auf die *GAPDH*-Expression angegeben. Gezeigt sind Daten einer repräsentativen Messung mit Duplikaten. Primerpaare für alle PCR-Produkte in Tabelle 2.5 (Seite 87); Primersequenzen Seite 79f.

Das Ergebnis der qPCR in Abbildung 4.8 lässt erkennen, dass mit allen getesteten Primerpaaren mit mindestens einem Primer im intronischen Bereich Expressionswerte in der gleichen Größenordnung erreicht wurden wie für die als spezifisch für *FANCM-669* angesehene PCR A. Diese Beobachtung zeigt sich unabhängig von der Art der eingesetzten RNA (Total-RNA oder poly(A)-RNA) und vom Primer der cDNA-Synthese (*anchored*-Oligo(dT) oder *random hexamer*) (Abbildung 4.8-ii/iii) und unabhängig von der Zelllinie (Abbildung 4.8-ii/iv/v). Da nicht davon auszugehen ist, dass alle diese Produkte spezifische Transkriptvarianten darstellen, handelt es höchstwahrscheinlich um die Amplifikation ungespleißter Bereiche. Der vermeintlich spezifische *FANCM-669*-Nachweis stellt demnach vielmehr den Nachweis einer *intron retention* von Intron 11 dar. Ob es sich dabei um ein reguliertes alternatives Spleißen oder einen Fehler bzw. eine Ungenauigkeit der Spleißmaschinerie handelt, ist unklar.

Auch vorläufige Ergebnisse zur Quantifizierung von *FANCM-669* in weiteren immortalisierten Zelllinien, primären Fibroblasten von 18 verschiedenen Spendern, RNA verschiedener Gewebe sowie Zellen nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien erbrachten keinen Hinweis auf eine signifikante Induktion einer alternativen Polyadenylierung (nicht gezeigt). In Übereinstimmung damit konnte bei einer Studie von RNA-Spezies zu verschiedenen Zeitpunkten ihrer Lebensdauer mittels *Bromouridine sequencing* (BruSeq) keine Überrepräsentation eines bestimmten Teils des *FANCM*-Gens in unreifen Transkripten festgestellt werden, wie sie bei einem verfrühten Abbrechen der Transkription durch Polyadenylierung nach einem Drittel der Länge des Gens zu erwarten wäre (PAULSEN *et al.* 2014; M. Ljungman, persönliche Kommunikation).

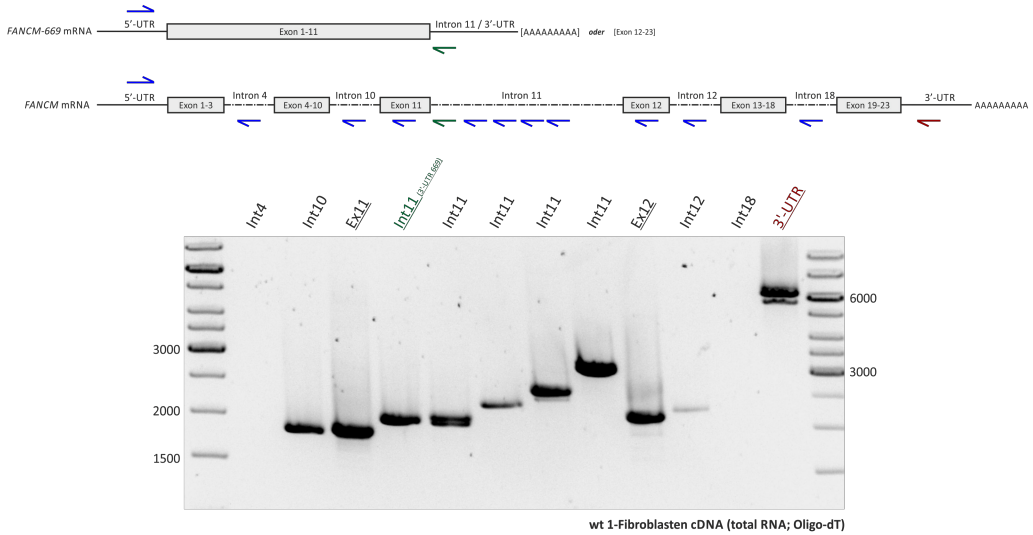


Abbildung 4.9: **RT-PCR zur Amplifizierung großer Abschnitte des *FANCM*-Transkriptes.** Aus Wildtyp-Fibroblasten (wt 1) wurde Total-RNA isoliert, mit *anchored*-Oligo(dT)-Primer in cDNA umgeschrieben (Seite 86) und als *template* für eine *touchdown*-PCR eingesetzt (Seite 86). Es wurden die oben schematisch gezeigten Produkte amplifiziert. Dabei lag der *forward*-Primer immer in der 5'UTR und wurde mit unterschiedlichen *reverse*-Primern kombiniert. Grün: *reverse*-Primer in potenzieller 3'UTR von *FANCM-669* (Produkt: 2068 bp); rot: *reverse*-Primer in 3'UTR des Volllängen-Transkriptes (Produkt: 6213 bp; „FL-PCR-Produkt"). Die Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Größe der Markerbanden in Basenpaaren (bp). *Forward*-Primer: #K172; *reverse*-Primer (von links nach rechts): #K178; #K167; #K90; #K83; #K174; #K175; #K176; #K177; #K152; #K156; #K179; #K171 (Primersequenzen Seite 79f).

Wie bereits in Kapitel 4.1.1 (Seite 132) erläutert, würde auch ein Transkript mit *intron retention* von Intron 11 für FANCM-669 codieren, wäre aber ein potenzielles Substrat des NMD. Um für die verkürzte FANCM-Isoform zu codieren, müssten aber Intron 1–10 aus dem Transkript herausgespleißt sein. In diesem Fall müsste mit Primern in der 5'UTR von *FANCM* und am Beginn von Intron 11 ein entsprechendes Produkt aus dem cDNA-Pool amplifizierbar sein, was bestätigt werden konnte (Abbildung 4.9; grün). Es existiert also, wenn auch in sehr geringen Mengen, ein Transkript, dessen Translation FANCM-669 produzieren würde. Die ebenfalls getesteten alternativen *reverse*-Primer im hinteren Bereich von Intron 11 sowie in Intron 10 und 12 liefern ebenfalls ein Produkt (Abbildung 4.9), was die Vermutung stützt, dass in mehreren Fällen ganze Introns im Transkript verbleiben. Dies ist aber nicht für alle Introns zu verallgemeinern, da mit den Primern in Intron 4 und Intron 18 kein Produkt amplifiziert werden konnte (alle getesteten Introns haben eine ähnliche Größe zwischen 2400 und 3500 bp). Interessanterweise wurde aufgrund von RNASeq-Daten beschrieben, dass *intron retention* ein deutlich häufigeres Phänomen darstellt als meist angenommen und eine Rolle bei der Regulation niedrig exprimierter Gene spielen kann (BRAUNSCHWEIG *et al.* 2014). Ob dies für *FANCM* relevant ist, ist allerdings offen.

Tabelle 4.1: **Übersicht über Datenbankeinträge bei NCBI und Ensembl zu *FANCM*-Transkripten** (Stand 10.02.2022)**.** *FANCM* Gene ID: NCBI: 57697; Ensembl: ENSG00000187790. NM: *Protein-coding transcript*; XM: *Predicted model protein-coding transcript.* Als „nicht-codierend" vermerkte Einträge wurden nicht in die Übersicht aufgenommen.

mRNA	Transkript-ID (NCBI)	Isoform (Protein)	Größe (aa)	Ensembl Transkript ID	ENA-Klon	Beschreibung
1	NM_020937.4	1	2048	ENST00000267430.10	DQ140356	***FANCM-FL*** („normales *FANCM*")
2	NM_001308133.2	2	2022	ENST00000542564.6	BC140776, BC144511	***FANCM-Δ3*** (Exon 3 *skipping*: *in frame*: minus 26 aa)
3	NM_001308134.2	3	669	ENST00000556036.5	BC036056	***FANCM-669*** (Intron 11, fs: 669*)
X1	XM_011537034.2	X1	2053			Exon 16-alternative 5'-*splice site* (Ex16extd) → plus 5 aa *in frame*
X2	XM_011537035.3	X2	2027			Ex16extd + Δ3
X4	XM_017021523.1	X3	1801			Ex16extd + Δ21/22 (Exon *skipping*) – *frameshift*
X6	XM_017021524.2	X4	1732			alternativer Start + Ex16extd
X7	XM_017021525.2	X5	1658			alternativer Start + Ex16extd
X8	XM_017021526.2	X5	1658	ENST00000556250.5		alternativer Start + Ex16extd
X9	XM_017021527.1	X6	1653			alternativer Start
X11	XM_011537037.3	X7	1391			alternativer Start (Intron 11-Sequenz enthält Startcodon) + Ex16extd

4.2.2 SUCHE NACH WEITEREN TRANSKRIPTVARIANTEN

Als immer deutlicher wurde, dass die Untersuchung von *FANCM-669* eine Sackgasse darstellte, wurde die Untersuchung anderer Transkriptvarianten von *FANCM* in den Fokus genommen, auch um die Vorarbeiten zu Komplementationsanalysen in HCT116 FANCM$^{-/-}$ (größtenteils nicht gezeigt) sinnvoll nutzen zu können.

Tabelle 4.1 zeigt eine Übersicht über Datenbankeinträge zu *FANCM*-Transkripten. Drei der Einträge sind durch mehr als bioinformatische Vorhersagen belegt, darunter das Volllängen-Transkript (*FANCM-FL*) und *FANCM-669* (entsprechend BC036056). Die dritte Variante ist bezüglich 5'UTR und 3'UTR identisch mit *FANCM-FL*, ihr fehlt aber Exon 3. Diese Variante wurde ebenso wie *FANCM-669* als Teil einer cDNA-Bibliothek entdeckt (STRAUSBERG *et al.* 2002). Darüber hinaus werden acht bioinformatisch vorhergesagte Varianten gelistet, die potenziell proteincodierend sind. Darunter sind fünf Varianten mit einem alternativen Startcodon (X6–X9; X11), die ein N-terminal verkürztes Protein ergeben würden, und zum Teil weitere Veränderungen auf mRNA-Ebene [*exon skipping* (Δ2/3, Δ6), 5'-Verkürzungen] aufweisen. Die anderen drei der vorhergesagten Transkripte entsprechen vom Startcodon bis zur 3'UTR dem Volllängen-Transkript, beinhalten aber verschiedene Veränderungen als Resultate alternativer Spleißereignisse:

- Δ3: *exon skipping* von Exon 3 (78 bp; also *in frame*); bedeutet auf Proteinebene Deletion von 26 Aminosäuren im Vergleich zu FANCM-FL (Aminosäuren 228–253 im Bereich der Helikase-Domäne inklusive des Walker III-Motivs; vgl. Abbildung 5.4; Seite 168)
- Δ21/22: *exon skipping* von Exon 21 und 22 (668 bp; also *frameshift*); bedeutet auf Proteinebene: Aminosäuren 1–1780 wie FANCM-FL + 16 Aminosäuren *out of frame* codiert von Exon 23 + verfrühtes Stopcodon in Exon 23 (1–1780 + LTSRNLHVCTSNSSEG*; also Fehlen der pseudo-Nuklease- und der $(HhH)_2$-Domäne; vgl. Abbildung 5.4; Seite 168)
- „Ex16extd": verlängertes („*extended*") Exon 16 durch Nutzung einer alternativen 5'-Spleißstelle (*in frame*-Insertion der ersten 15 Nukleotide von Intron 16); bedeutet auf Proteinebene Insertion von 5 Aminosäuren (YSKYQ) hinter R1462, also im Bereich zwischen MM2 und der pseudo-Nuklease-Domäne

Auf Proteinebene erscheinen vor allem Δ3 und Δ21/22 interessant, da sie funktionale Domänen von FANCM betreffen. Keine der Variationen, auch in Kombination miteinander, würde potenziell NMD des Transkriptes auslösen, da bei Δ3 und Ex16extd das *FANCM-FL*-Stopcodon genutzt wird und bei Δ21/22 das verfrühte Stopcodon im terminalen Exon liegt. Es könnte sich also um *in vivo* relevante Spleißvarianten handeln.

Um die Suche nach den genannten drei sowie potenziell unbekannten Spleißvarianten auf reife mRNAs einzugrenzen, wurde nicht der cDNA-Pool, sondern das Amplikon einer RT-PCR mit Primern in der 5'UTR und der 3'UTR des Volllängen-Transkriptes untersucht („FL-PCR-Produkt"; Abbildung 4.9; rot; Seite 144). Dadurch werden zwar verkürzte Transkripte ausgeschlossen, aber der Ausschluss unreifer Transkripte und von Transkripten mit großen *intron retentions* erschien an dieser Stelle wichtiger, um möglichst relevante Informationen zu gewinnen. Wie in Abbildung 4.9 zu sehen, sind schon nach der elektrophoretischen Trennung mindestens zwei Produktgrößen zu erkennen. Bei der unteren Bande könnte es sich um eine Δ21/22-Variante handeln. Das PCR-Produkt wurde mit ExoSAP-IT™ behandelt und zunächst komplett sequenziert (Seite 54), um auffällige Stellen anhand von definierten Übergängen zu Mischsequenzen zu erkennen.

Anhand der Sequenzierungsauswertung bestätigte sich, dass am Übergang zu Exon 3 und Exon 21 alternative Sequenzen vorhanden waren. Allerdings konnte kein Hinweis auf die bioinformatisch für

mehrere Transkripte vorausgesagte alternative 5'ss von Exon 16 (Ex16extd) gefunden werden. Vermutlich handelt es sich hierbei um ein *in silico*-Artefakt: die 5'ss von Exon 16extd ist nach bioinformatischen Abschätzungen stärker, *in vivo* wird aber wohl aufgrund des Einflusses regulativer Faktoren die für *FANCM-FL* beschriebene 5'ss genutzt. Stattdessen wurden Hinweise auf eine bisher nicht bekannte Insertion eines alternativen Exons entdeckt: im Anschluss an Exon 11 ergab sich eine deutliche Doppelsequenz über 125 bp, wo die Exon 12-Sequenz von einem Teil von Intron 11 überlagert wurde. Interessanterweise handelte es sich hierbei um eine interne Sequenz von Intron 11, die im Weiteren als Exon 11b (Ex11b) bezeichnet wird (vgl. Abbildung 4.11-i; Seite 149). Die Insertion von Exon 11b führt zu einem Abbruch der Translation nach 32 Codons durch ein verfrühtes Stopcodon. Das gebildete Protein wäre 699 Aminosäuren groß und entspricht in wesentlichen Teilen FANCM-669. Allerdings wäre *FANCM-Ex11b* durch das verfrühte Stopcodon auch ein potenzielles NMD-Substrat. Es wurden zunächst keine Hinweise auf weitere Deletionen oder Insertionen gefunden.

Um die gefundenen Spleißvariationen genauer untersuchen zu können, wurden die FL-PCR-Produkte von wt 1-Fibroblasten-cDNA (siehe oben und Abbildung 4.9; rot; Seite 144) in pJET1.2/blunt kloniert (Seite 88) und eine Reihe von Einzelklonen mittels PCR und Sequenzierung genauer analysiert. Für 20 Klone konnte die gesamte Sequenz bestimmt werden, woraus sich die in Tabelle 4.2 zusammengefassten Informationen ergaben. *Exon skipping* konnte sowohl für Exon 3 als auch für Exon 21/22 bestätigt werden. Auch die Insertion des alternativen Exons 11b konnte mehrfach beobachtet werden. Zusätzlich ergab sich bei zwei Klonen das bisher nicht beschriebene *exon skipping* von Exon 5 (Δ5), was einem *in frame*-Entfall von 132 bp (44 Aminosäuren) entspricht. Die fehlenden Aminosäuren 307–350 liegen wie bei Δ3 innerhalb der Helikase-Domäne von FANCM. Interessanterweise ist der Anteil an Klonen mit Variationen vergleichsweise hoch und einige der analysieren Klone weisen Kombinationen der Motive auf. Allerdings handelt es sich hier nicht um statistisch auswertbare Ergebnisse, sondern nur um eine Sondierung potenziell interessanter Stellen.

Tabelle 4.2: **Ergebnisse der Analyse von 20 Einzelklonen nach Klonierung des Amplikons des Volllängen-*FANCM*-Transkriptes in pJET1.2/blunt.** Die Klone wurden mittels PCR und Sequenzierung auf die angegebenen Spleißvariationen untersucht. Rechts: Unterstrichene Variationen haben Einfluss auf das von dieser Variante codierte Protein.

Motiv	Häufigkeit in 20 Klonen
Δ3	3
Δ5	2
Δ21/22	9
Ex11b	4

Transkriptvariante	Häufigkeit in 20 Klonen
FANCM-FL	8
<u>Δ5</u>	2
<u>Δ21/22</u>	6
<u>Δ3</u> + <u>Ex11b</u>	1
<u>Ex11b</u> + Δ21/22	1
<u>Δ3</u> + <u>Ex11b</u> + Δ21/22	2

Um festzustellen, ob die bei wt 1 nachgewiesenen Varianten auch in Fibroblasten anderer Individuen auftreten, und um mögliche weitere Varianten zu finden, wurden für zwei weitere Wildtyp-Fibroblasten-

Zelllinien und für die immortalisierten Fibroblasten der Linie GM00637 das FL-PCR-Produkt von cDNA amplifiziert und alle Amplikons des *FANCM*-Transkriptes für die in Abbildung 4.10 gezeigte PCR eingesetzt. Es wurden Primerpaare gewählt, die die gesamte Länge des Amplikons abdecken und dabei klein genug sind, dass das Fehlen von Exons bei der Agarosegelelektrophorese sichtbar werden sollte. Bei wt 1 und teilweise auch bei den anderen getesteten Zelllinien sind die Produkte für die Varianten Δ3, Ex11b und Δ21/22 zu erkennen (hier schwer zu erkennen, im Original aber deutlich). Ein Δ5-spezifisches Produkt konnte nicht beobachtet werden. Insgesamt sind die Varianten bei wt 1 wesentlich stärker vertreten. Die Ursache hierfür ist nicht klar. Möglicherweise weisen die Zellen eine höhere Rate alternativen Spleißens auf, was auch den vergleichsweise geringen Anteil an *FANCM-FL* in den analysierten Klonen erklären würde. Unerwartete Banden waren für das Wildtyp-Material nur bei PCR XI und PCR XIII im hinteren Teil des Transkriptes zu sehen. Die Größe passt nicht zu einem Fehlen von nur Exon 21 oder Exon 22. Die Identität der Bande konnte aber nicht geklärt werden. Bei GM00637 konnten zwei zusätzliche Banden als Varianten mit Δ14 und Δ13/14 + 51 bp aus der Mitte von Intron 14 identifiziert werden. Diese Hinweise wurden aber nicht weiterverfolgt, da die Produkte nur bei immortalisierten Fibroblasten auftraten.

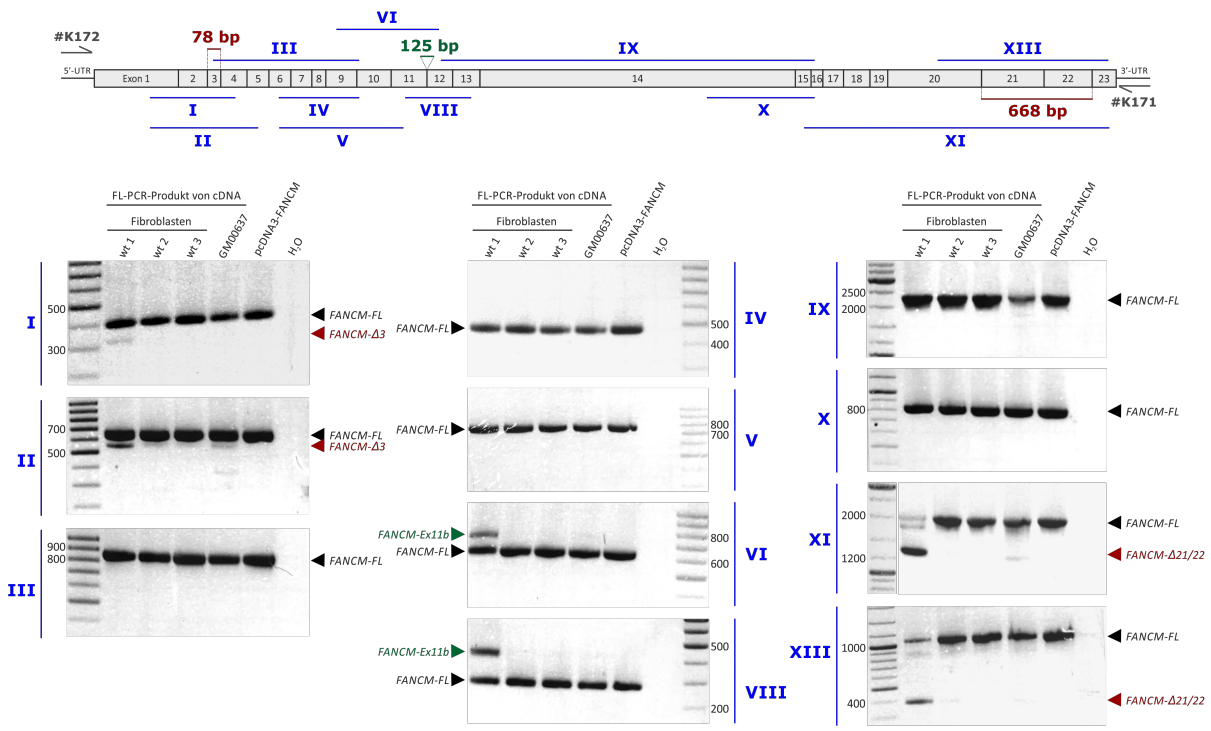


Abbildung 4.10: **PCR zum Nachweis weiterer *FANCM*-Transkriptvarianten auf Grundlage von Amplikons des gesamten *FANCM*-Transkriptes.** Aus Wildtyp-Fibroblasten (wt 1, 2 oder 3) und immortalisierten Fibroblasten (GM00637) wurde Total-RNA isoliert, mit *anchored*-Oligo(dT)-Primer in cDNA umgeschrieben (Seite 86) und als *template* für eine *touchdown*-PCR mit den Primern #K172 und #K171 eingesetzt (Seite 86). Die Amplikons wurden mit ExoSAP-IT™ behandelt und 1:1000 verdünnt als *template* für die oben schematisch gezeigten PCRs eingesetzt, die die gesamte Länge des Transkripts abdecken. Das Plasmid pcDNA3-FANCM diente als Positivkontrolle für die Volllängen-Produkte. Ein Ansatz nur mit cDNA 1:1000 verdünnt ergab keine Produkte (nicht gezeigt), die sichtbaren Produkte stammen demnach nur von FL-PCR-Produkten. Die Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Größe der Markerbanden in Basenpaaren (bp). Primerpaare und Produktgröße auf *FANCM-FL*: I: #K163/#K28 (394 bp); II: #K163/#K165 (619 bp); III: #K99/#K66 (862 bp); IV: #K60/#K66 (481 bp); V: #K60/#K90 (750 bp); VI: #K180/#K62 (636 bp); VIII: #K81/#K108 (282 bp); IX: #K105/#K112 (2264 bp); X: #K58/#K112 (821 bp); XI: #K109/#K94 (1820 bp); XIII: #K50/#K94 (1058 bp). Primersequenzen Seite 79f.

4.2.3 SPEZIFISCHER NACHWEIS VON *FANCM-Ex11B*, *FANCM-Δ3* UND *FANCM-Δ21/22*

Wie bereits im vorigen Abschnitt ausgeführt, handelt es sich bei Exon 11b um 125 bp aus dem Inneren von Intron 11 (Abbildung 4.11-i). Die genauere Analyse der Sequenz zeigt Spleißstellen für das *major* Spleißosom und einen potenziellen *branchpoint*. Interessanterweise sind die 3'-Spleißstellen von Exon 11b und Exon 12 im bioinformatischen Vergleich fast gleich stark (MaxEntScan; YEO & BURGE 2004). Da die Übergänge zwischen den kanonischen Exons und Exon 11b in ungespleißter RNA nicht vorkommen, ist es für Ex11b möglich, Primerpaare zu finden, die Varianten mit diesem Motiv spezifisch erkennen. Abbildung 4.11-ii zeigt eine solche PCR und deren gelungene Anwendung. Exon 11b lässt sich auch direkt mit cDNA nachweisen, wie hier für GM00637 gezeigt. Im Falle der Ex11b-Ex12-PCR zeigt sich hier sowohl das Ex11b-spezifische Produkt als auch die bereits zuvor beobachteten Produkte aufgrund ungespleißter RNA mit *intron retention*. Die Ex11-Ex11b-PCR ließe sich auch für die qRT-PCR einsetzen, dies konnte allerdings nicht mehr umgesetzt werden. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass *FANCM-Ex11b* nicht in relevanter Menge detektierbar ist, da die in Abbildung 4.8 (Seite 143) gezeigte PCR N vermutlich diesen Bereich amplifizieren würde (drei *mismatches* am 5'-Ende des *forward*-Primers).

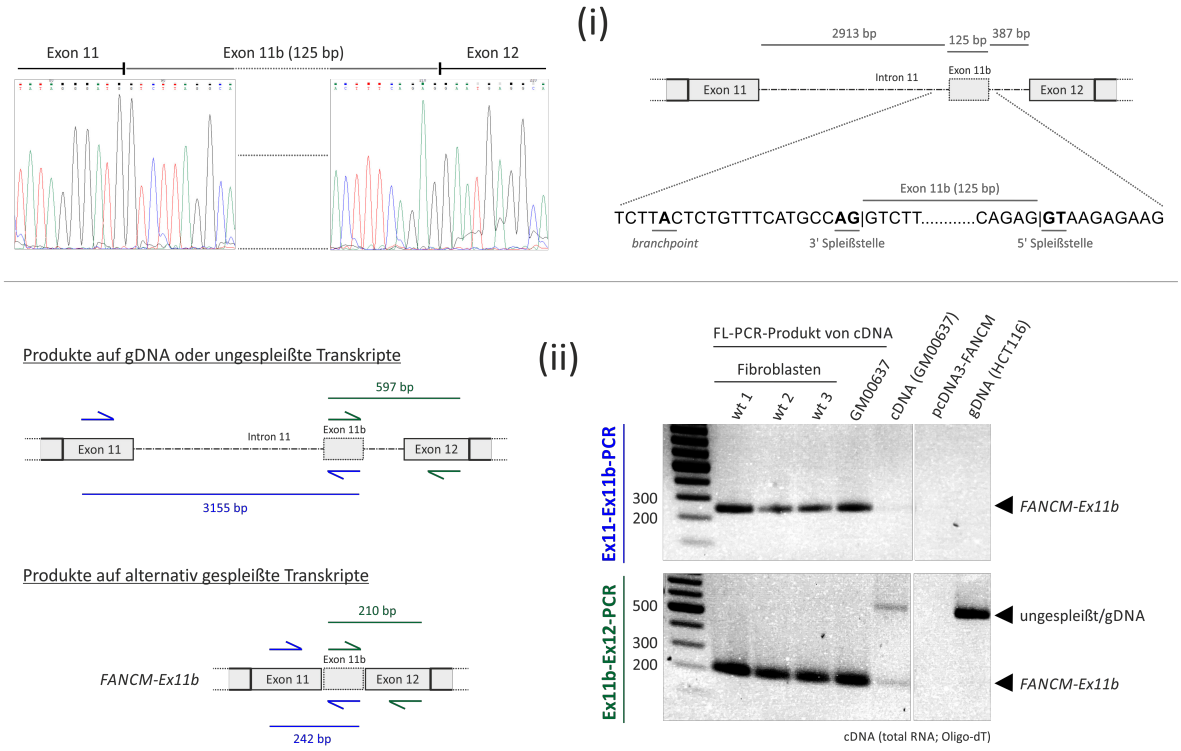


Abbildung 4.11: **Genauere Analyse von *FANCM-Ex11b*. (i)** Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Sequenzierung eines Amplikons mit Exon 11b und schematische Darstellung der Lage von Exon 11b innerhalb von Intron 11. Der Sequenzausschnitt zeigt die Existenz von 3'- und 5'-Spleißstellen und das Adenin des potenziellen *branchpoints*. **(ii)** PCR zum spezifischen Nachweis von *FANCM-Ex11b*. Aus Zellen der angegebenen Zelllinien wurde Total-RNA isoliert, mit *anchored*-Oligo(dT)-Primer in cDNA umgeschrieben (Seite 86) und als *template* für eine *touchdown*-PCR mit den Primern #K172 und #K171 eingesetzt (Seite 86). Die Amplikons wurden mit ExoSAP-IT™ behandelt und als *template* für die links schematisch gezeigten PCRs eingesetzt. Zusätzlich wurde cDNA von GM00637-Zellen direkt als *template* eingesetzt. Das Plasmid pcDNA3-FANCM und genomische DNA (gDNA; Seite 86) dienten als Kontrolle. Die Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Größe der Markerbanden in Basenpaaren (bp). Blau: #K82/#K85; grün: #K86/#K152. Primersequenzen Seite 79f.

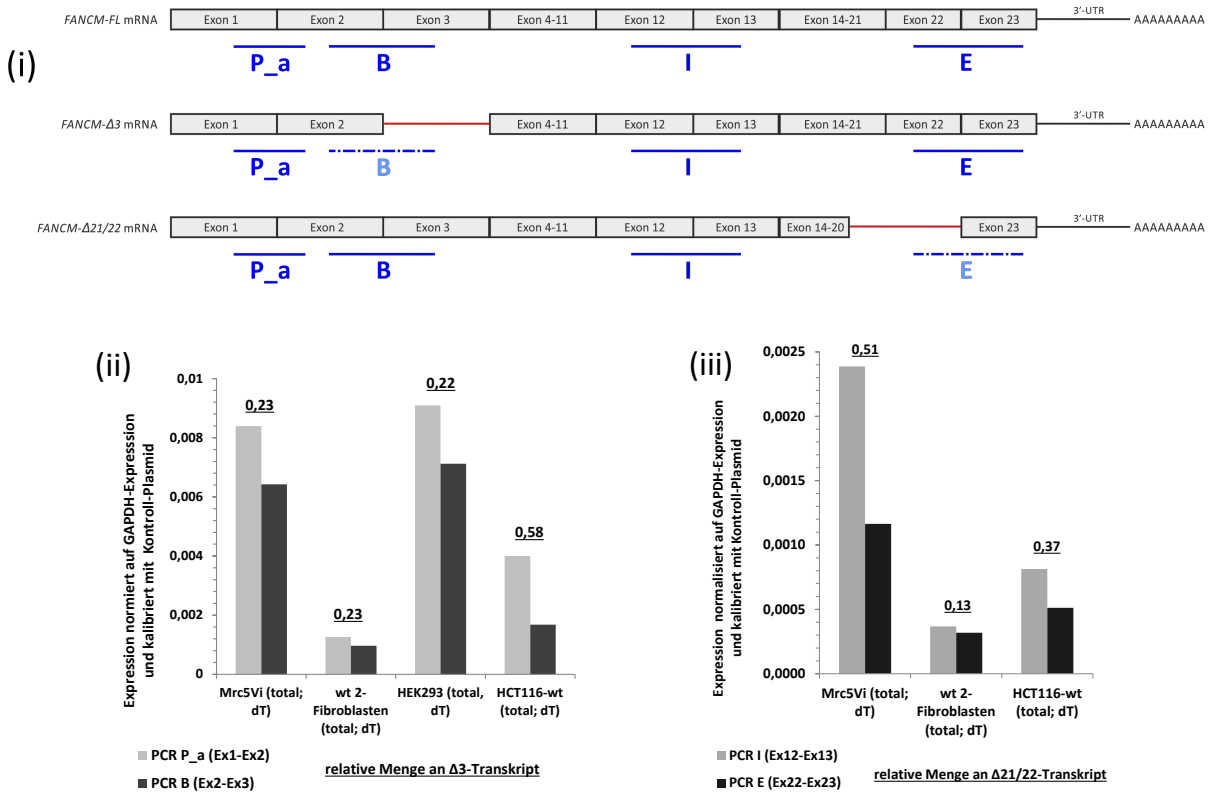


Abbildung 4.12: **Versuch einer spezifischen *real-time*-RT-PCR zur Quantifizierung von *FANCM-Δ3* und *FANCM-Δ21/22*. (i)** Schematische Darstellung der Transkriptvarianten *FANCM-FL*, *FANCM-Δ3* und *FANCM-Δ21/22* mit den vier in der qPCR amplifizierten Bereichen. PCR I und PCR P_a sollten auf alle Transkriptvarianten Produkt liefern. PCR B amplifiziert nur *templates* mit Exon 3 und PCR E nur solche mit Exon 22. Zu beachten ist, dass natürlich auch Varianten vorkommen können, die beide Variationen oder zusätzlich weitere Veränderungen enthalten (nicht gezeigt). **(ii/iii)** Aus Zellen der angegebenen Linien wurde Total-RNA isoliert, mit *anchored*-Oligo(dT)-Primer in cDNA umgeschrieben und als *template* für die qPCR eingesetzt (Seite 86/87). Das Ergebnis der Quantifizierung ist jeweils normiert auf die *GAPDH*-Expression angegeben. Der relative Anteil von Δ3-enthaltenden Transkripten an allen *FANCM*-Transkripten ergibt sich aus 1–(B/P_a), der relative Anteil von Δ21/22-enthaltenden Transkripten an allen Transkripten aus 1–(E/I). Gezeigt sind Daten einer repräsentativen Messung mit Duplikaten. Die Ergebnisse für Δ3 und Δ21/22 stammen aus getrennten Experimenten, weshalb sich die absoluten Zahlen aufgrund von unterschiedlichen Kalibrierungswerten unterscheiden können. Primerpaare für alle PCR-Produkte in Tabelle 2.5 (Seite 87); Primersequenzen Seite 79f.

Der spezifische Nachweis von Varianten mit der Δ3-, Δ5- oder Δ21/22-Variation sollte in der qRT-PCR am besten mit Primern erfolgen, die die in den anderen Transkripten nicht vorhandene Exon-Exon-Grenze überspannen. Da dieser Nachweis im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erfolgen konnte, habe ich aus vorhandenen qRT-PCR-Daten, die im Rahmen der Suche nach *FANCM-669* gesammelt wurden, die Menge an Δ3- bzw. Δ21/22-beinhaltenden Transkripten abzuschätzen versucht (Abbildung 4.12). Sowohl *exon skipping* von Exon 3 als auch von Exon 21/22 scheint in einer relevanten Anzahl von Transkripten aufzutreten. Dabei sind die Anteile alternativ gespleißter Transkripte in den getesteten Wildtyp-Fibroblasten niedriger als in den immortalisierten Zellen, wo bis zu der Hälfte der Transkripte ohne Exon 21/22 detektiert wurden. Da sowohl Δ3 als auch Δ5 und Δ21/22 sowie Kombinationen aus diesen Variationen Transkripte bilden, die keine Substrate des NMD darstellen sollten, wäre eine genauere Analyse der Expression dieser *FANCM*-Spleißvarianten von Interesse.

5 DISKUSSION

5.1 MPH1

5.1.1 PHOSPHORYLIERUNG VON MPH1

Man kann nicht nicht phosphorylieren. So möchte man meinen, lautet der Grundsatz, der beinahe jedem zellulären Regulationsprozess zugrunde liegt. Für die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sind über 46.000 Phosphorylierungsstellen aus Hochdurchsatz- und Einzelanalysen bekannt (LANZ *et al.* 2021), die sich auf ihre etwa 6.000 verschiedenen Proteine verteilen. Das posttranslationale Anhängen von Phosphatresten durch Kinasen und die Abspaltung der Modifikation durch Phosphatasen ist ein universeller Mechanismus zur Weiterleitung von Signalen. Die Phosphorylierung eines Proteins fungiert dabei häufig als Schalter, um Aktivitäten oder Interaktionen an- und auszuschalten. Auch die Proteine der *DNA damage response* liegen häufig hyperphosphoryliert vor (HUANG *et al.* 2016) und werden in Abhängigkeit von DNA-Schäden differenziell von Kinasen des *DNA damage checkpoint* phosphoryliert (*reviewed* in WATERMAN *et al.* 2020).

Auch für Mph1 wurde eine Regulation durch differenzielle Phosphorylierung angenommen (vgl. Seite 99). Im Zuge dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern die postulierten verschiedenen Funktionen von Mph1 bei der fehlerfreien Umgehung replikationsarretierender Läsionen durch Phosphorylierung aufeinander abgestimmt und vom *DNA damage checkpoint* beeinflusst werden. Dazu wurden Stämme mit „Mph1-Phosphorylierungsmutanten“ mit Aminosäureaustauschen zu Alanin bzw. Glutamat an potenziellen Phosphorylierungsstellen hergestellt. Die Aminosäureaustausche bezogen sich auf zwei verschiedene Bereiche, die unabhängig voneinander untersucht wurden:

- fünf [S/T]Q-Motive aufgrund der angenommenen Phosphorylierung durch Mec1 (SCHÜRER 2003)
- T540/S542 aufgrund der Detektion eines entsprechenden Phosphopeptids nach MMS-Behandlung (ALBUQUERQUE *et al.* 2008)

Dabei liegen das vordere SQ-Doppelmotiv (S322/S333) und T540/S542 zwischen den konservierten Motiven der Helikase-Domäne und könnten Einfluss auf die katalytische Aktivität von Mph1 nehmen. Das hintere SQ-Doppelmotiv (S961/S973) liegt am Ende der C-terminalen Domäne von Mph1 und könnte die für diesen Bereich beschriebenen Protein-Protein-Interaktionen beeinflussen (Abbildung 5.1).

Keine der konstruierten Mutanten zeigte in Bezug auf die Sensitivität gegenüber den DNA-schädigenden Agenzien MMS, 4-NQO und Camptothecin sowie bezüglich der spontanen Mutationsrate einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp (Kapitel 3.1.2; Seite 101). Dies wich von zuvor im Labor von W. Kramer durchgeführten Experimenten ab, wo die Sensitivität einiger [S/T]Q-Mutanten bereits zuvor an unabhängig hergestellten Hefestämmen untersucht worden war (Wuttke, unveröffentlicht). Hier hatte eine der Mutanten eine *mph1*Δ entsprechende Sensitivität gezeigt. Vermutlich war diese Beobachtung auf eine

unerkannte zusätzliche Mutation zurückzuführen, die zum Funktionsverlust von Mph1 führte, da der von mir hergestellte Stamm keinerlei erhöhte Sensitivität zeigte.

Die Untersuchung von Schwesterchromatid-Interaktionen mittels Messung induzierter Reversionen des KanKanMX4-Moduls sollte die spezifischere Analyse der Effekte der Mutationen an den potenziellen Phosphorylierungsstellen ermöglichen. Aufgrund systematischer Probleme, die in den Kapiteln 3.2 und 5.1.2 beschrieben sind, fiel diese Möglichkeit leider aus. Selbst wenn sich durch eine Anpassung des Protokolls zur Vermeidung multipler Integrationen Messungen hätten durchführen lassen (was zu diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich war, da das *S. cerevisiae*-Projekt bereits weitgehend beendet war), bestand der Verdacht, dass die Deletion von *MPH1* keine so starke Reduktion der Schwesterchromatid-Interaktionen hervorruft wie angenommen (vgl. Kapitel 3.2.4; Seite 116). Damit entfiel das Argument, dass die KanKanMX4-Methode eine sensitivere Möglichkeit zur Aufdeckung von Unterschieden zwischen den Phosphorylierungsmutanten darstellte.

Ursprünglich sollte die Veränderlichkeit der Phosphorylierung von Mph1 auch *in vivo* unter Einfluss verschiedener DNA-schädigender Agenzien mittels Western Blot und durch massenspektrometrische Analysen untersucht werden. Dies hätte auch zur Entdeckung weiterer Phosphorylierungsstellen führen können. Da aber deren funktionale Analyse wiederum die Konstruktion von Mutanten und deren phänotypische Analyse beinhaltet hätte, dieser Weg schon einmal erfolglos beschritten worden war und etablierte Methoden zur Analyse differenzieller Phänotypen fehlten, wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt. Die biochemische Untersuchung der Aktivität auffälliger Mph1-Varianten sowie die Untersuchung einer möglichen Beeinflussung von Protein-Protein-Interaktionen durch Phosphorylierung entfiel ebenfalls, da keine interessanten Varianten herausgefiltert werden konnten.

Was währenddessen in der Welt geschah

Während der letzten Jahre hat die massenspektrometrische Untersuchung von Phosphopeptiden große Fortschritte gemacht und große Datenressourcen generiert. Die Beurteilung der biologischen Relevanz und die Aufklärung des Wirkmechanismus, durch den eine Phosphorylierung Einfluss auf ein Protein nimmt, sind aber noch immer Gegenstand von Einzelanalysen, die weiterhin auch auf Protein-Varianten mit Aminosäureaustauschen zurückgreifen. Ich möchte im Folgenden kurz auf die Fortschritte eingehen, die bezüglich der Phosphorylierung von Mph1 seit dem Abschluss meiner Experimente gemacht wurden und diskutieren, inwiefern diese den Misserfolg meiner Versuchsreihe erklären können.

Wie in Abbildung 5.1 dargestellt, wurden mindestens elf unterschiedliche Phosphorylierungsstellen beschrieben, wobei drei mit den von mir untersuchten Stellen übereinstimmen. Von den aufgrund der Übereinstimmung mit der Konsensussequenz ausgewählten Mec1/Tel1-[S/T]Q-Motiven tauchte nur S973 in einem groß angelegten Hochdurchsatz-*Phosphoproteomics*-Screen auf (LANZ *et al.* 2021). Weitere Informationen über die Kinase oder besondere Regulierung konnten für diese Position nicht geliefert werden. Sie liegt aber an der ersten Position des dritten der relativ genau beschriebenen Interaktionsmotive für Smc5 (XUE *et al.* 2014), das die Interaktion zwischen Mph1 und dem Smc5/6-Komplex vermittelt, und könnte hierauf einen Einfluss haben. In dem Screen von LANZ *et al.* 2021 wurden

auch Phosphorylierungen an drei Serinen im vorderen Bereich von Mph1 (S9, S27 und S63) sowie an S894 in der C-terminalen Domäne gefunden, deren funktionelle Relevanz aber unklar bleibt. S9 und ein weiteres Serin im C-terminalen Bereich des Proteins (S819) tauchen in den Daten eines *Phosphoproteomics*-Screens von HU *et al.* 2019 auf. Für S819 wird dort interessanterweise eine signifikante Regulation abhängig von TORC1 beschrieben. TORC1 reguliert das Zellwachstum in Abhängigkeit von Nährstoffverfügbarkeit und Stressoren, ist aber beispielsweise auch bei der Regulation der Meiose beteiligt (ZHENG & SCHREIBER 1997, LOEWITH *et al.* 2002). Die biologische Relevanz der Verbindung zu Mph1 wurde aber noch nicht weiter untersucht.

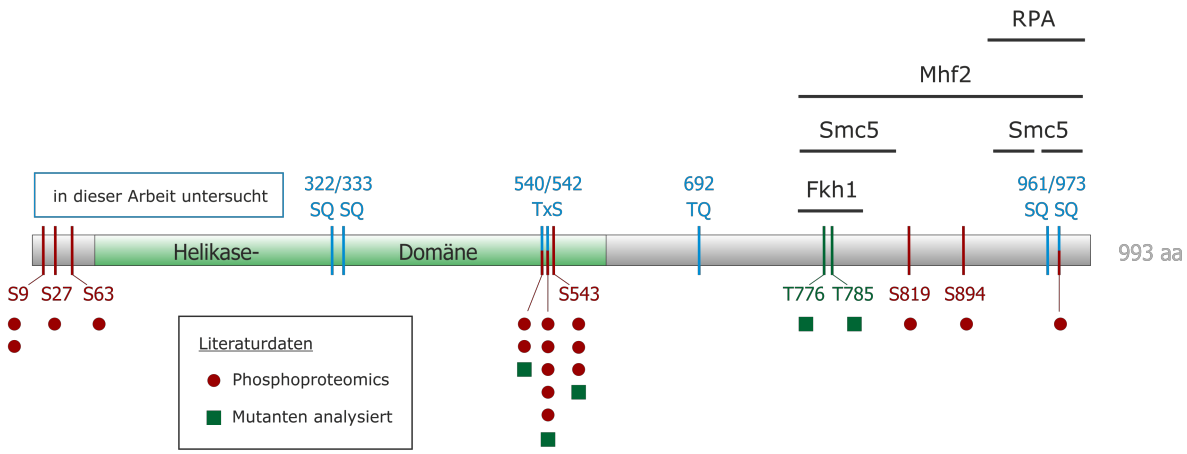


Abbildung 5.1: **Potenzielle und nachgewiesene Phosphorylierungsstellen innerhalb der Proteinstruktur von Mph1.** Die blau markierten Stellen wurden im Rahmen dieser Arbeit anhand von Aminosäureaustausch-Mutanten untersucht. Rote Punkte stehen für Treffer aus einem *Phosphoproteomics*-Screen (ALBUQUERQUE *et al.* 2008, BASTOS DE OLIVEIRA *et al.* 2015, HUANG *et al.* 2016, HU *et al.* 2019, MACGILVRAY *et al.* 2020, LANZ *et al.* 2021), grüne Quadrate für Studien über phänotypische Auffälligkeiten entsprechender Alanin-Mutanten (DUMMER *et al.* 2016, HUANG *et al.* 2016). Schwarze Balken markieren bekannte Protein-Protein-Interaktionsbereiche (BANERJEE *et al.* 2008, CHAVEZ *et al.* 2011, XUE *et al.* 2014, XUE *et al.* 2015a, DUMMER *et al.* 2016).

Nicht nur sind nicht alle in *Phosphoproteomics*-Screens gefundenen Phosphorylierungsstellen biologisch relevant, manche Stellen werden auch in den Screens nicht gefunden, weil sie nur in sehr spezifischen Situationen relevant sind. Dies gilt für die beiden Threonine T776 und T785, deren Phosphorylierung für die Interaktion von Mph1 mit Fkh1 während des *mating type switchings* essenziell ist (DUMMER *et al.* 2016). Interessanterweise interagiert das entsprechende Phosphopeptid spezifisch mit Fkh1 und die Phosphorylierung hat keinen Einfluss auf die Interaktion von Mph1 mit Mhf2, RPA und Smc5 (DUMMER *et al.* 2016). Selbst wenn ich T776 und T785 in meine Untersuchungen mit eingeschlossen hätte, hätte ich keine Informationen bezüglich der Funktion von Mph1 bei der Umgehung von Replikationsarresten gewinnen können, da die Mutante T776A/T785A einen sehr spezifischen Defekt bei der Donorpräferenz während des *mating type switchings* zeigt, aber weder erhöhte MMS-Sensitivität noch eine veränderte Mutationsrate aufweist (DUMMER *et al.* 2016).

Am häufigsten tauchen die auch von mir untersuchten Reste T540 und S542 (manchmal auch S543) in der Literatur auf. Phosphorylierungen dieser Reste wurden nach Behandlung der Zellen mit MMS (ALBUQUERQUE *et al.* 2008, BASTOS DE OLIVEIRA *et al.* 2015, HUANG *et al.* 2016, LANZ *et al.* 2021) oder dem reduzierenden Agens Dithiothreitol (DTT, löst ER-Stress aus; MACGILVRAY *et al.* 2020) gefunden. Besonders

zu beachten ist hier die Studie von HUANG *et al.* 2016, da hier zusätzliche eine Dreifach-Alanin-Mutante (T540A/S542A/S543A) untersucht wurde, die im Gegensatz zu meiner T540A/S542A-Doppelmutante MMS-Sensitivität zeigte. Die Autoren beschreiben eine Reduktion der Kolonienzahl auf 70 % im Vergleich zum Wildtyp auf Medium mit 0,01 % MMS, während *mph1*Δ eine Reduktion auf 5–10 % zeigt. Diese Sensitivität war bei mir für T540A/S542A trotz gleicher MMS-Konzentration nicht sichtbar, obwohl *mph1*Δ sogar einen deutlicheren Wachstumsdefekt zeigt (vgl. Abbildung 3.2; Seite 102). Für diesen Unterschied könnte neben dem unterschiedlichen Stammhintergrund (BY4741 zu CEN.PK2-1C) die zusätzliche S543A-Mutation verantwortlich sein. Unter Umständen hätte aber für die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Varianten auch eine quantitativere Untersuchung der Sensitivität, zum Beispiel durch Messung der Überlebensrate nach Inkubation mit MMS oder 4-NQO feinere Unterschiede aufgedeckt. Die Frage ist allerdings, ob solch winzige Unterschiede, die im *drop dilution assay* nicht sichtbar werden, tatsächlich auf eine biologische Relevanz der jeweiligen Phosphorylierungsstellen hindeuten.

Was würde ich mit dem heutigen Wissenstand tun?

Mit dem aktuellen Wissensstand kämen immer noch einige Positionen von Mph1 – allerdings zumeist andere als im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden – für eine genauere Analyse in Frage, da über die meisten Stellen noch wenig bekannt ist. So konnte für keine der Phosphorylierungsstellen bisher die verantwortliche Kinase identifiziert werden. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass Mph1 ein direktes Substrat von Mec1 oder Tel1 darstellt, da nur eines der [S/T]Q-Motive in den Phosphoproteomics-Screens aufgetaucht ist und für die gefundenen Mph1-Phosphopeptide kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtypzellen und *mec1*Δ *tel1*Δ festgestellt werden konnte (BASTOS DE OLIVEIRA *et al.* 2015, LANZ *et al.* 2021). Für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen bietet DUMMER *et al.* 2016 ein gutes Beispiel, wie anhand von Fluoreszenz-Anisotropie die Bindung zwischen Fkh1 und einem künstlich hergestellten Phosphopeptid untersucht wurde. Proteinvarianten mit Glutamat-Austauschen auf veränderte Bindung zu testen, bietet sich hingegen nicht an, da die Glutamatreste zu unspezifisch die Phosphatgruppe nachbilden, als dass dadurch eine spezifische Interaktion mit dem Bindungspartner zustande kommen würde (DEPHOURE *et al.* 2013).

Erfolgreich konnte eine Regulierung durch Phosphorylierung vor Kurzem für die wie Mph1 an der homologen Rekombination beteiligten Helikase Sgs1 gezeigt werden. Einerseits wurde eine Mec1-abhängige Phosphorylierung beschrieben, die die *D-loop*-auflösende Wirkung verstärkt (SANFORD *et al.* 2021). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Sgs1 zellzyklusspezifisch von Cdc28 (CDK) und Cdc5 (Kinase für mitotischen Exit) phosphoryliert wird und dass diese Modifikation die Helikase-Aktivität und die Prozessivität des Enzyms verstärkt (GRIGAITIS *et al.* 2020). Dies zeigt, dass unsere Experimente grundsätzlich von den richtigen Annahmen ausgegangen sind. Nur nicht von den richtigen Phosphorylierungsstellen.

5.1.2 DIE REVERSIONEN IN DER REVISION

Mit dem KanKanMX4-System lag ein von C. Rudolph im Labor von W. Kramer entwickelter *assay* zur Messung von Schwesterchromatid-Interaktionen vor, der auf der Reversion einer künstlich eingeführten, direkten Sequenzwiederholung innerhalb des KanMX4-Markergens beruht (vgl. Kapitel 3.2.1; Seite 104ff; RUDOLPH 2003). Die Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien führt zu einem dosisabhängigen Anstieg der Reversionsfrequenz („induzierte Reversionen"; EDE *et al.* 2011). Für *mph1*Δ war im Vergleich zum Wildtyp eine starke Reduktion der induzierten Reversionsfrequenz beschrieben worden (EDE *et al.* 2011). Aufgrund dieses spezifischen Phänotyps sollte das KanKanMX4-System im Rahmen dieser Arbeit als sensitive Methode zur Untersuchung der Mph1-Phosphorylierungsmutanten genutzt werden. Aminosäureaustausche, die die Aktivität von Mph1 am *D-loop* beeinflussen, sollten durch eine veränderte induzierte Reversionsfrequenz auffallen. Das KanKanMX4-Modul wurde im Vorfeld der Messung durch Transformation der zu untersuchenden Hefestämme mit einem integrativen Plasmid am chromosomalen *URA3*-Lokus der zu testenden Stämme integriert (vgl. Abbildung 3.6; Seite 106).

Im Zuge der Experimente zeigte sich allerdings eine zuvor bereits mindestens einmal beschriebene und mehrmals aufgetretene Diskrepanz zwischen den Kurvenverläufen unabhängiger Transformanten (EDE 2009; Wuttke, unveröffentlicht; W. Kramer, persönliche Kommunikation). Durch die systematische Generierung unabhängiger KanKanMX4-Transformanten und deren parallele Analyse bezüglich der spontanen und induzierten Reversionen des KanKanMX4-Moduls konnte ich eine deutliche Korrelation zwischen der Höhe der spontanen Reversionsraten und der Höhe des Kurvenverlaufs der induzierten Reversionsfrequenzen feststellen. Der gleiche Zusammenhang bestand auch bei der Integration des KanKanMX4-Konstruktes am *LEU2*-Lokus, was einen lokusspezifischen Effekt am *URA3*-Lokus ausschloss. Zudem waren in beiden Fällen die gemessenen Unterschiede in Nachkommen der Transformanten stabil. Es handelte sich also um definierte, vererbbare Unterschiede, die ab dem Zeitpunkt der Transformation festgelegt zu sein schienen.

Erst zu einem späteren Zeitpunkt entstand aufgrund der Wiederentdeckung alter Publikationen die Hypothese, dass es bei der Plasmid-Integration über homologe Rekombination zu multiplen Insertionen am Ziellokus gekommen war. J. Szostak und T. Orr-Weaver hatten wiederholt beobachtet, dass in 50 % der Transformanten zwei bis fünf Kopien der in die Zellen eingebrachten Plasmide als Tandem integrieren (SZOSTAK & WU 1979, ORR-WEAVER *et al.* 1981, ORR-WEAVER & SZOSTAK 1983). Mit Hilfe quantitativer *real time*-PCR konnte ich zeigen, dass auch ein Großteil meiner unabhängigen Transformanten sowie mindestens ein für frühere Untersuchungen verwendeter Wildtyp-Stamm [wt (E)] multiple Integrationen des KanKanMX4-Plasmids im Genom trugen. Die Anzahl der Integrate und damit der KanKanMX4-Kopien korrelierte dabei mit der Höhe der spontanen und induzierten Reversionen, weshalb sie als Ursache der festgestellten Unterschiede anzunehmen sind. Es handelte sich also nie um ein Problem der Varianz zwischen genetisch identischen Stämmen, sondern das Problem bestand von Anfang an darin, dass sich die Transformanten durch eine unterschiedliche Anzahl integrierter Plasmide genetisch voneinander unterschieden. Das Vorhandensein mehrerer KanKanMX4-Module erhöht unbemerkt die Anzahl der Revertanten, was im *assay* als erhöhte Reversionsfrequenz sichtbar wird und als verstärkte Interaktion

zwischen Schwesterchromatiden gedeutet wird. Problematisch wird es, wenn zwei oder mehr Stämme verglichen werden, die unterschiedlich viele KanKanMX4-Integrationen tragen, da hier der *readout* des *assays* nicht mehr nur auf den zu untersuchenden genetischen Unterschied (z.B. eine *MPH1*-Deletion) zurückzuführen ist, sondern in unbekanntem Ausmaß auf den Unterschied in der Anzahl der Reporterkonstrukte. Dies kann zu Fehlinterpretationen und in der Folge zu falschen Annahmen bezüglich der untersuchten Gene führen. Abbildung 3.8 (Seite 109) zeigt deutlich ein Beispiel, wie sich bei nur einer zufällig ausgesuchten Transformante pro Stammhintergrund jede mögliche relative Beziehung der drei zu vergleichenden Stämmen ergeben kann.

Ich möchte im Folgenden auf einige Fragen eingehen, die sich aus diesen Befunden ergeben:

- Ist das KanKanMX4-System als Methode zur Messung von Schwesterchromatid-Interaktionen noch zu retten?
- Was bedeuten die Ergebnisse für andere (in dieser Arbeit) verwendete Methoden, die auf der Integration von Konstrukten in das Genom von *S. cerevisiae* durch homologe Rekombination beruhen?
- Was bedeuten die Ergebnisse für die Interpretation mit dem KanKanMX4-System gewonnener Daten?

Mit welchen Anpassungen könnte das KanKanMX4-Modul weiterhin zur Messung von Schwesterchromatid-Interaktionen dienen?

Am einfachsten wäre es natürlich, die schon vorhandenen Daten im Nachhinein „mathematisch retten“ zu können. Trotz der Korrelation zwischen der Anzahl der Integrationen und der spontanen Reversionsrate ist es aber nicht möglich, die Werte der Reversionsfrequenzen unabhängiger Transformanten desselben Ausgangsstammes durch einfache Division durch die Anzahl der KanKanMX4-Module zur Deckung zu bringen. Der Zusammenhang ist nicht exakt linear, was vermutlich auf eine gegenseitige Beeinflussung der Module, vor allem bei hoher Schadensdichte, zurückzuführen ist. Durch die multiple Insertion wird die Region insgesamt repetitiv, was die Replikation und auch die Reaktion auf Replikationsprobleme beeinflussen kann. Daher sollten nur Stämme mit identischer KanKanMX4-Kopienzahl bezüglich der Stärke der Schwesterchromatid-Interaktionen miteinander verglichen werden. Idealerweise sollte natürlich – wie ursprünglich geplant – nur eine Kopie des Moduls pro Stamm vorhanden sein.

Vorhandene oder neu erstellte Transformanten anhand der geringsten spontanen Reversionsrate auszusuchen, ist nicht zu empfehlen, da einerseits nicht sichergestellt ist, dass eine Transformante mit einer einzigen Integration darunter ist und andererseits ein Unterschied in der spontanen Reversionsrate einen Phänotyp darstellen kann. Der Verzicht auf eine Vereinzelung nach der Transformation garantiert aufgrund zumeist geringer und wechselnder Ausbeute der Integration keine im Mittel gleiche Kopienzahl. Zudem könnte es bei Verwendung von Deletionsmutanten von Genen der homologen Rekombination zu Unterschieden in der Anzahl der Integrationen kommen, die dann im Folgenden die Reversionswerte verfälschen. Eine Möglichkeit, die Wahrscheinlichkeit multipler Integrationen zu verringern, ist die Reduktion der für die Transformation eingesetzten DNA-Menge (PLESSIS & DUJON 1993). Diese Möglichkeit

reduziert aber nur die Wahrscheinlichkeit multipler Integration und eliminiert diese nicht. Die Stämme müssten zur Sicherheit zusätzlich mittels Southern Blot oder der hier verwendeten qPCR auf die Anzahl der Integrationen untersucht werden.

Wäre es angesichts der Probleme mit der chromosomalen Integration besser, zu dem ursprünglich verwendeten, episomalen System mit dem Centromerplasmid pRS316-KanKanMX4 (vgl. Abbildung 3.6-iii; Seite 106; RUDOLPH 2003) zurückzukehren? Da nur wenige Klone eine erhöhte Plasmid-Kopienzahl zeigen (vgl. Abbildung 3.14; Seite 116), sollten bei Verzicht auf eine Vereinzelung nach der Transformation vergleichbare KanKanMX4-Dosen vorliegen. Das Hauptargument gegen das episomale System ist hier, dass unklar ist, inwiefern Chromatinveränderungen, die Verbindung der Schwesterchromatide durch Kohäsine und der Umgang mit Replikationsarresten bei Untersuchung an einem nur 6704 bp großen, zirkulären Plasmid korrekt abgebildet werden können. Wie in Kapitel 1.2.2.4 (Seite 17) beschrieben, sind diese Vorgänge komplex und bedürfen einer genauen Abstimmung, bei der viele regulative Mechanismen ineinandergreifen. Gerade bezüglich der Frage nach einer möglichen Regulation von Mph1 durch Phosphorylierung ist es essenziell, diese Prozesse in einem möglichst natürlichen Kontext zu untersuchen, wo alle Faktoren zusammenwirken können. So wird Mph1 beispielsweise durch den Kohäsin-ähnlichen Komplex Smc5/6 reguliert (XUE *et al.* 2014, ZAPATKA *et al.* 2019) und Kohäsine sind entscheidend für den korrekten Ablauf des *template switchings* beim *gap filling* (FUMASONI *et al.* 2015). Auf einem zirkulären Plasmid erreicht auch die zweite Replikationsgabel vergleichsweise schnell die arretierte Replikationsgabel, sodass auch der Zeitraum, in dem normalerweise Schadenstoleranzmechanismen greifen, verändert ist. Analog hierzu konnte bei der Erforschung der ICL-Reparatur das *traversal* des Replisoms nur im Chromosom und nicht am etablierten *Xenopus*-Plasmid-System beobachtet werden (vgl. Kapitel 1.2.4.2; Seite 23ff; HUANG *et al.* 2013, ZHANG *et al.* 2015). Dass das episomale KanKanMX4-Modul nicht die chromosomale Situation abbilden kann, zeigen auch die um den Faktor zehn höheren spontanen Reversionsraten im Vergleich zum integrierten Konstrukt (vgl. Tabelle 3.1, Tabelle 3.2 und Tabelle 3.3; Seiten 102ff). Dies könnte für eine geringere Unterdrückung der homologen Rekombination im Zuge der Replikation sprechen. Es wäre demnach möglich gewesen, die Mph1-Phosphorylierungsmutanten mit dem episomalen KanKanMX4-System zu untersuchen, die Ergebnisse hätten aber aufgrund der nicht die chromosomalen Verhältnisse abbildenden Regulationsmechanismen eine nur begrenzte Aussagekraft gehabt. Die chromosomale Integration des KanKanMX4-Konstruktes ist also notwendig.

Mit den vorhandenen YIplac-Vektoren könnten alle genetischen Manipulationen ausgehend von einem geprüften Wildtyp-Stamm mit nur einer KanKanMX4-Integration vorgenommen werden. Allerdings müssten dann alle Stämme regelmäßig auf spontane Reversionen und den Verlust des Moduls überprüft werden. Aufgrund der Verdopplung des chromosomalen Markerlokus im Zuge der Integration (Abbildung 5.2-i) kann es zu einem spontanen *snapout* unter Verlust des KanKanMX4-Moduls kommen (vgl. *gene replacement*; Abbildung 2.7; Seite 66). Dabei handelt es sich zwar um ein sehr seltenes Ereignis, wie auch die Stabilität der Tandems nach Vereinzelung zeigt (vgl. Abbildung 3.12-ii; Seite 114), aber bei der Kultivierung über einen längeren Zeitraum könnte dieses Problem relevant werden.

Eine Möglichkeit, sowohl die Gefahr des spontanen *snapouts* als auch die multiple Integration zu vermeiden, stellt die Verwendung eines alternativen Konstruktes dar. Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten, ein DNA-Stück über homologe Rekombination in das Genom einzuschleusen (Abbildung 5.2). Bei klassischen integrativen Vektoren wie der YIplac-Reihe (GIETZ & SUGINO 1988) wird das Plasmid innerhalb des zum Integrationslokus homologen Bereichs geschnitten, was zur vollständigen Integration ohne Verlust chromosomalen Materials führt. Anschließend liegt der homologe Bereich im Genom verdoppelt vor und der nicht-homologe Bereich des Plasmids wurde dazwischen integriert. Wird das zu integrierende Konstrukt stattdessen zwischen die homologen Bereiche gesetzt (Abbildung 5.2-ii), kommt es beim *crossover* zu einem Austausch genomischen Materials gegen das Konstrukt. Eine vergleichbare Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit beispielsweise bei der PCR-basierten Deletion (Seite 62) und dem PCR-basierten *tagging* (Seite 63) angewendet. Da es hier nicht zu einer Reversion des Prototrophiemarkers kommt, muss zusätzlich ein Resistenzmarker im Konstrukt enthalten sein, um Zellen mit Integration selektieren zu können. Ein solches Konstrukt könnte auch für das KanKanMX4-Modul mittels PCR hergestellt werden. Eine sicherere Alternative bietet aber die Klonierung in einen Vektor, aus dem das in Abbildung 5.2-ii gezeigte Konstrukt durch Restriktionsverdau herausgeschnitten werden kann (z.B. TAXIS & KNOP 2006). Mit dieser Anpassung sollte das KanKanMX4-Konstrukt eine geeignete Methode zur Messung von Schwesterchromatid-Interaktionen darstellen.

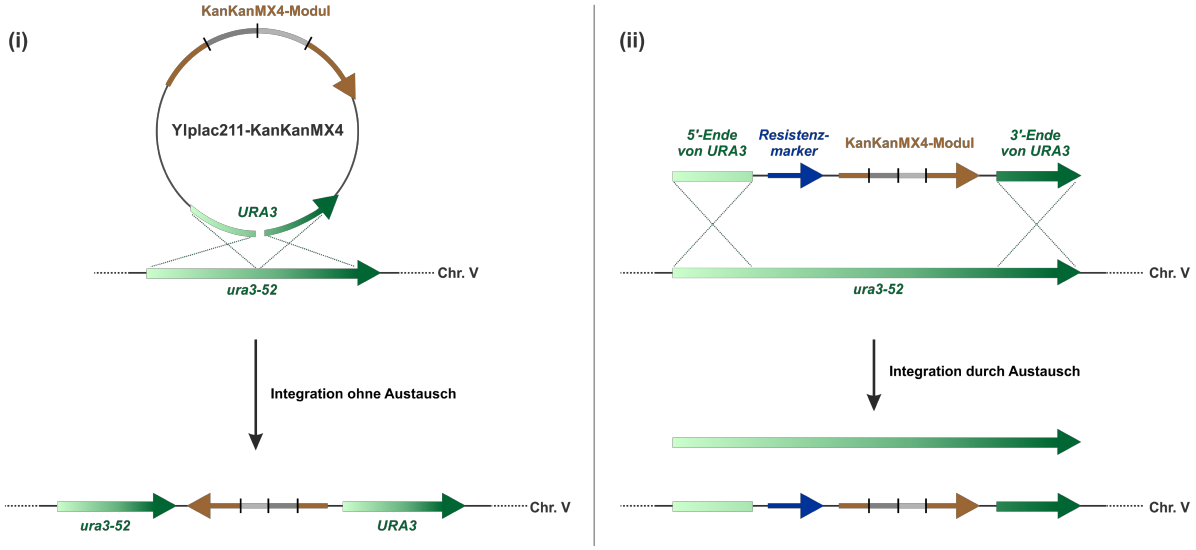


Abbildung 5.2: **Zwei Möglichkeiten zur chromosomalen Integration durch homologe Rekombination. (i)** Bei integrativen Derivaten von YIplac211 und YIplac128 erfolgt bei einem *crossover* die Integration des Plasmids in das Chromosom, wobei kein chromosomales Fragment entfernt wird und es zu einer Verdopplung des Integrationslokus (hier des *URA3*-Allels) kommt. Es kann zu multiplen Integrationen kommen, indem z. B. ein weiteres Plasmid mit einem der *URA3*-Allele rekombiniert. **(ii)** Liegt das zu integrierende Fragment im für die Transformation eingesetzten Konstrukt zwischen zum Ziellokus homologen Bereichen, kommt es bei einem *crossover* zum Austausch gegen das chromosomale Fragment zwischen den homologen Flanken. Eine multiple Integration ist unwahrscheinlich, da bei einer erneuten Rekombinationsrunde lediglich ein weiterer Austausch stattfinden würde.

Auswirkungen auf andere Methoden

Die Integration des KanKanMX4-Moduls war nicht die einzige auf homologer Rekombination beruhende genetische Manipulation von *S. cerevisiae*, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde. Inwiefern spielen möglicherweise auch bei den anderen Methoden multiple Integrationen eine Rolle?

Die bereits erwähnte PCR-basierte Gendeletion (Seite 62) und das PCR-basierte *tagging* (Seite 63) beruhen auf dem in Abbildung 5.2-ii gezeigten Mechanismus, bei dem nicht die Gefahr einer Tandem-Integration besteht. Das *gene replacement* (Seite 65) beruht allerdings auf einer vollständigen Integration des Plasmids (Abbildung 5.2-i), bei der es zu mehrfacher Integration kommen kann. In diesem Fall beeinflusst eine Tandem-Integration aber nicht die Wirksamkeit der Methode, da im zweiten Schritt auf Zellen mit spontanem *snapout* selektiert wird. Nur wenn der *snapout* zwischen den äußersten Kopien des Allels stattgefunden hat, sind alle Kopien des *URA3*-Markers aus dem Genom verschwunden und die Zellen resistent gegen 5-FOA.

Im Allgemeinen stellt eine multiple Integration nur dann ein Problem dar, wenn die integrierte DNA in einem *assay* für einen quantitativen *readout* verwendet wird. Teilweise werden hohe Gendosen auch gezielt gefördert, wenn zum Beispiel in der Biotechnologie große Mengen eines Proteins (heterolog) in Hefezellen produziert werden sollen (LOPES *et al.* 1991). In den meisten anderen Fällen bleibt zu hoffen, dass die Experimentatoren sich im Gegensatz zu uns des Problems der multiplen Integration bewusst waren und entsprechende Vorkehrungen getroffen haben.

An dieser Stelle stellt sich die Frage, warum dies hier nicht das Fall gewesen ist. Im Nachhinein stellt sich die Situation völlig klar und vor allem vermeidbar dar. Dazu bleibt nur zu sagen, dass ich nicht einschätzen kann, wie verbreitet das Wissen um dieses Problem ist. Aber mir und auch allen Beteiligten war es bis zum endgültigen Nachweis nicht bewusst. Daraus folgt für mich nur der dringende Appell, bei Übernahme eines Projektes auch etablierte Methoden grundsätzlich zu hinterfragen. Dies ist natürlich gerade dann schwierig, wenn man sich gleichzeitig auf ein neues Forschungsgebiet bewegt. Aber nur so kann sichergestellt werden, dass am Ende im Sinne der Fragestellung interpretierbare Ergebnisse vorhanden sind.

Auswirkungen auf mit dem KanKanMX4-Modul gewonnene Daten

Wie in Kapitel 3.2.4 (Seite 116) ausgeführt, ist anzunehmen, dass die für die *MPH1*-Deletionsmutante anhand des KanKanMX4-Moduls beobachtete Reduktion der 4-NQO-induzierten Reversionen auf durchschnittlich 10 % im Vergleich zum Wildtyp (EDE *et al.* 2011) zumindest teilweise auf eine unterschiedliche Kopienzahl des KanKanMX4-Konstruktes in den untersuchten Stämmen zurückzuführen ist. Ich konnte beim Vergleich von Wildtyp und *mph1*Δ mit jeweils zwei Kopien des KanKanMX4-Moduls lediglich eine Reduktion auf durchschnittlich 72 % feststellen. Bei der spontanen Reversionsrate zeigte *mph1*Δ bei gleicher Reporterdosis keine Veränderung zum Wildtyp. Da auch die Komplementation des Phänotyps nur bei den Transformanten mit identischer Kopienzahl des Reporters möglich war (vgl. Abbildung 3.16; Seite 118), verringert das Fehlen von Mph1 Schwesterchromatid-Interaktionen nach Behandlung mit 4-NQO offenbar in geringerem Maße als bisher angenommen. Interessant wäre die

Überprüfung der durch MMS und Camptothecin induzierten Reversionsfrequenzen, bei denen die *MPH1*-Deletionsmutante bei EDE *et al.* 2011 eine geringere Reduktion zeigte als nach Behandlung mit 4-NQO. Möglicherweise läge hier bei der Überprüfung keine Reduktion vor. Dies konnte aber leider nicht mehr getestet werden.

Die zusätzlich zu *mph1*Δ von EDE *et al.* 2011 mit Hilfe des KanKanMX4-Moduls untersuchten Deletionsmutanten *rad51*Δ, *rad52*Δ, *rad30*Δ und *rev3*Δ wurden ausgehend von einem bereits den Reporter enthaltenden Wildtyp-Stamm hergestellt, weshalb der jeweils beschriebene Phänotyp nicht in Zweifel gezogen werden muss. Lediglich die zusätzliche Reduktion induzierter Reversionsereignisse in der Doppelmutante *mph1*Δ *rad51*Δ verglichen mit *rad51*Δ könnte erneut auf eine unterschiedliche Anzahl des Reporterkonstrukts zurückzuführen sein, da die Doppelmutante ausgehend von *mph1*Δ konstruiert wurde, welches unabhängig mit dem KanKanMX4-Modul transformiert worden war. *rad51*Δ wäre demnach vermutlich, wie ursprünglich erwartet, epistatisch zu *mph1*Δ bezüglich der Schwesterchromatid-Interaktionen. Passend zur Epistasis bezüglich der Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien und bezüglich des spontanen Mutatorphänotyps (SCHÜRER *et al.* 2004) würde dies bedeuten, dass alle Mph1-abhängigen Reversionen auch von Rad51 abhängen, was zu dessen essenzieller Funktion bei der Generierung von *D-loops* im Rahmen der homologen Rekombination passt.

Für andere, teils unveröffentlichte, mit dem KanKanMX4-System gewonnene Daten lässt sich nicht mehr im Einzelnen nachvollziehen, welche Stämme unabhängig mit dem Reporter transformiert wurden. Zur Sicherheit wäre hier, vor allem bei nur geringen Unterschieden, eine Überprüfung des Phänotyps mit einem angepassten Konstrukt (vgl. Abbildung 5.2-ii) angeraten.

5.1.3 MPH1 SCHEINT IN DER S-PHASE ENTBEHRLICH ZU SEIN

Wie in der Einleitung und in Kapitel 3.3.1 (Seite 119) erläutert wurde, herrscht mittlerweile die anerkannte Meinung, dass die Schadenstoleranzprozesse der postreplikativen Reparatur (PRR) entsprechend ihrer ursprünglichen Namensgebung nicht direkt an, sondern hinter der Replikationsgabel arbeiten. Der Arrest der Replikationsgabel wird in den meisten Fällen durch *repriming* aufgehoben, das Replisom kann reassemblieren und die Replikation in normaler Geschwindigkeit fortsetzen. Die zurückbleibenden Einzelstranglücken sind die eigentlichen Substrate der PRR und können fehlerfrei mittels Schwesterchromatid-Interaktion oder fehlerbehaftet mit Hilfe von Transläsionspolymerasen geschlossen werden (Abbildung 5.3; BRANZEI & SZAKAL 2016a). Unter anderem durch KARRAS & JENTSCH 2010 wurde gezeigt, dass diese sogenannte *gap repair* nicht nur postreplikativ in dem Sinne sein kann, dass sie örtlich von der Replikationsgabel getrennt abläuft, sondern sogar postreplikativ im Sinne von „erst in der G2-Phase“ normales Zellüberleben sichern kann. Diese Verschiebbarkeit zeigten die Autoren durch Anhängen eines sogenannten G2-*Tags* an Proteine der PRR. Das G2-*Tag* kombiniert den *CLB2*-Promotor mit einer N-terminalen Fusion der ersten 180 Aminosäuren von Clb2. Dies bewirkt transkriptionelle Induktion zu Beginn der G2-Phase und proteasomalen Abbau am Ende der M-Phase. G2-*getaggte* Proteine treten in der Zelle daher nur in der G2/M-Phase auf und fehlen in der S-Phase (vgl. Seite 119).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Auswirkung des *G2-MPH1*-Allels, also einer Restriktion der Expression von *MPH1* in die G2/M-Phase getestet. Hintergrund war die Hypothese, dass *G2-MPH1* keine normale Schadenstoleranz ermöglichen dürfte, falls Mph1 eine für das Zellüberleben essenzielle Rolle an der Replikationsgabel spielt, z.B. durch *fork regression* zur Stabilisierung der Replikationsgabel oder bei der Reparatur kollabierter Replikationsgabeln durch Stranginvasion und *break induced replication*. Beide Prozesse sind konzeptionell nur schwer von der Replikationsgabel zu trennen.

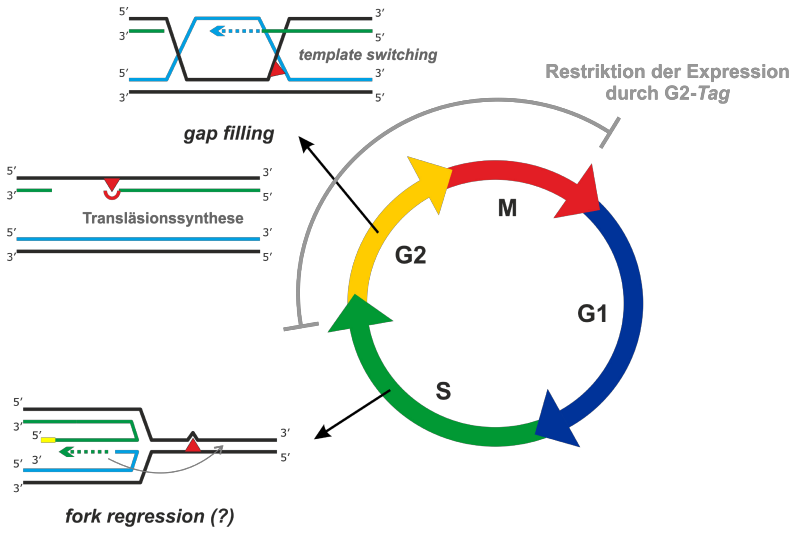


Abbildung 5.3: **Möglicher Ablauf der Schadenstoleranz relativ zum Zellzyklus.** Während die Prozesse des *gap fillings* zum Schließen von Einzelstranglücken nach Replikationsarresten sowohl theoretisch als auch experimentell gezeigt ohne Funktionsverlust in die G2-Phase verschiebbar sind, erscheinen Prozesse, die direkt an der Replikationsgabel ablaufen, wie *fork regression*, konzeptionell mit der S-Phase verbunden zu sein. Die Expression eines Proteins mit G2-*Tag* kann experimentell dabei helfen, die zellzyklusphasenspezifischen Aufgaben von Schadenstoleranzfaktoren zu untersuchen.

Zusammenfassend zeigten die im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Daten, dass die Restriktion der Expression von *MPH1* in die G2/M-Phase keine Auswirkungen auf die Sensitivität der Zellen gegenüber DNA-schädigenden Agenzien und keine Auswirkung auf die spontane Mutationsrate hat (vgl. Abbildung 3.18; Seite 122 und Tabelle 3.5; Seite 123). Dies entspricht den Ergebnissen von KARRAS & JENTSCH 2010 für die von ihnen getesteten PRR-Faktoren. Auch eine *G2-MPH1 G2-RAD5* Doppelmutante zeigte keine vom Wildtyp abweichende Sensitivität (vgl. Abbildung 3.19; Seite 123). Rad5, welches wie Mph1 *in vitro fork regression* katalysieren kann (BLASTYÁK *et al.* 2007, ZHENG *et al.* 2011), übernimmt also nicht diese Funktion für Mph1 während der S-Phase.

Noch interessanter ist die Beobachtung bei Kombination des *G2-MPH1*-Allels mit *pso2*Δ, dem zentralen ICL-Reparaturprotein der Hefe. Im *pso2*Δ-Hintergrund war für *mph1*Δ eine starke Erhöhung der *crosslinker*-Sensitivität beschrieben worden, obwohl *mph1*Δ allein nicht sensitiver als der Wildtyp ist (WARD *et al.* 2012b). Postuliert wurde, dass Mph1 die am ICL arretierte Replikationsgabel schützt, bis Proteine rekrutiert werden, die die Pso2-Funktion übernehmen können. Dieser „prototypische FA-Weg“ ist aber nur in Mutanten ohne die normale Pso2-ICL-Reparatur relevant (DAEE *et al.* 2012, WARD *et al.* 2012b). Wenn die Hauptfunktion von Mph1 im *pso2*Δ-Hintergrund der Schutz ICL-arretierter Replikationsgabeln wäre, sollte *G2-MPH1* in *pso2*Δ-Zellen zu deutlich mehr toxischen Intermediaten und damit erhöhter Sensitivität

führen. Während aber die Doppelmutante *mph1*Δ *pso2*Δ den von WARD *et al.* beschriebenen synergistischen Effekt aufwies, zeigte *G2-MPH1 pso2*Δ überraschenderweise die gleiche Sensitivität wie die *pso2*Δ-Einzelmutante (vgl. Abbildung 3.23; Seite 127).

G2-MPH1 vermittelt also in allen getesteten genetischen Hintergründen normales Überleben und zeigt keine Erhöhung der Mutationsrate. Mph1 kann seine Funktion anscheinend trotz Fehlens während der S-Phase ordnungsgemäß erfüllen. Dafür gibt es verschiedene Erklärungsansätze:

(i) Eine andere Helikase übernimmt die Funktion von Mph1 (für Rad5 ausgeschlossen) bei der *fork regression*. Das könnte diese Helikase allerdings auch in *mph1*Δ. Möglicherweise entstehen nach der Stabilisierung der Replikationsgabel und der Wiederaufnahme der Replikation Einzelstranglücken, an deren Schließung Mph1 dann in der G2-Phase beteiligt ist. Dies würde bedeuten, dass die toxischen Intermediate nicht die arretierten Replikationsgabeln sind, sondern die bis in die G2-Phase zurückbleibenden Lücken, falls das *gap filling* nicht schon in der S-Phase ordnungsgemäß funktioniert. In diesem Zusammenhang wurde erst kürzlich postuliert, dass die toxischen Intermediate in BRCA-defizienten Tumoren nicht Doppelstrangbrüche und arretierte Replikationsgabeln sind, sondern unreparierte Einzelstranglücken aufgrund unkoordinierter Replikation und defektem *gap filling* (PANZARINO *et al.* 2021). Die für das Überleben der Zellen wichtige Funktion von Mph1 wäre demnach beim *gap filling*, während es an der Replikationsgabel ersetzbar ist.

(ii) Wie bereits ausgeführt, ist *fork regression* vor allem während der S-Phase vorstellbar, da hier der Großteil er Replikation abläuft. In der späten S-Phase und frühen G2-Phase existieren nur noch wenige Replikationsgabeln in spät replizierenden Regionen. Vielleicht ist aber die Stabilisierung der Replikationsgabel in der Hefe nicht so wichtig wie angenommen. Die arretierte Gabel könnte bis in die späte S-Phase existieren (ähnlich Replikationsgabeln später *origins of replication*) und kann dann unter Beteiligung von Mph1 verspätet prozessiert werden. Das würde bedeuten, dass die Gefahr des Auseinanderbrechens der Replikationsgabel kleiner ist als gedacht und möglicherweise erst in der G2-Phase relevant wird.

(iii) Mph1 hat eine andere als die postulierte Funktion bei der *backup*-ICL-Reparatur bzw. generell keine Funktion, in der *fork regression* für die Zelle essenziell ist.

Alle diese Überlegungen sind unter Vorbehalt aufgrund des fehlenden Nachweises der definierten Expression von *G2-MPH1* mittels Western Blot. Allerdings ist es ausgeschlossen, dass das Fusionsprotein nicht produziert wird, da es in unsynchronisierten Zellen detektiert wurde (nicht gezeigt). Bei Fehlen des Proteins müsste zudem der Phänotyp der Deletionsmutante auftreten, was nicht der Fall war. Dass der Promotor nicht korrekt funktioniert, ist praktisch ausgeschlossen, da das G2-*Tagging* für unzählige Proteine bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen erfolgreich getestet wurde und hier die Expression auch nachvollzogen wurde (KARRAS & JENTSCH 2010, GONZALEZ-HUICI *et al.* 2014, MENOLFI *et al.* 2015, RENAUD-YOUNG *et al.* 2015, HUNG *et al.* 2017, LAFUENTE-BARQUERO *et al.* 2017, BITTMANN *et al.* 2020). Eine andere Gefahr wäre, dass das Clb2-*Tag* (teilweise) abgespalten wird und das Restprotein nicht mehr dem proteasomalen Abbau unterliegt. Das erscheint zum einen unwahrscheinlich, zum anderen wird dies bei

KARRAS & JENTSCH 2010 ebenfalls nicht adressiert, da die Detektion des Fusionsproteins mit einem Clb2-Antikörper erfolgt, gespaltenes Protein also nicht detektiert würde. Es ist daher davon auszugehen, dass die Restriktion auf G2/M korrekt bzw. in gleicher Güte wie in den genannten Publikationen funktioniert hat.

Eine mögliche Weiterentwicklung, vorbehaltlich des Nachweises der Restriktion der Expression, wäre ein groß angelegter Screen, in dem nach genetischen Interaktionen des *G2-MPH1*-Allels gesucht wird. Hierzu würde ein *G2-MPH1*-Stamm mit einer existierenden Bibliothek aller Deletionsmutanten nicht-essenzieller Hefe-Gene gekreuzt werden. Auf diese Art könnten interessante Interaktionspartner gefunden werden, die mit Mph1 bei seinen verschiedenen Funktionen zusammenarbeiten.

5.1.4 ZUR FUNKTION VON MPH1

Für Mph1 wurde bereits früh eine Beteiligung an einem Rad51-abhängigen Weg der fehlerfreien Schadenstoleranz unabhängig von der *RAD18*/*RAD6*-abhängigen PRR postuliert (SCHÜRER *et al.* 2004). Es wurde vermutet, dass die *D-loop*-auflösende Wirkung hier eine Rolle spielt. Aus der beobachteten starken Reduktion der Schwesterchromatid-Interaktionen und dem Mutatorphänotyp wurde zudem geschlossen, dass Mph1 noch mindestens eine weitere Rolle vor oder bei der Ausbildung des *D-loops* spielen müsste (EDE 2009, EDE *et al.* 2011).

Nachdem das KanKanMX4-System zur Messung der Schwesterchromatid-Interaktionen im Rahmen dieser Arbeit überprüft und Phänotypen teils neu bewertet worden waren, zeigten sich für *mph1*Δ einige von früheren Beobachtungen abweichende Daten:

(i) Die Reduktion der 4-NQO-induzierten Schwesterchromatid-Interaktionen ist deutlich geringer als zuvor angenommen.

(ii) Die Reduzierung der Camptothecin-induzierten Schwesterchromatid-Interaktionen könnte aufgrund des ursprünglich bereits geringen Unterschieds mit dem angepassten KanKanMX4-System gar nicht vorhanden sein. Dies konnte aber nicht mehr getestet werden.

(iii) Es liegt vermutlich keine Veränderung der spontanen Reversionsrate des KanKanMX4-Moduls in *mph1*Δ gegenüber dem Wildtyp vor.

(iv) *rad51*Δ ist vermutlich epistatisch zu *mph1*Δ bezüglich der Schwesterchromatid-Interaktionen. Dies würde bedeuten, dass alle Mph1-abhängigen Reversionen auch von Rad51 abhängen, was zu dessen essenzieller Funktion bei der Generierung von *D-loops* im Rahmen der homologen Rekombination passt.

Dazu kommt unter Vorbehalt die im vorigen Kapitel erläuterte Beobachtung, dass die Funktion von Mph1 auf die G2/M-Phase verschiebbar ist.

Bis auf den namensgebenden Mutatorphänotyp passen alle Daten zu der ursprünglich postulierten Annahme, dass Mph1 im Rahmen der HR-abhängigen fehlerfreien Schadensumgehung *D-loops* auflöst, um *crossover* zu vermeiden. Im Zuge der *gap repair* wäre dies problemlos in die G2-Phase verschiebbar. Bezüglich des Mutatorphänotyps könnte eine anfangs verworfene Hypothese noch einmal überprüft

werden: Mph1 könnte als Helikase für die Vergrößerung der Lücke vor der *gap invasion* bei der *gap repair* mit verantwortlich sein (vgl. Abbildung 1.4; Seite 18). Die Helikase Pif1, eine 5'-3'-Helikase, schält das 3'-Ende des Stranges auf der einen Seite ab (GARCÍA-RODRÍGUEZ *et al.* 2018). Auf der anderen Seite sind Nukleasen involviert, aber auch Mph1 könnte hier als 3'-5'-Helikase eine Rolle spielen. Möglicherweise tut es dies nicht im Zuge der PRR, sondern im später während des Zellzyklus ablaufenden *salvage pathway*, der grundsätzlich die gleichen Intermediate erzeugt wie die fehlerfreie PRR, aber anders reguliert ist und teilweise andere Faktoren beinhaltet (BRANZEI & SZAKAL 2016a). Wenn bei Fehlen von Mph1 aufgrund einer unzureichend großen Einzelstranglücke zu wenig RPA und in der Folge Rad51 binden kann und die *gap invasion* daher weniger effizient abläuft, könnte die Einzelstranglücke länger ein Substrat für die Transläsionssynthese darstellen, was den Mutatorphänotyp erklären könnte. Diese Funktion ist zusätzlich zu der *D-loop*-auflösenden Funktion zu verstehen, nicht alternativ. Helikasen sind ja schließlich (fast) Alleskönner.

5.2 FANCM

FANCM (*Fanconi anemia complementation group M*), das FA-Protein, dessen Defekt keine Fanconi-Anämie, aber erhöhtes Krebsrisiko und reduzierte Fertilität verursachen kann, ist in der Zelle neben der Koordinierung der ICL-Reparatur an vielen Prozessen zur Erhaltung der genetischen Stabilität beteiligt. Es stabilisiert arretierte Replikationsgabeln, aktiviert den *DNA damage checkpoint*, interagiert mit dem BLM-Komplex zur Vermeidung von potenziell schädlichen *crossover*-Ereignissen und löst mit Hilfe seiner Translokaseaktivität *D-loops* und *R-loops* auf (vgl. Kapitel 1.3.1; Seite 30f; *reviewed* in BASBOUS & CONSTANTINOU 2019). Die Vielfältigkeit dieser Funktionen ließ es vorstellbar erscheinen, dass verschiedene Isoformen zum breiten Spektrum der FANCM-Aktivitäten beitragen. Da FANCM zahlreiche funktionelle Domänen besitzt, sind etliche Varianten unterschiedlicher Funktion denkbar. Ziel dieses Teils der vorliegenden Arbeit war es, biologisch relevante Transkriptvarianten von *FANCM* zu identifizieren. Ein vielversprechender Kandidat war das aus Vorarbeiten bekannte, nur für die Helikase-Domäne codierende *FANCM-669*.

5.2.1 *O FANCM-669, WHERE ART THOU?*

Ausgangspunkt dieses Teilprojektes war die auf Vorarbeiten begründete Annahme, dass menschliche Zellen ein alternatives Transkript enthalten, welches nur für die ersten 669 der 2048 Aminosäuren des FANCM-Proteins codiert (vgl. Seite 130f). Dadurch besitzt das entstehende verkürzte Protein nur die Helikasedomäne, nicht aber die XPF-ähnliche Endonuklease-Domäne sowie die meisten der Interaktionsmotive im C-terminalen Bereich von FANCM. Die Isoform wurde entsprechend der Anzahl ihrer Aminosäuren FANCM-669 genannt. Aufgrund von Ähnlichkeiten mit FANCM-Homologen niederer Eukaryoten wie dem Mph1-Protein der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* erschien es denkbar, dass FANCM-669 unabhängig vom FA-Weg eine für FANCM beschriebene oder bisher unbekannte Funktion ausübt. Die Hypothese, dass es sich bei *FANCM-669* um eine biologisch relevante Transkriptvariante handelt, wurde dadurch unterstützt, dass das Transkript auf der Verwendung eines alternativen Polyadenylierungssignals

im Intron 11 zu beruhen schien, weshalb es trotz der Verkürzung des codierenden Bereichs nicht *per se* als Substrat des *Nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) anzusehen ist.

Um die biologische und potenziell medizinische Relevanz von *FANCM-669* zu überprüfen, sollten Transkriptom und Proteom verschiedener Zelltypen und unter unterschiedlichen Bedingungen auf die Anwesenheit von *FANCM-669* untersucht werden. Darüber hinaus sollten funktionale Ansätze die Frage adressieren, worin die physiologische Funktion von FANCM-669 und der funktionale Unterschied zu FANCM bestehen.

Zusammenfassend musste konstatiert werden, dass weder ein alternativ polyadenyliertes *FANCM-669*-Transkript noch das Proteinprodukt FANCM-669 unter den getesteten Bedingungen nachgewiesen werden konnte, und weder ein positiver noch ein negativer Einfluss von *FANCM-669* auf die normale Zellfunktion beobachtet werden konnte.

In der quantitativen RT-PCR konnte zwar ein vermeintlich für *FANCM-669* spezifisches Produkt amplifiziert werden, dieses war aber nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze und in gleicher Größenordnung wie umliegende intronische Regionen detektierbar (vgl. Abbildung 4.8; Seite 143). Insgesamt ergab sich der Eindruck, dass einzelne Introns in seltenen Fällen im reifen *FANCM*-Transkript verbleiben, darunter auch Intron 11. *Intron retention* kann zur Regulation der Expression eines Gens auf mRNA-Ebene beitragen. Dies ist aber vermehrt für am Rande des Gens liegende Introns mit hohem GC-Gehalt beschrieben (BRAUNSCHWEIG *et al.* 2014), zwei Faktoren, die auf Intron 11 von *FANCM* nicht zutreffen. Ob es sich also im Falle der für *FANCM* beobachteten *intron retention* um statistische Fehler der Spleißmaschinerie oder um von der Zelle „beabsichtigte" funktionale Prozesse handelt, bleibt unklar.

Auch ein Transkript, das die ersten zehn Exons in gespleißter Form und ein verbliebenes Intron 11 enthält, wie es mittels RT-PCR anhand von cDNA aus primären Fibroblasten amplifiziert werden konnte (vgl. Abbildung 4.9; Seite 144), würde bei Translation zur Produktion von FANCM-669 führen. Allerdings wäre ein solches Transkript aufgrund des Stopcodons in Intron 11 bei insgesamt 23 Exons ein ideales Substrat für den NMD. Trotzdem wurde die Möglichkeit eines dominant-negativen Einflusses des verkürzten Proteins auf FANCM untersucht. Da FANCM-669 aber, vermutlich aufgrund der fehlenden Interaktion mit FAAP24, nicht in den Zellkern zu gelangen scheint (vgl. Abbildung 4.4; Seite 136) und zudem eine Überexpression die Sensitivität von HEK293-Zellen gegenüber verschiedensten DNA-schädigenden Agenzien nicht beeinflusst (vgl. Abbildung 4.5; Seite 138), ist ein dominant-negativer Einfluss sehr unwahrscheinlich. Auch ein positiver Einfluss von FANCM-669 auf die replikationsunabhängige ICL-Reparatur konnte weitestgehend ausgeschlossen werden (vgl. Abbildung 4.6; Seite 140).

Meine abschließende Einschätzung ist, dass es sich bei *FANCM-669* nicht um eine biologisch relevante Transkriptvariante handelt. Auch Hinweise auf eine medizinische Relevanz im pathologischen Kontext konnten bislang nicht gefunden werden.

Bleibt die Frage, woher der Klon BC036056 stammt, von dem *FANCM-669* ursprünglich als polyadenylierte Variante innerhalb einer cDNA-Bibliothek menschlichen Hodengewebes beschrieben wurde (STRAUSBERG *et al.* 2002). Da die *FANCM*-Expression in Hodengewebe generell höher ist (KASAK *et al.* 2018) und dort

zudem Polyadenylierungsfaktoren vermehrt exprimiert werden (WALLACE *et al.* 2004, LIU *et al.* 2007), könnte es zu einem seltenen alternativen Polyadenylierungsereignis gekommen sein, das in Form der cDNA-Klonierung festgehalten wurde. Dafür, dass *FANCM-669* in Hodengewebe eine generelle Rolle spielt, zeigten sich bei der Untersuchung von RNA aus *testis* keine Hinweise (nicht gezeigt). Unter Umständen wäre aber in Hinblick auf die in den letzten Jahren beschriebene Manifestierung von *FANCM*-Mutationen in Fertilitätsdefekten eine genauere Untersuchung dieser Gewebe von Interesse. Ich halte es aufgrund der vorliegenden Ergebnisse allerdings für unwahrscheinlich, dass *FANCM-669* in gesunden Zellen eine relevante Rolle spielt. Auch in Krebszellen sind Polyadenylierungsfaktoren häufig überaktiv (LUTZ & MOREIRA 2011, SCOTTI & SWANSON 2016), aber in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Krebszelllinien konnte in Bezug auf *FANCM-669* kein Unterschied zu Wildtyp-Zellen festgestellt werden.

Methodische Erwägungen zur variantenspezifischen qRT-PCR

Ob Primerpaare für die Amplifikation und damit Detektion einer bestimmten Transkriptvariante spezifisch sind, ist von vielen Faktoren abhängig. Besonders wenn – wie im Falle von *FANCM-669* – kein nur für die gesuchte Variante spezifischer Bereich verfügbar ist, sind für den Einzelfall passende Kontrollen wichtig. Im Falle des Exon-Intron-Übergangs bei *FANCM-669* ist dies vor allem die Kontrolle, ob generell das gesamte Intron nachweisbar ist. Zudem ist es wichtig zu bedenken, dass bei der qRT-PCR immer nur ein Ausschnitt der jeweiligen Variante betrachtet wird. Da aber mehrere Spleißvariationen in ein und demselben Transkript in unterschiedlichen Kombinationen vorkommen können, lässt der Nachweis eines spezifischen Amplikons immer nur einen Rückschluss auf den untersuchten Bereich und nicht auf den Rest des Transkriptes zu. So weist eine Δ3-spezifische PCR nicht den Anteil an *FANCM-Δ3* nach, sondern nur den Anteil an Transkripten, denen Exon 3 fehlt. Darunter können aber auch Transkripte mit zusätzlicher alternativer Prozessierung sein, z.B. *FANCM-Δ3-Δ21/22*. Die Quantifizierung eines bestimmten Transkriptes ist also nicht direkt möglich. Das gilt im Übrigen auch für RNA-Seq-Ansätze. Hier kann zwar die relative Abdeckung aller Regionen einer mRNA zeitgleich bestimmt werden, aufgrund der vorangegangenen Fragmentierung der RNA fehlen aber auch hier die Informationen, wie die Spleißvariationen sich zu ganzen Transkripten zusammensetzen. Das Problem wird – auch bei der qRT-PCR – noch dadurch vergrößert, dass zum einen der Übergang zwischen induzierten Ereignissen und statistischen Fehlern bei der Prozessierung der Transkripte fließend ist und zum anderen selten alle möglichen Transkriptvarianten eines Gens bekannt sind. Letzteres führte im Zuge meiner Experimente beispielsweise dazu, dass sich ein zunächst als Kontrolle für eine intronische Region genutzter Bereich bei späteren Experimenten als alternatives Exon herausstellte, weshalb alle Daten neu interpretiert werden mussten.

Unter Berücksichtigung dieser intrinsischen Unsicherheiten können sowohl qRT-PCR als auch RNA-Seq wertvolle Erkenntnisse liefern. Besonders bei der Untersuchung und möglichen Empfehlung von als Biomarker relevanten Bereichen sollten allerdings alle Eventualitäten beachtet werden, da hier die Interpretation im Endeffekt lebenswichtige Entscheidungen in der personalisierten Medizin nach sich ziehen kann.

5.2.2 DAS TRANSKRIPTOM: UNENDLICHE TRANSKRIPTVARIANTEN-WEITEN

Die Prozessierung der primären Transkripte zur reifen mRNA verläuft nicht immer fehlerfrei. Im Sinne der Evolution ist dies nützlich, da sich nur aus Fehlern neue regulative Mechanismen entwickeln können. Für Transkriptom-Analysen bedeutet dies aber eine Herausforderung. Unter den möglichen Polyadenylierungs- und Spleißvarianten, die in jeder Zelle auch durch Fehler der komplexen Prozessierung der mRNAs entstehen können, diejenigen zu identifizieren, die eine biologische Bedeutung haben, ist besonders bei niedrig exprimierten Genen wie *FANCM* schwierig. Bei nur wenigen Volllängen-Transkripten pro Zelle treten seltene Varianten teilweise weniger als einmal pro Zelle, also nicht in jeder Zelle einer Zellpopulation gleichzeitig auf. Dies erschwert zum einen den Nachweis und zum anderen die Abgrenzung zwischen „Unfall“ und „absichtlich“ erzeugter Variante.

Aufgrund von Datenbankeinträgen (NCBI, Ensembl) und eigenen, sondierenden Experimenten zu spontanen Spleißvarianten von *FANCM* konnten vier potenziell interessante Variationen ausgemacht werden: Δ3, Δ5 und Δ21/22 sowie die Insertion des alternativen Exon 11b (vgl. Kapitel 4.2.2; Seite 145f). Alle Varianten wurden bei der Klonierung von Amplikons des Volllängen-Transkriptes gefunden. Sowohl Δ5 als auch Exon 11b entsprechen keinem der zuvor genannten Datenbankeinträge.

Keine der *exon skipping* (oder *cassette exon*) Variationen, auch in Kombination miteinander, sollte zum NMD des Transkriptes führen, da bei Δ3 und Δ5 (beide *in frame*) das *FANCM-FL*-Stopcodon genutzt wird und bei Δ21/22 das verfrühte Stopcodon im terminalen Exon 23 liegt. *FANCM-Ex11b* ist durch das verfrühte Stopcodon an Codon-Position 32 des alternativen Exons ein potenzielles NMD-Substrat. Die Auswirkungen der experimentell bestätigten Varianten auf die von ihnen codierten Proteine sind in Abbildung 5.4 schematisch gegenübergestellt. Kombinationen von Variationen sind nicht dargestellt, können aber auftreten (vgl. Tabelle 4.2; Seite 147). Alle drei *exon skipping*-Variationen betreffen funktionale Bereiche von FANCM. Aufgrund der zahlreichen funktionalen Domänen muss dies aber nicht den vollständigen Funktionsverlust des Proteins bedeuten.

Für alle Transkriptvarianten sollte ein möglichst spezifisches qRT-PCR-System entwickelt werden, um die Expression der Varianten quantifizieren zu können. In allen Fällen ist dies leichter möglich als bei *FANCM-669*, da es jeweils Übergänge gibt, über die Primer gelegt werden können, die weder in den anderen Transkripten noch in ungespleißter RNA binden. Aussagekräftig in Bezug auf eine biologische Relevanz wäre zusätzlich die massenspektrometrische Quantifizierung dieser Isoformen über einzigartige Peptide, wie sie im Rahmen dieser Arbeit für FANCM-669 versucht wurde (vgl. Seite 132).

Der Wegfall der von Exon 3 oder Exon 5 codierten Aminosäuren betrifft die N-terminale Helikase-Domäne, bei Δ3 sogar eines der konservierten Motive (Walker III). Vermutlich besitzen diese Varianten keine Translokaseaktivität und eine beeinträchtigte oder fehlende DNA-Bindung. Die Chromatin-Assoziation könnte aber trotzdem über den C-terminalen Bereich sowie über die Interaktion mit FAAP24 und dem MHF1/2-Komplex erfolgen. Als möglicherweise biologisch relevante Isoformen stellen diese Varianten die interessantesten Kandidaten dar und die Untersuchung ihrer Funktion sollte nachgeholt werden.

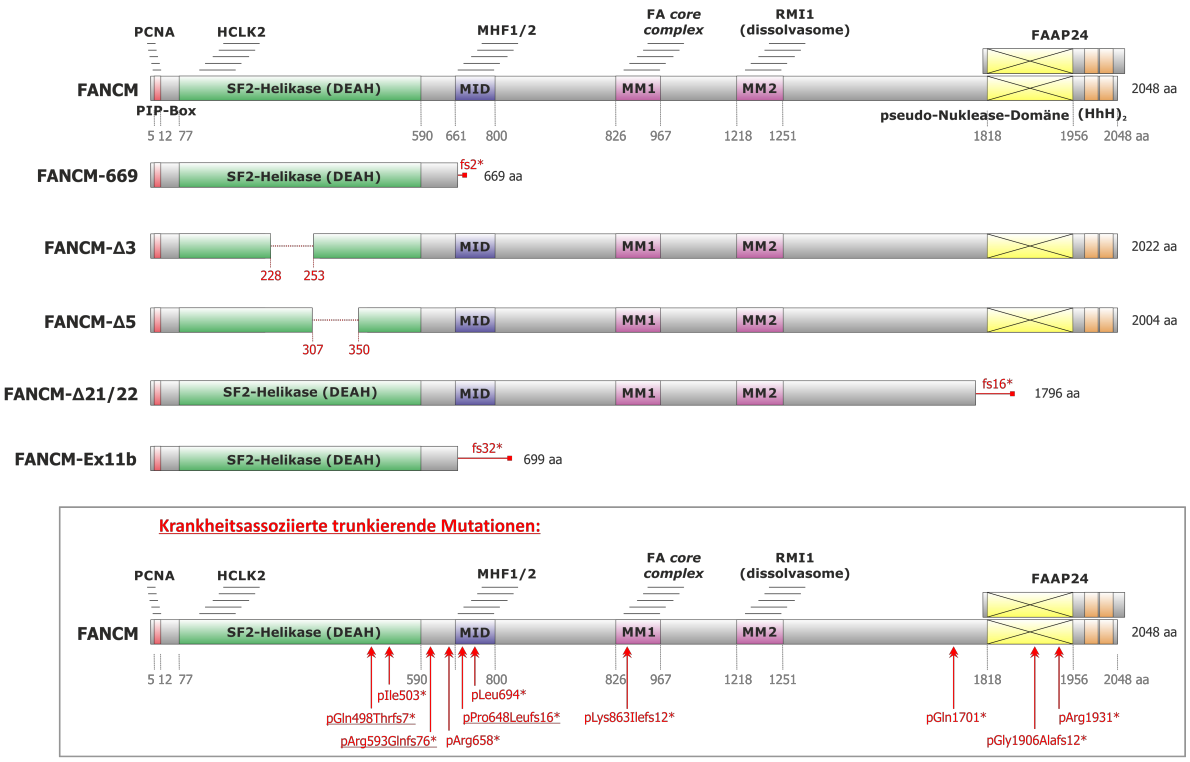


Abbildung 5.4: **Proteinstruktur der potenziell von spontanen Transkriptvarianten produzierten FANCM-Isoformen und Vergleich mit krankheitsassoziierten, trunkierenden Mutationen. Oben**: Funktionale Domänen von FANCM mit Andeutung bekannter Interaktionen (vgl. Abbildung 1.9; Seite 30). Die im Rahmen dieser Arbeit relevanten Transkriptvarianten codieren für die darunter gezeigten Isoformen von FANCM. fs = *frameshift*. **Unten**: In der Literatur beschriebene, C-terminal verkürzte Proteine verursachende Mutationen, die mit Krebserkrankungen oder Infertilitätssyndromen assoziiert sind. Unterstrichene Varianten wurden als ursächlich für männliche Unfruchtbarkeit beschrieben, teilweise in Verbindung mit erhöhtem Krebsrisiko (KASAK *et al.* 2018, YIN *et al.* 2019, ZHANG *et al.* 2021b), andere Varianten vor allem in Verbindung mit erblichem Brustkrebs (hier nur die häufigsten Varianten abgebildet) und *early-onset*-Krebserkrankungen (KLAMPFL *et al.* 2011, KIISKI *et al.* 2014, PETERLONGO *et al.* 2015, TRUBICKA *et al.* 2017, BOGLIOLO *et al.* 2018, CATUCCI *et al.* 2018, FIGLIOLI *et al.* 2020). In Verbindung mit Brustkrebs sind noch etwa 20 weitere seltene trunkierende Varianten bekannt (FIGLIOLI *et al.* 2020).

Interessanterweise ähneln einige der spontanen Transkriptvarianten bekannten Genvarianten, bei denen eine *nonsense*- oder *frameshift*-Mutation zu einem trunkierten Protein führt. Im unteren Teil der Abbildung 5.4 ist eine Auswahl der in den letzten Jahren beschrieben, krankheitsverursachenden Mutationen gezeigt, die zu verkürzten Proteinprodukten führen. Wie in der Einleitung bereits ausgeführt, kristallisiert sich *FANCM* mehr und mehr als wichtiger Tumorsuppressor heraus. Die in Abbildung 5.4 genannten Mutationen prädisponieren ihre Träger für verschiedene Krebsarten, allen voran erblichen Brustkrebs, oder verursachen Fertilitätsdefekte, die sich bei Frauen in einer verfrühten Menopause und bei Männern bis hin zur Azoospermie äußern (vgl. Seite 31f). Die Schwere des Phänotyps korreliert dabei lose mit der Position der trunkierenden Mutation innerhalb des Gens (CATUCCI *et al.* 2018). Die häufigsten krebsassoziierten Mutationen finden sich im C-terminalen Bereich und eliminieren „nur“ die pseudo-Nuklease-Domäne (FIGLIOLI *et al.* 2020). Ein weiterer Hotspot für trunkierende Mutationen mit schwerwiegenden Folgen, darunter auch die meisten der mit Infertilitätssyndromen assoziierten Allele, ist der Bereich um Position 600. Die resultierenden verkürzten Proteine ähneln dabei den von *FANCM-669* und *FANCM-Ex11b* codierten Varianten und enthalten höchstens die Helikase-Domäne als funktionales

Element. Einige der proteintrunkierenden Genvarianten wurden während der letzten Jahre auch funktional untersucht, was einen Abgleich der beobachteten Phänotypen mit den in dieser Arbeit analysierten spontanen Transkriptvarianten ermöglicht.

Das Herausspleißen von Exon 21 und 22 führt zu einem *frameshift* innerhalb der Exon 23-Sequenz und damit zu einem verkürzten Protein, das genau vor der pseudo-Nuklease-Domäne endet. FANCM-Δ21/22 kann demnach nicht mit FAAP24 interagieren und DNA nur über die Helikase-Domäne und die Interaktion mit dem MHF1/2-Komplex binden. Die Interaktion mit dem BLM-Komplex und dem FA *core complex* bliebe theoretisch möglich. Da sowohl die Funktion beim FA-Weg als auch bei der Unterdrückung von *crossover*-Produkten aber abhängig von FAAP24 ist (WANG *et al.* 2013), kann diese Isoform diese Funktionen vermutlich nicht erfüllen. Interessanterweise ist die mit familiärem Brustkrebs assoziierte Mutation c.5791C>T, die an Position 1931 eine *nonsense*-Mutation bewirkt, in Wahrheit eine Spleißmutation. Obwohl die Mutation auch unter pArg1931* in der Literatur auftaucht, ist die biologische Konsequenz eigentlich das Hervorrufen einer starken Bindungsstelle für hnRNPA1, was wiederum zum *exon skipping* von Exon 22 und zu einem ebenfalls trunkierten Protein führt, nämlich pGly1906Alafs12* (PETERLONGO *et al.* 2015). Weder das auf 1931 Aminosäuren verkürzte FANCM, noch die Δ22-Variante können die *crosslinker*-Sensitivität FANCM-defizienter Zellen komplementieren und beide Varianten führen zu vermehrter Chromosomenfragilität (PETERLONGO *et al.* 2015). Es ist davon auszugehen, dass auch FANCM-Δ21/22 ähnliche Resultate zeigen würde.

Das vom *FANCM-Ex11b*-Transkript codierte Protein ist für die funktionale Analyse nur bedingt interessant, da es im Grunde FANCM-669 ohne terminales Lysin, dafür mit 32 von Exon 11b codierten Aminosäuren ist. Um von FANCM-669 verschiedene Effekte zu erzeugen, also überhaupt Effekte auszulösen, müssten die von Exon 11b codierten Aminosäuren dem Protein eine einzigartige Funktion verleihen. Auszuschließen ist das nicht. Zuvor sollte aber getestet werden, ob das entsprechende Protein in den Zellen endogen produziert wird. Gemeint ist nicht (nur), ob es stabil von einem Vektor exprimiert werden kann, sondern ob das endogene Transkript zu den Ribosomen gelangen kann, translatiert wird und nicht durch NMD abgebaut wird.

Die mit Azoospermie assoziierte Mutation pPro648Leufs16* erzeugt ein ähnlich verkürztes Protein wie *FANCM-669* und *FANCM-Ex11b*. Wenig überraschend zeigen mit FANCM (pPro648Leufs*16) komplementierte FANCM-defiziente Zellen weiterhin MMC-induzierte Chromosomenbrüche und reduzierte FANCD2-Ubiquitinierung, also reduzierte Aktivierung des FA-Wegs (YIN *et al.* 2019). Nach den Ergebnissen mit FANCM-669 im Rahmen dieser Arbeit ist davon auszugehen, dass auch dieses verkürzte Protein nicht in den Kern gelangt. Die Nicht-Komplementierung der *crosslinker*-Sensitivität ergibt sich aus der fehlenden Interaktionsmöglichkeit mit dem FA *core complex*. Grundsätzlich besteht aber ein Unterschied zwischen der Erklärung des Phänotyps von Individuen, die homozygot für eine trunkierende *FANCM*-Mutation sind, und möglichen Folgen einer spontanen Transkriptvariante, die für ein verkürztes Protein codiert. In den für die verkürzende Genvariante homozygoten Individuen wird der Phänotyp durch den Wegfall der Proteinfunktion von FANCM bedingt. Im Falle der spontanen Variante kommen verkürztes Protein und FANCM in derselben Zelle vor und können sich gegenseitig (negativ) beeinflussen. Daher ist

hier die Untersuchung möglicher dominant-negativer Effekte von Bedeutung. Diese können wiederum Rückschlüsse auf die Situation in heterozygoten Individuen zulassen, wo trunkierendes Allel und Wildtyp-Allel zusammenkommen. Auch für heterozygote Träger ist bei einigen FANCM-Mutationen erhöhte Krebsanfälligkeit zu beobachten (PETERLONGO *et al.* 2021).

5.2.3 MÖGLICHE BEDEUTUNG SPONTANER *FANCM*-TRANSKRIPTVARIANTEN IM PATHOLOGISCHEN KONTEXT

Da für *FANCM-669* keine Hinweise auf einen dominant-negativen Effekt gefunden wurden, ist zu vermuten, dass auch andere trunkierte Varianten ähnlicher Größe, die vor dem MHF1/2-Interaktionsmotiv enden, keinen solchen Effekt ausüben. Möglicherweise ist das auch ein Grund dafür, dass bei monoallelischen Trägern die Krebsanfälligkeit eher von im C-terminalen Bereich trunkierten Proteinen ausgeht, die auf vielfältige Art und Weise mit FANCM konkurrieren könnten, z.B. um DNA-Substrate und Bindungspartner.

Bezüglich der spontanen Transkriptvarianten mit stark verkürzten Proteinprodukten (*FANCM-669* und *FANCM-Ex11b*) sehe ich weniger die Gefahr eines dominant-negativen Effekts durch eine Wirkung des Proteins als vielmehr die Gefahr einer Überexpression der Variante zu Ungunsten des Expressionslevels des Volllängen-Transkriptes.

Bei einer Fehlregulation der Prozessierung, also einer überdurchschnittlichen Nutzung des alternativen Polyadenylierungssignals am Beginn von Intron 11 oder bei übermäßigem alternativem Spleißen unter Benutzung der starken Spleißstellen von Exon 11b würden in beiden Fällen Transkripte entstehen, die vermutlich für nicht-funktionale Proteine codieren. Da die Transkription in beiden Fällen kein Volllängen-Transkript produziert, könnte so die Proteinmenge an FANCM sinken. Im Extremfall könnte der Genotyp einer mono- oder biallelischen trunkierenden Variante simuliert werden, was schädliche Auswirkungen auf den Organismus hätte. Eine Fehlregulation der Prozessierung der mRNA von *FANCM* könnte auf Defekten von *trans*-Faktoren wie Spleißenhancern oder Polyadenylierungsfaktoren beruhen oder auf *cis*-Mutationen der *FANCM*-Gensequenz.

Da das Intron 11 bereits ein vergleichsweise gutes Polyadenylierungssignal und ein alternatives Exon 11b enthält, die „nur darauf warten“ aktiviert zu werden, könnten Punktmutationen ausreichen, um hier zu Spleißmutationen bzw. PAS-Mutationen zu führen. Mutationsträger würden dann vermehrt oder im schlimmsten Fall nur noch das kurze bzw. fehlgespleißte Transkript produzieren, weniger *FANCM*-Transkript und weniger FANCM. Eine solche Mutation würde eine früh trunkierende Mutation bedeuten und könnte vermutlich analog zu den bereits bekannten Mutationen Phänotypen wie erhöhte Krebsanfälligkeit, erhöhte Toxizität chemotherapeutischer Behandlungen und drastische Fertilitätsstörungen auslösen.

Aus den genannten Gründen würde ich empfehlen, Intron 11 in das *whole exome sequencing* bei Patienten mit unklaren Genotypen und den genannten Phänotypen mit einzuschließen, da hier die Schwelle für krankheitsauslösende Mutationen vermutlich relativ gering ist.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Leben ist lebensgefährlich. Die vielfältigen exogenen und endogenen Angriffe auf ihr Erbgut kann eine Zelle nur langfristig überleben, weil sie mit einem Netzwerk aufeinander abgestimmter Sicherheitsmaßnahmen ausgestattet ist: der *DNA damage response*. Reparaturenzyme reparieren fortlaufend DNA-Schäden, trotzdem behindern immer wieder Schäden die Replikation. Bei Replikationsproblemen helfen die Faktoren der Schadenstoleranzsysteme, indem sie die Replikation am Laufen halten und die Chromosomen in einen „vererbbaren" Zustand bringen. Die Koordination übernimmt der *DNA damage checkpoint*.

Ein kleines Rad im Gefüge der *DNA damage response* bilden die Mitglieder der FANCM-Familie, die als Motorproteine DNA-Substrate umstrukturieren können. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist dies Mph1, im Menschen die weitaus größere und multifunktionalere Fanconi-Anämie-Determinante M (FANCM), die zwar gar keine Fanconi-Anämie (FA) determiniert, aber ein wichtiger Tumorsuppressor ist.

FANCM orchestriert zusammen mit den anderen FA-Proteinen die Reparatur von *interstrand crosslinks*. Dies ist aber bei weitem nicht die einzige Funktion, die FANCM zugeschrieben wird: komplexe Aufgaben innerhalb und außerhalb des FA-Wegs sind bekannt. Die Vielfältigkeit dieser Funktionen führte zu der Hypothese, dass das Produkt der Transkriptvariante *FANCM-669* möglicherweise zum breiten Spektrum der FANCM-Aktivitäten beiträgt. Meine Daten konnten dies leider nicht bestätigen. Stattdessen habe ich andere spontane Transkriptvarianten von *FANCM* nachweisen können (*FANCM-Ex11b*, *FANCM-Δ3*, *FANCM-Δ5* und *FANCM-Δ21/22*), die teilweise krankheitsauslösenden, trunkierenden Genvarianten ähneln, allerdings noch einer genaueren Untersuchung bedürfen.

Das Bäckerhefe-Ortholog Mph1 ist kleiner als FANCM, dafür aber eine funktionale Helikase. Als solche übernimmt Mph1 in der Zelle vielfältige Funktionen, die vor allem durch die Auflösung spezieller Rekombinationsintermediate (*D-loops*) bedingt sind. Bei der fehlerfreien Umgehung replikations-arretierender Schäden ist Mph1 in dieser Funktion ebenfalls unterwegs. Da es aufgrund seines namensgebenden Mutatorphänotyps noch weitere Funktionen ausüben muss, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine mögliche Regulation von Mph1 durch Phosphorylierung untersucht. Meine Daten lieferten allerdings keinen Hinweis auf eine entscheidende Regulation durch Phosphorylierung von Mph1 im Kontext der Schadenstoleranz. Im Zuge meiner Experimente habe ich aber ein methodisches Problem bei der Messung von Schwesterchromatid-Interaktionen aufgrund multipler Integration des Reporter-konstrukts aufgedeckt, woraufhin die zu Mph1 vorliegenden Daten teilweise überprüft werden mussten. Demnach reduziert Mph1 die durch DNA-Schäden induzierten Schwesterchromatid-Interaktionen weniger stark als bisher angenommen, was aber seine postulierte Funktion nicht grundsätzlich in Frage stellt. Die Möglichkeit der multiplen Integration bestimmter Vektoren sollte aber stets bedacht werden, wenn die integrierte DNA für einen quantitativen *readout* verwendet wird. Zusätzlich lieferte die Restriktion der Expression von *MPH1* in die G2/M-Phase Hinweise darauf, dass Mph1 in der S-Phase entbehrlich ist. Das stellt allerdings in Frage, inwiefern die für Mph1 im Kontext verschiedener Reparatur- und Schadenstoleranzwege postulierte Funktion zum Schutz arretierter Replikationsgabeln während der S-Phase für das Zellüberleben relevant ist.

7 ANHANG

7.1 ERGÄNZENDE ABBILDUNGEN

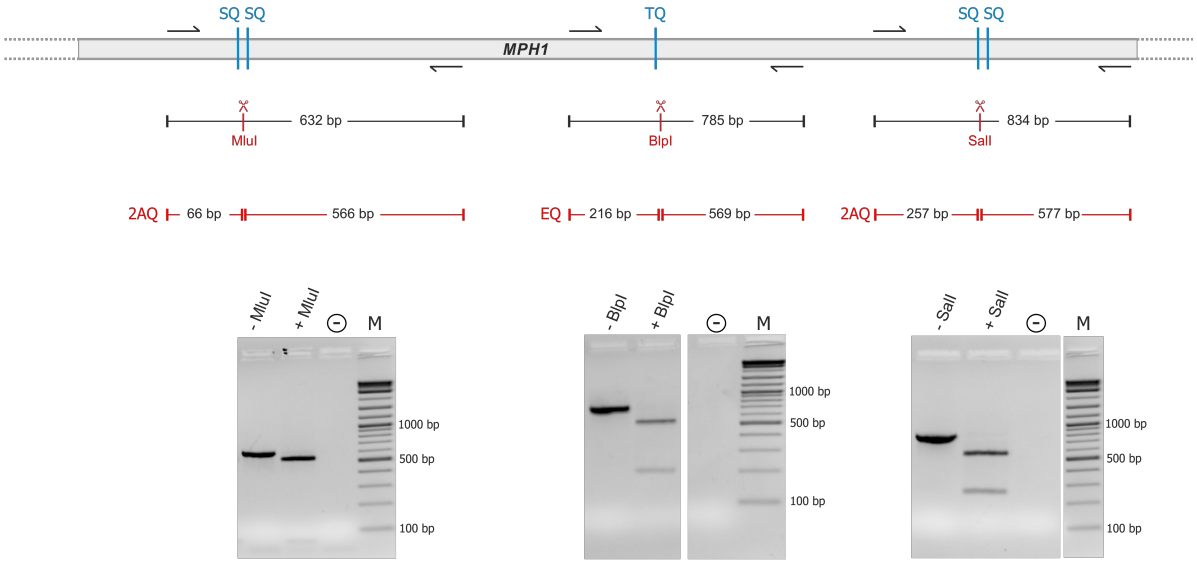


Abbildung 7.1: PCR-Restriktions-Screen zur Verifizierung der eingeführten Mutationen an putativen Phosphorylierungsstellen beispielhaft an *MPH1-2AQ-EQ-2AQ*. Mit den Mutationen für die Aminosäureaustausche wurden Schnittstellen für die genannten Restriktionsenzyme eingeführt. Die Bereiche um die Mutationen wurde per PCR amplifiziert, mit dem jeweiligen Enzym geschnitten und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Screen und Produktgrößen siehe Seite 67.

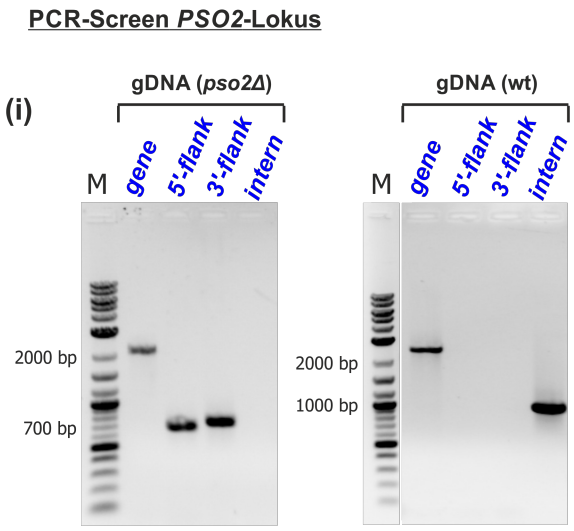


Abbildung 7.2: **PCR-Screen zur Verifizierung der *PSO2*-Deletion.** Die angegebenen Bereiche wurden per PCR amplifiziert und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Screen und Produktgrößen siehe Seite 62.

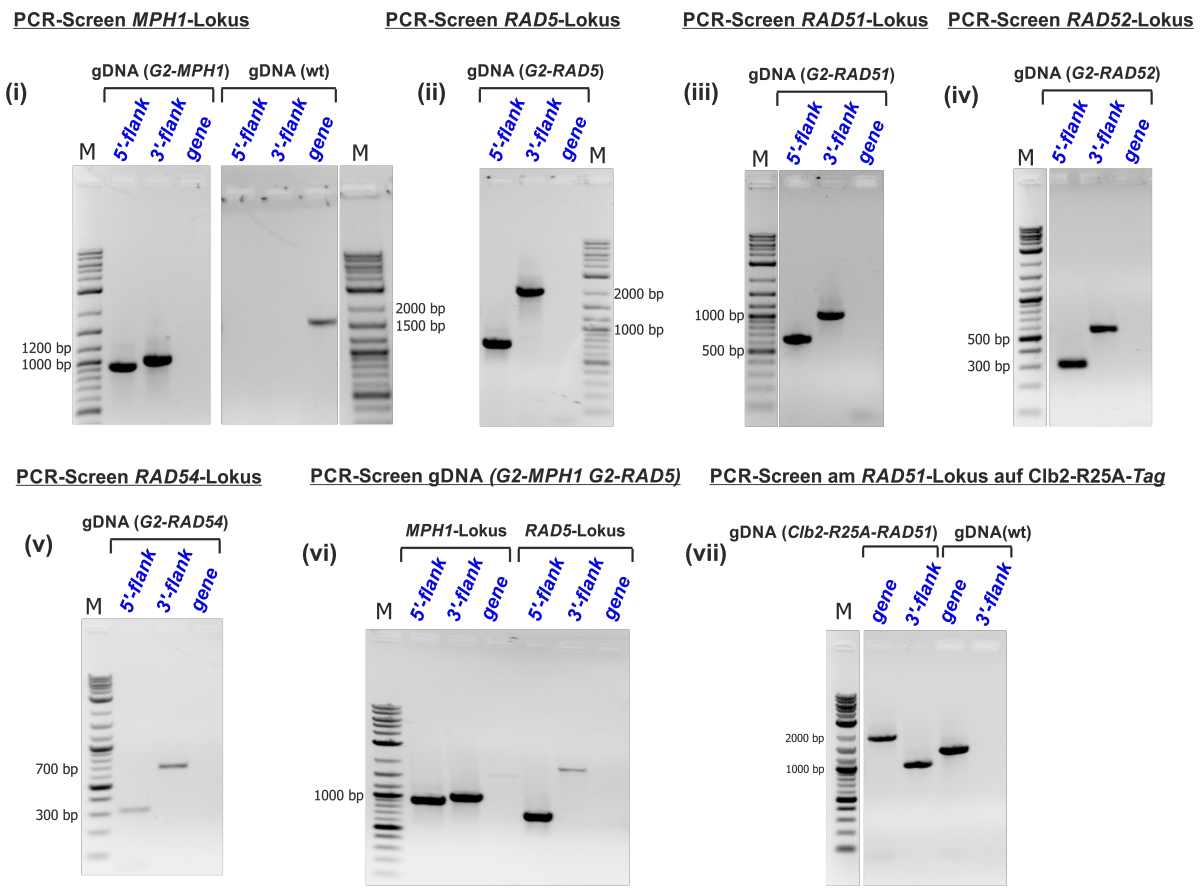


Abbildung 7.3: **PCR-Screen zur Verifizierung der G2-*Tag*-Stämme.** Die angegebenen Bereiche wurden per PCR amplifiziert und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Screen und Produktgrößen siehe Seite 63 bzw. für *Clb2-R25A-RAD51* Seite 68.

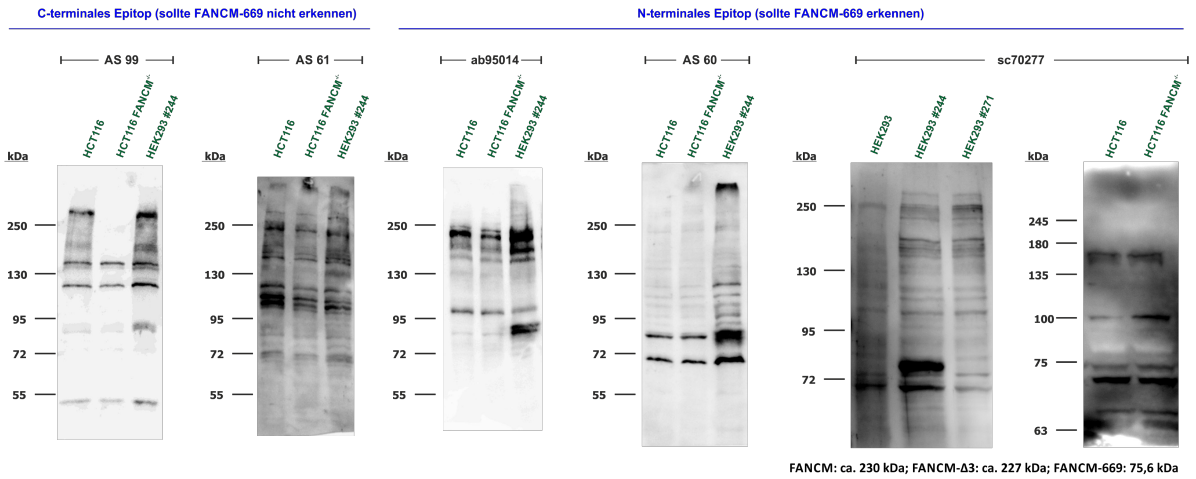


Abbildung 7.4: **Vergleich verschiedener FANCM-Antikörper im Western Blot** (Seite 90). Es wurden gleiche Mengen Gesamtzelllysat verwendet. #244: transiente Expression von *FANCM-669*; #271: transiente Expression von *FANCM*. Nur AS99 kann FANCM zweifelsfrei detektieren, da nur hier die entsprechenden Banden in den *knockout*-Zellen fehlen. Überexprimiertes FANCM-669 wird von allen drei N-terminal bindenden Antikörpern erkannt. Es lassen sich aber keine Banden endogenem FANCM-669 zuordnen. Antiköper-Details und Verdünnung siehe Seite 82.

8 LITERATURVERZEICHNIS

AGASHE, S., C. R. JOSEPH, T. A. C. REYES, D. MENOLFI, M. GIANNATTASIO, A. WAIZENEGGER, B. SZAKAL & D. BRANZEI 2021: Smc5/6 functions with Sgs1-Top3-Rmi1 to complete chromosome replication at natural pause sites. Nature communications 12 (1): 2111.

ALBUQUERQUE, C. P., M. B. SMOLKA, S. H. PAYNE, V. BAFNA, J. ENG & H. ZHOU 2008: A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. Molecular & cellular proteomics MCP 7 (7): 1389–1396.

AMON, A. 1994: Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. Cell 77 (7): 1037–1050.

AMUNUGAMA, R., S. WILLCOX, R. A. WU, U. B. ABDULLAH, A. H. EL-SAGHEER, T. BROWN, P. J. MCHUGH, J. D. GRIFFITH & J. C. WALTER 2018: Replication Fork Reversal during DNA Interstrand Crosslink Repair Requires CMG Unloading. Cell reports 23 (12): 3419–3428.

ANDREWS, A. M., H. J. MCCARTNEY, T. M. ERRINGTON, A. D. D'ANDREA & I. G. MACARA 2018: A senataxin-associated exonuclease SAN1 is required for resistance to DNA interstrand cross-links. Nat Commun 9 (1): 2592.

ANG, J. S., S. DUFFY, R. SEGOVIA, P. C. STIRLING & P. HIETER 2016: Dosage Mutator Genes in Saccharomyces cerevisiae: A Novel Mutator Mode-of-Action of the Mph1 DNA Helicase. Genetics 204 (3): 975–986.

APELT, K., H. LANS, O. D. SCHÄRER & M. S. LUIJSTERBURG 2021: Nucleotide excision repair leaves a mark on chromatin: DNA damage detection in nucleosomes. Cellular and molecular life sciences CMLS 78 (24): 7925–7942.

APTE, M. S. & J. P. COOPER 2017: Life and cancer without telomerase: ALT and other strategies for making sure ends (don't) meet. Critical reviews in biochemistry and molecular biology 52 (1): 57–73.

AUERBACH, A. D. 1993: Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. Experimental hematology 21 (6): 731–733.

BADDOCK, H. T., Y. YOSAATMADJA, J. A. NEWMAN, C. J. SCHOFIELD, O. GILEADI & P. J. MCHUGH 2020: The SNM1A DNA repair nuclease. DNA repair 95: 102941.

BAILEY, L. J., J. BIANCHI & A. J. DOHERTY 2019: PrimPol is required for the maintenance of efficient nuclear and mitochondrial DNA replication in human cells. Nucleic Acids Res 47 (8): 4026–4038.

BAKKER, S. T., H. J. VAN DE VRUGT, M. A. ROOIMANS, A. B. OOSTRA, J. STELTENPOOL, E. DELZENNE-GOETTE, A. VAN DER WAL, M. VAN DER VALK, H. JOENJE, H. TE RIELE & J. P. de WINTER 2009: Fancm-deficient mice reveal unique features of Fanconi anemia complementation group M. Human molecular genetics 18 (18): 3484–3495.

BANERJEE, S., S. SMITH, J.-H. OUM, H.-J. LIAW, J.-Y. HWANG, N. SIKDAR, A. MOTEGI, S. E. LEE & K. MYUNG 2008: Mph1p promotes gross chromosomal rearrangement through partial inhibition of homologous recombination. The Journal of cell biology 181 (7): 1083–1093.

BASBOUS, J. & A. CONSTANTINOU 2019: A tumor suppressive DNA translocase named FANCM. Critical reviews in biochemistry and molecular biology 54 (1): 27–40.

BASTOS DE OLIVEIRA, F. M., D. KIM, J. R. CUSSIOL, J. DAS, M. C. JEONG, L. DOERFLER, K. H. SCHMIDT, H. YU & M. B. SMOLKA 2015: Phosphoproteomics reveals distinct modes of Mec1/ATR signaling during DNA replication. Molecular cell 57 (6): 1124–1132.

BEHM-ANSMANT, I., I. KASHIMA, J. REHWINKEL, J. SAULIÈRE, N. WITTKOPP & E. IZAURRALDE 2007: mRNA quality control: an ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons. FEBS letters 581 (15): 2845–2853.

BENKOVIC, S. J., A. M. VALENTINE & F. SALINAS 2001: Replisome-mediated DNA replication. Annual review of biochemistry 70: 181–208.

BERANEK, D. T. 1990: Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. Mutation research 231 (1): 11–30.

BERGER, J. M. 1998: Structure of DNA topoisomerases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression 1400 (1-3): 3–18.

BERTI, M., D. CORTEZ & M. LOPES 2020: The plasticity of DNA replication forks in response to clinically relevant genotoxic stress. Nature Reviews Molecular Cell Biology 21 (10): 633–651.

BHAT, K. P. & D. CORTEZ 2018: RPA and RAD51: fork reversal, fork protection, and genome stability. Nature structural & molecular biology 25 (6): 446–453.

BIANCHI, J., S. G. RUDD, S. K. JOZWIAKOWSKI, L. J. BAILEY, V. SOURA, E. TAYLOR, I. STEVANOVIC, A. J. GREEN, T. H. STRACKER, H. D. LINDSAY & A. J. DOHERTY 2013: PrimPol bypasses UV photoproducts during eukaryotic chromosomal DNA replication. Molecular cell 52 (4): 566–573.

BIENKO, M., C. M. GREEN, N. CROSETTO, F. RUDOLF, G. ZAPART, B. COULL, P. KANNOUCHE, G. WIDER, M. PETER, A. R. LEHMANN, K. HOFMANN & I. DIKIC 2005: Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. Science 310 (5755): 1821–1824.

BITTMANN, J., R. GRIGAITIS, L. GALANTI, S. AMARELL, F. WILFLING, J. MATOS & B. PFANDER 2020: An advanced cell cycle tag toolbox reveals principles underlying temporal control of structure-selective nucleases. eLife 9.

BJELLAND, S. & E. SEEBERG 2003: Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. Mutation research 531 (1-2): 37–80.

BLACKFORD, A. N., R. A. SCHWAB, J. NIEMINUSZCZY, A. J. DEANS, S. C. WEST & W. NIEDZWIEDZ 2012: The DNA translocase activity of FANCM protects stalled replication forks. Human molecular genetics 21 (9): 2005–2016.

BLASTYÁK, A., L. PINTÉR, I. UNK, L. PRAKASH, S. PRAKASH & L. HARACSKA 2007: Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression. Molecular cell 28 (1): 167–175.

BOGLIOLO, M., D. BLUTEAU, J. LESPINASSE, R. PUJOL, N. VASQUEZ, C. D. D'ENGHIEN, D. STOPPA-LYONNET, T. LEBLANC, J. SOULIER & J. SURRALLÉS 2018: Biallelic truncating FANCM mutations cause early-onset cancer but not Fanconi anemia. Genetics in medicine official journal of the American College of Medical Genetics 20 (4): 458–463.

BOUAOUN, L., D. SONKIN, M. ARDIN, M. HOLLSTEIN, G. BYRNES, J. ZAVADIL & M. OLIVIER 2016: TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. Human mutation 37 (9): 865–876.

BOUFFARD, F., K. PLOURDE, S. BÉLANGER, G. OUELLETTE, Y. LABRIE & F. DUROCHER 2015: Analysis of a FANCE Splice Isoform in Regard to DNA Repair. Journal of molecular biology 427 (19): 3056–3073.

BRANZEI, D. & B. SZAKAL 2016a: DNA damage tolerance by recombination: Molecular pathways and DNA structures. DNA repair 44: 68–75.

BRANZEI, D. & B. SZAKAL 2016b: Priming for tolerance and cohesion at replication forks. Nucleus (Austin, Tex.) 7 (1): 8–12.

BRANZEI, D., F. VANOLI & M. FOIANI 2008: SUMOylation regulates Rad18-mediated template switch. Nature 456 (7224): 915–920.

BRAUNSCHWEIG, U., N. L. BARBOSA-MORAIS, Q. PAN, E. N. NACHMAN, B. ALIPANAHI, T. GONATOPOULOS-POURNATZIS, B. FREY, M. IRIMIA & B. J. BLENCOWE 2014: Widespread intron retention in mammals functionally tunes transcriptomes. Genome research 24 (11): 1774–1786.

BUCALA, R., P. MODEL & A. CERAMI 1984: Modification of DNA by reducing sugars: a possible mechanism for nucleic acid aging and age-related dysfunction in gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 81 (1): 105–109.

BUDZOWSKA, M., T. G. W. GRAHAM, A. SOBECK, S. WAGA & J. C. WALTER 2015: Regulation of the Rev1-pol ζ complex during bypass of a DNA interstrand cross-link. EMBO J 34 (14): 1971–1985.

BURGERS, P. M. J. & T. A. KUNKEL 2017: Eukaryotic DNA Replication Fork. Annual review of biochemistry 86: 417–438.

CATUCCI, I., A. OSORIO, B. ARVER, G. NEIDHARDT, M. BOGLIOLO, F. ZANARDI, M. RIBONI, S. MINARDI, R. PUJOL, J. AZZOLLINI, B. PEISSEL, S. MANOUKIAN, G. de VECCHI, S. CASOLA, J. HAUKE, L. RICHTERS, K. RHIEM, R. K. SCHMUTZLER, K. WALLANDER, T. TÖRNGREN, Å. BORG, P. RADICE, J. SURRALLÉS, E. HAHNEN, H. EHRENCRONA, A. KVIST, J. BENITEZ & P. PETERLONGO 2018: Individuals with FANCM biallelic mutations do not develop Fanconi anemia, but show risk for breast cancer, chemotherapy toxicity and may display chromosome fragility. Genetics in medicine official journal of the American College of Medical Genetics 20 (4): 452–457.

CECCALDI, R., P. SARANGI & A. D. D'ANDREA 2016: The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions. Nature reviews. Molecular cell biology 17 (6): 337–349.

CHAVEZ, A., V. AGRAWAL & F. B. JOHNSON 2011: Homologous recombination-dependent rescue of deficiency in the structural maintenance of chromosomes (Smc) 5/6 complex. The Journal of biological chemistry 286 (7): 5119–5125.

CHEN, Z., X. S. XU, J. YANG & G. WANG 2003: Defining the function of XPC protein in psoralen and cisplatin-mediated DNA repair and mutagenesis. Carcinogenesis 24 (6): 1111–1121.

CHI, P., Y. KWON, C. SEONG, A. EPSHTEIN, I. LAM, P. SUNG & H. L. KLEIN 2006: Yeast recombination factor Rdh54 functionally interacts with the Rad51 recombinase and catalyzes Rad51 removal from DNA. Journal of Biological Chemistry 281 (36): 26268–26279.

CICCIA, A., C. LING, R. COULTHARD, Z. YAN, Y. XUE, A. R. MEETEI, E. H. LAGHMANI, H. JOENJE, N. MCDONALD, J. P. de WINTER, W. WANG & S. C. WEST 2007: Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM. Molecular cell 25 (3): 331–343.

COHN, M. A., P. KOWAL, K. YANG, W. HAAS, T. T. HUANG, S. P. GYGI & A. D. D'ANDREA 2007: A UAF1-containing multisubunit protein complex regulates the Fanconi anemia pathway. Molecular cell 28 (5): 786–797.

COLLIS, S. J., A. CICCIA, A. J. DEANS, Z. HOREJSÍ, J. S. MARTIN, S. L. MASLEN, J. M. SKEHEL, S. J. ELLEDGE, S. C. WEST & S. J. BOULTON 2008: FANCM and FAAP24 function in ATR-mediated checkpoint signaling independently of the Fanconi anemia core complex. Molecular cell 32 (3): 313–324.

COLOMBO, C. V., M. GNUGNOLI, E. GOBBINI & M. P. LONGHESE 2020: How do cells sense DNA lesions? Biochemical Society transactions 48 (2): 677–691.

CONTI, C., B. SACCÀ, J. HERRICK, C. LALOU, Y. POMMIER & A. BENSIMON 2007: Replication fork velocities at adjacent replication origins are coordinately modified during DNA replication in human cells. Molecular biology of the cell 18 (8): 3059–3067.

CORDA, Y., C. JOB, M. F. ANIN, M. LENG & D. JOB 1993: Spectrum of DNA--platinum adduct recognition by prokaryotic and eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases. Biochemistry 32 (33): 8582–8588.

COULTHARD, R., A. J. DEANS, P. SWUEC, M. BOWLES, A. COSTA, S. C. WEST & N. Q. MCDONALD 2013: Architecture and DNA recognition elements of the Fanconi anemia FANCM-FAAP24 complex. Structure (London, England 1993) 21 (9): 1648–1658.

COURTOT, L., J.-S. HOFFMANN & V. BERGOGLIO 2018: The Protective Role of Dormant Origins in Response to Replicative Stress. International Journal of Molecular Sciences 19 (11).

CRICKARD, J. B. & E. C. GREENE 2019: Helicase Mechanisms During Homologous Recombination in Saccharomyces cerevisiae. Annual review of biophysics 48: 255–273.

DAEE, D. L., E. FERRARI, S. LONGERICH, X. ZHENG, X. XUE, D. BRANZEI, P. SUNG & K. MYUNG 2012: Rad5-dependent DNA repair functions of the Saccharomyces cerevisiae FANCM protein homolog Mph1. The Journal of biological chemistry 287 (32): 26563–26575.

DAEE, D. L. & K. MYUNG 2012: Fanconi-like crosslink repair in yeast. Genome integrity 3 (1): 7.

DAIGAKU, Y., A. A. DAVIES & H. D. ULRICH 2010: Ubiquitin-dependent DNA damage bypass is separable from genome replication. Nature 465 (7300): 951–955.

DEANS, A. J. & S. C. WEST 2009: FANCM connects the genome instability disorders Bloom's Syndrome and Fanconi Anemia. Molecular cell 36 (6): 943–953.

DEANS, A. J. & S. C. WEST 2011: DNA interstrand crosslink repair and cancer. Nature reviews. Cancer 11 (7): 467–480.

DELAMARRE, A., A. BARTHE, C. de LA ROCHE SAINT-ANDRÉ, P. LUCIANO, R. FOREY, I. PADIOLEAU, M. SKRZYPCZAK, K. GINALSKI, V. GÉLI, P. PASERO & A. LENGRONNE 2020: MRX Increases Chromatin Accessibility at Stalled Replication Forks to Promote Nascent DNA Resection and Cohesin Loading. Molecular cell 77 (2): 395-410.e3.

DEPAMPHILIS, M. L. & P. M. WASSARMAN 1980: Replication of eukaryotic chromosomes: a close-up of the replication fork. Annual review of biochemistry 49: 627–666.

DEPHOURE, N., K. L. GOULD, S. P. GYGI & D. R. KELLOGG 2013: Mapping and analysis of phosphorylation sites: a quick guide for cell biologists. Molecular biology of the cell 24 (5): 535–542.

DEWAR, J. M. & J. C. WALTER 2017: Mechanisms of DNA replication termination. Nature Reviews Molecular Cell Biology 18 (8): 507–516.

DI CAPRIO, L. & B. S. COX 1981: DNA synthesis in UV-irradiated yeast. Mutation research 82 (1): 69–85.

DOMINGUES-SILVA, B., B. SILVA & C. M. AZZALIN 2019: ALTernative Functions for Human FANCM at Telomeres. Frontiers in molecular biosciences 6: 84.

DONNIANNI, R. A. & L. S. SYMINGTON 2013: Break-induced replication occurs by conservative DNA synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences 110 (33): 13475–13480.

DONNIANNI, R. A., Z.-X. ZHOU, S. A. LUJAN, A. AL-ZAIN, V. GARCIA, E. GLANCY, A. B. BURKHOLDER, T. A. KUNKEL & L. S. SYMINGTON 2019: DNA Polymerase Delta Synthesizes Both Strands during Break-Induced Replication. Molecular cell 76 (3): 371-381.e4.

DUMMER, A. M., Z. SU, R. CHERNEY, K. CHOI, J. DENU, X. ZHAO & C. A. FOX 2016: Binding of the Fkh1 Forkhead Associated Domain to a Phosphopeptide within the Mph1 DNA Helicase Regulates Mating-Type Switching in Budding Yeast. PLoS genetics 12 (6): e1006094.

EDE, C. 2009: Untersuchungen zur Funktion der Gene MPH1 und MMS2 aus Saccharomyces cerevisiae bei der fehlerfreien Umgehung von replikationsarretierenden Schäden. Dissertation, Georg-August-Universität.

EDE, C., C. J. RUDOLPH, S. LEHMANN, K. A. SCHÜRER & W. KRAMER 2011: Budding yeast Mph1 promotes sister chromatid interactions by a mechanism involving strand invasion. DNA repair 10 (1): 45–55.

EIGEN, M. & P. SCHUSTER 1977: The hypercycle. A principle of natural self-organization. Part A: Emergence of the hypercycle. Die Naturwissenschaften 64 (11): 541–565.

ENOIU, M., J. JIRICNY & O. D. SCHÄRER 2012: Repair of cisplatin-induced DNA interstrand crosslinks by a replication-independent pathway involving transcription-coupled repair and translesion synthesis. Nucleic acids research 40 (18): 8953–8964.

ENTIAN, K. D., T. SCHUSTER, J. H. HEGEMANN, D. BECHER, H. FELDMANN, U. GÜLDENER, R. GÖTZ, M. HANSEN, C. P. HOLLENBERG, G. JANSEN, W. KRAMER, S. KLEIN, P. KÖTTER, J. KRICKE, H. LAUNHARDT, G. MANNHAUPT, A. MAIERL, P. MEYER, W. MEWES, T. MUNDER, R. K. NIEDENTHAL, M. RAMEZANI RAD, A. RÖHMER, A. RÖMER & A. HINNEN 1999: Functional analysis of 150 deletion mutants in Saccharomyces cerevisiae by a systematic approach. Molecular & general genetics MGG 262 (4-5): 683–702.

FASULLO, M. T. & R. W. DAVIS 1987: Recombinational substrates designed to study recombination between unique and repetitive sequences in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84 (17): 6215–6219.

FERRI, D., D. ORIOLI & E. BOTTA 2020: Heterogeneity and overlaps in nucleotide excision repair disorders. Clinical genetics 97 (1): 12–24.

FIGLIOLI, G., A. KVIST, E. THAM, J. SOUKUPOVA, P. KLEIBLOVA, T. A. MURANEN, N. ANDRIEU, J. AZZOLLINI, J. BALMAÑA, A. BARROSO, J. BENÍTEZ, B. BERTELSEN, A. BLANCO, B. BONANNI, Å. BORG, J. BRUNET, D. CALISTRI, M. CALVELLO, S. CHVOJKA, L. CORTESI, E. DARDER, J. DEL VALLE, O. DIEZ, S. EON-MARCHAIS, F. FOSTIRA, F. GENSINI, C. HOUDAYER, M. JANATOVA, J. I. KIISKI, I. KONSTANTOPOULOU, K. KUBELKA-SABIT, C. LÁZARO, F. LESUEUR, S. MANOUKIAN, R. MARCINKUTE, U. MICKYS, V. MONCOUTIER, A. MYSZKA, T. NGUYEN-DUMONT, F. C. NIELSEN, R. NORVILAS, E. OLAH, A. OSORIO, L. PAPI, B. PEISSEL, A. PEIXOTO, D. PLASESKA-KARANFILSKA, T. PÓCZA, M. ROSSING, V. RUDAITIS, M. SANTAMARIÑA, C. SANTOS, S. SMICHKOSKA, M. C. SOUTHEY, D. STOPPA-LYONNET, M. TEIXEIRA, T. TÖRNGREN, A. TOSS, M. URIOSTE, A. VEGA, Z. VLCKOVA, D. YANNOUKAKOS, V. ZAMPIGA, Z. KLEIBL, P. RADICE, H. NEVANLINNA, H. EHRENCRONA, R. JANAVICIUS & P. PETERLONGO 2020: The Spectrum of FANCM Protein Truncating Variants in European Breast Cancer Cases. Cancers 12 (2).

FOUQUET, B., P. PAWLIKOWSKA, S. CABURET, C. GUIGON, M. MÄKINEN, L. TANNER, M. HIETALA, K. URBANSKA, L. BELLUTTI, B. LEGOIS, B. BESSIERES, A. GOUGEON, A. BENACHI, G. LIVERA, F. ROSSELLI, R. A. VEITIA & M. MISRAHI 2017: A homozygous FANCM mutation underlies a familial case of non-syndromic primary ovarian insufficiency. eLife 6.

FRIEDBERG, E. C., P. L. FISCHHABER & C. KISKER 2001: Error-Prone DNA Polymerases. Cell 107 (1): 9–12.

FROCK, R. L., C. SADEGHI, J. MENG & J. L. WANG 2021: DNA End Joining: G0-ing to the Core. Biomolecules 11 (10).

FU, Y. V., H. YARDIMCI, D. T. LONG, T. V. HO, A. GUAINAZZI, V. P. BERMUDEZ, J. HURWITZ, A. VAN OIJEN, O. D. SCHÄRER & J. C. WALTER 2011: Selective bypass of a lagging strand roadblock by the eukaryotic replicative DNA helicase. Cell 146 (6): 931–941.

FULLBRIGHT, G., H. B. RYCENGA, J. D. GRUBER & D. T. LONG 2016: p97 Promotes a Conserved Mechanism of Helicase Unloading during DNA Cross-Link Repair. Molecular and cellular biology 36 (23): 2983–2994.

FUMASONI, M., K. ZWICKY, F. VANOLI, M. LOPES & D. BRANZEI 2015: Error-free DNA damage tolerance and sister chromatid proximity during DNA replication rely on the Polα/Primase/Ctf4 Complex. Molecular cell 57 (5): 812–823.

FUTREAL, P. A., Q. LIU, D. SHATTUCK-EIDENS, C. COCHRAN, K. HARSHMAN, S. TAVTIGIAN, L. M. BENNETT, A. HAUGEN-STRANO, J. SWENSEN & Y. MIKI 1994: BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. Science (New York, N.Y.) 266 (5182): 120–122.

GAILLARD, H., T. GARCÍA-MUSE & A. AGUILERA 2015: Replication stress and cancer. Nature reviews. Cancer 15 (5): 276–289.

GARCÍA-GÓMEZ, S., A. REYES, M. I. MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, E. S. CHOCRÓN, S. MOURÓN, G. TERRADOS, C. POWELL, E. SALIDO, J. MÉNDEZ, I. J. HOLT & L. BLANCO 2013: PrimPol, an archaic primase/polymerase operating in human cells. Molecular cell 52 (4): 541–553.

GARCÍA-MUSE, T. & A. AGUILERA 2016: Transcription-replication conflicts: how they occur and how they are resolved. Nature Reviews Molecular Cell Biology 17 (9): 553–563.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, N., R. P. WONG & H. D. ULRICH 2018: The helicase Pif1 functions in the template switching pathway of DNA damage bypass. Nucleic Acids Res 46 (16): 8347–8356.

GARI, K., C. DÉCAILLET, M. DELANNOY, L. WU & A. CONSTANTINOU 2008a: Remodeling of DNA replication structures by the branch point translocase FANCM. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105 (42): 16107–16112.

GARI, K., C. DÉCAILLET, A. Z. STASIAK, A. STASIAK & A. CONSTANTINOU 2008b: The Fanconi anemia protein FANCM can promote branch migration of Holliday junctions and replication forks. Molecular cell 29 (1): 141–148.

GEORGESCU, R., Z. YUAN, L. BAI, R. de LUNA ALMEIDA SANTOS, J. SUN, D. ZHANG, O. YURIEVA, H. LI & M. E. O'DONNELL 2017: Structure of eukaryotic CMG helicase at a replication fork and implications to replisome architecture and origin initiation. Proceedings of the National Academy of Sciences 114 (5): E697-E706.

GIANNATTASIO, M., K. ZWICKY, C. FOLLONIER, M. FOIANI, M. LOPES & D. BRANZEI 2014: Visualization of recombination-mediated damage bypass by template switching. Nature structural & molecular biology 21 (10): 884–892.

GIETZ, R. & A. SUGINO 1988: New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. Gene 74 (2): 527–534.

GIGLIA-MARI, G., A. ZOTTER & W. VERMEULEN 2011: DNA damage response. Cold Spring Harbor perspectives in biology 3 (1): a000745.

GILLET, L. C. J. & O. D. SCHÄRER 2006: Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. Chemical reviews 106 (2): 253–276.

GONZÁLEZ-ACOSTA, D., E. BLANCO-ROMERO, P. UBIETO-CAPELLA, K. MUTREJA, S. MÍGUEZ, S. LLANOS, F. GARCÍA, J. MUÑOZ, L. BLANCO, M. LOPES & J. MÉNDEZ 2021: PrimPol-mediated repriming facilitates replication traverse of DNA interstrand crosslinks. The EMBO journal 40 (14): e106355.

GONZALEZ-HUICI, V., B. SZAKAL, M. URULANGODI, I. PSAKHYE, F. CASTELLUCCI, D. MENOLFI, E. RAJAKUMARA, M. FUMASONI, R. BERMEJO, S. JENTSCH & D. BRANZEI 2014: DNA bending facilitates the error-free DNA damage tolerance pathway and upholds genome integrity. EMBO J 33 (4): 327–340.

GOODMAN, L. S. & M. M. WINTROBE 1946: Nitrogen mustard therapy; use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. Journal of the American Medical Association 132: 126–132.

GORBALENYA, A. E. & E. V. KOONIN 1993: Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. Current opinion in structural biology 3 (3): 419–429.

GRIGAITIS, R., L. RANJHA, P. WILD, K. KASACIUNAITE, I. CEPPI, V. KISSLING, A. HENGGELER, A. SUSPERREGUI, M. PETER, R. SEIDEL, P. CEJKA & J. MATOS 2020: Phosphorylation of the RecQ Helicase Sgs1/BLM Controls Its DNA Unwinding Activity during Meiosis and Mitosis. Developmental cell 53 (6): 706-723.e5.

GROSSMANN, K. F., A. M. WARD, M. E. MATKOVIC, A. E. FOLIAS & R. E. MOSES 2001: S. cerevisiae has three pathways for DNA interstrand crosslink repair. Mutation Research/DNA Repair 487 (3-4): 73–83.

GUILLIAM, T. A. 2021: Mechanisms for Maintaining Eukaryotic Replisome Progression in the Presence of DNA Damage. Frontiers in molecular biosciences 8: 712971.

GUILLIAM, T. A. & A. J. DOHERTY 2017: PrimPol-Prime Time to Reprime. Genes 8 (1).

GUILLIAM, T. A. & J. T. P. YEELES 2020a: An updated perspective on the polymerase division of labor during eukaryotic DNA replication. Critical reviews in biochemistry and molecular biology 55 (5): 469–481.

GUILLIAM, T. A. & J. T. P. YEELES 2020b: Reconstitution of translesion synthesis reveals a mechanism of eukaryotic DNA replication restart. Nature structural & molecular biology 27 (5): 450–460.

HANAHAN, D. 1983: Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. Journal of molecular biology 166 (4): 557–580.

HARPER, J. W. & S. J. ELLEDGE 2007: The DNA damage response: ten years after. Molecular cell 28 (5): 739–745.

HARRISON, J. C. & J. E. HABER 2006: Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. Annual review of genetics 40: 209–235.

HEAPHY, C. M., A. P. SUBHAWONG, S.-M. HONG, M. G. GOGGINS, E. A. MONTGOMERY, E. GABRIELSON, G. J. NETTO, J. I. EPSTEIN, T. L. LOTAN, W. H. WESTRA, I.-M. SHIH, C. A. IACOBUZIO-DONAHUE, A. MAITRA, Q. K. LI, C. G. EBERHART, J. M. TAUBE, D. RAKHEJA, R. J. KURMAN, T. C. WU, R. B. RODEN, P. ARGANI, A. M. de MARZO, L. TERRACCIANO, M. TORBENSON & A. K. MEEKER 2011: Prevalence of the alternative lengthening of telomeres telomere maintenance mechanism in human cancer subtypes. The American journal of pathology 179 (4): 1608–1615.

HENRIQUES, J. A. & E. MOUSTACCHI 1980: Isolation and characterization of pso mutants sensitive to photo-addition of psoralen derivatives in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 95 (2): 273–288.

HIRA, A., H. YABE, K. YOSHIDA, Y. OKUNO, Y. SHIRAISHI, K. CHIBA, H. TANAKA, S. MIYANO, J. NAKAMURA, S. KOJIMA, S. OGAWA, K. MATSUO, M. TAKATA & M. YABE 2013: Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. Blood 122 (18): 3206–3209.

HIROTA, K., M. TSUDA, MOHIUDDIN, T. TSURIMOTO, I. S. COHEN, Z. LIVNEH, K. KOBAYASHI, T. NARITA, K. NISHIHARA, J. MURAI, S. IWAI, G. GUILBAUD, J. E. SALE & S. TAKEDA 2016: In vivo evidence for translesion synthesis by the replicative DNA polymerase δ. Nucleic Acids Res 44 (15): 7242–7250.

HODSKINSON, M. R., A. BOLNER, K. SATO, A. N. KAMIMAE-LANNING, K. ROOIJERS, M. WITTE, M. MAHESH, J. SILHAN, M. PETEK, D. M. WILLIAMS, J. KIND, J. W. CHIN, K. J. PATEL & P. KNIPSCHEER 2020: Alcohol-derived DNA crosslinks are repaired by two distinct mechanisms. Nature 579 (7800): 603–608.

HOEGE, C., B. PFANDER, G.-L. MOLDOVAN, G. PYROWOLAKIS & S. JENTSCH 2002: RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. Nature 419 (6903): 135–141.

HOEIJMAKERS, J. H. 2001: Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature 411 (6835): 366–374.

HOEIJMAKERS, J. H. J. 2009: DNA damage, aging, and cancer. The New England journal of medicine 361 (15): 1475–1485.

HOERR, R. E., K. NGO & K. L. FRIEDMAN 2021: When the Ends Justify the Means: Regulation of Telomere Addition at Double-Strand Breaks in Yeast. Frontiers in cell and developmental biology 9: 655377.

HOOGENBOOM, W. S., R. A. C. M. BOONEN & P. KNIPSCHEER 2019: The role of SLX4 and its associated nucleases in DNA interstrand crosslink repair. Nucleic Acids Res 47 (5): 2377–2388.

HU, Z., S. K. PERUMAL, H. YUE & S. J. BENKOVIC 2012: The human lagging strand DNA polymerase δ holoenzyme is distributive. The Journal of biological chemistry 287 (46): 38442–38448.

HU, Z., S. RAUCCI, M. JAQUENOUD, R. HATAKEYAMA, M. STUMPE, R. ROHR, F. REGGIORI, C. de VIRGILIO & J. DENGJEL 2019: Multilayered Control of Protein Turnover by TORC1 and Atg1. Cell reports 28 (13): 3486-3496.e6.

HUANG, D., B. D. PIENING, J. J. KENNEDY, C. LIN, C. W. JONES-WEINERT, P. YAN & A. G. PAULOVICH 2016: DNA Replication Stress Phosphoproteome Profiles Reveal Novel Functional Phosphorylation Sites on Xrs2 in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 203 (1): 353–368.

HUANG, J., S. LIU, M. A. BELLANI, A. K. THAZHATHVEETIL, C. LING, J. P. de WINTER, Y. WANG, W. WANG & M. M. SEIDMAN 2013: The DNA translocase FANCM/MHF promotes replication traverse of DNA interstrand crosslinks. Molecular cell 52 (3): 434–446.

HUANG, J., J. ZHANG, M. A. BELLANI, D. POKHAREL, J. GICHIMU, R. C. JAMES, H. GALI, C. LING, Z. YAN, D. XU, J. CHEN, A. R. MEETEI, L. LI, W. WANG & M. M. SEIDMAN 2019: Remodeling of Interstrand Crosslink Proximal Replisomes Is Dependent on ATR, FANCM, and FANCD2. Cell reports 27 (6): 1794-1808.e5.

HUANG, M., J. M. KIM, B. SHIOTANI, K. YANG, L. ZOU & A. D. D'ANDREA 2010: The FANCM/FAAP24 complex is required for the DNA interstrand crosslink-induced checkpoint response. Molecular cell 39 (2): 259–268.

HUEN, M. S. Y. & J. CHEN 2008: The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. Cell research 18 (1): 8–16.

HUNG, S.-H., R. P. WONG, H. D. ULRICH & C.-F. KAO 2017: Monoubiquitylation of histone H2B contributes to the bypass of DNA damage during and after DNA replication. Proceedings of the National Academy of Sciences 114 (11): E2205-E2214.

JAIN, S., N. SUGAWARA, A. MEHTA, T. RYU & J. E. HABER 2016: Sgs1 and Mph1 Helicases Enforce the Recombination Execution Checkpoint During DNA Double-Strand Break Repair in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 203 (2): 667–675.

JIRICNY, J. 2013: Postreplicative mismatch repair. Cold Spring Harbor perspectives in biology 5 (4): a012633.

JOHNSON, K. M., N. E. PRICE, J. WANG, M. I. FEKRY, S. DUTTA, D. R. SEINER, Y. WANG & K. S. GATES 2013: On the formation and properties of interstrand DNA-DNA cross-links forged by reaction of an abasic site with the opposing guanine residue of 5'-CAp sequences in duplex DNA. Journal of the American Chemical Society 135 (3): 1015–1025.

JOHNSON, R. E., M. T. WASHINGTON, L. HARACSKA, S. PRAKASH & L. PRAKASH 2000: Eukaryotic polymerases iota and zeta act sequentially to bypass DNA lesions. Nature 406 (6799): 1015–1019.

JØRGENSEN, S. W., S. E. LIBERTI, N. B. LARSEN, M. LISBY, H. W. MANKOURI & I. D. HICKSON 2019: Esc2 promotes telomere stability in response to DNA replication stress. Nucleic Acids Res 47 (9): 4597–4611.

KARRAS, G. I., M. FUMASONI, G. SIENSKI, F. VANOLI, D. BRANZEI & S. JENTSCH 2013: Noncanonical role of the 9-1-1 clamp in the error-free DNA damage tolerance pathway. Molecular cell 49 (3): 536–546.

KARRAS, G. I. & S. JENTSCH 2010: The RAD6 DNA damage tolerance pathway operates uncoupled from the replication fork and is functional beyond S phase. Cell 141 (2): 255–267.

KASAK, L., M. PUNAB, L. NAGIRNAJA, M. GRIGOROVA, A. MINAJEVA, A. M. LOPES, A. M. PUNAB, K. I. ASTON, F. CARVALHO, E. LAASIK, L. B. SMITH, D. F. CONRAD & M. LAAN 2018: Bi-allelic Recessive Loss-of-Function Variants in FANCM Cause Non-obstructive Azoospermia. American journal of human genetics 103 (2): 200–212.

KASTAN, M. B. & J. BARTEK 2004: Cell-cycle checkpoints and cancer. Nature 432 (7015): 316–323.

KELSALL, I. R., J. LANGENICK, C. MACKAY, K. J. PATEL & A. F. ALPI 2012: The Fanconi anaemia components UBE2T and FANCM are functionally linked to nucleotide excision repair. PloS one 7 (5): e36970.

KHAN, S. G., V. MUNIZ-MEDINA, T. SHAHLAVI, C. C. BAKER, H. INUI, T. UEDA, S. EMMERT, T. D. SCHNEIDER & K. H. KRAEMER 2002: The human XPC DNA repair gene: arrangement, splice site information content and influence of a single nucleotide polymorphism in a splice acceptor site on alternative splicing and function. Nucleic Acids Res 30 (16): 3624–3631.

KIISKI, J. I., L. M. PELTTARI, S. KHAN, E. S. FREYSTEINSDOTTIR, I. REYNISDOTTIR, S. N. HART, H. SHIMELIS, S. VILSKE, A. KALLIONIEMI, J. SCHLEUTKER, A. LEMINEN, R. BÜTZOW, C. BLOMQVIST, R. B. BARKARDOTTIR, F. J. COUCH, K. AITTOMÄKI & H. NEVANLINNA 2014: Exome sequencing identifies FANCM as a susceptibility gene for triple-negative breast cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111 (42): 15172–15177.

KIM, N. W., M. A. PIATYSZEK, K. R. PROWSE, C. B. HARLEY, M. D. WEST, P. L. HO, G. M. COVIELLO, W. E. WRIGHT, S. L. WEINRICH & J. W. SHAY 1994: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science (New York, N.Y.) 266 (5193): 2011–2015.

KIM, S. T., D. S. LIM, C. E. CANMAN & M. B. KASTAN 1999: Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. Journal of Biological Chemistry 274 (53): 37538–37543.

KIM, S.-B., I.-S. KIM, D.-M. YEUM & Y.-H. PARK 1991: Mutagenicity of Maillard reaction products from d-glucose-amino acid mixtures and possible roles of active oxygens in the mutagenicity. Mutation Research/DNA Repair 254 (1): 65–69.

KLAMPFL, T., A. HARUTYUNYAN, T. BERG, B. GISSLINGER, M. SCHALLING, K. BAGIENSKI, D. OLCAYDU, F. PASSAMONTI, E. RUMI, D. PIETRA, R. JÄGER, L. PIERI, P. GUGLIELMELLI, I. IACOBUCCI, G. MARTINELLI, M. CAZZOLA, A. M. VANNUCCHI, H. GISSLINGER & R. KRALOVICS 2011: Genome integrity of myeloproliferative neoplasms in chronic phase and during disease progression. Blood 118 (1): 167–176.

KLEIN, H. L., G. BAČINSKAJA, J. CHE, A. CHEBLAL, R. ELANGO, A. EPSHTEIN, D. M. FITZGERALD, B. GÓMEZ-GONZÁLEZ, S. R. KHAN, S. KUMAR, B. A. LELAND, L. MARIE, Q. MEI, J. MINÉ-HATTAB, A. PIOTROWSKA, E. J. POLLEYS, C. D. PUTNAM, E. A. RADCHENKO, A. A. SAADA, C. J. SAKOFSKY, E. Y. SHIM, M. STRACY, J. XIA, Z. YAN, Y. YIN, A. AGUILERA, J. L. ARGUESO, C. H. FREUDENREICH, S. M. GASSER, D. A. GORDENIN, J. E. HABER, G. IRA, S. JINKS-ROBERTSON, M. C. KING, R. D. KOLODNER, A. KUZMINOV, S. A. LAMBERT, S. E. LEE, K. M. MILLER, S. M. MIRKIN, T. D. PETES, S. M. ROSENBERG, R. ROTHSTEIN, L. S. SYMINGTON, P. ZAWADZKI, N. KIM, M. LISBY & A. MALKOVA 2019: Guidelines for DNA recombination and repair studies: Cellular assays of DNA repair pathways. Microbial cell (Graz, Austria) 6 (1): 1–64.

KLEIN DOUWEL, D., R. A. C. M. BOONEN, D. T. LONG, A. A. SZYPOWSKA, M. RÄSCHLE, J. C. WALTER & P. KNIPSCHEER 2014: XPF-ERCC1 acts in Unhooking DNA interstrand crosslinks in cooperation with FANCD2 and FANCP/SLX4. Molecular cell 54 (3): 460–471.

KNIJNENBURG, T. A., L. WANG, M. T. ZIMMERMANN, N. CHAMBWE, G. F. GAO, A. D. CHERNIACK, H. FAN, H. SHEN, G. P. WAY, C. S. GREENE, Y. LIU, R. AKBANI, B. FENG, L. A. DONEHOWER, C. MILLER, Y. SHEN, M. KARIMI, H. CHEN, P. KIM, P. JIA, E. SHINBROT, S. ZHANG, J. LIU, H. HU, M. H.

BAILEY, C. YAU, D. WOLF, Z. ZHAO, J. N. WEINSTEIN, L. LI, L. DING, G. B. MILLS, P. W. LAIRD, D. A. WHEELER, I. SHMULEVICH, R. J. MONNAT, Y. XIAO & C. WANG 2018: Genomic and Molecular Landscape of DNA Damage Repair Deficiency across The Cancer Genome Atlas. Cell reports 23 (1): 239-254.e6.

KNUDSON, A. G. 2001: Two genetic hits (more or less) to cancer. Nature reviews. Cancer 1 (2): 157–162.

KOCKLER, Z. W., B. OSIA, R. LEE, K. MUSMAKER & A. MALKOVA 2021: Repair of DNA Breaks by Break-Induced Replication. Annual review of biochemistry 90: 165–191.

KOMORI, K., R. FUJIKANE, H. SHINAGAWA & Y. ISHINO 2002: Novel endonuclease in Archaea cleaving DNA with various branched structure. Genes & genetic systems 77 (4): 227–241.

KOOL, E. T. 2002: Active site tightness and substrate fit in DNA replication. Annual review of biochemistry 71: 191–219.

KREJCI, L., V. ALTMANNOVA, M. SPIREK & X. ZHAO 2012: Homologous recombination and its regulation. Nucleic acids research 40 (13): 5795–5818.

KROGH, B. O. & L. S. SYMINGTON 2004: Recombination proteins in yeast. Annual review of genetics 38: 233–271.

KUANG, L., H. KOU, Z. XIE, Y. ZHOU, X. FENG, L. WANG & Z. WANG 2013: A non-catalytic function of Rev1 in translesion DNA synthesis and mutagenesis is mediated by its stable interaction with Rad5. DNA repair 12 (1): 27–37.

KUCHENBAECKER, K. B., J. L. HOPPER, D. R. BARNES, K.-A. PHILLIPS, T. M. MOOIJ, M.-J. ROOS-BLOM, S. JERVIS, F. E. VAN LEEUWEN, R. L. MILNE, N. ANDRIEU, D. E. GOLDGAR, M. B. TERRY, M. A. ROOKUS, D. F. EASTON, A. C. ANTONIOU, L. MCGUFFOG, D. G. EVANS, D. BARROWDALE, D. FROST, J. ADLARD, K.-R. ONG, L. IZATT, M. TISCHKOWITZ, R. EELES, R. DAVIDSON, S. HODGSON, S. ELLIS, C. NOGUES, C. LASSET, D. STOPPA-LYONNET, J.-P. FRICKER, L. FAIVRE, P. BERTHET, M. J. HOONING, L. E. VAN DER KOLK, C. M. KETS, M. A. ADANK, E. M. JOHN, W. K. CHUNG, I. L. ANDRULIS, M. SOUTHEY, M. B. DALY, S. S. BUYS, A. OSORIO, C. ENGEL, K. KAST, R. K. SCHMUTZLER, T. CALDES, A. JAKUBOWSKA, J. SIMARD, M. L. FRIEDLANDER, S.-A. MCLACHLAN, E. MACHACKOVA, L. FORETOVA, Y. Y. TAN, C. F. SINGER, E. OLAH, A.-M. GERDES, B. ARVER & H. OLSSON 2017: Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. JAMA 317 (23): 2402–2416.

KUNKEL, T. A. 1988: Exonucleolytic proofreading. Cell 53 (6): 837–840.

LAEMMLI, U. K. 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 (5259): 680–685.

LAFUENTE-BARQUERO, J., S. LUKE-GLASER, M. GRAF, S. SILVA, B. GÓMEZ-GONZÁLEZ, A. LOCKHART, M. LISBY, A. AGUILERA & B. LUKE 2017: The Smc5/6 complex regulates the yeast Mph1 helicase at RNA-DNA hybrid-mediated DNA damage. PLoS Genet 13 (12): e1007136.

LAGE, C., M. de PÁDULA, T. A. M. de ALENCAR, S. R. DA FONSECA GONÇALVES, L. DA SILVA VIDAL, J. CABRAL-NETO & A. C. LEITÃO 2003: New insights on how nucleotide excision repair could remove DNA adducts induced by chemotherapeutic agents and psoralens plus UV-A (PUVA) in Escherichia coli cells. Mutation research 544 (2-3): 143–157.

LANGEVIN, F., G. P. CROSSAN, I. V. ROSADO, M. J. ARENDS & K. J. PATEL 2011: Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. Nature 475 (7354): 53–58.

LANZ, M. C., K. YUGANDHAR, S. GUPTA, E. J. SANFORD, V. M. FAÇA, S. VEGA, A. M. N. JOINER, J. C. FROMME, H. YU & M. B. SMOLKA 2021: In-depth and 3-dimensional exploration of the budding yeast phosphoproteome. EMBO reports 22 (2): e51121.

LAWRENCE, C. W. 2002: Cellular roles of DNA polymerase ζ and Rev1 protein. DNA repair 1 (6): 425–435.

LEA, D. E. & C. A. COULSON 1949: The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. Journal of genetics 49 (3): 264–285.

LEE, A. T. & A. CERAMI 1987: Elevated glucose 6-phosphate levels are associated with plasmid mutations in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84 (23): 8311–8314.

LEHMANN, A. R. 1972: Postreplication repair of DNA in ultraviolet-irradiated mammalian cells. Journal of molecular biology 66 (3): 319–337.

LEHMANN, C. P., A. JIMÉNEZ-MARTÍN, D. BRANZEI & J. A. TERCERO 2020: Prevention of unwanted recombination at damaged replication forks. Curr Genet 66 (6): 1045–1051.

LEHMANN, J., S. SCHUBERT, C. SEEBODE, A. APEL, A. OHLENBUSCH & S. EMMERT 2018a: Splice variants of the endonucleases XPF and XPG contain residual DNA repair capabilities and could be a valuable tool for personalized medicine. Oncotarget 9 (1): 1012–1027.

LEHMANN, J., C. SEEBODE, M. C. MARTENS & S. EMMERT 2018b: Xeroderma Pigmentosum - Facts and Perspectives. Anticancer Research 38 (2): 1159–1164.

LEHMANN, J., C. SEEBODE, S. SMOLORZ, S. SCHUBERT & S. EMMERT 2017: XPF knockout via CRISPR/Cas9 reveals that ERCC1 is retained in the cytoplasm without its heterodimer partner XPF. Cellular and Molecular Life Sciences 74 (11): 2081–2094.

LEHOCZKÝ, P., P. J. MCHUGH & M. CHOVANEC 2007: DNA interstrand cross-link repair in Saccharomyces cerevisiae. FEMS microbiology reviews 31 (2): 109–133.

LERNER, L. K. & J. E. SALE 2019: Replication of G Quadruplex DNA. Genes 10 (2).

LI, N., J. WANG, S. S. WALLACE, J. CHEN, J. ZHOU & A. D. D'ANDREA 2020: Cooperation of the NEIL3 and Fanconi anemia/BRCA pathways in interstrand crosslink repair. Nucleic Acids Res 48 (6): 3014–3028.

LI, Z., A. H. PEARLMAN & P. HSIEH 2016: DNA mismatch repair and the DNA damage response. DNA repair 38: 94–101.

LIANG, C.-C. & M. A. COHN 2016: UHRF1 is a sensor for DNA interstrand crosslinks. Oncotarget 7 (1): 3–4.

LIEFSHITZ, B., R. STEINLAUF, A. FRIEDL, F. ECKARDT-SCHUPP & M. KUPIEC 1998: Genetic interactions between mutants of the `error-prone' repair group of Saccharomyces cerevisiae and their effect on recombination and mutagenesis. Mutation Research/DNA Repair 407 (2): 135–145.

LINDAHL, T. 1993: Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature 362 (6422): 709–715.

LINKE, R., M. LIMMER, S. A. JURANEK, A. HEINE & K. PAESCHKE 2021: The Relevance of G-Quadruplexes for DNA Repair. International Journal of Molecular Sciences 22 (22).

LITWIN, I., T. BAKOWSKI, B. SZAKAL, E. PILARCZYK, E. MACIASZCZYK-DZIUBINSKA, D. BRANZEI & R. WYSOCKI 2018: Error-free DNA damage tolerance pathway is facilitated by the Irc5 translocase through cohesin. EMBO J 37 (18).

LIU, D., J. M. BROCKMAN, B. DASS, L. N. HUTCHINS, P. SINGH, J. R. MCCARREY, C. C. MACDONALD & J. H. GRABER 2007: Systematic variation in mRNA 3'-processing signals during mouse spermatogenesis. Nucleic Acids Res 35 (1): 234–246.

LIU, S. & Y. WANG 2013: A quantitative mass spectrometry-based approach for assessing the repair of 8-methoxypsoralen-induced DNA interstrand cross-links and monoadducts in mammalian cells. Analytical chemistry 85 (14): 6732–6739.

LOEWITH, R., E. JACINTO, S. WULLSCHLEGER, A. LORBERG, J. L. CRESPO, D. BONENFANT, W. OPPLIGER, P. JENOE & M. N. HALL 2002: Two TOR Complexes, Only One of which Is Rapamycin Sensitive, Have Distinct Roles in Cell Growth Control. Molecular cell 10 (3): 457–468.

LONG, D. T., V. JOUKOV, M. BUDZOWSKA & J. C. WALTER 2014: BRCA1 promotes unloading of the CMG helicase from a stalled DNA replication fork. Molecular cell 56 (1): 174–185.

LOPES, T. S., G.-J. A. HAKKAART, B. L. KOERTS, H. A. RAUÉ & R. J. PLANTA 1991: Mechanism of high-copy-number integration of pMIRY-type vectors into the ribosomal DNA of Saccharomyces cerevisiae. Gene 105 (1): 83–90.

LOPEZ-MARTINEZ, D., C.-C. LIANG & M. A. COHN 2016: Cellular response to DNA interstrand crosslinks: the Fanconi anemia pathway. Cellular and molecular life sciences CMLS 73 (16): 3097–3114.

LU, R., J. J. O'ROURKE, A. P. SOBINOFF, J. A. M. ALLEN, C. B. NELSON, C. G. TOMLINSON, M. LEE, R. R. REDDEL, A. J. DEANS & H. A. PICKETT 2019: The FANCM-BLM-TOP3A-RMI complex suppresses alternative lengthening of telomeres (ALT). Nature communications 10 (1): 2252.

LUJAN, S. A., J. S. WILLIAMS & T. A. KUNKEL 2016: DNA Polymerases Divide the Labor of Genome Replication. Trends in cell biology 26 (9): 640–654.

LUKAS, C., V. SAVIC, S. BEKKER-JENSEN, C. DOIL, B. NEUMANN, R. S. PEDERSEN, M. GRØFTE, K. L. CHAN, I. D. HICKSON, J. BARTEK & J. LUKAS 2011: 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. Nature cell biology 13 (3): 243–253.

LUKE-GLASER, S. & B. LUKE 2012: The Mph1 helicase can promote telomere uncapping and premature senescence in budding yeast. PloS one 7 (7): e42028.

LURIA, S. E. & M. DELBRÜCK 1943: Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. Genetics 28 (6): 491–511.

LUTZ, C. S. & A. MOREIRA 2011: Alternative mRNA polyadenylation in eukaryotes: an effective regulator of gene expression. WIREs RNA 2 (1): 22–31.

MACGILVRAY, M. E., E. SHISHKOVA, M. PLACE, E. R. WAGNER, J. J. COON & A. P. GASCH 2020: Phosphoproteome Response to Dithiothreitol Reveals Unique Versus Shared Features of Saccharomyces cerevisiae Stress Responses. Journal of proteome research 19 (8): 3405–3417.

MARINOV, G. K., B. A. WILLIAMS, K. MCCUE, G. P. SCHROTH, J. GERTZ, R. M. MYERS & B. J. WOLD 2014: From single-cell to cell-pool transcriptomes: stochasticity in gene expression and RNA splicing. Genome Res. 24 (3): 496–510.

MARTEIJN, J. A., H. LANS, W. VERMEULEN & J. H. J. HOEIJMAKERS 2014: [Duplikat] Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. Nature Reviews Molecular Cell Biology 15 (7): 465–481.

MARTENS, M. C., S. EMMERT & L. BOECKMANN 2021: Xeroderma Pigmentosum: Gene Variants and Splice Variants. Genes 12 (8).

MATSUOKA, S., B. A. BALLIF, A. SMOGORZEWSKA, E. R. MCDONALD, K. E. HUROV, J. LUO, C. E. BAKALARSKI, Z. ZHAO, N. SOLIMINI, Y. LERENTHAL, Y. SHILOH, S. P. GYGI & S. J. ELLEDGE 2007: ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. Science (New York, N.Y.) 316 (5828): 1160–1166.

MAZÓN, G. & L. S. SYMINGTON 2013: Mph1 and Mus81-Mms4 prevent aberrant processing of mitotic recombination intermediates. Molecular cell 52 (1): 63–74.

MCHUGH, P. J., T. A. WARD & M. CHOVANEC 2012: A prototypical Fanconi anemia pathway in lower eukaryotes? Cell cycle (Georgetown, Tex.) 11 (20): 3739–3744.

MEETEI, A. R., A. L. MEDHURST, C. LING, Y. XUE, T. R. SINGH, P. BIER, J. STELTENPOOL, S. STONE, I. DOKAL, C. G. MATHEW, M. HOATLIN, H. JOENJE, J. P. de WINTER & W. WANG 2005: A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. Nature genetics 37 (9): 958–963.

MEETEI, A. R., J. P. de WINTER, A. L. MEDHURST, M. WALLISCH, Q. WAISFISZ, H. J. VAN DE VRUGT, A. B. OOSTRA, Z. YAN, C. LING, C. E. BISHOP, M. E. HOATLIN, H. JOENJE & W. WANG 2003: A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. Nat Genet 35 (2): 165–170.

MEHTA, A., A. BEACH & J. E. HABER 2017: Homology Requirements and Competition between Gene Conversion and Break-Induced Replication during Double-Strand Break Repair. Molecular cell 65 (3): 515-526.e3.

MEHTA, A. & J. E. HABER 2014: Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. Cold Spring Harbor perspectives in biology 6 (9): a016428.

MENG, X. & X. ZHAO 2017: Replication fork regression and its regulation. FEMS yeast research 17 (1).

MENOLFI, D., A. DELAMARRE, A. LENGRONNE, P. PASERO & D. BRANZEI 2015: Essential Roles of the Smc5/6 Complex in Replication through Natural Pausing Sites and Endogenous DNA Damage Tolerance. Molecular cell 60 (6): 835–846.

MEYN III, M. A., P. G. MELLOY, J. LI & S. L. HOLLOWAY 2002: The destruction box of the cyclin Clb2 binds the anaphase-promoting complex/cyclosome subunit Cdc23. Archives of biochemistry and biophysics 407 (2): 189–195.

MIJIC, S., R. ZELLWEGER, N. CHAPPIDI, M. BERTI, K. JACOBS, K. MUTREJA, S. URSICH, A. RAY CHAUDHURI, A. NUSSENZWEIG, P. JANSCAK & M. LOPES 2017: Replication fork reversal triggers fork degradation in BRCA2-defective cells. Nat Commun 8 (1): 859.

MILLETTI, G., L. STROCCHIO, D. PAGLIARA, K. GIRARDI, R. CARTA, A. MASTRONUZZI, F. LOCATELLI & F. NAZIO 2020: Canonical and Noncanonical Roles of Fanconi Anemia Proteins: Implications in Cancer Predisposition. Cancers 12 (9).

MITCHEL, K., K. LEHNER & S. JINKS-ROBERTSON 2013: Heteroduplex DNA position defines the roles of the Sgs1, Srs2, and Mph1 helicases in promoting distinct recombination outcomes. PLoS genetics 9 (3): e1003340.

MJELLE, R., S. A. HEGRE, P. A. AAS, G. SLUPPHAUG, F. DRABLØS, P. SÆTROM & H. E. KROKAN 2015: Cell cycle regulation of human DNA repair and chromatin remodeling genes. DNA repair 30: 53–67.

MOLDOVAN, G.-L., B. PFANDER & S. JENTSCH 2007: PCNA, the maestro of the replication fork. Cell 129 (4): 665–679.

MOTNENKO, A., C.-C. LIANG, DI YANG, D. LOPEZ-MARTINEZ, Y. YOSHIKAWA, B. ZHAN, K. E. WARD, J. TIAN, W. HAAS, P. SPINGARDI, B. M. KESSLER, S. KRIAUCIONIS, S. P. GYGI & M. A. COHN 2018: Identification of UHRF2 as a novel DNA interstrand crosslink sensor protein. PLoS Genet 14 (10): e1007643.

MUÑOZ, S. & J. MÉNDEZ 2017: DNA replication stress: from molecular mechanisms to human disease. Chromosoma 126 (1): 1–15.

NIJMAN, S. M. B., T. T. HUANG, A. M. G. DIRAC, T. R. BRUMMELKAMP, R. M. KERKHOVEN, A. D. D'ANDREA & R. BERNARDS 2005: The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. Molecular cell 17 (3): 331–339.

NIRAJ, J., A. FÄRKKILÄ & A. D. D'ANDREA 2019: The Fanconi Anemia Pathway in Cancer. Annual review of cancer biology 3: 457–478.

NISHINO, T., K. KOMORI, Y. ISHINO & K. MORIKAWA 2005: Structural and functional analyses of an archaeal XPF/Rad1/Mus81 nuclease: asymmetric DNA binding and cleavage mechanisms. Structure (London, England 1993) 13 (8): 1183–1192.

NOUSPIKEL, T. 2009: DNA repair in mammalian cells Nucleotide excision repair: variations on versatility. Cellular and Molecular Life Sciences 66 (6): 994–1009.

O'DONNELL, M., L. LANGSTON & B. STILLMAN 2013: Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. Cold Spring Harbor perspectives in biology 5 (7).

O'ROURKE, J. J., R. BYTHELL-DOUGLAS, E. A. DUNN & A. J. DEANS 2019: ALT control, delete: FANCM as an anti-cancer target in Alternative Lengthening of Telomeres. Nucleus (Austin, Tex.) 10 (1): 221–230.

ORR-WEAVER, T. L. & J. W. SZOSTAK 1983: Multiple, tandem plasmid integration in Saccharomyces cerevisiae. Molecular and cellular biology 3 (4): 747–749.

ORR-WEAVER, T. L., J. W. SZOSTAK & R. J. ROTHSTEIN 1981: Yeast transformation: a model system for the study of recombination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 78 (10): 6354–6358.

OTA, T., Y. SUZUKI, T. NISHIKAWA, T. OTSUKI, T. SUGIYAMA, R. IRIE, A. WAKAMATSU, K. HAYASHI, H. SATO, K. NAGAI, K. KIMURA, H. MAKITA, M. SEKINE, M. OBAYASHI, T. NISHI, T. SHIBAHARA, T. TANAKA, S. ISHII, J. YAMAMOTO, K. SAITO, Y. KAWAI, Y. ISONO, Y. NAKAMURA, K. NAGAHARI, K. MURAKAMI, T. YASUDA, T. IWAYANAGI, M. WAGATSUMA, A. SHIRATORI, H. SUDO, T. HOSOIRI, Y. KAKU, H. KODAIRA, H. KONDO, M. SUGAWARA, M. TAKAHASHI, K. KANDA, T. YOKOI, T. FURUYA, E. KIKKAWA, Y. OMURA, K. ABE, K. KAMIHARA, N. KATSUTA, K. SATO, M. TANIKAWA, M. YAMAZAKI, K. NINOMIYA, T. ISHIBASHI, H. YAMASHITA, K. MURAKAWA, K. FUJIMORI, H. TANAI, M. KIMATA, M. WATANABE, S. HIRAOKA, Y. CHIBA, S. ISHIDA, Y. ONO, S. TAKIGUCHI, S. WATANABE, M. YOSIDA, T. HOTUTA, J. KUSANO, K. KANEHORI, A. TAKAHASHI-FUJII, H. HARA, T. TANASE, Y. NOMURA, S. TOGIYA, F. KOMAI, R. HARA, K. TAKEUCHI, M. ARITA, N. IMOSE, K. MUSASHINO, H. YUUKI, A. OSHIMA, N. SASAKI, S. AOTSUKA, Y. YOSHIKAWA, H. MATSUNAWA, T. ICHIHARA, N. SHIOHATA, S. SANO, S. MORIYA, H. MOMIYAMA, N. SATOH, S. TAKAMI, Y. TERASHIMA, O. SUZUKI, S. NAKAGAWA, A. SENOH, H. MIZOGUCHI, Y. GOTO, F. SHIMIZU, H. WAKEBE, H. HISHIGAKI, T. WATANABE, A. SUGIYAMA, M. TAKEMOTO, B. KAWAKAMI, M. YAMAZAKI, K. WATANABE, A. KUMAGAI, S. ITAKURA, Y. FUKUZUMI, Y. FUJIMORI, M. KOMIYAMA, H. TASHIRO, A. TANIGAMI, T. FUJIWARA, T. ONO, K. YAMADA, Y. FUJII, K. OZAKI, M. HIRAO, Y. OHMORI, A. KAWABATA, T. HIKIJI, N. KOBATAKE, H. INAGAKI, Y. IKEMA, S. OKAMOTO, R. OKITANI, T. KAWAKAMI, S. NOGUCHI, T. ITOH, K. SHIGETA, T. SENBA, K. MATSUMURA, Y. NAKAJIMA, T. MIZUNO, M. MORINAGA, M. SASAKI, T. TOGASHI, M. OYAMA, H. HATA, M. WATANABE, T. KOMATSU, J. MIZUSHIMA-SUGANO, T. SATOH, Y. SHIRAI, Y. TAKAHASHI, K. NAKAGAWA, K. OKUMURA, T. NAGASE, N. NOMURA, H. KIKUCHI, Y. MASUHO, R. YAMASHITA, K. NAKAI, T. YADA, Y. NAKAMURA, O. OHARA, T. ISOGAI & S. SUGANO 2004: Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. Nat Genet 36 (1): 40–45.

PAGES, V., R. JANEL-BINTZ & R. P. FUCHS 2005: Pol III proofreading activity prevents lesion bypass as evidenced by its molecular signature within E.coli cells. Journal of molecular biology 352 (3): 501–509.

PALANCADE, B. & R. ROTHSTEIN 2021: The Ultimate (Mis)match: When DNA Meets RNA. Cells 10 (6).

PAN, Q., O. SHAI, L. J. LEE, B. J. FREY & B. J. BLENCOWE 2008: Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. Nat Genet 40 (12): 1413–1415.

PAN, X., W. C. DROSOPOULOS, L. SETHI, A. MADIREDDY, C. L. SCHILDKRAUT & D. ZHANG 2017: FANCM, BRCA1, and BLM cooperatively resolve the replication stress at the ALT telomeres. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 114 (29): E5940-E5949.

PANZARINO, N. J., J. J. KRAIS, K. CONG, M. PENG, M. MOSQUEDA, S. U. NAYAK, S. M. BOND, J. A. CALVO, M. B. DOSHI, M. BERE, J. OU, B. DENG, L. J. ZHU, N. JOHNSON & S. B. CANTOR 2021: Replication Gaps Underlie BRCA Deficiency and Therapy Response. Cancer research 81 (5): 1388–1397.

PAULOVICH, A. G. & L. H. HARTWELL 1995: A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in S. cerevisiae in Response to DNA damage. Cell 82 (5): 841–847.

PAULSEN, M. T., A. VELOSO, J. PRASAD, K. BEDI, E. A. LJUNGMAN, B. MAGNUSON, T. E. WILSON & M. LJUNGMAN 2014: Use of Bru-Seq and BruChase-Seq for genome-wide assessment of the synthesis and stability of RNA. Methods (San Diego, Calif.) 67 (1): 45–54.

PEÑA-DIAZ, J. & J. JIRICNY 2012: Mammalian mismatch repair: error-free or error-prone? Trends in biochemical sciences 37 (5): 206–214.

PENG, X. P., S. LIM, S. LI, L. MARJAVAARA, A. CHABES & X. ZHAO 2018: Acute Smc5/6 depletion reveals its primary role in rDNA replication by restraining recombination at fork pausing sites. PLoS Genet 14 (1): e1007129.

PENG, Y. & H. PEI 2021: DNA alkylation lesion repair: outcomes and implications in cancer chemotherapy. Journal of Zhejiang University. Science. B 22 (1): 47–62.

PETERLONGO, P., I. CATUCCI, M. COLOMBO, L. CALECA, E. MUCAKI, M. BOGLIOLO, M. MARIN, F. DAMIOLA, L. BERNARD, V. PENSOTTI, S. VOLORIO, V. DALL'OLIO, A. MEINDL, C. BARTRAM, C. SUTTER, H. SUROWY, V. SORNIN, M.-G. DONDON, S. EON-MARCHAIS, D. STOPPA-LYONNET, N. ANDRIEU, O. M. SINILNIKOVA, G. MITCHELL, P. A. JAMES, E. THOMPSON, M. MARCHETTI, C. VERZEROLI, C. TARTARI, G. L. CAPONE, A. L. PUTIGNANO, M. GENUARDI, V. MEDICI, I. MARCHI, M. FEDERICO, S. TOGNAZZO, L. MATRICARDI, S. AGATA, R. DOLCETTI, L. DELLA PUPPA, G. CINI, V. GISMONDI, V. VIASSOLO, C. PERFUMO, M. A. MENCARELLI, M. BALDASSARRI, B. PEISSEL, G. ROVERSI, V. SILVESTRI, P. RIZZOLO, F. SPINA, C. VIVANET, M. G. TIBILETTI, M. A. CALIGO, G. GAMBINO, S. TOMMASI, B. PILATO, C. TONDINI, C. CORNA, B. BONANNI, M. BARILE, A. OSORIO, J. BENITEZ, L. BALESTRINO, L. OTTINI, S. MANOUKIAN, M. A. PIEROTTI, A. RENIERI, L. VARESCO, F. J. COUCH, X. WANG, P. DEVILEE, F. S. HILBERS, C. J. VAN ASPEREN, A. VIEL, M. MONTAGNA, L. CORTESI, O. DIEZ, J. BALMAÑA, J. HAUKE, R. K. SCHMUTZLER, L. PAPI, M. A. PUJANA, C. LÁZARO, A. FALANGA, K. OFFIT, J. VIJAI, I. CAMPBELL, B. BURWINKEL, A. KVIST, H. EHRENCRONA, S. MAZOYER, S. PIZZAMIGLIO, P. VERDERIO, J. SURRALLES, P. K. ROGAN & P. RADICE 2015: FANCM c.5791CT nonsense mutation (rs144567652) induces exon skipping, affects DNA repair activity and is a familial breast cancer risk factor. Human molecular genetics 24 (18): 5345–5355.

PETERLONGO, P., G. FIGLIOLI, A. J. DEANS & F. J. COUCH 2021: Protein truncating variants in FANCM and risk for ER-negative/triple negative breast cancer. NPJ breast cancer 7 (1): 130.

PETRINI, J. H., D. A. BRESSAN & M. S. YAO 1997: The RAD52 epistasis group in mammalian double strand break repair. Seminars in immunology 9 (3): 181–188.

PFAFFL, M. W. 2001: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29 (9): e45.

PFANDER, B., G.-L. MOLDOVAN, M. SACHER, C. HOEGE & S. JENTSCH 2005: SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. Nature 436 (7049): 428–433.

PHAM, N., Z. YAN, Y. YU, M. FARIA AFREEN, A. MALKOVA, J. E. HABER & G. IRA 2021: Mechanisms restraining break-induced replication at two-ended DNA double-strand breaks. EMBO J 40 (10): e104847.

PIAZZA, A., W. D. WRIGHT & W.-D. HEYER 2017: Multi-invasions Are Recombination Byproducts that Induce Chromosomal Rearrangements. Cell 170 (4): 760-773.e15.

PLESSIS, A. & B. DUJON 1993: Multiple tandem integrations of transforming DNA sequences in yeast chromosomes suggest a mechanism for integrative transformation by homologous recombination. Gene 134 (1): 41–50.

POMMIER, Y. 2006: Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. Nature reviews. Cancer 6 (10): 789–802.

POMMIER, Y., P. POURQUIER, Y. FAN & D. STRUMBERG 1998: Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression 1400 (1-3): 83–106.

PRAKASH, L. 1981: Characterization of postreplication repair in Saccharomyces cerevisiae and effects of rad6, rad18, rev3 and rad52 mutations. Molecular & general genetics MGG 184 (3): 471–478.

PRAKASH, R., L. KREJCI, S. VAN KOMEN, K. ANKE SCHÜRER, W. KRAMER & P. SUNG 2005: Saccharomyces cerevisiae MPH1 gene, required for homologous recombination-mediated mutation avoidance, encodes a 3' to 5' DNA helicase. The Journal of biological chemistry 280 (9): 7854–7860.

PRAKASH, R., D. SATORY, E. DRAY, A. PAPUSHA, J. SCHELLER, W. KRAMER, L. KREJCI, H. KLEIN, J. E. HABER, P. SUNG & G. IRA 2009: Yeast Mph1 helicase dissociates Rad51-made D-loops: implications for crossover control in mitotic recombination. Genes & development 23 (1): 67–79.

PRICE, N. E., K. M. JOHNSON, J. WANG, M. I. FEKRY, Y. WANG & K. S. GATES 2014: Interstrand DNA-DNA cross-link formation between adenine residues and abasic sites in duplex DNA. Journal of the American Chemical Society 136 (9): 3483–3490.

PROTIĆ-SABLJIĆ, M. & K. H. KRAEMER 1985: One pyrimidine dimer inactivates expression of a transfected gene in xeroderma pigmentosum cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82 (19): 6622–6626.

QUINET, A., S. TIRMAN, J. JACKSON, S. ŠVIKOVIĆ, D. LEMAÇON, D. CARVAJAL-MALDONADO, D. GONZÁLEZ-ACOSTA, A. T. VESSONI, E. CYBULLA, M. WOOD, S. TAVIS, L. F. Z. BATISTA, J. MÉNDEZ, J. E. SALE & A. VINDIGNI 2020: PRIMPOL-Mediated Adaptive Response Suppresses Replication Fork Reversal in BRCA-Deficient Cells. Molecular cell 77 (3): 461-474.e9.

RAJSKI, S. R. & R. M. WILLIAMS 1998: DNA Cross-Linking Agents as Antitumor Drugs. Chemical reviews 98 (8): 2723–2796.

RAMOTAR, D., E. BELANGER, I. BRODEUR, J. Y. MASSON & E. A. DROBETSKY 1998: A yeast homologue of the human phosphotyrosyl phosphatase activator PTPA is implicated in protection against oxidative DNA damage induced by the model carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. Journal of Biological Chemistry 273 (34): 21489–21496.

RÄSCHLE, M., P. KNIPSCHEER, P. KNIPSHEER, M. ENOIU, T. ANGELOV, J. SUN, J. D. GRIFFITH, T. E. ELLENBERGER, O. D. SCHÄRER & J. C. WALTER 2008: Mechanism of replication-coupled DNA interstrand crosslink repair. Cell 134 (6): 969–980.

RENAUDIN, X. & F. ROSSELLI 2020: The FANC/BRCA Pathway Releases Replication Blockades by Eliminating DNA Interstrand Cross-Links. Genes 11 (5).

RENAUD-YOUNG, M., D. C. LLOYD, K. CHATFIELD-REED, I. GEORGE, G. CHUA & J. COBB 2015: The NuA4 complex promotes translesion synthesis (TLS)-mediated DNA damage tolerance. Genetics 199 (4): 1065–1076.

RICKMAN, K. A., F. P. LACH, A. ABHYANKAR, F. X. DONOVAN, E. M. SANBORN, J. A. KENNEDY, C. SOUGNEZ, S. B. GABRIEL, O. ELEMENTO, S. C. CHANDRASEKHARAPPA, D. SCHINDLER, A. D. AUERBACH & A. SMOGORZEWSKA 2015: Deficiency of UBE2T, the E2 Ubiquitin Ligase Necessary for FANCD2 and FANCI Ubiquitination, Causes FA-T Subtype of Fanconi Anemia. Cell reports 12 (1): 35–41.

ROBERTSON, A. B., A. KLUNGLAND, T. ROGNES & I. LEIROS 2009: DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. Cellular and molecular life sciences CMLS 66 (6): 981–993.

ROGERS, C. M., C.-Y. LEE, S. PARKINS, N. J. BUEHLER, S. WENZEL, F. MARTÍNEZ-MÁRQUEZ, Y. TAKAGI, S. MYONG & M. L. BOCHMAN 2020a: The yeast Hrq1 helicase stimulates Pso2 translesion nuclease activity and thereby promotes DNA interstrand crosslink repair. The Journal of biological chemistry 295 (27): 8945–8957.

ROGERS, C. M., R. H. SIMMONS III, G. E. FLUHLER THORNBURG, N. J. BUEHLER & M. L. BOCHMAN 2020b: Fanconi anemia-independent DNA inter-strand crosslink repair in eukaryotes. Progress in biophysics and molecular biology 158: 33–46.

ROHLEDER, F., J. HUANG, Y. XUE, J. KUPER, A. ROUND, M. SEIDMAN, W. WANG & C. KISKER 2016: FANCM interacts with PCNA to promote replication traverse of DNA interstrand crosslinks. Nucleic acids research 44 (7): 3219–3232.

ROSE, M. & F. WINSTON 1984: Identification of a Ty insertion within the coding sequence of the S. cerevisiae URA3 gene. Molecular & general genetics MGG 193 (3): 557–560.

ROSENBERG, P. S., M. H. GREENE & B. P. ALTER 2003: Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. Blood 101 (3): 822–826.

ROSENBERG, P. S., H. TAMARY & B. P. ALTER 2011: How high are carrier frequencies of rare recessive syndromes? Contemporary estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel. American journal of medical genetics. Part A 155A (8): 1877–1883.

RUDOLPH, C. 2003: Untersuchungen zur Rolle des MPH1-Gens aus Saccharomyces cerevisiae bei der Reinitiation der Replikation nach schadensinduzierten Arresten. Dissertation, Georg-August-Universität.

RUDOLPH, C. J., P. DHILLON, T. MOORE & R. G. LLOYD 2007: Avoiding and resolving conflicts between DNA replication and transcription. DNA repair 6 (7): 981–993.

RUPP, W., C. E. WILDE, D. L. RENO & P. HOWARD-FLANDERS 1971: Exchanges between DNA strands in ultraviolet-irradiated Escherichia coli. Journal of molecular biology 61 (1): 25–44.

SAINI, N., S. RAMAKRISHNAN, R. ELANGO, S. AYYAR, Y. ZHANG, A. DEEM, G. IRA, J. E. HABER, K. S. LOBACHEV & A. MALKOVA 2013: Migrating bubble during break-induced replication drives conservative DNA synthesis. Nature 502 (7471): 389–392.

SALE, J. E., A. R. LEHMANN & R. WOODGATE 2012: Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. Nature Reviews Molecular Cell Biology 13 (3): 141–152.

SANCAR, A. 2003: Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. Chemical reviews 103 (6): 2203–2237.

SANCHEZ, A., D. LEE, D. in KIM & K. M. MILLER 2021: Making Connections: Integrative Signaling Mechanisms Coordinate DNA Break Repair in Chromatin. Frontiers in genetics 12: 747734.

SANDELL, L. 1993: Loss of a yeast telomere: Arrest, recovery, and chromosome loss. Cell 75 (4): 729–739.

SANDHU, R., F. MONGE NERIA, J. MONGE NERIA, X. CHEN, N. M. HOLLINGSWORTH & G. V. BÖRNER 2020: DNA Helicase Mph1FANCM Ensures Meiotic Recombination between Parental Chromosomes by Dissociating Precocious Displacement Loops. Developmental cell 53 (4): 458-472.e5.

SANFORD, E. J., W. J. COMSTOCK, V. M. FAÇA, S. C. VEGA, R. GNÜGGE, L. S. SYMINGTON & M. B. SMOLKA 2021: Phosphoproteomics reveals a distinctive Mec1/ATR signaling response upon DNA end hyper-resection. EMBO J 40 (10): e104566.

SANGER, F., S. NICKLEN & A. R. COULSON 1977: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74 (12): 5463–5467.

SATO, K., N. MARTIN-PINTADO, H. POST, M. ALTELAAR & P. KNIPSCHEER 2020: Multistep mechanism of DNA replication-coupled G-quadruplex resolution.

SCHÄFER, A., S. SCHUBERT, A. GRATCHEV, C. SEEBODE, A. APEL, P. LASPE, L. HOFMANN, A. OHLENBUSCH, T. MORI, N. KOBAYASHI, A. SCHÜRER, M. P. SCHÖN & S. EMMERT 2013: Characterization of three XPG-defective patients identifies three missense mutations that impair repair and transcription. The Journal of investigative dermatology 133 (7): 1841–1849.

SCHELLER, J. 1999: Characterization of the new mutator gene Mph1 of Saccharomyces cerevisiae. Dissertation, Georg-August-Universität.

SCHELLER, J., A. SCHÜRER, C. RUDOLPH, S. HETTWER & W. KRAMER 2000: MPH1, a yeast gene encoding a DEAH protein, plays a role in protection of the genome from spontaneous and chemically induced damage. Genetics 155 (3): 1069–1081.

SCHÜRER, K. A. 2003: Zur Funktion des MPH1-Gens von Saccharomyces cerevisiae bei der rekombinativen Umgehung von replikationsarretierenden DNA-Schäden. Dissertation, Georg-August-Universität.

SCHÜRER, K. A., J. ENZLIN, S. LEHMANN, R. GRUBER, G. MOSEDALE, C. RALF, W. KRAMER & I. HICKSON unveröffentlicht.

SCHÜRER, K. A., C. RUDOLPH, H. D. ULRICH & W. KRAMER 2004: Yeast MPH1 gene functions in an error-free DNA damage bypass pathway that requires genes from Homologous recombination, but not from postreplicative repair. Genetics 166 (4): 1673–1686.

SCHWAB, R. A., A. N. BLACKFORD & W. NIEDZWIEDZ 2010: ATR activation and replication fork restart are defective in FANCM-deficient cells. The EMBO journal 29 (4): 806–818.

SCHWAB, R. A., J. NIEMINUSZCZY, F. SHAH, J. LANGTON, D. LOPEZ MARTINEZ, C.-C. LIANG, M. A. COHN, R. J. GIBBONS, A. J. DEANS & W. NIEDZWIEDZ 2015: The Fanconi Anemia Pathway Maintains Genome Stability by Coordinating Replication and Transcription. Molecular cell 60 (3): 351–361.

SCOTTI, M. M. & M. S. SWANSON 2016: RNA mis-splicing in disease. Nature reviews. Genetics 17 (1): 19–32.

SEKEDAT, M. D., D. FENYÖ, R. S. ROGERS, A. J. TACKETT, J. D. AITCHISON & B. T. CHAIT 2010: GINS motion reveals replication fork progression is remarkably uniform throughout the yeast genome. Molecular systems biology 6: 353.

SELBY, C. P. & A. SANCAR 1993: Molecular mechanism of transcription-repair coupling. Science (New York, N.Y.) 260 (5104): 53–58.

SEMLOW, D. R., J. ZHANG, M. BUDZOWSKA, A. C. DROHAT & J. C. WALTER 2016: Replication-Dependent Unhooking of DNA Interstrand Cross-Links by the NEIL3 Glycosylase. Cell 167 (2): 498-511.e14.

SHAY, J. W. & S. BACCHETTI 1997: A survey of telomerase activity in human cancer. European journal of cancer (Oxford, England 1990) 33 (5): 787–791.

SHIVJI, M. K. K., J. G. MOGGS, I. KURAOKA & R. D. WOOD 2006: Assaying for the dual incisions of nucleotide excision repair using DNA with a lesion at a specific site. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 314: 435–456.

SHYU, A.-B., M. F. WILKINSON & A. VAN HOOF 2008: Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. EMBO J 27 (3): 471–481.

SIEDE, W., A. S. FRIEDBERG, I. DIANOVA & E. C. FRIEDBERG 1994: Characterization of G1 checkpoint control in the yeast Saccharomyces cerevisiae following exposure to DNA-damaging agents. Genetics 138 (2): 271–281.

SIKORSKI, R. S. & P. HIETER 1989: A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 122 (1): 19–27.

SILVA, B., R. PENTZ, A. M. FIGUEIRA, R. ARORA, Y. W. LEE, C. HODSON, H. WISCHNEWSKI, A. J. DEANS & C. M. AZZALIN 2019: FANCM limits ALT activity by restricting telomeric replication stress induced by deregulated BLM and R-loops. Nature communications 10 (1): 2253.

SILVA, S., V. ALTMANNOVA, S. LUKE-GLASER, P. HENRIKSEN, I. GALLINA, X. YANG, C. CHOUDHARY, B. LUKE, L. KREJCI & M. LISBY 2016: Mte1 interacts with Mph1 and promotes crossover recombination and telomere maintenance. Genes & development 30 (6): 700–717.

SINGH, T. R., A. M. ALI, M. PARAMASIVAM, A. PRADHAN, K. WAHENGBAM, M. M. SEIDMAN & A. R. MEETEI 2013: ATR-dependent phosphorylation of FANCM at serine 1045 is essential for FANCM functions. Cancer research 73 (14): 4300–4310.

SINGH, T. R., S. T. BAKKER, S. AGARWAL, M. JANSEN, E. GRASSMAN, B. C. GODTHELP, A. M. ALI, C. DU, M. A. ROOIMANS, Q. FAN, K. WAHENGBAM, J. STELTENPOOL, P. R. ANDREASSEN, D. A. WILLIAMS, H. JOENJE, J. P. de WINTER & A. R. MEETEI 2009: Impaired FANCD2 monoubiquitination and hypersensitivity to camptothecin uniquely characterize Fanconi anemia complementation group M. Blood 114 (1): 174–180.

SMITH, H. L., H. SOUTHGATE, D. A. TWEDDLE & N. J. CURTIN 2020: DNA damage checkpoint kinases in cancer. Expert reviews in molecular medicine 22: e2.

SMOGORZEWSKA, A., S. MATSUOKA, P. VINCIGUERRA, E. R. MCDONALD, K. E. HUROV, J. LUO, B. A. BALLIF, S. P. GYGI, K. HOFMANN, A. D. D'ANDREA & S. J. ELLEDGE 2007: Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. Cell 129 (2): 289–301.

SPARKS, J. L., G. CHISTOL, A. O. GAO, M. RÄSCHLE, N. B. LARSEN, M. MANN, J. P. DUXIN & J. C. WALTER 2019: The CMG Helicase Bypasses DNA-Protein Cross-Links to Facilitate Their Repair. Cell 176 (1-2): 167-181.e21.

SPIVAK, G. 2015: Nucleotide excision repair in humans. DNA repair 36: 13–18.

SPIVAK, G. 2016: Transcription-coupled repair: an update. Archives of toxicology 90 (11): 2583–2594.

STAFA, A., R. A. DONNIANNI, L. A. TIMASHEV, A. F. LAM & L. S. SYMINGTON 2014: Template switching during break-induced replication is promoted by the Mph1 helicase in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 196 (4): 1017–1028.

STELTER, P. & H. D. ULRICH 2003: Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. Nature 425 (6954): 188–191.

STIVISON, E. A., K. J. YOUNG & L. S. SYMINGTON 2020: Interstitial telomere sequences disrupt break-induced replication and drive formation of ectopic telomeres. Nucleic Acids Res 48 (22): 12697–12710.

STONE, M. P., Y.-J. CHO, H. HUANG, H.-Y. KIM, I. D. KOZEKOV, A. KOZEKOVA, H. WANG, I. G. MINKO, R. S. LLOYD, T. M. HARRIS & C. J. RIZZO 2008: Interstrand DNA cross-links induced by alpha,beta-unsaturated aldehydes derived from lipid peroxidation and environmental sources. Accounts of chemical research 41 (7): 793–804.

STRAUSBERG, R. L., E. A. FEINGOLD, L. H. GROUSE, J. G. DERGE, R. D. KLAUSNER, F. S. COLLINS, L. WAGNER, C. M. SHENMEN, G. D. SCHULER, S. F. ALTSCHUL, B. ZEEBERG, K. H. BUETOW, C. F. SCHAEFER, N. K. BHAT, R. F. HOPKINS, H. JORDAN, T. MOORE, S. I. MAX, J. WANG, F. HSIEH, L. DIATCHENKO, K. MARUSINA, A. A. FARMER, G. M. RUBIN, L. HONG, M. STAPLETON, M. B. SOARES, M. F. BONALDO, T. L. CASAVANT, T. E. SCHEETZ, M. J. BROWNSTEIN, T. B. USDIN, S. TOSHIYUKI, P. CARNINCI, C. PRANGE, S. S. RAHA, N. A. LOQUELLANO, G. J. PETERS, R. D. ABRAMSON, S. J. MULLAHY, S. A. BOSAK, P. J. MCEWAN, K. J. MCKERNAN, J. A. MALEK, P. H. GUNARATNE, S. RICHARDS, K. C. WORLEY, S. HALE, A. M. GARCIA, L. J. GAY, S. W. HULYK, D. K. VILLALON, D. M. MUZNY, E. J. SODERGREN, X. LU, R. A. GIBBS, J. FAHEY, E. HELTON, M. KETTEMAN, A. MADAN, S. RODRIGUES, A. SANCHEZ, M. WHITING, A. MADAN, A. C. YOUNG, Y. SHEVCHENKO, G. G. BOUFFARD, R. W. BLAKESLEY, J. W. TOUCHMAN, E. D. GREEN, M. C. DICKSON, A. C. RODRIGUEZ, J. GRIMWOOD, J. SCHMUTZ, R. M. MYERS, Y. S. N. BUTTERFIELD, M. I. KRZYWINSKI, U. SKALSKA, D. E. SMAILUS, A. SCHNERCH, J. E. SCHEIN, S. J. M. JONES & M. A. MARRA 2002: Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99 (26): 16899–16903.

SYMINGTON, L. S. 2014: End resection at double-strand breaks: mechanism and regulation. Cold Spring Harbor perspectives in biology 6 (8).

SYMINGTON, L. S., R. ROTHSTEIN & M. LISBY 2014: Mechanisms and regulation of mitotic recombination in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 198 (3): 795–835.

SZOSTAK, J. W., T. L. ORR-WEAVER, R. J. ROTHSTEIN & F. W. STAHL 1983: The double-strand-break repair model for recombination. Cell 33 (1): 25–35.

SZOSTAK, J. W. & R. WU 1979: Insertion of a genetic marker into the ribosomal DNA of yeast. Plasmid 2 (4): 536–554.

TAXIS, C. & M. KNOP 2006: System of centromeric, episomal, and integrative vectors based on drug resistance markers for Saccharomyces cerevisiae. BioTechniques 40 (1): 73–78.

TAYLOR, M. R. G. & J. T. P. YEELES 2018: The Initial Response of a Eukaryotic Replisome to DNA Damage. Molecular cell 70 (6): 1067-1080.e12.

TAYLOR, M. R. G. & J. T. P. YEELES 2019: Dynamics of Replication Fork Progression Following Helicase-Polymerase Uncoupling in Eukaryotes. Journal of molecular biology 431 (10): 2040–2049.

TIAN, B. & J. L. MANLEY 2017: Alternative polyadenylation of mRNA precursors. Nature reviews. Molecular cell biology 18 (1): 18–30.

TIRMAN, S., E. CYBULLA, A. QUINET, A. MERONI & A. VINDIGNI 2021: PRIMPOL ready, set, reprime! Critical reviews in biochemistry and molecular biology 56 (1): 17–30.

TONG, A. H. Y. & C. BOONE 2007: High-Throughput Strain Construction and Systematic Synthetic Lethal Screening in Saccharomyces cerevisiae. METHODS IN MICROBIOLOGY (36): 369–386.

TRUBICKA, J., T. ŻEMOJTEL, J. HECHT, K. FALANA, D. PIEKUTOWSKA-ABRAMCZUK, R. PŁOSKI, M. PEREK-POLNIK, M. DROGOSIEWICZ, W. GRAJKOWSKA, E. CIARA, E. MOSZCZYŃSKA, B. DEMBOWSKA-BAGIŃSKA, D. PEREK, K. H. CHRZANOWSKA, M. KRAJEWSKA-WALASEK & M. ŁASTOWSKA 2017: The germline variants in DNA repair genes in pediatric medulloblastoma: a challenge for current therapeutic strategies. BMC cancer 17 (1): 239.

TURESKY, R. J. 1994: DNA adducts of heterocyclic aromatic amines, arylazides and 4-nitroquinoline 1-oxide. IARC scientific publications (125): 217–228.

URULANGODI, M., M. SEBESTA, D. MENOLFI, B. SZAKAL, J. SOLLIER, A. SISAKOVA, L. KREJCI & D. BRANZEI 2015: Local regulation of the Srs2 helicase by the SUMO-like domain protein Esc2 promotes recombination at sites of stalled replication. Genes Dev. 29 (19): 2067–2080.

VANOLI, F., M. FUMASONI, B. SZAKAL, L. MALOISEL & D. BRANZEI 2010: Replication and recombination factors contributing to recombination-dependent bypass of DNA lesions by template switch. PLoS Genet 6 (11): e1001205.

VÉGVÁRI, A., M. REZELI, C. WELINDER, J. MALM, H. LILJA, G. MARKO-VARGA & T. LAURELL 2010: Identification of prostate-specific antigen (PSA) isoforms in complex biological samples utilizing complementary platforms. Journal of proteomics 73 (6): 1137–1147.

VILENCHIK, M. M. & A. G. KNUDSON 2003: Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100 (22): 12871–12876.

WACH, A., A. BRACHAT, R. PÖHLMANN & P. PHILIPPSEN 1994: New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in Saccharomyces cerevisiae. Yeast (Chichester, England) 10 (13): 1793–1808.

WADOSKY, K. M. & S. KOOCHEKPOUR 2017: Androgen receptor splice variants and prostate cancer: From bench to bedside. Oncotarget 8 (11): 18550–18576.

WALLACE, A. M., T. L. DENISON, E. N. ATTAYA & C. C. MACDONALD 2004: Developmental distribution of the polyadenylation protein CstF-64 and the variant tauCstF-64 in mouse and rat testis. Biology of reproduction 70 (4): 1080–1087.

WALTER, J., L. SUN & J. NEWPORT 1998: Regulated Chromosomal DNA Replication in the Absence of a Nucleus. Molecular cell 1 (4): 519–529.

WAN, L., J. LOU, Y. XIA, B. SU, T. LIU, J. CUI, Y. SUN, H. LOU & J. HUANG 2013: hPrimpol1/CCDC111 is a human DNA primase-polymerase required for the maintenance of genome integrity. EMBO reports 14 (12): 1104–1112.

WANG, A. T., B. SENGEROVÁ, E. CATTELL, T. INAGAWA, J. M. HARTLEY, K. KIAKOS, N. A. BURGESS-BROWN, L. P. SWIFT, J. H. ENZLIN, C. J. SCHOFIELD, O. GILEADI, J. A. HARTLEY & P. J. MCHUGH 2011: Human SNM1A and XPF-ERCC1 collaborate to initiate DNA interstrand cross-link repair. Genes Dev. 25 (17): 1859–1870.

WANG, E. T., R. SANDBERG, S. LUO, I. KHREBTUKOVA, L. ZHANG, C. MAYR, S. F. KINGSMORE, G. P. SCHROTH & C. B. BURGE 2008: Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. Nature 456 (7221): 470–476.

WANG, Y., J. W. LEUNG, Y. JIANG, M. G. LOWERY, H. DO, K. M. VASQUEZ, J. CHEN, W. WANG & L. LI 2013: FANCM and FAAP24 maintain genome stability via cooperative as well as unique functions. Molecular cell 49 (5): 997–1009.

WARD, T. A., Z. DUDÁŠOVÁ, S. SARKAR, M. R. BHIDE, D. VLASÁKOVÁ, M. CHOVANEC & P. J. MCHUGH 2012a: Components of a Fanconi-like pathway control Pso2-independent DNA interstrand crosslink repair in yeast. PLoS genetics 8 (8): e1002884.

WARD, T. A., Z. DUDÁŠOVÁ, S. SARKAR, M. R. BHIDE, D. VLASÁKOVÁ, M. CHOVANEC & P. J. MCHUGH 2012b: Components of a Fanconi-like pathway control Pso2-independent DNA interstrand crosslink repair in yeast. PLoS genetics 8 (8): e1002884.

WATERMAN, D. P., J. E. HABER & M. B. SMOLKA 2020: Checkpoint Responses to DNA Double-Strand Breaks. Annual review of biochemistry 89: 103–133.

WATT, P. M. & I. D. HICKSON 1996: Genome stability: Failure to unwind causes cancer. Current Biology 6 (3): 265–267.

WEI, X., Y. PENG, C. BRYAN & K. YANG 2021: Mechanisms of DNA-protein cross-link formation and repair. Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics 1869 (8): 140669.

WEINERT, T. A. & L. H. HARTWELL 1988: The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in Saccharomyces cerevisiae. Science (New York, N.Y.) 241 (4863): 317–322.

WHITBY, M. C. 2010: The FANCM family of DNA helicases/translocases. DNA repair 9 (3): 224–236.

WHITE, A. K., M. VANINSBERGHE, O. I. PETRIV, M. HAMIDI, D. SIKORSKI, M. A. MARRA, J. PIRET, S. APARICIO & C. L. HANSEN 2011: High-throughput microfluidic single-cell RT-qPCR. Proceedings of the National Academy of Sciences 108 (34): 13999–14004.

WILD, P., A. SUSPERREGUI, I. PIAZZA, C. DÖRIG, A. OKE, M. ARTER, M. YAMAGUCHI, A. T. HILDITCH, K. VUINA, K. C. CHAN, T. GROMOVA, J. E. HABER, J. C. FUNG, P. PICOTTI & J. MATOS 2019: Network Rewiring of Homologous Recombination Enzymes during Mitotic Proliferation and Meiosis. Molecular cell 75 (4): 859-874.e4.

WILSON, D. M. & M. M. SEIDMAN 2010: A novel link to base excision repair? Trends in biochemical sciences 35 (5): 247–252.

WILSON, M. A., Y. KWON, Y. XU, W.-H. CHUNG, P. CHI, H. NIU, R. MAYLE, X. CHEN, A. MALKOVA, P. SUNG & G. IRA 2013: Pif1 helicase and Polδ promote recombination-coupled DNA synthesis via bubble migration. Nature 502 (7471): 393–396.

WONG, R. P., N. GARCÍA-RODRÍGUEZ, N. ZILIO, M. HANULOVÁ & H. D. ULRICH 2020: Processing of DNA Polymerase-Blocking Lesions during Genome Replication Is Spatially and Temporally Segregated from Replication Forks. Molecular cell 77 (1): 3-16.e4.

WOOD, R. D. 1996: DNA repair in eukaryotes. Annual review of biochemistry 65: 135–167.

WOOSTER, R., G. BIGNELL, J. LANCASTER, S. SWIFT, S. SEAL, J. MANGION, N. COLLINS, S. GREGORY, C. GUMBS & G. MICKLEM 1995: Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature 378 (6559): 789–792.

WU, R. A., D. S. PELLMAN & J. C. WALTER 2021: The Ubiquitin Ligase TRAIP: Double-Edged Sword at the Replisome. Trends in cell biology 31 (2): 75–85.

WU, R. A., D. R. SEMLOW, A. N. KAMIMAE-LANNING, O. V. KOCHENOVA, G. CHISTOL, M. R. HODSKINSON, R. AMUNUGAMA, J. L. SPARKS, M. WANG, L. DENG, C. A. MIMOSO, E. LOW, K. J. PATEL & J. C. WALTER 2019: TRAIP is a master regulator of DNA interstrand crosslink repair. Nature 567 (7747): 267–272.

WYATT, M. D. & D. L. PITTMAN 2006: Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. Chemical research in toxicology 19 (12): 1580–1594.

XU, X., A. LIN, C. ZHOU, S. R. BLACKWELL, Y. ZHANG, Z. WANG, Q. FENG, R. GUAN, M. D. HANNA, Z. CHEN & W. XIAO 2016: Involvement of budding yeast Rad5 in translesion DNA synthesis through physical interaction with Rev1. Nucleic Acids Res 44 (11): 5231–5245.

XUE, X., K. CHOI, J. N. BONNER, T. CHIBA, Y. KWON, Y. XU, H. SANCHEZ, C. WYMAN, H. NIU, X. ZHAO & P. SUNG 2014: Restriction of replication fork regression activities by a conserved SMC complex. Molecular cell 56 (3): 436–445.

XUE, X., K. CHOI, J. N. BONNER, B. SZAKAL, Y.-H. CHEN, A. PAPUSHA, D. SARO, H. NIU, G. IRA, D. BRANZEI, P. SUNG & X. ZHAO 2015a: Selective modulation of the functions of a conserved DNA motor by a histone fold complex. Genes Dev. 29 (10): 1000–1005.

XUE, X., A. PAPUSHA, K. CHOI, J. N. BONNER, S. KUMAR, H. NIU, H. KAUR, X. ZHENG, R. A. DONNIANNI, L. LU, M. LICHTEN, X. ZHAO, G. IRA & P. SUNG 2016: Differential regulation of the anti-crossover and replication fork regression activities of Mph1 by Mte1. Genes & development 30 (6): 687–699.

XUE, X., P. SUNG & X. ZHAO 2015b: Functions and regulation of the multitasking FANCM family of DNA motor proteins. Genes & development 29 (17): 1777–1788.

XUE, X., P. SUNG & X. ZHAO 2015c: Functions and regulation of the multitasking FANCM family of DNA motor proteins. Genes & development 29 (17): 1777–1788.

XUE, Y., Y. LI, R. GUO, C. LING & W. WANG 2008: FANCM of the Fanconi anemia core complex is required for both monoubiquitination and DNA repair. Human molecular genetics 17 (11): 1641–1652.

YAMAMOTO, K., S. INOUE & S. KAWANISHI 1993: Site-specific DNA damage and 8-hydroxydeoxyguanosine formation by hydroxylamine and 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in the presence of Cu(II): role of active oxygen species. Carcinogenesis 14 (7): 1397–1401.

YAN, Z., M. DELANNOY, C. LING, D. DAEE, F. OSMAN, P. A. MUNIANDY, X. SHEN, A. B. OOSTRA, H. DU, J. STELTENPOOL, T. LIN, B. SCHUSTER, C. DÉCAILLET, A. STASIAK, A. Z. STASIAK, S. STONE, M. E. HOATLIN, D. SCHINDLER, C. L. WOODCOCK, H. JOENJE, R. SEN, J. P. de WINTER, L. LI, M. M. SEIDMAN, M. C. WHITBY, K. MYUNG, A. CONSTANTINOU & W. WANG 2010: A histone-fold complex and FANCM form a conserved DNA-remodeling complex to maintain genome stability. Molecular cell 37 (6): 865–878.

YANG, H., T. ZHANG, Y. TAO, F. WANG, L. TONG & J. DING 2013: Structural insights into the functions of the FANCM-FAAP24 complex in DNA repair. Nucleic acids research 41 (22): 10573–10583.

YANG, W., M. M. SEIDMAN, W. D. RUPP & Y. GAO 2019: Replisome structure suggests mechanism for continuous fork progression and post-replication repair. DNA repair 81: 102658.

YEELES, J. T. P., A. JANSKA, A. EARLY & J. F. X. DIFFLEY 2017: How the Eukaryotic Replisome Achieves Rapid and Efficient DNA Replication. Molecular cell 65 (1): 105–116.

YEO, G. & C. B. BURGE 2004: Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. Journal of computational biology a journal of computational molecular cell biology 11 (2-3): 377–394.

YIN, H., H. MA, S. HUSSAIN, H. ZHANG, X. XIE, L. JIANG, X. JIANG, F. IQBAL, I. BUKHARI, H. JIANG, A. ALI, L. ZHONG, T. LI, S. FAN, B. ZHANG, J. GAO, Y. LI, J. NAZISH, T. KHAN, M. KHAN, M. ZUBAIR, Q. HAO, H. FANG, J. HUANG, M. HULEIHEL, J. SHA, T. K. PANDITA, Y. ZHANG & Q. SHI 2019: A homozygous FANCM frameshift pathogenic variant causes male infertility. Genet Med 21 (1): 62–70.

ZAPATKA, M., I. POCIÑO-MERINO, H. HELUANI-GAHETE, M. BERMÚDEZ-LÓPEZ, M. TARRÉS, E. IBARS, R. SOLÉ-SOLER, P. GUTIÉRREZ-ESCRIBANO, S. APOSTOLOVA, C. CASAS, L. ARAGON, R. WELLINGER, N. COLOMINA & J. TORRES-ROSELL 2019: Sumoylation of Smc5 Promotes Error-free Bypass at Damaged Replication Forks. Cell reports 29 (10): 3160-3172.e4.

ZEMAN, M. K. & K. A. CIMPRICH 2014: Causes and consequences of replication stress. Nature cell biology 16 (1): 2–9.

ZHANG, H. & C. W. LAWRENCE 2005: The error-free component of the RAD6/RAD18 DNA damage tolerance pathway of budding yeast employs sister-strand recombination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102 (44): 15954–15959.

ZHANG, J., M. A. BELLANI, J. HUANG, R. C. JAMES, D. POKHAREL, J. GICHIMU, H. GALI, G. STEWART & M. M. SEIDMAN 2021a: Replication of the Mammalian Genome by Replisomes Specific for Euchromatin and Heterochromatin. Frontiers in cell and developmental biology 9: 729265.

ZHANG, J., J. M. DEWAR, M. BUDZOWSKA, A. MOTNENKO, M. A. COHN & J. C. WALTER 2015: DNA interstrand cross-link repair requires replication-fork convergence. Nature structural & molecular biology 22 (3): 242–247.

ZHANG, J., D. ZHAO, H. K. PARK, H. WANG, R. B. DYER, W. LIU, G. G. KLEE, M. A. MCNIVEN, D. J. TINDALL, J. R. MOLINA & P. FEI 2010: FAVL elevation in human tumors disrupts Fanconi anemia pathway signaling and promotes genomic instability and tumor growth. The Journal of clinical investigation 120 (5): 1524–1534.

ZHANG, Y., P. LI, N. LIU, T. JING, Z. JI, C. YANG, L. ZHAO, R. TIAN, H. CHEN, Y. HUANG, E. ZHI, N. OU, H. BAI, Y. ZHOU, Z. LI & C. YAO 2021b: Novel Bi-Allelic Variants of FANCM Cause Sertoli Cell-Only Syndrome and Non-Obstructive Azoospermia. Frontiers in genetics 12: 799886.

ZHENG, X., R. PRAKASH, D. SARO, S. LONGERICH, H. NIU & P. SUNG 2011: Processing of DNA structures via DNA unwinding and branch migration by the S. cerevisiae Mph1 protein. DNA repair 10 (10): 1034–1043.

ZHENG, X. F. & S. L. SCHREIBER 1997: Target of rapamycin proteins and their kinase activities are required for meiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94 (7): 3070–3075.

9 DANKSAGUNG

Ich bedanke mich. Herzlich. Sehr. Bei allen. Fast allen.

Und bin dann mal weg.

Nicht ganz. Nur fertig.

Hoffentlich.

PS: Nicht unfreundlich. Nur keine Zeit. Keine. Zeit. Nach zehn Jahren.

Ernsthaft.

DANKE!