

**Etablierung und Anwendung von Hochdurchsatz-Verfahren  
zur Identifizierung strahleninduzierbarer Gene in der Hefe**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Biologie

an der Ludwig-Maximilians-Universität

München

Vorgelegt von

Markus Kiechle

Mai 2000



1. Berichtstatter: Prof. Dr. Eckardt-Schupp

2. Berichtstatter: Prof. Dr. Bandlow

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2000





## Danksagung

Mein erster Dank gilt meiner „Doktormutter“ Prof. Dr. Friederike Eckardt-Schupp, die mir als „Lehramtler“ die Möglichkeit zur Promotion eröffnete. Ihr großes Engagement, das unter anderem die beiden Auslandsaufenthalte ermöglichte, und ihr außergewöhnliches Interesse am Fortgang der Arbeit werden mir in dankbarer Erinnerung bleiben. Insbesondere möchte ich mich auch ganz herzlich für das in mich gesetzte Vertrauen bedanken, das es mir ermöglichte, auch Beobachtungen nachzugehen, die nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Ziel dieser Dissertation standen.

Ohne Dr. Anna Friedl, die nach dem Weggang von Dr. Christian Klaus meine weitere Betreuung übernahm, wäre die Arbeit in dieser Form gar nicht möglich gewesen. Ihre bestechende Logik, ihr Ideenreichtum und ihre Bereitschaft, auf alle meine Fragen und Vorschläge geduldig einzugehen, verdienen meinen tiefen Respekt und größten Dank. Insbesondere ihre Hilfe beim Publizieren der Daten und bei der Erstellung dieser Arbeit waren für mich von unschätzbarem Wert!

Großer Dank gebührt auch meinem früheren Betreuer Dr. Christian Klaus, der mir durch seine große Fachkenntnis und analytisch-präzise Arbeitsweise viel vermittelte und hoffentlich nicht meinetwegen mittlerweile im IT-Bereich neue Herausforderungen sucht?!

Bei Klaudia Winkler bedanke ich mich ganz herzlich für die große Unterstützung in der Durchführung vieler Experimente. Bei Dr. Stefan Leibhard und Dr. Jan Smida möchte ich mich für viele interessante Diskussionen bedanken, die den Fortgang dieser Arbeit begleiteten. Der ganzen Arbeitsgruppe ein herzliches Dankeschön für viel Menschlichkeit, Spaß und Hilfsbereitschaft!

Schließlich auch ein ganz großes *Thanks* nach Übersee an Prof. Dr. Schiestl von der Harvard University, Boston und Prof Dr. C. Barret vom NIEHS in North Carolina, in deren Labors wichtige Teile dieser Arbeit entstanden sind. Auch allen dortigen Labormitgliedern, die mit ihrer Gastfreundschaft und Hilfe meine Aufenthalte so interessant und erlebnisreich werden ließen, sei ganz herzlich gedankt. In diesem Zusammenhang auch ein herzliches Dankeschön an die Neuherberger Forschungsförderung e.V., die mit ihren Reisestipendien die beiden USA-Aufenthalte unterstützte.

Besonders bei meiner Freundin Susanne sowie bei meinen Eltern und Freunden möchte ich für viel Geduld und Anteilnahme an dieser Stelle danken!



# Inhaltsverzeichnis

---

1 Einleitung .....	6
1.1 Warum Expressionsanalysen? .....	6
1.2 Regulationsmechanismen .....	7
1.3 Die transkriptionelle Kontrolle.....	9
1.3.1 Möglichkeiten der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren .....	9
1.3.2 Spezifische Motive der Promotoren ermöglichen die Bindung der Transkriptionsfaktoren.....	12
1.4 Bekannte strahleninduzierbare Hefegene .....	14
1.4.1 Ein Überblick .....	14
1.4.2 Ausgewählte Gene mit gut untersuchter Strahleninduzierbarkeit .....	16
1.4.2.1 <i>RAD54</i> .....	16
1.4.2.2 Ribonukleotidreduktase: <i>RNR1</i> , <i>RNR2</i> und <i>RNR3</i> .....	18
1.4.2.3 <i>RAD2</i> .....	20
1.5 Etablierte <i>Screening</i> -Verfahren zur Identifizierung schadensinduzierter Gene in <i>S. cerevisiae</i> .....	22
1.5.1 Fusionierung eines Reportergens mit cDNA-Banken.....	22
1.5.2 Differentielle Hybridisierung .....	22
1.5.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	23
1.5.4 <i>Microarrays</i> zur Identifizierung MMS-induzierbarer Gene in Hefe .....	24
1.6 <i>Gene trapping</i> als <i>Screening</i> -Methode in Säugerzellen .....	24
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit.....	26
2 Material und Methoden .....	27
2.1 Material .....	27
2.1.1 Geräte und andere Materialien .....	27
2.1.2 Computerprogramme.....	27
2.1.3 Chemikalien.....	28
2.1.4 Enzyme und Antikörper.....	29
2.1.5 DNA- und RNA-Längenstandards.....	29
2.1.6 Kits .....	29
2.1.7 Oligonukleotide.....	30
2.1.7.1 Oligonukleotide zur Ein-Schritt-Gen-Disruption mittels PCR .....	30
2.1.7.2 Oligonukleotide für die Sequenzierung bzw. den Nachweis von Integrationsloci.....	30
2.1.7.3 Sonstige verwendete Oligonukleotide .....	31
2.1.8 Plasmide und Klonierungsvektoren.....	32
2.1.8.1.1 pFA6-kanMX6 .....	32
2.1.8.1.2 YEplac195 .....	33
2.1.8.1.3 pGem4 .....	33
2.1.8.1.4 pCM159.....	34
2.1.8.1.5 Weitere verwendete Plasmide .....	35
2.1.9 Stämme.....	35
2.1.9.1 <i>Escherichia coli</i> Stamm.....	35
2.1.9.2 Haploide <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme .....	35

2.2 Methoden .....	36
2.2.1 Mikrobiologische Methoden .....	36
2.2.1.1 Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> .....	36
2.2.1.2 Kultivierung von Hefezellen .....	37
2.2.1.3 Zellzahlbestimmung .....	38
2.2.2 Standardmethoden der Molekularbiologie .....	39
2.2.2.1 Transformation von Bakterien .....	39
2.2.2.2 Standard-Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	39
2.2.2.3 Isolierung von DNA .....	40
2.2.2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	40
2.2.2.3.2 Isolierung genomischer DNA aus Hefezellen .....	40
2.2.2.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	41
2.2.2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten .....	41
2.2.2.6 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	41
2.2.2.7 Transfer von DNA-Molekülen auf Nylonmembranen .....	42
2.2.2.8 Hybridisierung und Nachweis von Nukleinsäuren .....	42
2.2.2.8.1 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Fragmenten .....	42
2.2.2.8.2 Entfernung gebundener Sonde .....	43
2.2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	43
2.2.2.10 Reinigung von PCR-Produkten .....	44
2.2.2.11 Sequenzanalyse von Nukleinsäuren .....	44
2.2.2.12 Klonierung und Subklonierung .....	45
2.2.2.12.1 Erzeugen glatter Enden .....	45
2.2.2.12.2 Abspaltung der 5'-Phosphate mittels alkalischer Phosphatase .....	45
2.2.2.12.3 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren .....	45
2.2.3 Bestrahlung von Hefezellen und Inkubation unter Nichtwuchsbedingungen .....	46
2.2.3.1 Bestrahlung der Hefezellen .....	46
2.2.3.1.1 UV-C-Bestrahlung .....	46
2.2.3.1.2 <sup>60</sup> Co- $\gamma$ -Bestrahlung .....	46
2.2.3.2 Inkubation unter Nichtwuchsbedingungen ('Liquid Holding Recovery') .....	47
2.2.3.3 Bestimmung der Plattierungseffizienz .....	47
2.2.4 Detektion von Chromosomenaberrationen mittels PFGE .....	47
2.2.4.1 Isolierung chromosomaler Hefe-DNA für die PFGE .....	47
2.2.4.2 Gelelektrophoretische Auftrennung chromosomaler DNA mittels PFGE .....	48
2.2.5 „High-Efficiency“-Transformation von Hefe .....	49
2.2.6 <i>Plasmid rescue</i> - Reisolierung integrierter Plasmide .....	50
2.2.6.1 Isolierung genomischer DNA aus den Transformanten .....	50
2.2.6.2 Restriktionsverdau und Ligation der genomischen DNA .....	51
2.2.6.3 Hocheffiziente <i>E. coli</i> -Transformation mittels Elektroporation .....	51
2.2.6.3.1 Herstellung elektrokompenter Zellen .....	52

2.2.6.3.2 Durchführung der Transformation.....	52
2.2.7 X-Gal-Überschichtung zur Identifizierung lacZ-exprimierender Kolonien.....	53
2.2.8 Quantifizierung der lacZ-Expression.....	53
2.2.8.1 Induktion des genomisch integrierten lacZ-Fusionsproteins.....	53
2.2.8.2 Detektion der lacZ-Expression.....	54
2.2.9 Expressionsmessungen mit <i>Microarrays</i> .....	54
2.2.9.1 Durchführung der Bestrahlungen.....	54
2.2.9.2 Isolierung der RNA.....	55
2.2.9.2.1 Isolierung der Gesamt-RNA.....	56
2.2.9.2.2 Isolierung der mRNA.....	56
2.2.9.3 Reverse Transkription, Markierung und Hybridisierung.....	57
2.2.9.3.1 Reverse Transkription bei gleichzeitiger Markierung.....	58
2.2.9.3.2 Aufreinigung der Probe.....	59
2.2.9.3.3 Hybridisierung.....	59
2.2.9.4 Auslesen der Fluoreszenzintensität und computergestützte Auswertung.....	60
2.2.9.5 Vergleich der Expression von interessanten Kandidatengenen mit Northern-Analysen.....	61
2.2.9.5.1 Vorbereitung der mRNA-Proben und Gelelektrophorese.....	62
2.2.9.5.2 Northern-Hybridisierung.....	62
2.2.9.5.2.1 Northern-Transfer und Färbung der Membran.....	62
2.2.9.5.2.2 Hybridisierung.....	63
3 Etablierung eines <i>Gene trap</i> -Verfahrens in Hefe.....	64
3.1 Problemstellung.....	64
3.2 Untersuchung von Parametern, die die nicht-homologe Integration beeinflussen.....	66
3.2.1 Verwendetes Integrationssystem.....	66
3.2.2 Erhöhung der Transformationsfrequenz durch parallele $\gamma$ -Bestrahlung.....	67
3.2.3 Illegitime Integration im <i>rad52</i> $\Delta$ -Hintergrund.....	69
3.2.4 Illegitime Integration im <i>rad5</i> $\Delta$ -Hintergrund.....	72
3.2.5 Illegitime Integration im <i>yku70</i> $\Delta$ -Hintergrund.....	74
3.2.5.1 Spontane und $\gamma$ -induzierte Rate der illegitimen Integration im <i>yku70</i> -Hintergrund.....	74
3.2.5.2 Die Entschlüsselung des Mechanismus der illegitimen Integration im <i>yku70</i> -Hintergrund.....	76
3.2.5.2.1 Die Integration des Plasmids ist assoziiert mit Retrotransposon-Elementen.....	78
3.2.5.2.2 Fünf-Basenpaar-Duplikationen des Integrationsortes - ein Charakteristikum der Ty-Integrase.....	81
3.2.5.2.3 In den meisten NHI-Fällen kointegrieren Retrotransposon- Sequenzen mit dem Plasmid.....	83
3.2.5.2.4 Plasmidsequenzen, die direkt an chromosomale DNA-Bereiche anknüpfen, enden bevorzugt mit einem 3'-endständigen Adenin.....	88
3.2.5.2.5 Ein Großteil der illegitimen Integrationen in <i>yku70</i> -Mutanten ist von Ty1-Transkription abhängig.....	90
3.2.5.3 Modelle zur Ty-vermittelten Integration von DNA-Fragmenten im <i>yku70</i> -Hintergrund.....	92
3.2.5.3.1 Modelle zur Entstehung der zusammengesetzten Plasmid/Ty-Elemente.....	92

3.2.5.3.2 Ku70 ist an der Erhaltung der Substratspezifität der Ty Integrase beteiligt.....	94
3.2.6 Zusammenfassung der Untersuchungen zur nicht-homologen Integration.....	97
3.3 Test der Eignung von lacZ als Reporter gen durch gezielte Integration .....	99
3.3.1 Klonierung eines Plasmids für die gezielte Integration in den <i>RAD54</i> -Lokus .....	99
3.3.2 Integration von lacZ-KanMX in das <i>RAD54</i> -Gen, dessen Induzierbarkeit bekannt ist.....	101
3.3.3 Integration einer lacZ-KanMX-Kassette in Gene, deren Induzierbarkeit vermutet wird: <i>RAD5</i> und <i>SMF3</i> .....	105
3.3.3.1 <i>RAD5</i> .....	106
3.3.3.2 <i>SMF3</i> .....	108
3.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der gezielten Integrationen.....	112
3.4 Anwendung des <i>Gene trap</i> -Verfahrens in Hefe .....	114
3.4.1 Konstruktion des Plasmids MKM20 für die Durchführung des <i>Gene trap</i> -Verfahrens .....	114
3.4.2 Isolierung von Transformanten, die das lacZ-Gen exprimieren.....	115
3.4.3 Halbquantitatives <i>Screening</i> auf UV-C-Induzierbarkeit .....	118
3.4.4 Ermittlung der genomischen Integrationsorte in Trans-formanten mit veränderter lacZ-Expression nach Bestrahlung.....	119
3.4.5 Sequenzierung und Zuordnung mittels Datenbankanalyse.....	120
3.4.6 Expressions-Kinetik der Transformanten nach UV-Bestrahlung .....	126
3.4.7 Phänotypische Charakterisierung der untersuchten Trans-formanten .....	128
3.4.7.1 Sensitivität gegenüber UV-C- und $\gamma$ -Strahlung.....	128
3.4.7.2 Wachstum und morphologische Besonderheiten der Transformanten .....	130
3.4.7.3 Temperatursensitivität der Transformanten .....	131
3.4.8 Detaillierte Beschreibung der Transformanten .....	132
3.4.8.1 Transformante #01 - 2 $\mu$ plasmid.....	132
3.4.8.2 Transformante #12 - <i>APG1</i> .....	132
3.4.8.3 Transformante #33 - <i>FIR1</i> .....	133
3.4.8.4 Transformante #35 - <i>MRP8</i> .....	133
3.4.8.5 Transformante #38 - <i>SDS24</i> .....	134
3.4.8.6 Transformante #42 - <i>UBC13</i> .....	134
3.4.8.7 Transformante #60 - <i>VAB36</i> .....	135
3.4.8.8 Transformante #66 - <i>BUD4</i> .....	136
3.4.8.9 Transformante #82 - <i>YBR052C</i> .....	136
3.4.8.10 Transformante #87 .....	136
3.4.8.11 Transformante #93 .....	137
3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse des <i>Gene trap</i> -Verfahrens .....	137
4 Einsatz von <i>Microarrays</i> zur Identifizierung strahleninduzierbarer Gene .....	140
4.1 Was sind <i>Microarrays</i> ?.....	140
4.2 Einsatz der <i>Microarray</i> -Technik zum Vergleich des Expressionsprofils nach verschiedenartiger Bestrahlung.....	143
4.2.1 Ermittlung äquitoxischer Dosen bei verschiedenen Strahlenarten .....	143

4.3 Vergleich der Expressionsprofile nach verschieden-artiger Bestrahlung .....	145
4.3.1 Expressionsprofil nach MMS-Behandlung - eine Kontrolle.....	146
4.3.2 Einfluss der getesteten Strahlenarten auf die Expression von Hefegenen .....	149
4.3.2.1 Einfluss von UV-C-Strahlung auf die Expression .....	151
4.3.2.2 Einfluss von ionisierender Strahlung auf die Expression .....	154
4.3.3 Stichprobenartige Überprüfung der gefundenen Gene mit veränderter Expression durch Northern-Hybridisierungen .....	158
4.3.3.1 <i>EGT2</i> .....	158
4.3.3.2 <i>HSP30</i> .....	159
4.3.3.3 <i>YPR015C</i> .....	161
4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der <i>Microarray</i> -Technik als <i>Screening</i> -Methode .....	162
5 Abschliessende Diskussion und Ausblick .....	165
5.1 <i>Gene trapping</i> .....	165
5.2 <i>Microarrays</i> .....	168
5.3 Bisher identifizierte Gene mit veränderter Expression.....	171
6 Literaturverzeichnis.....	173
Anhang.....	184

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 WARUM EXPRESSIONSANALYSEN?

Der Wettlauf zwischen dem „Human Genome Project“ und der US-amerikanischen Firma PE Celera um die vollständige Entschlüsselung des menschlichen Genoms neigt sich dem Ende entgegen. Auch wenn die Schätzungen über die Anzahl der menschlichen Gene mit 40000-140000 noch stark divergieren, wird bald die Sequenzinformation aller menschlichen Gene ebenso wie ihre Lokalisation im Genom bekannt sein. Trotz der derzeitigen Euphorie stellt dieses Sequenzierungsprojekt jedoch nur einen ersten Schritt dar, denn die Sequenzabfolge alleine beinhaltet kaum Informationen über die Funktionen der Gene. Entscheidende Bedeutung kommt daher den *functional genomics* zu, wie im englischen die funktionelle Genomanalyse genannt wird. So wird vermutlich nur ein kleiner Teil der Gene in allen Zellarten und zu allen Zeitpunkten gleich stark exprimiert. Im Gegensatz zu diesen konstant exprimierten „Haushaltsgenen“ wird wahrscheinlich ein sehr viel grösserer Anteil des Genoms für Proteine kodieren, die in ganz bestimmten Zelltypen oder zu bestimmten Entwicklungsstadien exprimiert werden. Neben dieser gewebe- bzw. zeitspezifischen Expression, die durch endogene Faktoren gesteuert wird, ist die Induktion von Genen durch äußere Stimuli ein interessanter Mechanismus, der es Zellen ermöglicht, auf Umwelteinflüsse spezifisch zu reagieren. Das Phänomen der Induktion von spezifischen Prozessen beruht auf zwei wichtigen Notwendigkeiten für Lebewesen. Einerseits ist ein ökonomischer Umgang mit Ressourcen notwendig, der es verbietet, zu große Überschüsse von nicht benötigten Proteinen zu produzieren. Andererseits ist es für Zellen essentiell, auf sich ändernde Umwelteinflüsse wie Nahrungsmangel, chemische Belastungen oder Strahlung reagieren zu können. Induzierbare Systeme vereinen diese beiden Voraussetzungen.

Die Zelle verfügt über zahlreiche Mechanismen (Übersicht für Regulationsmechanismen in Hefe bei (Struhl, et al., 1998)), um die Menge bzw. Aktivität von Genprodukten zu regulieren. Abbildung 1 zeigt schematisch einige dieser Möglichkeiten, die im folgenden kurz ausgeführt werden.



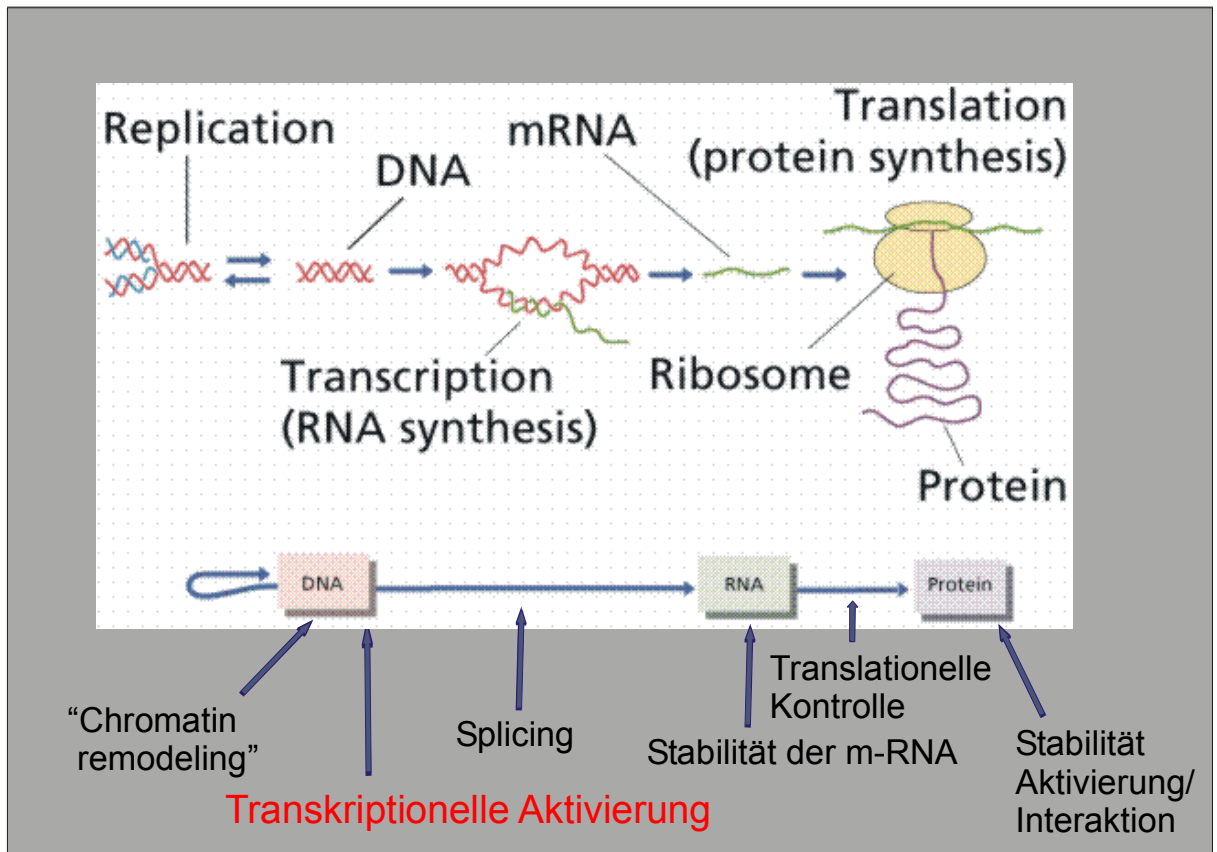


Abbildung 1: Möglichkeiten der Regulation von Proteinaktivität in einer eukaryontischen Zelle (modifiziert nach <http://gened.emc.maricopa.edu/bio/bio181/BIOBK/BioBookPROTSYn.html>)

## 1.2 REGULATIONSMECHANISMEN

Ein schon seit längerem bekanntes Beispiel für den Einfluss der Chromatinstruktur auf die Transkriptionsrate ist das sogenannte *Silencing* in Hefe (Übersicht bei (Lustig, 1998)). Sowohl die Transkription des *HML*-Lokus, der sich 12kb vom linken Telomer des Chromosoms III befindetet, als auch die des *HMR*-Lokus, der sich 20kb vom rechten Ende des gleichen Chromosoms befindetet, sind stabil reprimiert. Zudem ist auch eine metastabile Repression von telomernahen Genen in Nachbarschaft zu poly(TG<sub>1-3</sub>)-Trakten beschrieben worden. Verursacht wird diese Repression durch Bindung sogenannter *Silencing*-Faktoren (Rap1p, Sir-Proteine), die zu Modifikationen der Histonproteine und letztlich zu einer kompakten Packung des Chromatins führen. Die molekularen Mechanismen dieser Restrukturierung sind noch nicht gut verstanden, eine entscheidende Funktion beim *Silencing* kommt aber den „*silent information regulator*“-Proteinen (Sir2p, Sir3p und Sir4p) zu, da in deren Abwesenheit sonst stumme Bereiche fast normal transkribiert werden. Die telomernahen Gene werden offenbar

durch Bindung von Rap1p stillgelegt, bei den Paarungstyp-Loci *HML* und *HMR* wurden zusätzlich Abf1p- und ORC-Bindestellen gefunden wurden (Lustig, 1998). Charakteristisch für solche „stummen“ Bereiche ist neben der transkriptionellen Blockade und der Chromatinveränderung eine späte Replikation, vergleichbar dem Heterochromatin in Säugerzellen. Neben diesem *Silencing* wurde in letzter Zeit das *Chromatinremodeling*, die strukturelle Veränderung der Nukleosomen im Bereich von Promotor-Elementen als wichtiger Faktor zur Regulation der Transkription erkannt (Lustig, 1998; Ptashne and Gann, 1997; Svaren and Hörz, 1996). So konnte beispielsweise die Induzierbarkeit des *PHO5*-Gens von *S. cerevisiae* mit der Veränderung von vier Nukleosomen im Promotorbereich dieses Gens korreliert werden (Adams and Workman, 1993).

Neben der transkriptionellen Aktivierung, die wohl die wichtigste Form der Regulation darstellt (Lewin, 2000) und weiter unten ausführlicher besprochen wird, existieren mehrere weitere Möglichkeiten der Regulation in eukaryontischen Zellen. So ist die Stabilität der gebildeten mRNA entscheidend für die Häufigkeit der Translation dieser Matrize (Übersicht bei (Liebhaber, 1997)). Bestimmte mRNA-Strukturen zeigen eine höhere Resistenz gegenüber Nukleasen und damit verbundene Degradierung als andere Ribonukleinsäuren. Auch über differentielles Spleißen kann die höhere eukaryontische Zelle das Verhältnis der möglichen Produkte regulieren, wie dies zum Beispiel für das Gen IGF-I (Insuline-like growth factor I) in der Ratte nachgewiesen wurde (Rotwein, et al., 1993). Ferner spielt die Initiation der Translation eine wichtige Rolle bei der zellulären Streßantwort. So wurde gezeigt, daß genotoxische und andere Stressoren über Translationskontrollpunkte eine Inhibition der Proteinsynthese bewirken können [Sheikh MS, 1999 #124]. Auch durch die Geschwindigkeit der Translation findet Expressionskontrolle statt. So konnte Yanofsky (Neuere Überblicksartikel bei (Yanofsky, et al., 1996) und (Yanofsky, 2000)) bereits in den frühen siebziger Jahren für das Tryptophan-Operon von *E.coli* zeigen, daß hier über die Geschwindigkeit der Translation die Transkriptionsrate beeinflußt werden kann. Obwohl Attenuation, wie dieser Prozess genannt wurde, zumindest in dieser Form einen auf Prokaryonten beschränkter Regulationsmechanismus darstellt, da in Eukaryonten Translation und Transkription zeitlich und räumlich getrennt ablaufen, ist es doch ein interessantes Beispiel für einen Autoregulations-Mechanismus. Bei höheren Eukaryonten kann über die Verwendung verschiedener Kodons, die für die gleiche Aminosäure kodieren (*codon-usage*), eine Kontrolle der Translationsrate stattfinden. So zeigt sich in stark exprimierten Genen eine

## 1. Einleitung

---

Bevorzugung von Kodons, die häufig vorkommenden t-RNA-Molekülen entsprechen. Dies gewährleistet eine rasche Translation und somit hohe Verfügbarkeit des Genprodukts. Auf wenig exprimierten Genen lastet dieser evolutionäre Selektionsdruck nicht, so daß hier die verschiedenen degenerierten Kodons einer Aminosäure gleich häufig auftreten. Die Beobachtung, daß bei Reparaturgenen keine Kodonbevorzugung stattfindet, wurde als Indiz dafür gewertet, daß viele Reparaturgene, wie beispielsweise *RAD4*, häufig niedrig exprimiert sind (Fenech, et al., 1991; Friedberg, et al., 1995). Auf Proteinebene findet eine vielseitige Regulation statt. Die Aktivierung oder Deaktivierung von Proteinen insbesondere durch Phosphorylierungen spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation in Säugerzellen (Eckardt-Schupp and Klaus, 1999). So wird beispielsweise das Tumorsuppressorgen p53 hauptsächlich durch Phosphorylierung aktiviert, die ebenfalls gezeigte transkriptionelle Aktivierung spielt eine untergeordnete Rolle (Überblick bei (Colman, et al., 2000)). Viele weitere Transkriptionsfaktoren werden im Zuge von Signaltransduktionsketten ebenfalls durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von Proteinkinasen (PKs) aktiviert (Bender, et al., 1997; Herrlich and Rahmsdorf, 1994). Schließlich stellt auch die Regulation des Abbaus von Proteinen (z.B. durch Ubiquitinierung) einen bedeutenden Mechanismus

### 1.3 DIE TRANSKRIPTIONELLE KONTROLLE

Die wohl wichtigste Regulationsebene stellt indes die transkriptionelle Kontrolle dar. Im folgenden sollen die verschiedenen Möglichkeiten der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren dargestellt werden. Im weiteren werden dann die strukturellen Voraussetzungen der DNA für eine Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren erläutert. Da diese Arbeit dem Ziel dient, strahleninduzierbare Gene in Hefe zu identifizieren, werden hier insbesondere Promotormotive, die mit Antwort auf DNA-Schäden assoziiert sind, erläutert.

#### 1.3.1 MÖGLICHKEITEN DER AKTIVIERUNG VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN

Transkriptionsfaktoren (TF) können in drei Klassen eingeteilt werden. Die erste Gruppe beinhaltet die Basalfaktoren, die für die Bindung der Polymerase an die DNA verantwortlich sind. Sie sind in allen Promotoren zur Initiation der Transkription notwendig. In die zweite Klasse fallen die sogenannten *upstream factors*. Sie binden an kurze Nukleotidabfolgen

stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle und verstärken die Effizienz der Initiation. Diese Faktoren regulieren damit die Transkriptionshäufigkeit nicht-induzierbarer Gene. Allerdings wurden solche Sequenzen mittlerweile auch innerhalb der Leserahmen gefunden (Fantino, et al., 1992), so daß die Bezeichnung *upstream-factors* nicht ganz zutreffend ist. Zur dritten Klasse gehören die induzierbaren Faktoren, die durch Umwelteinflüsse oder endogene Faktoren aktiviert werden und zu einer regulierten Genexpression führen. Diese Faktoren müssen nicht unbedingt in der Nähe des Promotors binden, sondern können auch sehr viel weiter stromaufwärts an Erkennungssequenzen binden, wobei solche Elemente dann als *Enhancer*-Sequenzen bezeichnet werden. Die Aktivierung induzierbarer Transkriptionsfaktoren kann auf sehr unterschiedliche Weise erfolgen, wie Abbildung 2 verdeutlicht.

Der einfachste Fall ist die zeitlich oder räumlich begrenzte Synthese von TF (Abbildung 2A). In höheren Eukaryonten ist ein gewebespezifisches Auftreten von Faktoren in bestimmten Phasen typisch für Regulatoren der Differenzierung und Entwicklung, so z.B. bei Homeodomänen-Proteinen. Bei Hefe spielt die Gewebespezifität freilich keine Rolle, aber auch hier sind viele Proteine zellzyklusabhängig exprimiert, treten also nur in bestimmten Stadien auf (Cho, et al., 1998). Die Modifizierung von Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung (Abbildung 2B) oder Dephosphorylierung (Abbildung 2C) ist ein wichtiger Mechanismus in Säugerzellen. So wird beispielsweise der heterodimere TF AP1, der aus den Untereinheiten Jun und Fos besteht, durch Phosphorylierung von Jun aktiviert. Auch in *Saccharomyces cerevisiae* wurde eine Phosphorylierung von Rad53p durch Mec1p gezeigt, was im Zuge einer Signaltransduktionskette unter anderem die Induktion der *RNR*-Gene bewirkt (Sanchez, et al., 1996). Die Bindung von Liganden (Abbildung 2D) kann sowohl den Import von TF in den Zellkern bewirken oder die Affinität des TF zur DNA stimulieren. Steroidrezeptoren wie z.B. der Retinsäure-Rezeptor sind hierfür ein Beispiel (Carlberg, 1999). Die Ablösung von membrangebundenen Proteinen bei Sterolmangel führt zur Bindung und Aktivierung spezifischer TF (Abbildung 2E).



# 1. Einleitung

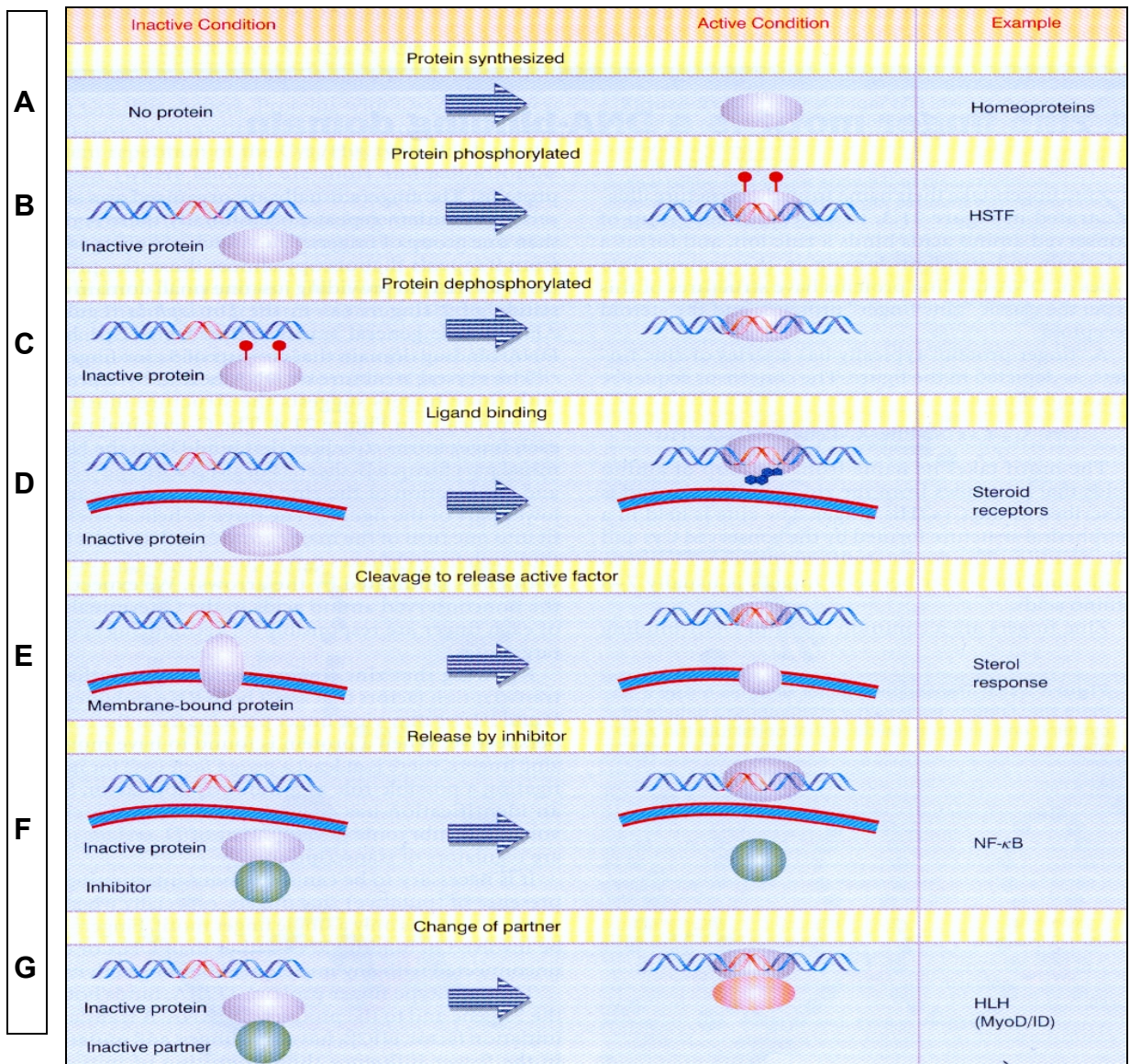


Abbildung 2: Verschiedene Aktivierungsmechanismen von Transkriptionsfaktoren nach (Lewin, 2000)

Auch die Inaktivierung von TF durch einen Inhibitor stellt einen Regulationsmechanismus dar. So wird der in vielen Zellarten anwesende TF NF $\kappa$ B durch das inhibitorische Protein I- $\kappa$ B inaktiviert. In B-Lymphozyten, in denen NF $\kappa$ B die Expression der  $\kappa$ -Immunoglobulingene aktiviert, wird NF $\kappa$ B von I- $\kappa$ B getrennt und in den Zellkern transportiert. Bei *S. cerevisiae* wurde ein ähnlicher Mechanismus für die Aktivierung des Gal4-Proteins gezeigt. So kann Gal4p zwar auch in Abwesenheit von Galaktose an die UAS-Elemente der Promotoren von *GAL1*, *GAL7* und *GAL10* binden, jedoch führt erst die Galaktose-abhängige Dissoziation des inhibitorischen Gal80-Proteins von Gal4p zur Freilegung der Aktivierungsdomäne und damit

zur Induktion dieser Gene. Auch die kompetitive Bindung von aktiven und inaktiven Partnern in dimeren Proteinen stellt einen beobachteten Aktivierungsmechanismus von TF dar.

Die DNA-Bindung der TF an die Promotorelemente erfolgt über unterschiedliche DNA-bindende Domänen (Übersicht bei (Lewin, 2000)). Zu den bekanntesten auch in *S. cerevisiae* charakterisierten Domänen gehören Zinkfingermotive, die sowohl in DNA- als auch RNA-bindenden Proteinen beschrieben worden sind und in mehreren Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden konnten (Rhodes and Klug, 1993). Leucin-Zipper-Motive, wie sie beispielsweise in dem oben beschriebenen Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B gefunden wurden (Moore, et al., 1993), enthalten eine Leucin-reiche Region, die häufig in Zusammenhang mit einer Dimerisierung von Transkriptionsfaktoren steht. Eine benachbarte basische Region ist dann oft für die DNA-Bindung verantwortlich.

### **1.3.2 SPEZIFISCHE MOTIVE DER PROMOTOREN ERMÖGLICHEN DIE BINDUNG DER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN**

Während die Struktur bakterieller Promotoren recht einheitlich ist, sind eukaryontische Promotoren durch die Variabilität ihres Aufbau gekennzeichnet. Ein in vielen eukaryontischen Genen gefundenes Element ist die ca. 30bp vor dem Transkriptionsstartpunkt gelegene TATA-Box. Diese AT-reiche Region fehlt bei konstitutiv exprimierten Haushaltsgenen und ist für die Bindung der RNA-Polymerase II an den Promotor verantwortlich, die hierhin durch verschiedene Transkriptionsfaktoren (TFIIH, TFIIA, TFIIB und TFIIE) geleitet wird. Zu den ebenfalls häufig gefundenen Elementen gehören die *upstream*-Elemente, die die Initiation der Transkription verstärken. Zu diesen meist zwischen den Basenpaaren -50 und -100 gelegenen Elementen gehören CCAAT-Boxen und GC-Boxen, die in unterschiedlicher Anzahl und Orientierung auftreten können. Meist noch weiter stromaufwärts liegen die sogenannten *Enhancer*-Elemente, die ebenfalls in wechselnder Zahl, Orientierung und Anordnung auftreten können und ihre aktivierende (oder reprimierende) Wirkung durch Kontakt mit dem Promotor infolge der Ausbildung einer Schleifenstruktur der dazwischenliegenden DNA entfalten können. *Enhancer*-Elemente können sowohl bei konstitutiv exprimierten als auch induzierbaren Genen auftreten. Für mehrere induzierbare Gene konnten durch Deletionsanalysen Elemente identifiziert werden, die für die Induzierbarkeit der Gene

## 1. Einleitung

---

notwendig sind. Je nach ihrer Funktion als Bindestellen für Repressoren oder Aktivatoren werden sie als *upstream repressing-* oder *upstream activating sequences* (URS und UAS) bezeichnet. Im Fall von Genen, die nach DNA-Schädigung induziert oder reprimiert werden, wurde dieses Element allgemein als *damage response element* (DRE) benannt.

Tabelle 1 zeigt einige dieser DRE-Elemente für Gene der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Es ist leicht ersichtlich, daß hier keine strikte Konsensussequenz auftritt.

Genname	Position	Sequenz
<b>DRE1 (RAD2)</b>	-168	GTGGAGGCATTAAAA
<b>DRE2 (RAD2)</b>	-93	TAAAGGGATTGAAA
<b>RAD23</b>	-296	GTGGCGAAATTGAAA
<b>MAG</b>	-221	TAGGTCGAATAAGAA
<b>SNM1</b>	-117	GGAAACGGACTGAAA
<b>PHR1</b>	-102	GAGGAAGCAGTCAAA
<b>RAD7</b>	-122	ATGGAAAGCAAAATG

*Tabelle 1: Sequenzähnlichkeiten in upstream-Regionen (angegebene Position ist relativ zum Translationsstartpunkt) von DNA-schadensinduzierbaren Genen von S. cerevisiae. Eine Rolle in der Genregulation wurde bislang für DRE1<sub>RAD2</sub>, DRE2<sub>RAD2</sub>, RAD23 und MAG gezeigt (Nach (Friedberg, et al., 1995), modifiziert).*

Die Variabilität ist ein allgemeines Charakteristikum von derartigen Motiven, wobei gerade durch geringfügige Veränderungen gegenüber der Konsensussequenz eine unterschiedlich hohe Bindungsaffinität der Transkriptionsfaktoren entstehen könnte. Daher können erst funktionelle Analysen, bei denen die Induzierbarkeit in Deletionsmutanten des Promotorbereichs geprüft wird, Aufschluß über eine wirkliche Beteiligung dieser Motive an regulatorischen Prozessen liefern. Für die in

Tabelle 1 aufgelisteten Gene wurde diese funktionelle Untersuchung bislang nur für *RAD2*, *RAD23* und *MAG* durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, daß die transkriptionelle Aktivierung in Eukaryonten einen komplexen Prozess darstellt und unterschiedlichste Faktoren an dessen Regulierung beteiligt sind. So sind weder die Erkennungsmotive der Promotorbereiche konserviert, noch zeigen die Transkriptionsfaktoren einen einheitlichen Mechanismus der Aktivierung. In vielen

Promotoren sind zudem mehrere Erkennungssequenzen für verschiedene Transkriptionsfaktoren vorhanden, so daß erst die gezielte Untersuchung der einzelnen Promotoren, z.B. durch Deletionsanalysen und *Band-Shift-Assays* zuverlässige Aussagen über die molekulare Ursachen der Aktivierung ermöglichen.

## 1.4 BEKANNTE STRAHLENINDUZIERBARE HEFEGENE

### 1.4.1 EIN ÜBERBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Verfahren zur Identifizierung strahleninduzierbarer Gene in Hefe entwickelt werden, weshalb im folgenden ein kurzer Überblick über bereits bekannte strahleninduzierbare Gene in *S. cerevisiae* gegeben werden soll. Diese sind in [Tabelle 2](#) aufgelistet. Interessanterweise zeigen die meisten aufgeführten Gene eine Induzierbarkeit durch mehrere Agenzien. Darunter finden sich auch Agenzien, die DNA-Schäden produzieren, welche zumindest in keinem direkten Zusammenhang mit der Reparaturfunktion des induzierbaren Genprodukts stehen. So konnte gezeigt werden, daß Photolyase (*PHRI*) nicht nur durch UV-Licht, sondern auch durch die Chemikalien 4-Nitroquinolin-1-oxid (4NQO) und Methylmethansulfonat (MMS) induzierbar ist (Sebastian, et al., 1990).

Die Gene, deren Strahleninduzierbarkeit bekannt ist, lassen sich grob in drei Gruppen einordnen. Zum einen finden sich erwartungsgemäß viele Gene, für die auch eine Funktion bei der DNA-Reparatur gezeigt wurde. Dass diese Gruppe die meisten Gene in [Tabelle 2](#) umfaßt, dürfte auch daran liegen, daß viele Reparaturgene gezielt auf Strahleninduzierbarkeit hin untersucht wurden. Die zweite Gruppe umfaßt Gene, die am DNA-Metabolismus beteiligt sind (z.B. *RNR*-Gene und *CDC17*). Schließlich sind in [Tabelle 2](#) auch Gene aufgeführt, deren Induzierbarkeit in *Screening*-Verfahren gezeigt wurde und von denen größtenteils noch nichts über ihre zelluläre Funktion bekannt ist (*DIN*- und *DDR*-Gene).



## 1. Einleitung

Gen	Funktion	UV- bzw. NQO-induzierbar	$\gamma$ -induzierbar	HS <sup>4</sup> -induzierbar	Zell-Zyklus reguliert	Erhöhte Transkription während Meiose	Promotorsequenz untersucht
<i>PHR1</i>	Photolyase	+		-			+
<i>RAD2</i>	NER <sup>1</sup>	+	+	-	-	+	+
<i>RAD7</i>	NER <sup>1</sup>	+		-	-	+	
<i>RAD16</i>	NER <sup>1</sup>	+					
<i>RAD23</i>	NER <sup>1</sup>	+		-	-	+	
<i>RAD5</i> = <i>REV2</i>	Helicase-ähnliches Protein Postrepl. Rep. <sup>2</sup>	+					
<i>RAD6</i>	Ubiquitin Konjugation Postrepl. Rep. <sup>2</sup>	+		-	-	+	
<i>RAD18</i>	Postrepl. Rep. <sup>2</sup>			-	-	+	
<i>RAD51</i>	DSB Rep. <sup>3</sup>		+		+		+
<i>RAD54</i>	DSB Rep. <sup>3</sup>	+	+	-	+	+	+
<i>HDF1</i>	DNA-bind. Protein	+					
<i>SNM1</i>	Cross-link-Rep.	+					+
<i>CDC8</i>	Thymidylat Kinase	+			+	+	
<i>CDC9</i>	DNA Ligase	+	+		+	+	
<i>CDC17</i> = <i>POL1</i>	DNA-Polymerase I	+			+	+	
<i>UBI4</i>	Polyubiquitin			+		+	
<i>MAG1</i>	Methyladenin DNA-Glykosylase	+		-			+
<i>RNR1</i>	Ribonucleotid Reduktase, Große UE	+	+		+		
<i>RNR2</i>	Kleine UE	+	+	-	(+)		+
<i>RNR3</i> = <i>DIN1</i>	Große UE	+	+	-			
<i>RNR4</i>	Kleine UE	+					
<i>DIN2, 3, 4, 6</i>	Unbekannt		(+)				
<i>DIN5</i>	Unbekannt	+	(-)				
<i>DDR42</i>	Unbekannt			+			
<i>DDR48</i>	ATP, GTPase unbek. Fkt.			+			
<i>Ty</i> = <i>DDR7</i> <i>8A</i>	Hefe Transposon	+	+				
<i>HIS 3, 4</i>	Histidin Metabolismus						

<sup>1</sup> NER=Nucleotid-Exzisions-Reparatur    <sup>2</sup> Postreplikations-Reparatur    <sup>3</sup> DSB=Doppel-Strang-Bruch    <sup>4</sup> HS = Hitzeschock

Tabelle 2: Strahleninduzierbare Gene von *S. cerevisiae* (nach (Friedberg, et al., 1995), erweitert)

Für keines der echten Reparaturgene mit Ausnahme von *RAD51* und *RAD54* konnte eine Zellzyklusregulation gezeigt werden, wohingegen Gene mit einer dualen Funktion in Zellzyklus und Reparatur wie *RNR1*, *CDC9* oder *CDC17* zellzyklus-reguliert sind. Inwieweit erhöhte Transkriptmengen in der Meiose auf eine wirkliche meiotische Regulation zurückzuführen sind, ist unklar, da viele Hefegene in der Meiose stärker exprimiert werden (Kaback and Feldberg, 1985). Besonders fragwürdig ist die physiologische Rolle in der Meiose bei den Genen, für die keinerlei meiotischer Effekt in Mutantenstämmen gefunden wurde.

Exemplarisch sollen im folgenden drei gut charakterisierte Gene beschrieben werden. Mit *RAD54* und *RAD2* wurden zwei Gene gewählt, die an unterschiedlichen Reparaturwegen beteiligt sind (homologe Rekombination (HR) und Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)). Das dritte Beispiel ist die Ribonukleotidreduktase mit den kodierenden Genen *RNR1*, *RNR2* und *RNR3*, bei dem die Signaltransduktion, die letztlich zur Induktion führt, zumindest ansatzweise verstanden ist.

## **1.4.2 AUSGEWÄHLTE GENE MIT GUT UNTERSUCHTER STRAHLEN-INDUZIERBARKEIT**

### **1.4.2.1 *RAD54***

Das DNA-Reparatur-Gen *RAD54* wird in die *Rad52*-Epistasisgruppe eingeordnet, die für die Reparatur von DNA-Schäden mittels homologer Rekombination verantwortlich ist. Im Gegensatz zu *rad52*-Mutanten, die einen generellen Defekt in homologer Rekombination aufweisen, können *rad54*-Zellen noch bestimmte Arten Chromosomen-vermittelter homologer Reparatur in der Meiose durchführen (Arbel, et al., 1999). Neben seiner Funktion beim homologen Schwester-Chromatid-Austausch (Sister-Chromatid-Exchange, SCE) wird Rad54p zusammen mit Rad51p, Rad55p und Rad57p für die Einzelstrang-Endverknüpfung (Single Strand Annealing SSA) benötigt (Ivanov, et al., 1996). Rad54p stimuliert in einem frühen Stadium der homologen Rekombination die Rad51p-abhängige Paarung der homologen DNA-Bereiche unter ATP-Hydrolyse. *RAD54* gehört zu den Genen in Hefe, deren Expression und Induzierbarkeit am ausführlichsten charakterisiert worden sind (Clever, et al.,

## 1. Einleitung

---

1999; Cole and Mortimer, 1989; Cole, et al., 1987; Cole, et al., 1989; Johnston and Johnson, 1995; Kanaar, et al., 1996). So wurde die Induzierbarkeit des *RAD54*-Gens von Cole et al. (Cole, et al., 1987) mit einem lacZ-Fusionsplasmid untersucht. Hierbei waren die Promotorregion und ca. 300bp des kodierenden Bereichs im richtigen Leseraster mit dem bakteriellen lacZ-Gen ligiert. Bei einer Dosis von 500Gy war das Fusionsprotein sechsfach induzierbar, eine Dosis von 50Gy bewirkte eine 3,7 fache Induktion jeweils vier Stunden nach Bestrahlung. Auch UV-C-Strahlung bewirkte eine deutliche Induktion (6-fach bei 100J/m<sup>2</sup> und 2-fach bei 30J/m<sup>2</sup>) ebenso wie die alkylierende Chemikalie MMS. Hitzeschockbehandlung führte hingegen zu keiner Induktion. Eine induzierte Expression der Restriktionsendonuklease *EcoRI* bewirkte eine dreifache Induktion des *RAD54*-Fusionsgens, was darauf hindeutet, daß die so erzeugten DSB alleine ausreichend sind, um ein Signal für die Induktion auszulösen. Durch Arretierung der Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase konnte außerdem gezeigt werden, daß die Induktion nach DNA-Schäden unabhängig vom Zellzyklus stattfindet (Cole, et al., 1987). Das Gen *RAD54* zeigt eine Zellzyklusregulation mit ähnlichem Verlauf wie bei dem *RNRI*-Gen (Johnston and Johnson, 1995). Im *RAD54*-Promotorbereich konnte ein MCB-Element wie in mehreren anderen schadensinduzierbaren Genen (*CDC9*, *POL1*, *RAD51*, *RNRI*) nachgewiesen werden. Der MBF-Komplex, für den eine Bindung an das MCB-Element gezeigt wurde, gehört mit SBF zu den zwei bislang bekannten Transkriptionskomplexen, die bei Einleitung der Mitose aktiviert werden. Offenbar ist das MCB-Element charakteristisch für viele Gene mit dualer Funktion in S-Phase und DNA-Schadensreparatur.

Die Gruppe von Hoeijmakers (Kanaar, et al., 1996) konnte für die Maus- und Menschhomologe mRAD54 und hRAD54 ebenfalls eine Zellzyklusregulation zeigen, nicht aber die Konservierung der Schadensinduzierbarkeit. Zwar konnte eine partielle funktionelle Komplementation des Hefegens in Säugern gezeigt werden, aber im Gegensatz zu dem Hefegen wird hRAD54 nach UV- und gamma-Bestrahlung nicht induziert.

Für *RAD54* in Hefe wurde ein 29bp langes *damage response element* (DRE) im Bereich von –99 bis –77 des Transkriptionstartpunktes durch Deletionsanalysen charakterisiert. Da die Deletion dieses Bereiches aber keinerlei Einfluß auf Wachstum oder Überleben nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien im Vergleich zum WT hatte (Cole and

Mortimer, 1989), bleibt die physiologische Bedeutung der Schadensinduktion des *RAD54*-Gens unklar.

#### 1.4.2.2 RIBONUKLEOTIDREDUKTASE: *RNR1*, *RNR2* UND *RNR3*

Die Ribonukleotidreduktase katalysiert als Multimer des Typs  $\alpha_2\beta_2$ , wobei  $\alpha$  Rnr1p und  $\beta$  Rnr2p darstellen, die Reduktion von Ribonukleotiden zu Desoxyribonukleotiden. Die Geschwindigkeit dieses Schritt ist der limitierende Faktor der Rate der DNA-Synthese (Übersicht bei (Elledge, et al., 1993)). *RNR1* stellt die große, *RNR2* die kleine Untereinheit des Enzyms dar. *RNR1* und *RNR3* sind funktionell homolog, werden allerdings unterschiedlich stark basal exprimiert. Alle drei Gene sind sehr stark induzierbar durch DNA-Schäden oder DNA-Synthese-Inhibitoren wie Hydroxyharnstoff (HU). Für *RNR2* (Elledge and Davis, 1989; Hurd and Roberts, 1989) und *RNR3* (Endo-Ichikawa, et al., 1996) wurde die Promotorsequenz durch Deletionsanalysen untersucht, und es konnten in beiden Genen jeweils drei Elemente identifiziert werden, die die schadensinduzierte Induktion vermitteln. Im Fall von *RNR3* wurden zwei URS-Elemente und ein UAS- Element gefunden, wobei für die URS1-Sequenz die Bindung eines noch nicht näher charakterisierten Proteinfaktors gezeigt wurde, der im Zug der transkriptionellen Aktivierung abgespalten wird. Somit spielt hier offenbar eine Art Derepression für die Induktion eine wichtige Rolle. Auch für *RNR2* wird Derepression als Mechanismus diskutiert, da die Deletion der URS zu einem erhöhten Basalniveau von Rnr2p führt, aber keine verstärkte Induktion gefunden wurde. Bei *RNR2* wurden ein URS und zwei UAS charakterisiert, wobei für UAS2 (-355 bis -346) die Bindung des Rap1-Proteins gezeigt wurde. Rap1p spielt, wie weiter oben beschrieben, eine wichtige Funktion beim *Silencing* von Genen, kann aber offensichtlich auch transkriptionsaktivierend wirken. Von großem Interesse sind bei den Ribonukleotidreduktase-Genen aber vor allem mehrere Proteinfaktoren, die die DNA-Schadensinduktion bedingen und durch mehrere *Screening*-Verfahren identifiziert wurden. Dabei machte sich die Gruppe von Elledge den Umstand zu Nutze, daß *RNR3* unter normalen physiologischen Bedingungen nicht oder allenfalls sehr gering exprimiert wird. Durch genomische Integration einer Fusionskassette des 5'-Bereichs des *RNR3*-Gens mit dem offenen Leserahmen des *URA3*-Gens in Zellen, deren genomische *URA3*-Kopie deletiert war, konnte auf spontane Mutanten selektioniert werden, die *RNR3-URA3* ohne Schadensinduktion konstitutiv exprimierten (Zhou and Elledge, 1992). Unter den gefundenen *CRT*-Genen (*constitutive RNR3 expression*) befanden sich zwei Gene,

## 1. Einleitung

---

die als Transkriptionsfaktoren bereits bekannt waren (*TUP1* und *SSN6*) sowie *POLI*, *RNR2* und *RNR1*. Das gleiche System ermöglichte unter veränderten Bedingungen die Isolierung von *DUN*-Mutanten (*damage uninducible*), indem das Fusionsgen durch HU induziert wurde und mittels FOA-Medium (5-Fluor-Orothidinsäure, in dessen Gegenwart uracil-synthetisierende Zellen absterben) Mutanten selektioniert wurde, die kein Rnr3-Ura3-Fusionsprotein herstellen konnten (Zhou and Elledge, 1993). Für *dun1*-Mutanten konnte gezeigt werden, daß auch die Induktion von *RNR2* und *RNR1* blockiert ist, wohingegen die Induktion von *UBI4* unbeeinflusst blieb, was auf die Existenz von mindestens zwei unterschiedlichen Induktionswegen nach DNA-Schädigung schließen lässt. *DUN1* kodiert für eine nukleäre Proteinkinase, die bei DNA-Schädigung phosphoryliert wird, vermutlich durch Autophosphorylierung. Ein drittes *Screening*-Verfahren (Allen, et al., 1994) ermöglichte die Identifizierung von zwei weiteren Genen, die an der Signaltransduktion zur schadensinduzierten Transkription beteiligt sind. Isoliert wurden hierbei *sad*-Mutanten (*S-phase arrest-defective*), die einen Defekt im S-Phasenarrest-Kontrollpunkt aufwiesen und in Gegenwart des DNA-Synthese-Inhibitors HU die Mitose einleiteten, was letale Folgen aufgrund unreplizierter DNA nach sich zog. *SAD1* ist allelisch mit *RAD53* und kontrolliert neben dem S-Phasen- auch die G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Kontrollpunkte. Ferner zeigte sich, daß in der *sad1*-Mutante die schadensinduzierte Aktivierung von Dun1p unterbleibt und somit die transkriptionelle Aktivierung der *RNR*-Gene nach DNA-Schädigung blockiert ist. Die schadensinduzierte Phosphorylierung von *SAD1* (=Rad53) wird wiederum von den zwei ATM-Homologen *MEC1* und *TEL1* kontrolliert (Sanchez, et al., 1996), so das Rad53p offenbar eine Rolle als Signaltransduktor einnimmt. Schließlich konnte in jüngerer Zeit nachgewiesen werden, daß auch *RAD16* für die transkriptionelle Aktivierung der *RNR*-Gene benötigt wird (Paesi-Toresan, et al., 1998). Insgesamt ergibt sich somit ein recht komplexes Bild der schadensinduzierten Signaltransduktion für die *RNR*-Gene, das in [Abbildung 3](#) zusammengefasst ist. Neben den koregulierten Genen *MAG* und *MGT1* (Xiao, et al., 1993) sind die *RNR*-Gene der bisher einzige Fall in Hefe, bei dem eine gemeinsame Regulation mehrerer schadensinduzierter Gene, ähnlich wie bei der SOS-Antwort in *E. coli*, beobachtet wurde. Zudem konnten bislang für kein anderes schadensinduziertes Hefegen so viele Faktoren identifiziert werden, die stromaufwärts in der Transduktionskaskade eine Rolle sowohl für die schadensinduzierte Transkription als auch für den Zellzyklusarrest spielen.

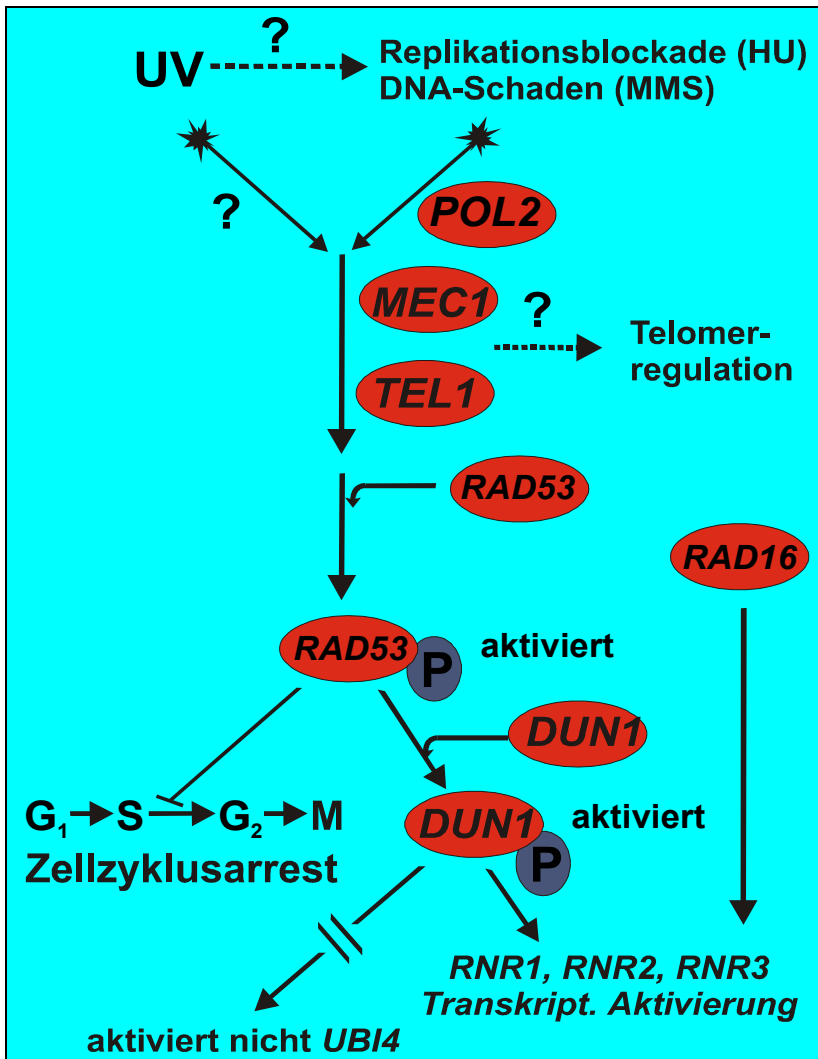


Abbildung 3: Signalkaskade der an der Aktivierung der RNR-Gene beteiligten Faktoren (nach (Sanchez, et al., 1996) modifiziert und erweitert)

### 1.4.2.3 RAD2

*RAD2* gehört mit *RAD1*, *RAD3*, *RAD4* und *RAD10* zu den Genen, die in einem frühen Stadium der Nukleotid-Exzisions-Reparatur für spezifische Schnitte in der geschädigten DNA nötig sind. Im Gegensatz zu *RAD1* und *RAD3* konnte eine transkriptionelle Aktivierung gezeigt werden (Robinson, et al., 1986), die wie bei den oben vorgestellten Genen (*RAD54* und *RNR*) nicht auf einen spezifischen Induktor beschränkt war. So konnte eine maximal fünffache Induktion 1,5 Stunden nach Behandlung mit 400Gy bzw. 35J/m<sup>2</sup> für ein genomisch integriertes Rad2-lacZ-Fusionsprotein gezeigt werden. Die Chemikalien 4-NQO, Bleomycin, Nalidixin-Säure und Bleomycin führten im Gegensatz zu einer Hitzeschockbehandlung ebenfalls zu einer erhöhten Expression des Fusionsproteins, wengleich die maximale

## 1. Einleitung

---

Induktion mit Faktor 2-3 etwas geringer war. Promotoranalysen ergaben, daß die Induzierbarkeit von zwei Sequenzen DRE1 und DRE2 im Bereich von -166 bis -153 bzw. von -95 bis -72 relativ zum Beginn des kodierenden Bereichs abhängig war (Siede, et al., 1989). Im Gegensatz zu *RAD54*, bei dem die Deletion des DRE zu keinem phänotypischen Unterschied im Vergleich zum WT führte, bewirkt eine Deletion von DRE2 eine erhöhte UV-Sensitivität von Zellen sowohl in der G<sub>1</sub>/frühen S- als auch in der S/G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus. Diese Sensitivität tritt auch in stationären Zellen auf, wohingegen die Deletion des zweiten Elements DRE1 lediglich zu einer erhöhten Sensitivität bei Zellen, die in der G<sub>1</sub>/S-Phase bestrahlt wurden, führt (Siede and Friedberg, 1992). In der gleichen Arbeit wurde gezeigt, daß spezifische Proteine im nichtinduzierten Zustand an die beiden DRE-Elemente gebunden waren. Die Behandlung der Zellen mit DNA-schädigenden Agenzien führte zu einer verstärkten Bindung, die von *de novo* Proteinsynthese abhängig war. Für das *RAD2*-Gen wurden ferner erhöhte Transkriptmengen in der Meiose festgestellt (Madura and Prakash, 1990), während die Expression im mitotischen Zellzyklus konstant war. Interessanterweise wurde mit *DIN7* ein Strukturhomolog zu *RAD2* gefunden, das ebenfalls durch DNA-schädigende Agenzien (MMS, UV, HU) induzierbar war (Mieczkowski, et al., 1997). Für *DIN7* wurde gezeigt, daß die transkriptionelle Aktivierung wie bei den *RNR*-Genen von einem funktionsfähigen *RAD53*-Gen abhängig ist. Ob *DIN7* auch von den anderen Faktoren, die für die Aktivierung der *RNR*-Gene nötig sind, abhängig ist und ob *RAD2* vielleicht auch in Zusammenhang mit dieser Signaltransduktionskette gebracht werden kann, ist momentan noch nicht geklärt.

Die drei hier vorgestellten Gene stellen die am besten untersuchten DNA-schadensinduzierbaren Gene dar. Das Wissen über viele andere Gene, die durch DNA-Schäden aktiviert werden, ist meist deutlich lückenhafter und beschränkt sich in vielen Fällen auf den Nachweis, das erhöhte Transkriptmengen nach Bestrahlung oder Behandlung mit Strahlenmimetika vorliegen. Die „echten“ Reparaturgene, welche häufig über erhöhte Strahlensensitivität der Mutanten entdeckt wurden, und die Gene des DNA-Metabolismus sind gezielt auf Strahleninduzierbarkeit hin untersucht worden. Es wurden aber auch mehrere *Screening*-Verfahren entwickelt, mit denen strahleninduzierbare Gene unabhängig von der physiologischen Rolle des Proteins in der DNA Reparatur identifiziert wurden. Im folgenden sind diese Verfahren kurz dargestellt.

## 1.5 ETABLIERTE *SCREENING*-VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG SCHADENSINDUZIERTER GENE IN *S. CEREVISIAE*

### 1.5.1 FUSIONIERUNG EINES REPORTERGENS MIT cDNA-BANKEN

Bereits Mitte der achtziger Jahre konnten sechs Gene ermittelt werden, die als Fusionsgene auf Plasmiden durch DNA-schädigende Agenzien transkriptionell induziert wurden (Ruby and Szostak, 1985). Diese als *DIN*-Gene (**d**amage **i**nducible) bezeichneten Leserahmen wurden durch ein *Screening*-Verfahren entdeckt, bei dem *lacZ* als Reporter gen mit cDNA-Banken zufällig fusioniert wurde und die exprimierten Fusionsproteine auf Induzierbarkeit mit verschiedenen Agenzien untersucht wurden. Es zeigte sich, daß fünf der gefundenen Gene sowohl durch UV-Licht und  $\gamma$ -Strahlung als auch durch Methotrexat (MTS) und alkylierende Chemikalien aktiviert werden. Ein Fusionsprotein war hingegen nur durch UV-Licht und MTS induzierbar, was bereits damals als Indiz für die Existenz verschiedener Induktionswege gewertet wurde. Interessanterweise zeigte sich später, daß es sich bei dem Gen *DINI* um das oben beschriebene *RNR3*-Gen handelte, während die Funktion der anderen Gene bis heute nicht geklärt ist.

### 1.5.2 DIFFERENTIELLE HYBRIDISIERUNG

Eine weitere Technik zur Identifizierung strahleninduzierter Gene beruhte auf differentieller Plaque-Hybridisierung (McClanahan and McEntee, 1984). Hierbei wurden ca. 9000  $\lambda$ -Klone, die genomische *HindIII*-Fragmente von *S. cerevisiae* enthielten, auf je zwei Nylonmembranen immobilisiert. Die beiden Membranen wurden dann mit radioaktiv markierten cDNA-Proben hybridisiert. Dabei wurde eine Membran mit cDNA aus unbehandelten Kontrollzellen und die andere Membran mit einer cDNA-Probe von UV- bzw. NQO-behandelten Zellen hybridisiert. Es konnten ca. 30 Plaques identifiziert werden, die ein stärkeres Signal mit der behandelten cDNA-Probe zeigten. Vier Plaques zeigten hingegen ein stärkeres Signal bei Hybridisierung mit der Kontroll-cDNA, was auf reprimierte Gene zurückgeführt wurde. Die gefundenen Gene wurden als *DDR*-Gene (**D**N**A**-**d**amage **r**esponse) bezeichnet. Im Fall von *DDR78A* wurde durch Southern-Hybridisierung gezeigt, daß es sich bei dem Transkript um ein repetitives Hefeelement handelte. Tatsächlich handelte es sich bei *DDR78A* um das Retrotransposon Ty



## 1. Einleitung

---

(Bradshaw and McEntee, 1989). Zwei der gefundenen Transkripte (*DDRA2* und *DDR48*) wurden neben NQO und UV-Strahlung auch durch Hitzeschock induziert (McClanahan and McEntee, 1986). In einer weiteren Untersuchung wurde der Einfluss verschiedener *RAD*-Gene auf die Induzierbarkeit von *DDR48* und *DDRA2* getestet (Maga, et al., 1986). Hierbei konnte die Induzierbarkeit des *DDRA2*-Gens auf die Funktionalität des Rad3-Proteins zurückgeführt werden. Hingegen führen Mutationen in *RAD52* und *RAD6* zu erhöhten Basalmengen von *DDRA2* bei unveränderter Induzierbarkeit.

Die gleiche Technik der differentiellen Kolonie-Hybridisierung wurde von Rolfe ebenfalls zur Identifizierung DNA-schadensinduzierbarer Gene angewendet (Rolfe, 1985). Er verwendete allerdings eine genomische DNA-Bank mit *SauIII*-Fragmenten, die nicht in den Phagen  $\lambda$ , sondern in das Plasmid YRp12 inkloniert war. Überraschenderweise fand er lediglich vier DNA-Sequenzen, die nach Schadensinduktion eine erhöhte Transkriptmenge zeigten. Drei dieser Sequenzen zeigten überdies Sequenzhomologien, so daß nur zwei unterschiedliche Transkripte beschrieben werden konnten. Tatsächlich zeigte eine detailliertere Untersuchung (Rolfe, et al., 1985), daß es sich bei allen vier Sequenzen um unterschiedliche Teile des repetitiven Ty-Elements handelte. Für mehrere Kolonien wurde wie in der Studie von Ruby eine Reprimierung der Expression nach DNA-Schädigung beobachtet.

### 1.5.3 ZWEIDIMENSIONALE GELELEKTROPHORESE

Die Technik der zweidimensionalen Gelelektrophorese erlaubte die Identifizierung von zwölf Proteinen, die nach UV-Bestrahlung bzw. NQO-Behandlung verstärkt exprimiert werden (Gailit, 1990). Diese zwölf Proteine wurden auch im *rad3*- und *rad52*-Hintergrund unverändert induziert, und lediglich ein Protein zeigte in der *rad6*-Mutante eine fehlende Induzierbarkeit. Fünf der zwölf gefundenen Proteine ließen sich auch durch Hitzeschock induzieren. Der experimentelle Ansatz dieses *Screening*-Verfahrens limitierte die Analyse auf größere Proteine, die keine hohe Ladung aufwiesen. Die Art der Markierung führte dazu, daß Proteine mit niedrigem Methioningehalt nicht detektierbar waren, und ferner, daß sehr niedrig exprimierte Proteine unterhalb der Auflösungsgrenze von 0,0001% des Gesamtproteingehalts der Zelle nicht nachgewiesen werden konnten. Ob die gefundenen Proteine korrelierbar sind mit induzierbaren Transkripten, die von den anderen Gruppen gefunden wurden, bleibt unklar.

#### **1.5.4 MICROARRAYS ZUR IDENTIFIZIERUNG MMS-INDUZIERBARER GENE IN HEFE**

In jüngster Zeit (Jelinsky and Samson, 1999) wurde durch die Verwendung von sogenannten *Microarrays* das gesamte Hefegenom mit den über 6000 offenen Leserahmen auf transkriptionelle Veränderungen nach Behandlung mit der alkylierenden Chemikalie MMS untersucht. Die *Microarray*-Technik ermöglicht neben der kompetitiven Hybridisierung die parallele Expressionsanalyse mehrerer tausend Gene. Da diese Hochdurchsatz-Methode in dieser Arbeit ebenfalls angewendet wurde, wird hier auf eine Einführung dieser Technik verzichtet (siehe Kap.4). 325 Transkripte mit erhöhter und 76 Transkripte mit erniedrigter Expression nach Behandlung mit 0,1% MMS konnten identifiziert werden. Von den 21 vorher als MMS-induzierbar beschriebenen Genen konnte die Induktion für 18 Gene in dieser Studie bestätigt werden. Interessanterweise waren viele der neu gefundenen Gene sehr viel stärker induzierbar als die bislang bekannten induzierbaren Gene. Die als Kontrolle durchgeführten Northern-Blot-Analysen zeigten eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Array-Hybridisierung. Zusammengefasst lassen die Experimente auf die Induktion eines spezifischen zellulären Programms zur Beseitigung und Ersetzung alkylierter Proteine schließen. Eine Liste aller offenen Leserahmen mit den gemessenen Transkriptmengen und Induktionsfaktoren ist unter <http://www.hsph.harvard.edu/geneexpression/> im Internet abrufbar.

#### **1.6 GENE TRAPPING ALS SCREENING-METHODE IN SÄUGERZELLEN**

Die sogenannte *Gene trap*-Methode beruht auf der Integration einer Genkassette in Zellen höherer Eukaryonten (Hill and Wurst, 1993a; Skarnes, 1993). Gewöhnlich enthält die Kassette ein Selektionsgen und ein promotorloses Reporter-gen. Das Selektionsgen ermöglicht die Identifizierung der Transformanten, in denen die Kassette genomisch integriert wurde. In Säugerzellen wird häufig das Neomycin-Resistenz-Gen unter der transkriptionellen Kontrolle eines starken Promotors verwendet. Der Einsatz des ursprünglich eingesetzten menschlichen  $\beta$ -Actin-Promotors durch den Phospho-Glycerat-Kinase-Promotor (PGK) führte zu einer ca. fünffachen Steigerung der Anzahl neomycin-resistenter Zellen (Hill and Wurst, 1993b). Als promotorloses Reporter-gen wird meist das bakterielle lacZ-Gen benutzt. Bei Integration der

## 1. Einleitung

---

Kassette in ein zelluläres Exon im richtigen Leseraster entsteht somit ein Fusionsprotein, dessen transkriptionelle Kontrolle vom Promotor des getroffenen Gens bestimmt wird.

Zwei zusätzliche Variationen dieses Prinzips wurden entwickelt, um die Anzahl lacZ-exprimierender Zellen zu erhöhen. Einerseits wurde dem lacZ-Gen eine IRES-Sequenz (*internal ribosomal entry site*) vorgeschaltet, die eine Translation unabhängig vom Leseraster des getroffenen Gens durch eine zusätzliche Eintrittsstelle für das Ribosom ermöglicht, wodurch die Frequenz der Reporter-gen-exprimierenden Zellen um den Faktor drei gesteigert werden konnte. Leider ist eine IRES-Sequenz in Hefezellen nicht funktionell [Evstafieva, 1993 #72], so daß die Verwendung einer solchen Kassette für ein *Gene trap*-Verfahren in Hefe nicht in Frage kommt. Eine zweite Strategie zur Effizienzerhöhung bestand in der Verwendung eines En-Introns mit einer *splice-acceptor-site*, das dem lacZ-Gen in der Kassette vorangestellt wurde. In diesem Fall führt die zufällige Integration der Kassette in ein Intron dazu, daß beim Prozeß des Spleißens das vorangehende Exon mit dem lacZ-Gen verknüpft wird und somit ein funktionsfähiges Fusionsprotein gebildet werden kann. Eine Variation dieses Vektors bestand in der Einführung eines ATG-Kodons ins lacZ-Gen, wodurch auch Integrationen in untranslatierte erste Exon-Elemente eines Gens zur Expression von lacZ führen. Diese Modifikation erhöhte die Anzahl lacZ-exprimierender Kolonien wiederum um den Faktor drei. Da die wenigsten Hefegene (weniger als 5%, (Mewes, et al., 1997)) über eine Exon-Intron-Struktur verfügen, ist der Einsatz eines En-Introns in *S. cerevisiae* nicht sinnvoll.

Für die Identifizierung induzierbarer Gene in Säugerzellen wurde die *Gene trap* Methode bereits erfolgreich eingesetzt (Forrester, et al., 1996). Die Kassetten wurden in embryonalen Stammzellen genomisch integriert und die lacZ-exprimierenden Klone auf Expressionsunterschiede hin untersucht, die durch exogene Zuführung der morphogenen Substanz Retinsäure hervorgerufen waren. Von den zwanzig Integrationen, bei denen es zu Expressionsunterschieden kam, waren in neun Fällen eine Induktion und in elf Fällen eine Reprimierung beobachtet worden. Die Analyse des Integrationsorts erfolgte über RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA ends*) und anschließende Sequenzierung, bei der ausgehend von sechs Integrationsfällen fünf neue Gene sowie das als Protoonkogen eingestufte *c-fyn* gefunden wurden. Somit konnte das *Gene trap*-Verfahren zur Identifizierung von Genen, die stromabwärts von Signaltransduktionswegen lagen, erfolgreich eingesetzt werden.

## 1.7 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines neuen Verfahrens zur Identifizierung strahleninduzierbarer Gene in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dabei sollte das für Säugerzellen entwickelte *Gene trap*-Verfahren derart modifiziert werden, daß ein Einsatz in Hefe möglich wurde. Hefe- und Säugerzellen verfügen zwar über eine ähnliche enzymatische Ausstattung für verschiedene Integrationsmechanismen, der Anteil der illegitimen Rekombination, die dem *Gene trapping* zugrunde liegt, ist mit 0,1% (pers. Auskunft R. Schiestl) im Vergleich zur homologen Rekombination deutlich niedriger als bei Säugern. Daher stand im ersten Teil dieser Arbeit die Suche nach integrationsfördernden Methoden im Vordergrund. Weiterhin sollte die Funktionalität des gewählten Reportergens für die Induktionsmessung durch gezielte Integration in Gene, deren Induzierbarkeit bekannt ist oder vermutet wurde, gezeigt werden. Schließlich sollte das derart etablierte Verfahren zur Identifizierung einiger strahleninduzierbarer Gene genutzt werden. Mit der Integration ist stets die Entstehung einer Insertionsmutation verbunden. Daher konnten die als strahleninduzierbar eingestuften Transformanten zur Charakterisierung des betroffenen Gens auf phänotypische Merkmale hin untersucht werden. In einem weiteren Teil dieser Arbeit wird ein sehr neues *Screening*-Verfahren, die hochparallele Analyse mit *Microarrays*, beschrieben und es werden erste Resultate bei der Identifizierung von strahleninduzierbaren Genen mit den „DNA-Chips“ vorgestellt.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 GERÄTE UND ANDERE MATERIALIEN

Agarosegelelektrophorese-Apparaturen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CHEF DRII-Geräte</li> <li>• CHEF-Mapper</li> <li>• horizontale Standardgelelektrophorese alle von BioRad, München</li> </ul>
Blotting-Papier	Whatmann 3MM, Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
<sup>60</sup> Co-γ-Zelle 220	Atomic Energy of Canada, Ltd., Ottawa, Canada
Elektroporationsgerät	Gene Pulser & Pulse Controller, BioRad, München
Elektroporationsküvetten	0,2 cm Küvetten, Invitrogen
Fotofilme	Polaroid Black-and-White print film Type 667, Polaroid, St. Albans, Grossbritannien
Glasperlen (Ø0,25-0,5 mm)	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
Hybridisierungsöfen	HYBAID, MWG-BIOTECH, Ebersberg
Microcon-30 Filter	Amicon, USA
Milli-Pore-Anlage	Millipore GmbH, Eschborn
Nylonmembranen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hybond N<sup>+</sup>, Amersham Buchler GmbH und Co KG, Braunschweig</li> <li>• Qiabrane, Qiagen, Hilden</li> </ul>
PCR-Geräte	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GeneAmp-PCR-System-2400, Perkin Elmer, Norwalk, USA</li> <li>• Thermo Cycler, Perkin Elmer, Norwalk, USA</li> </ul>
PhosphorImager	Fujix BAS 1000 Bio Imaging Analyzer, Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo, Japan
Photometer	Epson MX-82 F/T, Epson GmbH, Düsseldorf
Röntgenfilme	X RAY 90, Fuji-Medical-Films, Tokyo, Japan
Scannergerät	Epson GT-900, Epson GmbH, Düsseldorf SnapScan 1212, Agfa
UV-Transilluminator	T-20S, Herolab
UV- Bestrahlungsapparaturen	Schott GmbH, Mainz
UV-Dosimeter	J225, Micro Pulse Technology, Great Britain
UV- Bestrahlungsapparaturen	Schott GmbH, Mainz

#### 2.1.2 COMPUTERPROGRAMME

für Abbildungen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CorelDraw 8.0, Corel Corporation Limited</li> <li>• Corel Photo-Paint 8.0, Corel Corporation Limited</li> <li>• Photoshop 5.0, Adobe Inc.</li> </ul>
Für die Auswertung der <i>Microarrays</i>	IPLab, Scanalytics, modifiziert
für Homologiesuchen	<a href="http://genome-www2.stanford.edu/cgi-bin/SGD/nph-blast2sgd">http://genome-www2.stanford.edu/cgi-bin/SGD/nph-blast2sgd</a>

für Literaturrecherchen	<a href="http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/">http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/</a>
für Kurzinformationen zu Hefegenen	<a href="http://www.proteome.com/databases/YPD/YPDsearch-quick.html">http://www.proteome.com/databases/YPD/YPDsearch-quick.html</a>
für Plasmiddarstellungen	WinPlas 2.5, Goldstein Software,
für die Quantifizierung von DNA-Banden	RFLPscan™, Scanalytics
für Tabellenkalkulation und Grafiken	Excel 5.0, Microsoft
für die Textverarbeitung	Word für Windows 95, Microsoft
für Zitate	Endnote 2.3, Niles&Associates, Inc.

### 2.1.3 CHEMIKALIEN

[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP, >4.000 Ci/mmol	ICN, Eschwege
Agarosen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• LMP Agarose, GIBCO BRL Life Technologies, Eggenstein</li> <li>• SeaKem LE, Biozym, Hess. Oldendorf</li> <li>• Agarose Type I: Low EEO, SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</li> </ul>
Ampicillin	Serva, Heidelberg
ATP	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Bacto-Agar	DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Bacto-Pepton	DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Bacto-Trypton	DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Bacto-Yeast-Extract	DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Bacto Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate	DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Blocking Reagenz	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Bromphenolblau	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
BSA (Fraktion V)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Cd <sup>2+</sup>	Merck KGaA, Darmstadt
CPRG	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-dATP, >3.000 Ci/mmol	ICN, Eschwege
[ $\alpha$ - <sup>35</sup> S]-dCTP, 600 Ci/mmol	ICN, Eschwege
DTT (0,1M)	GIBCO BRL, USA
Ficoll Type 400	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Fluoreszenzfarbstoffe Cy3- und Cy5-dUTP	Amersham, USA
G418	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Heringssperma-DNA	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Hexanukleotid-Mix	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Kanamycin	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
10x Low T dNTPs	Amersham, USA
Mineralöl (heavy white oil)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
N-Lauroylsarcosin	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Lachssperma-DNA	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
ONPG	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
PEG (MW 3350)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Triton X100	Merck KGaA, Darmstadt
X-Gal	Carl Roth GmbH, Karlsruhe BioTech Trade&Service GmbH, St. Leon-Rot

## 2. Material und Methoden

---

Aminosäuren wurden von Merck KGaA, Darmstadt oder SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, und sonstige Chemikalien von Merck KGaA, Darmstadt, Serva, Heidelberg, oder SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, bezogen.

### 2.1.4 ENZYME UND ANTIKÖRPER

T4-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
Lyticase	<ul style="list-style-type: none"><li>• Roche Molecular Biochemicals, Mannheim</li></ul>
Proteinase K	<ul style="list-style-type: none"><li>• Roche Molecular Biochemicals, Mannheim</li></ul>
Restriktionsendonukleasen und zugehörige Puffer	<ul style="list-style-type: none"><li>• Roche Molecular Biochemicals, Mannheim</li><li>• GIBCO BRL Life Technologies, Eggenstein</li><li>• MBI Fermentas, Vilnius, Litauen</li><li>• New England Biolabs, Schwalbach</li><li>• Promega, Mannheim</li></ul>
Reverse Transkriptase SuperscriptII	GIBCO BRL, USA
RNAsin	GIBCO BRL, USA
T4-Polynukleotid-Kinase	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
<i>Taq</i> DNA Polymerase	GIBCO BRL Life Technologies, Eggenstein
Zymolyase T100	Saikagaku Corporation, Tokyo, Japan

Alle weiteren Enzyme wurden von Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, bezogen.

### 2.1.5 DNA- UND RNA-LÄNGENSTANDARDS

1 kb Ladder (DNA)	GIBCO BRL Life Technologies, Eggenstein
1 kb Ladder (DNA) improved	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
RNA-ladder	<ul style="list-style-type: none"><li>• Roche Molecular Biochemicals</li><li>• New-England Biolabs, Schwalbach</li></ul>

### 2.1.6 KITS

QIAprep 8 Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Midi-Plasmid-Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Maxi-Plasmid-Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Giga-Plasmid-Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen mRNA-Oligotex-Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

## 2.1.7 OLIGONUKLEOTIDE

### 2.1.7.1 OLIGONUKLEOTIDE ZUR EIN-SCHRITT-GEN-DISRUPTION MITTELS PCR

Bezeichnung	Sequenz	$T_A$
RAD5-KanMX-C	5' CTA TTC AAA CAG CAT CTG GAT TTC TTC AAT TCT CCT TTT TCT GGG TCA CCC GGC CAG CG 3'	57°C
RAD5-lacZ-N	5' ATG AGT CAT ATT GAA CAG GAA GAA AGG AAG AGG TTT TTT AAC GAT CCC GTC GTT TTA CAA CG 3'	53°C
SMF3-KanMX-C	5' GAC AAT AAA TAG GTT CCA TTA AAA ATG GAT GTC GGC ACC TGG GTC ACC CGG CCA GCG 3'	57°C
SMF3-lacZ-N	5' CCC AGG AAA TTA TGC CAC TAG TGT TTC CGG TGG TGC TCA AGA TCC CGT CGT TTT ACA ACG 3'	53°C
SPT3-kanMX-C	5' TTA CAT GAT AAT TGG TTT AGA ACT GAG TCT ACC ACC TTT ACT GGG TCA CCC GGC CAG CG 3'	57°C
SPT3-lacZ-N	5' ATG ATG GAC AAG CAT AAG TAT CGT GTG GAG ATT CAA CAG ATG GAT CCC GTC GTT TTA CAA CG 3'	53°C

Die unterstrichenen Bereiche sind komplementär zu Sequenzen des Plasmids MKM14, das als Matrize diente. Die restliche Sequenz ist homolog zu den Hefegenen, die substituiert werden.

### 2.1.7.2 OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE SEQUENZIERUNG BZW. DEN NACHWEIS VON INTEGRATIONSLOCI

Bezeichnung	Sequenz	$T_A$
P1-ku70	5' AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA 3'	63°C
P2-ku70	5' CGG AGA TTA CCG AAT CAA 3'	50°C
MK18fw-VI-263742	5' ACA CCA TAT TCA CGC TCG 3'	52°C
MK18-rev-VI-264195	5' TCA TTG TAG TGA ATA TTT TGG 3'	52°C
MK20-fw-IV-1256721	5' TCC TTT AAC AAT TCA GAC C 3'	50°C
MK20-rev-IV-1257671	5' CAA GTC ATT CCA AAT GGC 3'	50°C
MK26-fw-VII-205343	5' CGC TCA CTT GAG CAG TTC 3'	54°C
MK26-rev-VII-205674	5' GTA GCT TGA TCA CAG AAC C 3'	54°C
MK34-fw-XIII-420387	5' ACT ATG TAC TGC ATT TAG G 3'	50°C
MK34-rev-XIII-421203	5' AAG TCT AGA GAT GTA ATG G 3'	50°C
MK26-seq2	5' CCA CCC GAT TTC ACA CC 3'	52°C



## 2. Material und Methoden

### 2.1.7.3 SONSTIGE VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE

Bezeichnung	Sequenz	$T_A$
SPT3-N-1258610	5' GTT GAA GAC ACT CTG AAC C 3'	54°C
SPT3-C-1259756	5' CAC ATT TAT CAT ACC AGA AGG 3'	56°C
lacZ-Nterm-BglII	5' <u>CGA ATT CAG ATC TAC</u> TGG CCG TCG TTT TAC 3'	50°C
lacZ-Cterm-BamHI	5' <u>CGA ATT CGG ATC CAG</u> CTG AAG CTT CGT ACG 3'	50°C
rad54-N-out	5' GTC TGG TAA TCT GCG TCT TGC 3'	62°C
Seq-Ura3-rc	5' AAT CTA AGT CTG TGC TCC 3'	50°C
Seq-lacZ-rc	5' ACT CCA GCC AGC TTT CC 3'	52°C
EGT2-fw	5' AGA CTC AAA CTT TCT GAT GG 3'	54°C
EGT2-rev	5' TGC ATT ATA CCA AAA GAA CTC 3'	54°C
HSP30-fw	5' ACA AAA CAA CAA GTT TGA GAC 3'	54°C
HSP30-rev	5' TTA AGA CAA TCT CAA GCT GC 3'	54°C
YPR015C-fw	5' GTC TTC ATT GAC CCG TTT C 3'	54°C
YPR015C-rev	5' TTG GTA AAA AGT GTC ACA CC 3'	54°C
ACT1-fw	5' TCC ACC ACT TCT GAA AGA 3'	52°C
ACT1-rev	5' CAC TTG TGG TGA ACG ATA G 5'	54°C
Oligo dT (Amersham)	5' T <sub>(30)</sub> 3'	

Die unterstrichenen Bereiche bei den Primern lacZ-Nterm-BglII und lacZ-Cterm-BamHI bezeichnen die nicht zur Matrize komplementären Bereiche, die zur Einführung der Restriktionsschnittstellen in das Amplifikat benutzt wurden.

Mit Ausnahme der Oligonukleotide, deren Herkunft anders bezeichnet ist, wurden alle Oligonukleotide von der Fa. Metabion, Martinsried, synthetisiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Wenn nicht anderes angegeben, wurde die Anlagerungstemperatur  $T_A$  nach der modifizierten Wallace-Regel berechnet, die für Oligonukleotide mit einer Länge zwischen 17 nt und 30 nt anwendbar ist (Scheinert, et al., 1995).

$$T_A = [ m \times 2^\circ\text{C} + n \times 4^\circ\text{C} ] - 2^\circ\text{C}$$

**m** = Anzahl von (A) und (T)

**n** = Anzahl von (C) und (G)

## 2.1.8 PLASMIDE UND KLONIERUNGSVEKTOREN

### 2.1.8.1.1 pFA6-kanMX6

Das Plasmid pFA6-kanMX6 (3938 bp, siehe [Abbildung 4](#)) wurde mir freundlicherweise von W. D. Heyer zur Verfügung gestellt. Es diente als Matrize für die Herstellung von Fragmenten für die PCR-gestützte Gendisruption von *RAD54* (Wach, et al., 1994).

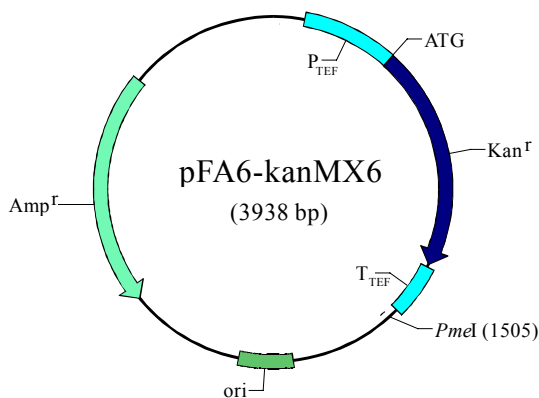


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Plasmids pFA6-kanMX6

Dieses zur Herstellung von Disruptionsfragmenten genutzte Plasmid trägt ein Ampicillinresistenzgen (bp 2523-3380) sowie einen Replikationsursprung (ori, bp 1897-2096) und das kanMX6-Vektormodul. Dieses Modul besteht aus der Promotor- (P, bp 115-457) und der Terminatorregion (T, bp 1277-1470) des TEF, sowie einem dazwischen liegenden, vollständigen Kanamycinresistenzgen (bp 459-1267). Das kanMX6-Modul ist bis auf eine Schnittstelle (*PmeI* statt *SalI* bei bp 1505) identisch mit dem kanMX4-Modul (W. D. Heyer, persönliche Mitteilung), dessen Konstruktion von Wach (Wach, et al., 1994) bereits beschrieben wurde.

## 2. Material und Methoden

---

### 2.1.8.1.2 YEPLAC195

Das Plasmid YEplac195 ([Abbildung 5](#)) wurde in allen Experimenten zur illegitimen Integration parallel transformiert. Als Hefe-*E.coli*-Shuttle-Vektor kann es sich durch seinen 2 $\mu$ -Replikationsstartpunkt auch in Hefe autonom replizieren. Bei geglückter Transformation wird die Uracil-Defizienz des Stammes RSY12 durch das *URA3*-Gen des Plasmids behoben. Interexperimentelle Unterschiede, die durch eine unterschiedliche Aufnahmehäufigkeit des Plasmids verursacht wurden, konnten so ausgeglichen werden. Die Frequenz der illegitimen Integration wurde stets als Quotient von illegitimen Transformanten zu Kontroll-Transformanten mit YEplac195 angegeben. Nähere Informationen zur Klonierung dieses Vektors sind unter

<http://www.umanitoba.ca/academic/faculties/medicine/biochem/gietz/Vectors/YEplac195.html> erhältlich.

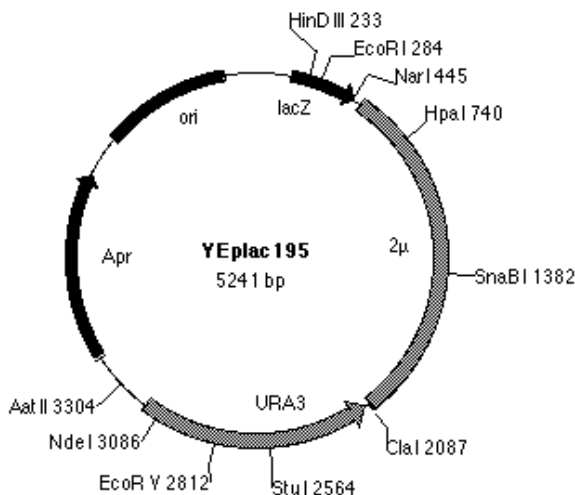


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Plasmids YEplac195

### 2.1.8.1.3 pGEM4

In den Vektor pGem4 wurde das genomische *RAD54*-Fragment einkloniert, um einen Vektor für die gezielte Integration herzustellen ([Kap.3.1](#)). pGem4 ist kommerziell bei der Fa. Promega zu beziehen. [Abbildung 6](#) zeigt eine schematische Darstellung des Plasmids mit den Restriktionsschnittstellen, in die das *RAD54*-Fragment einkloniert wurde.

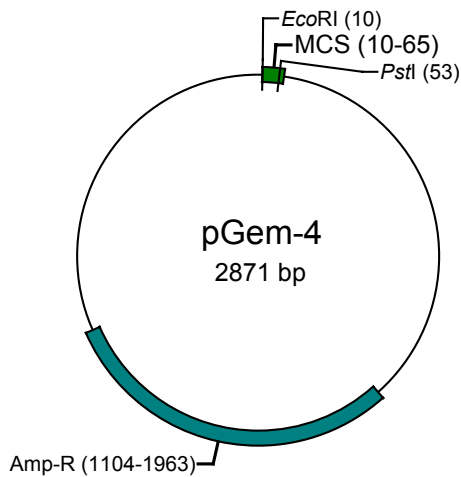


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Plasmids pGem4. Mit MCS ist die „multi-cloning site“ abgekürzt.

#### 2.1.8.1.4 pCM159

Dieses freundlicherweise von F. Herrero zur Verfügung gestellte Plasmid wurde benutzt, um das darin enthaltene lacZ-Gen in die Vektoren für die gezielten und ungezielten Integrationen umzusetzen. Hierzu wurde pCM159 mit *Bam*HI und *Pst*I restringiert und das 3,1 kb lange lacZ-Fragment im Agarosegel isoliert.

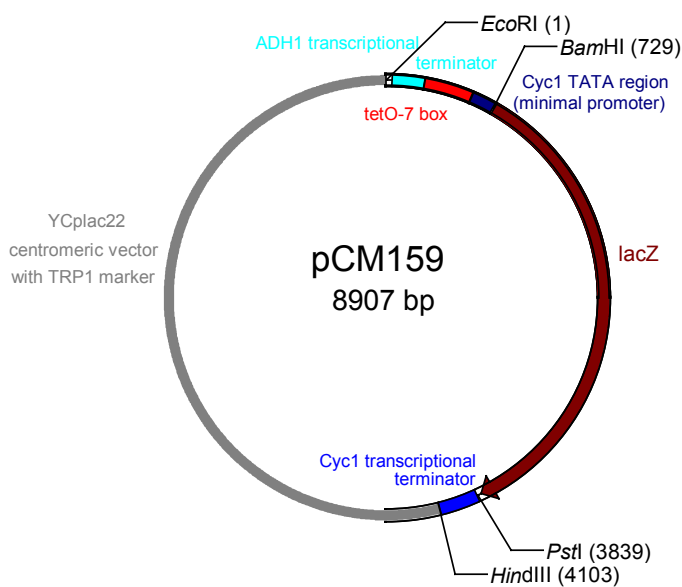


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Plasmids pCM159.

## 2. Material und Methoden

### 2.1.8.1.5 WEITERE VERWENDETE PLASMIDE

Die weiteren in dieser Arbeit verwendeten Plasmide MKM9, MKM14, MKM20 und pM151 sind aus Gründen der Übersichtlichkeit an entsprechender Stelle im Ergebnisteil ([Kap.3](#)) beschrieben und dargestellt. Auch die Herstellung ist dort erläutert.

### 2.1.9 STÄMME

#### 2.1.9.1 *ESCHERICHIA COLI* STAMM

DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>	F <sup>-</sup> $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 <math>\lambda</math> thi-1 gyrA96 relA1</i>
----------------------------	---

Die verwendeten DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> Zellen wurden von GIBCO BRL Life Technologies, Eggenstein, in Form von MAX Efficiency DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> Competent Cells bezogen.

#### 2.1.9.2 HAPLOIDE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* STÄMME

Stamm	Genotyp	Referenz
mk166	Wildtyp <i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>RAD</i> , <i>ade2-1</i> (ochre), <i>can1-100</i> (ochre), <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>trp1<math>\Delta</math>lys2::TylSup</i> , <i>HIS3::lys2::ura3-x</i> , <i>his4::TRP1::his4</i>	(Liefshitz, et al., 1998)
mk166	<i>rad5<math>\Delta</math></i> <i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>rad5<math>\Delta</math>::lacZ-KanMX</i> , <i>ade2-1</i> (ochre), <i>can1-100</i> (ochre), <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>trp1<math>\Delta</math>lys2::TylSup</i> , <i>HIS3::lys2::ura3-x</i> , <i>his4::TRP1::his4</i>	diese Arbeit
mk166	<i>rad54<math>\Delta</math></i> <i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>rad54<math>\Delta</math>::lacZ-KanMX</i> , <i>ade2-1</i> (ochre), <i>can1-100</i> (ochre), <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>trp1<math>\Delta</math>lys2::TylSup</i> , <i>HIS3::lys2::ura3-x</i> , <i>his4::TRP1::his4</i>	diese Arbeit
MKP0	Wildtyp <i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>SMF3</i> , <i>ade2-1</i> , <i>lys2-1</i> , <i>his3<math>\Delta</math>200</i> <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>trp1<math>\Delta</math>901</i> , <i>can1-100</i>	(Ahne, et al., 1997)
MKP0	<i>smf3<math>\Delta</math></i> <i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>smf3<math>\Delta</math>::lacZ-KanMX</i> , <i>ade2-1</i> , <i>lys2-1</i> , <i>his3<math>\Delta</math>200</i> <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>trp1<math>\Delta</math>901</i> , <i>can1-100</i>	diese Arbeit
NY648	<i>smf3<math>\Delta</math></i> <i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>smf3<math>\Delta</math>::URA3</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , <i>-112</i>	(West, et al., 1992)
RSY12	Wildtyp <i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>RAD</i> , <i>yKU70</i> , <i>SPT3</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>his3-11-15</i> , <i>ura3<math>\Delta</math>::HIS3</i>	(Schiestl, et al., 1994)
RSY12	<i>yku70<math>\Delta</math></i> <i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>RAD</i> , <i>yku70<math>\Delta</math>::LEU2</i> , <i>SPT3</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>his3-11-15</i> , <i>ura3<math>\Delta</math>::HIS3</i>	R. Schiestl, pers. Ausk.
RSY12	<i>rad52<math>\Delta</math></i> <i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>rad52<math>\Delta</math>::LEU2</i> , <i>YKU70</i> , <i>SPT3</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>his3-11-15</i> , <i>ura3<math>\Delta</math>::HIS3</i>	(Schiestl, et al., 1994)
RSY12	<i>rad5<math>\Delta</math></i> <i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>rad5<math>\Delta</math>::lacZ-KanMX</i> <i>YKU70</i> <i>SPT3</i> <i>leu2-3</i> , <i>112</i> <i>his3-11-15</i>	diese Arbeit

		<i>ura3Δ::HIS3</i>	
RSY12	<i>spt3Δ</i>	<i>MATa, RAD, YKU70, spt3Δ::lacZ-KanMX, leu2-3, 112, his3-11-15, ura3Δ::HIS3</i>	diese Arbeit
RSY12	<i>yku70Δ</i> <i>spt3Δ</i>	<i>MATa, RAD, yku70Δ::LEU2, spt3Δ::lacZ-KanMX, leu2-3, 112, his3-11-15, ura3Δ::HIS3</i>	diese Arbeit

## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

#### 2.2.1.1 ANZUCHT UND LAGERUNG VON *E. COLI*

Um Bakterien aus einer Gefrierkultur anzuimpfen, wurde mit einer sterilen Impföse etwas Material von der gefrorenen Oberfläche abgekratzt, ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Die so entstandenen Bakterien-Einzelkolonien wurden mit einer sterilen Impföse in das gewünschte Volumen LB-Medium, eventuell versetzt mit einem Antibiotikum, überführt und 12-16 h mit 140 -180 rpm bei 37°C geschüttelt.

Zur kurzfristigen Aufbewahrung wurden die mit Parafilm verschlossenen Agarplatten bei 4°C bis zu 6 Wochen inkubiert. Im übrigen wurden Gefrierkulturen angelegt, indem das gewünschte Volumen einer frischen Bakterienkultur mit 0,2 Vol 100%igem, sterilen Glycerin gründlich vermischt und bei -80°C eingefroren wurde.

#### LB-Medium:

1% (w/v) Bacto-Trypton  
1% (w/v) Natriumchlorid  
0,5% (w/v) Bacto-Yeast-Extract  
2% (w/v) Bacto-Agar  
pH 7,0

- für Flüssigmedium entfiel die Zugabe von Bacto-Agar;
- gegebenenfalls wurde dem Medium nach Abkühlung auf 55°C ein Antibiotikum zugesetzt:  
Ampicillin (gelöst in MilliQ-Wasser) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml  
Kanamycin (gelöst in MilliQ-Wasser) in einer Endkonzentration von 50 µg/ml;

## 2. Material und Methoden

---

### 2.2.1.2 KULTIVIERUNG VON HEFEZELLEN

Um Einzelzellkolonien aus einer Gefrier- oder Flüssigkultur zu erhalten, wurden die Zellen ausplattiert oder ausgestrichen und 3-5 d inkubiert. Wenn nicht anders vermerkt, erfolgte die Hefeanzucht bei 30°C. Durch die Verwendung von Selektionsmedien, bei denen eine oder mehrere Aminosäuren/Nukleoside fehlten (bzw. ein Antibiotikum zugesetzt wurde), wurde auf das Vorliegen einer Prototrophie (Sensibilität) bzw. das Vorhandensein eines entsprechenden Auxotrophie-(Resistenz)-Markergens selektioniert. Die in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme wurden regelmässig durch einen Markertest überprüft.

Um stationäre Hefezellen (Knospenanteil 5-10%) zu erhalten, wurde eine Hefekolonie von einer Platte abgenommen und in geeignetem Flüssigmedium angeimpft. Die Zellen wurden 3-4 d bis zur stationären Phase geschüttelt (160 rpm), bevor sie geerntet wurden.

Um Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu erhalten, wurde ein Aliquot einer Übernachtskultur auf  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in frischem VM angesetzt und 3-4 h geschüttelt (160 rpm). Dabei wurde darauf geachtet, daß die Zellen mindestens zwei Teilungen vollzogen hatten und sich 60-70% der Zellen in der G2/M- oder S-Phase befanden.

Zur kurzfristigen Lagerung wurden Hefezellen auf mit Parafilm verschlossenen Platten bei 4°C aufbewahrt. Um Hefezellen über eine lange Zeit zu lagern, wurde eine Kolonie von einem frischen Verdünnungsausstrich abgenommen, in 0,5 ml Einfriermedium resuspendiert und bei -80°C gelagert.

#### YEPD-Vollmedium :

2% (w/v) Glukose  
2% (w/v) Bacto-Pepton  
1% (w/v) Bacto-Yeast-Extract  
2% (w/v) Bacto-Agar

- für Flüssigmedium entfiel die Zugabe von Bacto-Agar;
- gegebenenfalls wurde das Medium nach dem Abkühlen auf 50°C mit 200 µg/ml G418 versetzt.

#### SM-Medium :

2% (w/v) Glukose  
2% (w/v) Bacto-Agar

nach dem Autoklavieren auf 50-55°C abgekühlt und komplementiert mit:

0,1% Bacto Yeast nitrogen base  
0,11% Ammoniumsulfat  
11,6 µM Adeninsulfat  
47,5 µM L-Arginin-HCl  
47,5 µM L-Histidin-HCl  
457 µM L-Isoleucin  
457 µM L-Leucin

109,5 µM L-Lysin-HCl  
67,0 µM L-Methionin  
49,0 µM L-Tryptophan  
89,2 µM Uracil  
256 µM L-Valin

- für Mangelmedium wurde auf die Zugabe der entsprechenden AS bzw. des Nukleosids verzichtet.
- für Flüssigmedium entfiel die Zugabe von Bacto-Agar.

Einfriermedium :

1% (w/v) Bacto Yeast Pepton  
2% (w/v) Bacto Yeast Extract  
15% (w/v) Glycerol (100%)

### 2.2.1.3 ZELLZAHLBESTIMMUNG

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauerzählkammer. Die Zellen wurden mit Kaliumphosphatpuffer in 1:10-Schritten verdünnt, bis eine quantifizierbare Konzentration zum Auszählen vorlag. Da bei *S. cerevisiae* die Zellvermehrung über Knospbildung erfolgt, musste folgendes beachtet werden:

- I. Zellen mit einer Knospe, deren Grösse höchstens 1/3 der Mutterzelle beträgt (S-Phase), wurden in jedem Fall nur als eine Zelle gezählt.
- II. Bei der Bestimmung der Kernäquivalente (nötig für die Isolation von chromosomaler DNA) wurden Zellen, deren Knospengrösse 1/3 der Mutterzelle übersteigt (G2/M-Phase), doppelt gezählt.
- III. Bei der Bestimmung der koloniebildenden Einheiten wurden alle Formen von knospenden Zellen nur als eine Einheit gewertet.

Kaliumphosphatpuffer :

25 mM Kaliumdihydrogenphosphat  
25 mM di-Kaliumhydrogenphosphat  
mit Kaliumhydroxid auf pH 7,0 eingestellt



### 2.2.2 STANDARDMETHODEN DER MOLEKULARBIOLOGIE

#### 2.2.2.1 TRANSFORMATION VON BAKTERIEN

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der Kalziumchlorid-Methode (Tang, et al., 1994) hergestellt und sofort in eine Transformation eingesetzt oder in Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

Zur Transformation mittels Hitzeschock (Lederberg and Cohen, 1974) wurden 50 µl kompetente Bakterien mit 1 ng unbehandeltem Vektor (Transformationskontrolle) bzw. 5 µl Ligationsansatz gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 45 s bei 42°C in einem Wasserbad inkubiert, sofort mit 1 ml SOC-Medium versetzt und 2 min auf Eis gestellt. Um die Ausbildung der Resistenz zu ermöglichen, wurden die Bakterien eine Stunde bei 37°C inkubiert, bevor 5%, 10% und 85% des Ansatzes auf je eine (bei Blau-Weiss-Selektion zusätzlich mit X-Gal versetzter) Selektionsplatte ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert wurden.

#### SOC-Medium :

2% (w/v) Bacto-Trypton  
0,5% (w/v) Bacto-Yeast-Extract  
10 mM Natriumchlorid  
2,5 mM Kaliumchlorid  
1 mM Natriumhydroxid  
pH 7,0  
nach dem Autoklavieren werden folgende steril  
filtrierte Reagenzien zugefügt :  
10 mM Magnesiumchlorid  
20 mM Glukose

#### 2.2.2.2 STANDARD-TRANSFORMATION VON *S. CEREVISIAE*

Die Kompetenzinduktion und Transformation erfolgten nach der Lithiumacetat-Methode (Gietz and Schiestl, 1995). Um die Resistenzausbildung nach Einbringen des kanMX6-Moduls zu ermöglichen, wurde das Protokoll modifiziert. Nach erfolgtem Hitzeschock wurden die Zellen nicht sofort ausplattiert, sondern in 1 ml YEPD resuspendiert und 8 h bei 30°C inkubiert, bevor sie abzentrifugiert (6.000 rpm, 15 s), in 1 ml sterilem MilliQ-Wasser

resuspendiert, auf Selektionsmedium ausgebracht (1%, 10% und 89% des Ansatzes), und für 4 Tage bebrütet wurden.

### 2.2.2.3 ISOLIERUNG VON DNA

#### 2.2.2.3.1 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS *E. COLI*

Der Aufschluß der Zellen und die Plasmidisolierung erfolgte mit Hilfe der verschiedenen Kits (QIAGEN GmbH, Hilden, Mai 1995) zur DNA-Isolierung nach der Vorschrift des Herstellers.

#### 2.2.2.3.2 ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS HEFEZELLEN

nach (Hoffman and Winston, 1987)

5 ml frühstationäre Hefekultur wurde durch Zentrifugation (10 min, 3.000 rpm, 4°C) geerntet und der Überstand vollständig abgenommen. Das Zellpellet wurde in 0,2 ml frisch aus sterilen Stammlösungen angesetzt Lysepuffer aufgenommen und mit 0,2 ml PCI sowie 0,3 g Glasperlen ( $\varnothing$  0,25-0,5 mm) versetzt. Nachdem die Zellen mechanisch durch Vortexen (3 min) aufgeschlossen worden waren, erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation (12.000 rpm). Die obere wäßrige Phase wurde mit 0,15 ml TE sowie 1 ml 100%igem Ethanol versetzt und erneut 5 min zentrifugiert. Nachdem das Pellet bei RT kurz getrocknet und in 0,3 ml TER (TE mit 50  $\mu$ g/ml RNase A) gelöst worden war, wurde es zweimal 5 min bei 65°C inkubiert, wobei zwischen den Hitzeschritten kurz durch Vortexen gemischt wurde. Zur Fällung der DNA wurde der Ansatz mit 100  $\mu$ l 10 M Ammoniumacetat vermischt, bevor 1 ml 100%iger Ethanol zugegeben und das Präzipitat abzentrifugiert wurde (12.000 rpm, 5 min). Die zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschene DNA wurde kurz luftgetrocknet und anschließend in 50  $\mu$ l Milli-Q-Wasser gelöst.

<u>Lysepuffer</u> :	2% (v/v) Triton X-100 1% (v/v) SDS 0,1 M Natriumchlorid 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0
<u>TE</u> :	10 mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0

## 2. Material und Methoden

---

### 2.2.2.4 SPALTUNG VON DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Die Spaltung der DNA-Moleküle wurde nach den von den Herstellern gemachten Angaben und mit den beigefügten Puffern durchgeführt. Plasmid-DNA wurde für 1-5 h, genomische DNA ÜN bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

### 2.2.2.5 GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON DNA-FRAGMENTEN

Verwendet wurden 0,7 - 1%ige (w/v) Agarosegele (SeaKem LE, gelöst in 0,5 x TBE), gegossen in einer Horizontalapparatur. Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE, die angelegte Spannung betrug 6 V/cm.

Die zu analysierende DNA-Lösung wurde mit 1/5 Ausgangsvolumen 6 x Gelauftragspuffer versetzt und zusammen mit einem DNA-Längenstandard bekannter Konzentration aufgetrennt.

Nach Beendigung der Elektrophorese erfolgte die Färbung der DNA, indem das Agarosegel für 30 min in einer Lösung aus gebrauchtem Laufpuffer, versetzt mit 150 µg/l EB inkubiert wurde. Die Fluoreszenz des interkalierten EB ermöglichte die Visualisierung der DNA-Moleküle bei  $\lambda = 302$  nm. Zur Dokumentation wurden Fotos angefertigt.

<u>6 x Gelauftragspuffer :</u>	15% (w/v) Ficoll 400 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol FF gelöst in TE
<u>5 x TBE :</u>	0,445 M Tris 0,445 M Borsäure 0,01 mM EDTA pH 8,3

### 2.2.2.6 ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN

Zur Elution der DNA aus den Agarose-Stücken wurde der QIAquick Gel Extraction Kit angewendet. Vorgegangen wurde nach dem QIAquick Gel Extraction Protokoll aus dem QIAquick Spin Handbook, September 1997.

### 2.2.2.7 TRANSFER VON DNA-MOLEKÜLEN AUF NYLONMEMBRANEN

nach (Southern, 1974), modifiziert

Das Agarosegel wurde 1 min auf einem Transilluminator ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) bestrahlt und anschließend 15 min in 0,25 M HCl geschwenkt, um eine partielle Depurinierung der DNA und damit eine Erhöhung der Transfereffizienz zu erreichen (der Bestrahlungsschritt wurde nur für PF-Gele durchgeführt). Anschließend wurde das Gel 15 Minuten in 0,4 N NaOH-Lösung geschwenkt, die auch als Transferpuffer diente. Der Blotaufbau erfolgte nach Standardvorschrift, wobei positiv geladene Nylonmembranen (Hybond N<sup>+</sup> bzw. Qiabran plus) verwendet wurden. Die Transferzeit betrug 18 h für Standardagarosegele und 36 h für PF-Gele.

Nach der angegebenen Transferzeit wurde die Membran kurz in 2 x SSC gewaschen, um überschüssige Salze und Gelreste zu entfernen, und luftgetrocknet.

20 x SSC :

3 M Natriumchlorid  
0,3 M Natriumcitrat  
pH 7,0 mit NaOH einstellen

### 2.2.2.8 HYBRIDISIERUNG UND NACHWEIS VON NUKLEINSÄUREN

#### 2.2.2.8.1 HYBRIDISIERUNG MIT RADIOAKTIV MARKIERTEN FRAGMENTEN

##### I. Markierung des Fragments nach (Feinberg and Vogelstein, 1983)

Zur Herstellung der Sonde wurden 60 ng denaturiertes Fragment mit 20  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha$  <sup>32</sup>P] dATP, je 1mM dCTP, dTTP und dGTP, 0,1 Vol Hexanukleotid-Mix und 2 U Klenow-Enzym gemischt und 4-16 h bei 37°C inkubiert.

##### II. Hybridisierung

Die kurz in 2 x SSC geschwenkte Membran wurde mit 20 ml Prä-Hybridisierungslösung eine Stunde bei 68°C prä-inkubiert, bevor diese durch 10 ml Hybridisierungslösung ersetzt wurde, die die denaturierte DNA-Sonde enthielt. Die Hybridisierung erfolgte ÜN bei 68°C. Um

## 2. Material und Methoden

---

überschüssige Sonde zu entfernen, wurde bei 65°C zunächst dreimal je 10 min mit Waschpuffer I und anschließend dreimal je 30 min mit Waschpuffer II gewaschen. Die Membran wurde in Folie eingeschweißt und ein Röntgenfilm 30 min bis 7 d exponiert.

<u>Prä-Hybridisierungslösung :</u>	0,5% (w/v) Blocking Reagenz 1% (w/v) SDS 2 x SSC 0,75 mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA
<u>Hybridisierungslösung II :</u>	0,5% (w/v) Blocking Reagenz 1% (w/v) SDS 2 x SSC 0,5 mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA
<u>Waschpuffer I :</u>	0,5% (w/v) SDS 2 x SSC
<u>Waschpuffer II :</u>	0,5% (w/v) SDS 0,5 x SSC

### 2.2.2.8.2 ENTFERNUNG GEBUNDENER SONDE

Sollte eine Membran erneut mit einer anderen Sonde hybridisiert werden, wurde zunächst die gebundene, radioaktiv markierte Sonde entfernen. Dazu wurde die Membran zweimal je eine Stunde bei 68°C in mindestens 500 ml 0,4 N NaOH/ 0,1% (w/v) SDS geschwenkt. Die vollständige Entfernung der Sonde wurde mit Hilfe eines Geiger-Müller-Zählrohrs überprüft, bevor die Membran kurz mit 2 x SSC abgespült und anschließend luftdicht eingeschweißt wurde.

### 2.2.2.9 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

nach (Saiki, et al., 1988)

Es wurde folgender 20 µl-Standard-Ansatz gewählt: 0,1 Vol 10 x PCR-Puffer (Gibco BRL), 1,25 mM Magnesiumchlorid, je 2 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP, je 4 - 8 pmol des 3'- und 5'-Oligonukleotids und 1 U *Taq* DNA Polymerase, gemischt mit mindestens 200 ng genomische DNA bzw. 2 ng Plasmid-DNA. Sämtliche Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Wenn der DNA-Thermo-Cycler benutzt wurde, mußte die Probe mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet werden.

Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte nach folgendem Grundprogramm:

		95°C	10 min
30 x	}	95°C	1 min (Denaturierung)
		T <sub>A</sub>	1 min (Anlagerung)
		72°C	je nach Produktlänge (Extension) (30 s je 500 bp)
		72°C	10 min (finale Extension)

T<sub>A</sub> = Anlagerungstemperatur. Wiesen die beiden Primer unterschiedliche Anlagerungstemperaturen auf, wurde die niedrigere Temperatur gewählt.

Bei Einsatz des Expand®-PCR-Kits (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim), daß die Amplifikation sehr langer PCR-Produkte ermöglichte, wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen.

#### 2.2.2.10 REINIGUNG VON PCR-PRODUKTEN

Die Fragmente wurden mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit entsprechend den Herstellerangaben (QIAGEN GmbH, Hilden) aufgereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

#### 2.2.2.11 SEQUENZANALYSE VON NUKLEINSÄUREN

Sämtliche Sequenzierungen wurden von den Firmen Genome Therapeutics, Waltheim, MA, USA und MediGenomix, Martinsried, durchgeführt

### 2.2.2.12 KLONIERUNG UND SUBKLONIERUNG

#### 2.2.2.12.1 ERZEUGEN GLATTER ENDEN

0,1 - 1 µg DNA wurden mit den gewünschten Enzymen in einem Volumen von 20 µl verdaut und zur Inaktivierung des Restriktionsenzym 30 min bei -80°C tiefgefroren. Dem aufgetauten Ansatz wurden 1 µl dNTP-Mischung (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und 5 U Klenow-Polymerase zugefügt. Die Probe wurde 15 min bei 30°C inkubiert und die Reaktion durch zehnmünütige Inkubation bei 75°C gestoppt. Anschließend wurde die DNA einer Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation nach (Sambrook, et al., 1989) unterworfen und bei -20°C aufbewahrt.

#### 2.2.2.12.2 ABSPALTUNG DER 5'-PHOSPHATE MITTELS ALKALISCHER PHOSPHATASE

Der Restriktionsansatz wurde mit 0,1 Endvolumen 10 x Dephosphorylierungspuffer und 1 U alkalischer Phosphatase je 30 µg linearisierter Plasmid-DNA versetzt, mit MilliQ-Wasser auf ein Endvolumen von 40 µl gebracht und anschließend 60 min bei 37°C mit inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms erfolgte eine Phenolextraktion und Ethanol-fällung.

#### 2.2.2.12.3 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN IN VEKTOREN

100 ng geschnittener Vektor wurde mit 0,1 Vol 10 x Ligationspuffer und 1 µl 10 mM ATP vermischt. Zu diesem Ansatz wurde soviel Fragment pipettiert, daß das molare Verhältnis von Fragment zu Plasmid 3 : 1 betrug. Zum Schluss wurde 1 U T4-DNA-Ligase zugegeben und die Probe mit MilliQ-Wasser auf ein Endvolumen von 20 µl gebracht. Der Ansatz wurde im Wasserbad bei 14°C ÜN (bei glatten Enden) oder 4 h bei RT (bei überhängenden Enden) inkubiert. Als Ligationkontrolle diente eine Probe, bei der das Fragment durch ein entsprechendes Volumen MilliQ-Wassers ersetzt wurde.

## **2.2.3 BESTRAHLUNG VON HEFEZELLEN UND INKUBATION UNTER NICHTWUCHSBEDINGUNGEN**

### **2.2.3.1 BESTRAHLUNG DER HEFEZELLEN**

#### 2.2.3.1.1 UV-C-BESTRAHLUNG

Die gesamte Bestrahlung wurde im verdunkelten Labor durchgeführt. Die Dosisleistung der UV-C-Lampe wurde vor Versuchsbeginn geeicht. Die Hefezellen wurden unmittelbar vor der Bestrahlung in LHR-Puffer resuspendiert und das gewünschte Volumen in Plastik-Petrischalen pipettiert. Um die Oberflächenspannung zu reduzieren, wurde 1µl einer 1:100-Verdünnung von TritonX100 zugegeben. Die Zellsuspension wurde unter konstanten Schütteln bei 2-4 J/m<sup>2</sup>sec bestrahlt, bis die gewünschte Dosis erreicht war. Nach der Bestrahlung wurde die Zellsuspension in Falcon-Röhrchen überführt und die Platten zweimal mit je 2ml LHR-Puffer gespült, um möglichst wenige Zellen zu verlieren. Die unbestrahlte Kontrolle wurde abgesehen von der Bestrahlung identisch behandelt

#### 2.2.3.1.2 <sup>60</sup>Co-γ-BESTRAHLUNG

Die Bestrahlung mit γ-Strahlen erfolgte in einer <sup>60</sup>Co-γ-Zelle, deren rechnerisch ermittelte Dosisleistung regelmäßig mittels Fricke-Dosimetrie überprüft wurde. Die Bestrahlungsleistung nahm im dreijährigen Versuchszeitraum von 17 Gy/min auf 10 Gy/min ab. Bedingt durch die Geometrie der Bestrahlungskammer traten Dosisabweichungen von höchstens ± 10% auf. Die Zellen wurden gewöhnlich vor der Bestrahlung in LHR-Puffer überführt und in Polyethylengefäßen bestrahlt. Bei Bestrahlung mehrerer Agaroseplatten mit darauf plattierten Zellen wurde eine Blei-Ausgleichsummantelung eingesetzt, die die vertikale Dosischwankung ausglich.



### 2.2.3.2 INKUBATION UNTER NICHTWUCHSBEDINGUNGEN ('LIQUID HOLDING RECOVERY')

Um eine optimale Erholung der Zellen unter Nichtwuchsbedingungen nach Bestrahlung mit  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlen sicherzustellen, wurden sowohl die unbestrahlte Kontrolle als auch die bestrahlte Probe in sterilem LHR-Puffer (Frankenberg-Schwager, et al., 1980) verdünnt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C im Schüttler (120 rpm). Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Proben, um eine gleichmäßige Zellverteilung im Puffer zu gewährleisten, durchmischt, bevor Aliquots entnommen wurden.

LHR-Puffer :

67 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 5,0  
100 mM Glukose  
in MilliQ-Wasser

### 2.2.3.3 BESTIMMUNG DER PLATTIERUNGSEFFIZIENZ

Zur Erstellung von Dosis-Effekt Kurven für den biologischen Endpunkt Überleben nach Bestrahlung oder zur Ermittlung der Plattierungseffizienz nach Gendisruption wurde die Fähigkeit zur Bildung makroskopisch sichtbarer Kolonien herangezogen. Dazu wurden die zu untersuchenden Proben und eine unbehandelte Kontrolle auf einen geeigneten Zelltiter verdünnt und auf YEPD-Platten ausgebracht. Nach 4 d Inkubation erfolgte die Auswertung.

## 2.2.4 DETEKTION VON CHROMOSOMENABERRATIONEN MITTELS PFGE

### 2.2.4.1 ISOLIERUNG CHROMOSOMALER HEFE-DNA FÜR DIE PFGE

modifiziert nach (Friedl, et al., 1993)

Hefezellen der stationären Wachstumsphase wurden mittels Zentrifugation (4.000 rpm, 10 min, 4°C) geerntet und zweimal mit Kaliumphosphatpuffer gewaschen. Die folgenden Angaben beziehen sich auf einen Ansatz von je  $1 \times 10^9$  c. Das Zellpellet wurde in 600  $\mu\text{l}$  50 mM EDTA (pH 8,0) resuspendiert, mit 200  $\mu\text{l}$  Lysepuffer und 800  $\mu\text{l}$  Agaroselösung (temperiert auf 50°C) versetzt, gemischt und sofort in ethanolgereinigte Formen (1 mm x 1 cm

x 2 cm) pipettiert. Nach dem Erstarren der Blöckchen wurden diese in 2 ml Inkubationspuffer überführt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde der Puffer durch 2 ml Proteinase K-Lösung ersetzt, und der Ansatz bei 50°C für 20 h inkubiert. Die Peptide sowie andere, bei der PFGE störende Substanzen wie das Detergenz, wurden durch mindestens drei mehrstündige Waschschrirte mit jeweils 10 ml Waschpuffer entfernt. Die Proben wurden solange bei 4°C aufbewahrt, bis zur Beladung eines Gels Teile der Blöckchen steril entnommen und mit Deckgläschen auf eine Größe von 1 mm x 1 cm x 0,5 cm zugeschnitten wurden.

<u>Lysepuffer :</u>	200 ml SEC-Puffer 5 µl 2-Mercaptoethanol 555 U/ml Lytikase
<u>SEC-Puffer :</u>	1 M Sorbitol 0,1 M EDTA 0,01M Citrat-Phosphat-Puffer pH 7,0
<u>Agaroselösung :</u>	2% (w/v) LMP-Agarose gelöst in 125 mM EDTA (pH 8,0)
<u>Inkubationspuffer :</u>	0,5 M EDTA 0,01 mM Tris/HCl pH 9,0
<u>Proteinase K-Lösung :</u>	1% (w/v) Natriumlauroylsarcosine 0,1% (w/v) Proteinase K 0,5 M EDTA, pH 9,0
<u>Waschpuffer :</u>	10 mM EDTA 10 mM Tris/HCl pH 7,5

#### **2.2.4.2 GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG CHROMOSOMALER DNA MITTELS PFGE**

Für die PFGE wurden 0,9%ige (w/v) Agarosegele (Agarose Type I: Low EEO, gelöst in Laufpuffer, 0,5 x TBE) verwendet, bei denen die Größe der Auftragstaschen genau 1 cm x 1 mm (Länge mal Tiefe) betrug, so daß die auf 0,5 cm x 1 cm (Höhe mal Länge) zugeschnittenen DNA-haltigen Agarose-Blöcke (Tiefe 1 mm, siehe 2.2.4.1), genau eingepaßt werden konnten. Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE (1,9 l), vorgekühlt auf 14°C.

Die Elektrophorese erfolgte in PFGE-Geräten bei konstant 14°C Puffertemperatur, einem festgelegten Winkel von 120° und 6 V/cm unter folgenden Bedingungen:

## 2. Material und Methoden

---

<i>Gerätetyp</i>	<i>Laufzeit</i>	<i>Pulsdauer</i>
<u>CHEF-DR II</u>	8 h 18,5 h	60 s 90 s - 150 s linear ansteigend
<u>CHEF-Mapper</u>	8 h 14 h	60 s 90 s - 150 s linear ansteigend

Bei diesen Bedingungen wurden 14 Hefechromosomen optimal aufgetrennt, die beiden größten Hefechromosomen (Chromosom IV und XII) befanden sich jedoch in oder nahe der Kompressionszone des PF-Gels. Dadurch kam es zum sogenannten ‘self trapping’ (Noolandi, 1992), so daß nicht alle Moleküle an den durch ihre Länge determinierten Ort im Gel wanderten, und die entsprechenden Moleküle nach Färbung eine verringerte Fluoreszenzintensität aufwiesen.

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die DNA-Moleküle ÜN mit EB angefärbt (EB-Lösung: 100 µg/l in 0,5 x TBE). Die lange Inkubationsdauer gewährleistet eine Sättigung aller Interkalationstellen für EB, so daß die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur vorhandenen DNA-Menge war.

### 2.2.5 „HIGH-EFFICIENCY“-TRANSFORMATION VON HEFE

nach (Gietz, et al., 1992), modifiziert

- Eine Einzelkolonie wurde in 10 ml YPAD-Medium (Vollmedium mit 80mg Adenin pro Liter) angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt.
- Nach Auszählen wurden 100 ml YPAD-Medium mit  $3 \times 10^8$  Hefezellen der Übernachtskultur angeimpft und dreieinhalb Stunden bei 30°C und 300 rpm inkubiert.
- Nach Zentrifugation (2' bei 4400 rpm) und Waschen mit 20 ml aqua dest. wurden die Zellen in 20 ml 0,1M Lithiumacetat resuspendiert und unter Schütteln 15 min bei 30°C inkubiert. Währenddessen wurde ein zuvor abgenommenes Aliquot der Zellen ausgezählt.
- Nach erneuter Zentrifugation der Hefezellen wurde eine Konzentration von  $1 \times 10^9$  c/ml mit 0,1 M Lithiumacetat (LiAc) eingestellt und 100 µl der Suspension mit 240 µl 50% PEG, 15 µl einzelsträngiger Lachssperma-DNA (3,2 mg/ml), 31 µl 1M LiAc und 20 µl DNA versetzt und gut vermischt. Die DNA-Menge für illegitime Integrationen betrug 7 µg, bei den Kontrolltransformationen mit einem episomalen Plasmid 100 ng.

- Der Ansatz wurde 30 min bei 30°C geschüttelt, bevor der Hitzeschock (42°C, 20 min) erfolgte.
- Der Transformationsansatz wurde danach sofort kurz zentrifugiert, der Überstand abgossen und das Zellpellet in 400 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Je 100 µl wurden auf einer Uracil-Mangelmedium-Platte ausplattiert. Bei der stets parallel durchgeführten Kontrolltransformation mit dem episomalen Hefep lasmid YEplac195 wurde das Pellet in 1 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert und Aliquots von 100 µl sowie 10 µl ausplattiert.
- Die Platten wurden bis zur Auswertung nach 3-4 Tagen bei 30°C im Brutschrank inkubiert.

## **2.2.6 PLASMID RESCUE - REISOLIERUNG INTEGRIERTER PLASMIDE**

nach M. Palaniyandi (persönliche Mitteilung), modifiziert

### **2.2.6.1 ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS DEN TRANSFORMANTEN**

- Eine Einzelkolonie wurde ein bis zwei Tage in 5 ml Vollmedium angezogen. Nach Zentrifugation (2' bei 3000 rpm) wurde das Zellpellet mit aqua dest. gewaschen. Im Gegensatz zum ursprünglichen Protokoll wurde dieser Waschschrift dreimal wiederholt. Diese Modifikation verminderte die Zahl verschleppter, nicht integrierter Plasmide deutlich.
- Nach Resuspendierung in 0,4 ml SCE + 0,4 mg Zymolyase wurde das Eppendorf-Gefäß 1-2 h bei 37°C inkubiert. Der vollständige Zellwandverdau wurde mikroskopisch durch Zugabe eines Tropfen SDS zu einem Aliquot des Zelllysats geprüft.
- Nach Zugabe von 0,4 ml 2% SDS und vorsichtigem Mischen wurden 0,2 ml 5M NaCl zugegeben. Nach erneutem Mischen erfolgte eine einstündige Inkubation auf Eis.
- Die Probe wurde zehn Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen.
- Das Pellet wurde mit 0,4 ml aqua dest. versetzt und über Nacht gelöst. Rückstände wurden durch vorsichtiges Auf- und Ab-Pipettieren gelöst.
- Nach Zugabe von Phenol/Chloroform erfolgte ein fünfminütiges Vortexen, um DNA-gebundene Proteine abzutrennen. Nach anschließender Zentrifugation wurde die wäßrige Phase abgenommen und mit 0,8 ml Isopropanol versetzt.
- Das DNA-Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknung an Luft in 50-100 µl H<sub>2</sub>O (abhängig von der Größe des Pellets) gelöst.

## 2. Material und Methoden

---

### 2.2.6.2 RESTRIKTIONSVERDAU UND LIGATION DER GENOMISCHEN DNA

- 25 µl der wäßrigen DNA-Lösung wurden mit folgenden Substanzen versetzt:

5 µl Restriktionsenzym

5 µl Restriktionspuffer

0,5 µl BSA

ad 50 µl H<sub>2</sub>O

- Der Restriktionsverdau erfolgte in acht bis zwölf Stunden bei 37°C.
- Nach Präzipitation mit 96% Ethanol und zweimaligem Waschen mit 70% Ethanol wurde die DNA in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.
- Der DNA-Lösung wurden 2,5 µl T4-DNA-Ligase und 10 µl 10 x Ligase-Puffer zugegeben und mit H<sub>2</sub>O ein Endvolumen von 100 µl eingestellt. Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht.
- Nach erneuter Präzipitation und zweimaligem Waschen wurde das DNA-Pellet in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und bis zur Elektroporation bei 4°C aufbewahrt.

### 2.2.6.3 HOCHEFFIZIENTE *E. COLI*-TRANSFORMATION MITTELS ELEKTROPORATION

Durch den vorangegangenen Restriktionsverdau wurde das Genom in DNA-Fragmente zerlegt, die dann durch Ligase zirkularisiert wurden. Da das Restriktionsenzym so gewählt wurde, daß keine Erkennungssequenz im zuvor integrierten Plasmid vorhanden war, blieb der vollständige Vektor einschließlich flankierender genomischer Bereiche des Integrationsorts beim Restriktionsverdau erhalten. Von der Vielzahl zirkularisierter DNA-Moleküle nach der Ligation sollten lediglich diejenigen, die den zuvor integrierten Vektor enthielten, zu einer autonomen Replikation in Bakterien befähigt sein. Nur diese verfügen über eine ori-Sequenz sowie ein Amp<sup>R</sup>-Selektionsgen, das es transformierten *E.coli*-Bakterien ermöglicht, auf Ampicillin-haltigen Agarplatten zu wachsen. Da lediglich ein einziges Plasmid pro eingesetzter Hefezelle isoliert werden konnte, mußte die Transformation in Bakterien mit hoher Effizienz erfolgen. Daher wurde die Technik der Elektroporation eingesetzt.

#### 2.2.6.3.1 HERSTELLUNG ELEKTROKOMPETENTER ZELLEN

- 200 µl DH5α-Zellen wurden in 500 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von exakt 0,5 bei 600 nm angezogen.
- Es folgten folgende Waschschrirte mit eisgekühltem, sterilem Wasser:
  - 2 x 500 ml
  - 2 x 250 ml
  - 2x 50 ml

Die Zentrifugationsschritte erfolgten in einer auf 4°C gekühlten Heraeus-Zentrifuge für fünf Minuten bei 13000 rpm.

- Abschließend wurden die Zellen in 5 ml eisgekühltem Glycerin resuspendiert und aliquotiert. Die Aliquots wurden in einer Ethanol/Trockeis-Mischung schockgefroren und bei -80°C bis zur Transformation aufbewahrt

#### 2.2.6.3.2 DURCHFÜHRUNG DER TRANSFORMATION

- Die Elektroporationsküvetten, Pipetten-Spitzen und LB-Medium wurden mit Eis vorgekühlt. Elektrokompente Zellen wurden kurz vor der Transformation auf Eis aufgetaut.
- Pro Transformation wurden 10 µl DNA-Lösung an die Wand der Küvette pipettiert und mit 60 µl der kompetenten Zellen versetzt. Nach kurzem Mischen erfolgte die Elektroporation bei 2,5 kV (Widerstand: 200 Ω, Kapazität 25 µFD). Die Küvette wurde mit 1 ml LB-Medium gespült und die Zellen in Eppendorf-Gefäße überführt.
- Zur Regeneration der Bakterienzellen erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C im Schüttler. Nach kurzer Zentrifugation und Entfernung des Überstands wurden die transformierten Zellen auf LB-Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.
- Als Kontrolle wurde stets eine Transformation ohne DNA parallel durchgeführt.
- Abhängig von der Zahl der angewachsenen Bakterienkolonien wurden maximal drei Einzelklone gepickt und nach Vermehrung in Flüssigmedium DNA-Plasmid-Präparationen durchgeführt.
- Die Länge der isolierten Plasmide sollte in jedem Fall größer sein als die des Ausgangsplasmids, was im Agarosegel überprüft wurde

## 2. Material und Methoden

---

- Je nach Länge der isolierten Plasmide wurden weitere Mini- oder Midi-Präparationen durchgeführt und anschließend zur Sequenzierung versendet.
- Bei der Technik des *Gene trapping* wurden für die Transformanten, bei denen mit dem ersten Restriktionsenzym keine Transformanten erhalten wurden, weitere Restriktionsenzyme eingesetzt. Durch Verwendung vier unterschiedlicher Restriktionsenzyme konnte die Effizienz der Plasmidreisolierung von 40% auf über 90% gesteigert werden.

### 2.2.7 X-GAL-ÜBERSCHICHTUNG ZUR IDENTIFIZIERUNG LACZ-EXPRIMIERENDER KOLONIEN

Einer ca. 60°C heißen, einprozentigen LMP-Agarose-Lösung (*low-melting-point*) wurde unter ständigem Rühren 1 mg/ml des Substrats X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) zugesetzt. Agaroseplatten mit stationär angewachsenen Kolonien wurden mit ungefähr 10 ml Chloroform versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation der Kolonien im Abzug wurde das Chloroform abgegossen und die Platten für weitere fünf Minuten getrocknet. Die Agarose-X-Gal-Suspension wurde zupipettiert, bis alle Kolonien überschichtet waren (ca. 15 ml). Nach Erhärtung der Überschichtung erfolgte eine Inkubation bei 30°C im Brutschrank, deren Dauer abhängig von der Expression des lacZ-Gens war und die für maximal 24 h durchgeführt wurde.

### 2.2.8 QUANTIFIZIERUNG DER LACZ-EXPRESSION

#### 2.2.8.1 INDUKTION DES GENOMISCH INTEGRIERTEN LACZ-FUSIONSPROTEINS

$3 \times 10^8$  Hefezellen einer Übernachtskultur wurden in 200 ml Vollmedium angeimpft und bei 30°C unter Schütteln (300 rpm) in die logarithmische Wachstumsphase angezogen. Nach Erreichen einer Zelldichte von  $5 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter wurden die Zellen durch zehnminütige Zentrifugation bei 5000 rpm geerntet. Nach Resuspension in 10 ml LHR-Puffer wurden Aliquots von 2 ml ( $1 \times 10^8$  c/ml) bestrahlt. Nach UV- Bestrahlung wurden die verwendeten Plastikschälchen zweimal mit je 2 ml LHR-Puffer gewaschen, im Fall einer  $\gamma$ -Bestrahlung wurden 4 ml LHR-Puffer direkt ins Falcon-Röhrchen zugegeben. Die Röhrchen

wurden dann bei 30°C im Schüttler (300rpm) inkubiert. Zu den verschiedenen Zeitwerten wurden Aliquots von 1 ml entnommen, zentrifugiert (3 min bei 5000 rpm) und in 0,5 ml Z-Puffer resuspendiert. Bis zur Detektion wurden die Proben dann bei -80°C eingefroren.

### 2.2.8.2 DETEKTION DER LACZ-EXPRESSION

Die Proben der verschiedenen Zeitwerte wurden parallel auf Eis aufgetaut und ein Aliquot von 50µl zur Bestimmung der OD600 entnommen. Der Rest wurde mit 100µl einer Zymolyase-Lösung (0,5 mg in 1 ml Z-Puffer) versetzt und 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach vollständiger Lyse wurden 100 µl des Substrats CPRG-Lösung (Chloro-Phenol-Red-Galaktopyranosid, 4 mg/ml Z-Puffer) zugesetzt und abhängig von der lacZ-Expression zwischen 1 und 180 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei ausreichender Substratumsetzung (mit bloßem Auge erkennbar) wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung gestoppt und die Inkubationszeit in Minuten notiert. Nach 15min Zentrifugation (15000 rpm) wurden 500 µl des Überstands in eine Ein-Weg-Küvette überführt und die optische Dichte bei 574 nm (spezifisch zur Substratumsetzung) und 634 nm (Kontrollwert, der Zellreste berücksichtigt) gemessen. Die Aktivität der β-Galaktosidase errechnet sich nach:

$$\text{Miller Units} = ((\text{OD}_{574} - \text{OD}_{634}) \times 1000) / (\text{OD}_{600} \times t(\text{Inkub.}))$$

Z-Puffer:                    8,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anhydr.)  
                                  5,5 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 1 H<sub>2</sub>O  
                                  0,75g KCl  
                                  0,246 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
                                  ad 1 l H<sub>2</sub>O dest.

## 2.2.9 EXPRESSIONSMESSUNGEN MIT *MICROARRAYS*

### 2.2.9.1 DURCHFÜHRUNG DER BESTRAHLUNGEN

Die Anzucht der Hefezellen erfolgte im 2l-Erlenmeyerkolben mit Vollmedium über dreieinhalb Stunden, ausgehend von einer Übernachtskultur des haploiden Stammes RSY12.



## 2. Material und Methoden

---

Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von  $5 \times 10^6$  c/ml geerntet und abhängig von der verwendeten Strahlenart weiterbehandelt. Die Durchführung der Bestrahlung mit  $\gamma$ - und UV-C-Strahlen erfolgte wie oben beschrieben. Die Durchführung der Bestrahlung mit Protonen und Kohlenstoff-Ionen ( $C^{6+}$ ) erfolgte im Tandembeschleuniger der TU München in Garching. Die Justierung des Strahlengangs sowie die Durchführung der Bestrahlung wurde von P. Quicken übernommen. Da die  $C^{6+}$ -Ionen lediglich eine Reichweite von ungefähr  $100 \mu\text{m}$  aufweisen, mußten spezielle Behältnisse für die Bestrahlung verwendet werden. Hierzu wurden Glasringe mit einem Durchmesser von ca. 4 cm mit Hostafanfolie an einer Öffnung beklebt. Die Trocknung des Epoxid-Klebstoffes und gleichzeitige Sterilisation erfolgte über 4h bei  $150^\circ\text{C}$ . Zusätzlich wurde die Konzentration der Zellsuspension derart gewählt, daß lediglich eine einzige Zellschicht (Monolayer) nach dem Absetzen der Zellen in den Bestrahlungsschalen vorlag. Bei einem ungefähren Durchmesser von  $4 \mu\text{m}$  pro Hefezelle ergab sich somit eine Zellzahl von  $5 \times 10^7$  Zellen pro Schälchen. Dies machte den Einsatz von 20 Schälchen für die Bestrahlung mit  $C^{6+}$ -Ionen notwendig. Bei Protonen konnten aufgrund der wesentlich höheren Eindringtiefe Plastikschälchen des gleichen Durchmessers verwendet werden. Zudem war nicht die Notwendigkeit eines „Monolayers“ gegeben, so daß die zu bestrahlenden Zellen auf lediglich fünf Schälchen aufgeteilt wurden. Nach der Bestrahlung wurden die Behältnisse mit LHR-Puffer gewaschen und mit der bestrahlten Zellsuspension vereinigt, um den Verlust von Zellen zu minimieren. Die Zellen wurden in temperierten Behältnissen zurück in die GSF gebracht und dort eine Stunde bei  $30^\circ\text{C}$  und 200 rpm inkubiert, bevor die RNA-Isolierung erfolgte.

### 2.2.9.2 ISOLIERUNG DER RNA

nach Protokoll des NIEHS (pers. Mitteilung)

Um Kontaminationen mit RNAsen zu vermeiden wurden alle Arbeiten in einem separaten Labor mit Handschuhen durchgeführt. Alle verwendeten Gefäße wurden mit einer 0,1% DEPC-Lösung versetzt, über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend autoklaviert. Verwendete Lösungen wurden, soweit möglich, mit DEPC-haltigem Wasser (0,1%) hergestellt und autoklaviert.

### 2.2.9.2.1 ISOLIERUNG DER GESAMT-RNA

- Die Zellen wurden bei 3500 rpm in 3 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in Falcon-Röhrchen mit 4 ml Lysepuffer resuspendiert
- Es erfolgte die Zugabe von 4 ml saurem Phenol (pH5,5) und ausgiebiges Vortexen.
- Die Mischung wurde eine Stunde bei 65°C im Wasserbad unter gelegentlichem Vortexen inkubiert.
- Die Röhrchen wurden für 10 min auf Eis gestellt und anschließend 10 min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert
- Die wäßrige Phase wurde abgenommen, mit 4 ml Phenol bei RT reextrahiert und abschließend mit 4 ml Chloroform extrahiert.
- Es folgte die Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung und 2 Volumen Ethanol (96%). Nach 20 minütiger Inkubation bei -20°C erfolgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 4°C mit 15000 rpm.
- Das RNA-Pellet wurde schließlich zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 500 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Es folgte die photometrische Quantifizierung eines Aliquots bei 260nm Wellenlänge. Bis zur mRNA-Isolierung wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt

Lyse-Puffer

10mM Tris-Hcl (pH 7,5)  
10mM EDTA (pH 8,0)  
0,5% SDS

### 2.2.9.2.2 ISOLIERUNG DER MRNA

Da Gesamt-RNA lediglich ca. 5% mRNA enthält und insbesondere die rRNA für die weiteren Arbeiten stören könnte, wurde eine mRNA-Isolierung aus der Gesamt-RNA mittels des Oligotex mRNA-Midi-Kits gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

- 1 mg Gesamt-RNA wurde mit dem entsprechenden Volumen Wasser (RNase-frei) auf 500 µl eingestellt und mit 500 µl Puffer OBB und 55 µl Oligotex-Suspension versetzt.
- Die gut durchmischte Probe wurde drei Minuten bei 70°C im Wasserbad erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA zu zerstören.

## 2. Material und Methoden

---

- Es folgte eine zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur, während der die Hybridisierung der oligo dT<sub>30</sub>-Primer der Oligotex-Partikel mit den PolyA-Schwänzen der mRNA erfolgte. Der Oligotex-mRNA-Komplex wurde durch zweiminütige Zentrifugation bei 15000 rpm abgetrennt.
- Das Pellet wurde in 400 µl OW2-Puffer resuspendiert und auf eine mitgelieferte Säule überführt. Es erfolgte eine einminütige Zentrifugation sowie ein weiterer Waschschrift mit OW2-Puffer.
- Die Säule mit dem Oligotex-mRNA-Komplex wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 100 µl heißem OEB-Puffer (70°C) versetzt und durch einminütige Zentrifugation eluiert. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde ein weiterer Elutionsschritt durchgeführt.
- Die mRNA wurde mit Ethanol (96%) gefällt und zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 25 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und ein Aliquot von 5 µl für die Quantifizierung und Qualitätskontrolle entnommen. Die restliche Charge wurde bei -80°C eingefroren.

### 2.2.9.3 REVERSE TRANSKRIPTION, MARKIERUNG UND HYBRIDISIERUNG

Die mRNA-Proben der verschiedenartig bestrahlten Hefezellen wurden auf Trockeneis nach

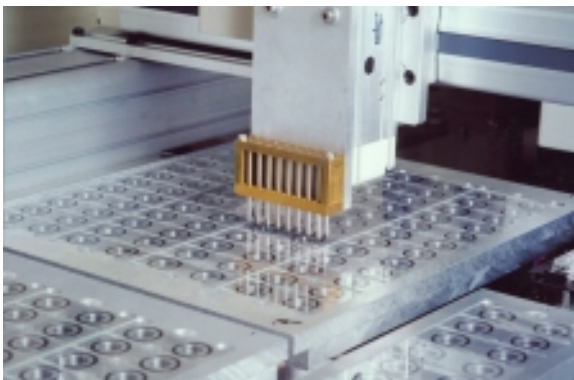


Abbildung 8: Herstellung der Arrays

USA transportiert. Die folgenden Schritte wurden im *Microarray*-Center des National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) in North Carolina durch-geführt. Die Herstellung der Hefe-Arrays mit PCR-Proben aller 6218 Hefegene ist auf der „Homepage“ des Instituts dokumentiert (<http://dir.niehs.nih.gov/microarray/>). Da die fertigen Arrays zum Zeitpunkt meines Eintreffens dort bereits zur Verfügung standen, wird hier auf ihre Herstellung nicht näher eingegangen.

Für Markierungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 wurden 4 µg mRNA eingesetzt, für Markierungen mit Cy3 aufgrund der besseren Markierungseffizienz 2 µg. Die mRNA der

unbestrahlten Kontrolle wurde anfangs mit Cy5, die der bestrahlten mRNA-Probe mit Cy3 markiert. Bei den Wiederholungsexperimenten wurden diese Zuordnung vertauscht.

#### 2.2.9.3.1 REVERSE TRANSKRIPTION BEI GLEICHZEITIGER MARKIERUNG

- Es wurde entsprechend der Anzahl der zu markierenden Proben ein „Mastermix“ aus den folgenden Substanzen hergestellt:

Substanz	Menge in $\mu\text{l}$
5x SuperscriptII-Puffer	8,0
DTT	4,0
dNTP's	4,0
Cy3 oder Cy5	4,0
SuperscriptII	2,0
RNAsin	1,0
Gesamt	23,0

- 14  $\mu\text{l}$  der auf Eis aufgetauten mRNA wurden mit 2  $\mu\text{l}$  Oligo dT-Primer und 1  $\mu\text{l}$  RNAsin in einem Eppendorfgefäß gemischt und 5 min bei 65°C inkubiert
- Es wurden 23  $\mu\text{l}$  des Mastermix zupipettiert und die Probe für 25 min bei 42°C inkubiert. Zu jedem Eppendorf- Gefäß wurden weitere 2  $\mu\text{l}$  SuperscriptII zugegeben und für weitere 35 min bei 42°C inkubiert.
- Durch Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  0,5M EDTA wurde die Reaktion der reversen Transkription gestoppt.
- Es erfolgte die Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  1M NaOH und eine 30 minütige Inkubation bei 65°C, um die verbliebene RNA zu hydrolysieren.
- Nach Abkühlung auf RT wurden 25  $\mu\text{l}$  1M Tris-HCl (pH7,5) zugegeben und die Proben bis zur Aufreinigung auf Eis gestellt

Nach jeder Zugabe erfolgte kurzes Vortexen und Zentrifugieren der Probe.

## 2. Material und Methoden

---

### 2.2.9.3.2 AUFREINIGUNG DER PROBE

Um Unterschiede in der Effizienz der Proben-Aufreinigung zu minimieren, wurden die Cy3- und Cy5-markierten Proben im nächsten Schritt vereinigt und gemeinsam weiterbehandelt.

- Die Proben wurden in eine Microcon30-Säule überführt und mit 500 µl 0,1M TE (pH7,5) überschichtet. Es folgte eine sechsminütige Zentrifugation bei 12000 rpm. Die Zentrifugationsschritte wurden mit verkürzter Dauer wiederholt, bis das Probenvolumen weniger als 100 µl betrug.
- Das Eluat wurde verworfen und die Säule bis 2 mm unter dem oberen Rand mit Wasser gefüllt. Die Probe wurde wiederum durch mehrstufiges Zentrifugieren auf ca. 10 µl eingengt und schließlich die Säule kopfüber in ein frisches Eppendorfgefäß plaziert. Durch dreiminütige Zentrifugation wurde die gereinigte Probe extrahiert.

### 2.2.9.3.3 HYBRIDISIERUNG

Die folgenden Substanzen wurden gemischt und kurz abzentrifugiert.

Substanz	Menge in µl
Probe	23,3
PolyA	1,2
tRNA	1,2
Cot1	1,2
20xSSC	3,3
50xDenhardt's	1,2
2 min auf 98°C erhitzen und auf RT abkühlen	
2,5% SDS	1,0
<b>Gesamt</b>	<b>32,6</b>

Die Hybridisierungs-Probe wurde auf ein Deckglas der entsprechenden Größe pipettiert. Der Glasobjektträger mit den aufgebrachtensonden wurde von oben auf das Deckglas gelegt und schnell mit dem durch Kohäsionskräfte der Hybridisierungslösung gehaltenen Deckglas gewendet. Der „Array“ mit dem Deckglas und der dazwischen befindlichen Hybridisierungslösung wurde dann sofort in eine Hybridisierungskammer gelegt und wasserdicht verschlossen. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C im Wasserbad für 16-24 Stunden.

Nach der Hybridisierung erfolgten zweimal zwei Waschschriffe: Der „Array“ wurde samt Deckglas in ein 0,2l-Gefäß mit 0,5xSSC, 0,01%SDS eingetaucht, wobei sich nach kurzer Zeit das Deckglas vom Objektträger löste. Der zweiminütige Waschschriff wurde einmal wiederholt und anschließend wurde der *Microarray* zweimal mit 0,06xSSC gewaschen. Sofort danach wurde der Objektträger in einer speziellen Halterung in einer Mikrotiter-Plattentauglichen Zentrifuge 3min bei 1000rpm zentrifugiert, um die Rückstände der Waschlösungen vollständig zu entfernen, bevor diese auf dem Array eintrocknen konnten. Der Array wurde lichtdicht verpackt und bis zum Scannen bei RT aufbewahrt.

#### 2.2.9.4 AUSLESEN DER FLUORESCENZINTENSITÄT UND COMPUTERGESTÜTZTE AUSWERTUNG

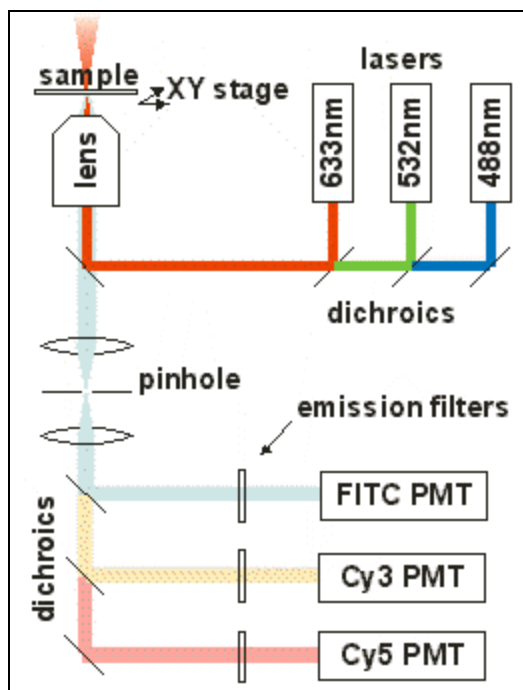


Abbildung 9: Schema der Optik

Die [Abbildung 9](#) zeigt eine vereinfachte Darstellung der verwendeten Optik eines konfokalen Scanners. Die einzelnen Laser sind über halbdurchlässige Spiegel verbunden, so daß theoretisch die Anregung der Fluoreszenzmoleküle bei verschiedenen Wellenlängen gleichzeitig möglich ist. Da hierbei aber Interferenzen auftreten können, wurde stets nur ein Laser gleichzeitig verwendet. Durch den Einfallswinkel bedingt wird an einem zweiten halbdurchlässigen Spiegel das Licht auf die Probe gelenkt. Das von der Probe emittierte Licht wird durch einen Lochschlitz von Streustrahlung

getrennt und durch weitere Linsen gebündelt, bevor es nach Durchgang durch spezielle Emissionsfilter von den Wellenlänge-spezifischen Photomultipliern (PMTs) registriert und quantifiziert wird.

### Zur Anregung eingesetzte Laser:

Laserart	Wellenlänge	Leistung	Benutzt für
NdYag	532nm	100mW	Cy3
HeNe	633nm	35mW	Cy5



Abbildung 10: Benutzer Scanner

Für genauere Informationen zu diesem in [Abbildung 10](#) dargestellten Scanner wird hier aus Platzgründen wieder auf obige Internet-Homepage verwiesen. Der *Microarray* wurde zweimal mit den Wellenlängen von 532nm und 633nm ausgelesen und die resultierenden Signale zu Intensitätsprofilen umgewandelt. Diese zwei resultierenden Bilder wurden mit einer Bildverarbeitungssoftware ausgewertet. Die beiden einzelnen Bilder wurden elektronisch zusammengefügt und die Fluoreszenzintensitäten in Falschfarben dargestellt. Ein roter Spot zeigte hierbei eine Erhöhung der Expression in der bestrahlten Probe an, ein grüner Punkt eine Erniedrigung während ein gelb-brauner Punkt im Fall einer unveränderten Expression in Kontrolle und bestrahlter Probe auftrat. Für die Auswertung wurde eine modifizierte Version des von Scanalytics, Inc. vertriebenen Programms IPLab verwendet. Von Programmierern des National Human Genome Research Institute wurde dieses Programm erweitert. Diese „Array-Suite-Extensions“ ermöglichen die Erkennung der einzelnen Punkte und deren Quantifizierung sowie Zuordnung zu dem entsprechenden Gen. Ferner besteht hier die Möglichkeit, mittels Verteilungskurven der Signalintensitäten die Qualität der Hybridisierung einzuschätzen und bestimmte Fehlerquellen zu erkennen. Da ab einer gewissen Energie jegliche Materie fluoresziert und somit Verunreinigungen des Arrays z.B. durch Staubkörner falsche Signale hervorrufen könnten, wurden alle interessanten Gene mit veränderter Expression nach Bestrahlung manuell auf Verunreinigungen kontrolliert.

### **2.2.9.5 VERGLEICH DER EXPRESSION VON INTERESSANTEN KANDIDATENGENEN MIT NORTHERN-ANALYSEN**

Für die Kontrolle der Expressionsmuster, die mit den *Microarrays* ermittelt wurden, wurden stichprobenartig Gene, die als besonders interessant erschienen, mit Northern-Analysen untersucht, um die Array-Daten zu verifizieren.

#### 2.2.9.5.1 VORBEREITUNG DER mRNA-PROBEN UND GELELEKTROPHORESE

Es wurden jeweils 0,5-1,0 µg mRNA eingesetzt und mit DEPC-Wasser (0,1 %) auf 5 µl Gesamtvolumen eingestellt. Hierzu wurden 15 µl Denaturierungslösung zugegeben und die Probe drei Minuten bei 50°C im Wasserbad inkubiert, um die mRNA zu denaturieren. Die Proben wurden auf Eis gestellt und 4 µl Beladungspuffer zugegeben. Parallel wurde ein 1 % Agarosegel hergestellt. Die Gelkammer wurde mit ca. 800 ml 1xPhosphatpuffer gefüllt. Nach Auftragen der Proben lief die Elektrophorese für 2-3 Stunden bei 100 V im Kühlraum.

- Denaturierungslösung:**
- 50 µl 20xPhosphatpuffer
  - 500µl DMSO
  - 195µl deionisiertes Glyoxal (30%)
- RNA-Beladungspuffer:**
- 5ml Glyzerin
  - 3,265 ml autoklaviertes MilliQ-Wasser
  - 0,435 ml 20xPhosphat-Puffer
  - einige Kristalle Bromphenolblau
- 20x Phosphat-Puffer:**
- 780 ml 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O
  - 1220 ml 0,2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O
- Agarosegel:**
- 1g Agarose
  - 5ml 20xPhosphat-Puffer
  - 94 ml autoklaviertes MilliQ-Wasser
- Färbelösung für den RNA-Blot:**
- 0,5M Natriumacetat (pH 5,2)
  - Einige Kristalle Methylenblau

#### 2.2.9.5.2 NORTHERN-HYBRIDISIERUNG

##### 2.2.9.5.2.1 Northern-Transfer und Färbung der Membran

Aufbau und Durchführung des Northern-Transfers entsprachen dem weiter oben beschriebenen Southern-Transfer. Als Blottingmembran wurde die Hybond N+ Membran verwendet. Der Transfer erfolgte im Kühlraum über Nacht. Nach Abbau der Apparatur wurde der Blot ungewaschen (!) bei 80°C für drei Stunden getrocknet. Um restliches Glyoxal zu entfernen, wurde der Filter in 200 ml einer 20 mM Tris-HCl-Lösung (pH 8,0) der Temperatur 100°C gelegt und bis auf Raumtemperatur abgekühlt. Um die Effizienz des Transfers zu



## 2. Material und Methoden

---

überprüfen, wurde der RNA-Blot gefärbt. Als Vorbehandlung hierfür wurde die Membran zehn Minuten bei RT in 5% Essigsäure gelegt. Danach wurde der Blot in die Färbelösung transferiert und weitere zehn Minuten inkubiert. Zur Kontrasterhöhung wurde der Filter mit Wasser gewaschen. Die RNA erschien dunkelblau, während die restliche Membran lediglich hellblau gefärbt vorlag.

### 2.2.9.5.2.2 Hybridisierung

Der Blot wurde in eine Glasröhre eingebracht und mit 10 ml Prä-Hybridisierungslösung versetzt. Die Inkubation bei 42°C erfolgte über Nacht im Hybridisierungsofen. Anschließend wurde die Prähybridisierungs-Lösung entfernt und durch Hybridisierungslösung ersetzt. Die denaturierte radioaktiv markierte Sonde wurde hinzugegeben und die Hybridisierung erfolgte für 16-24 Stunden bei 42°C im Hybridisierungsofen. Zur Entfernung nicht gebundener Sonde wurde der Blot anschließend für jeweils 15-30 min in den folgenden Waschlösungen inkubiert:

- 2 x SSC, 0,1% SDS
- 1 x SSC, 0,1% SDS
- 0,5 x SSC, 0,1% SDS

Nach den Waschschritten wurde der Blot in eine Plastikfolie eingeschweißt und mit dem Phospho-Imager ausgewertet. Die mitgelieferte Software des Phospho-Imagers erlaubte dann die Quantifizierung der Intensität der Banden.

#### **100 x Denhardts Reagenz**

- 2% BSA
- 2% Ficoll
- 2% Polyvenylpyrrolidon

#### **Prähybridisierungslösung:**

- 5ml Formamid (deionisiert)
- 2,5ml 20 x SSC
- 1,5ml 20 x Phosphat-Puffer
- 1ml 100 x Denhardts Reagenz
- 250µg einzelsträngige Lachssperma-DNA

#### **Hybridisierungslösung:**

- 5ml Formamid (deionisiert)
- 2,5ml 20 x SSC
- 1,5ml 20 x Phosphat-Puffer
- 1ml 100 x Denhardts Reagenz
- 250µg einzelsträngige Lachssperma-DNA
- denaturierte radioaktiv markierte Probe

## 3 ETABLIERUNG EINES *GENE TRAP*-VERFAHRENS IN HEFE

### 3.1 PROBLEMSTELLUNG

Sogenannte *Gene trap*-Verfahren beruhen darauf, daß promoterlose Reporter-genkonstrukte nach ungerichteter Integration in das Genom unter die Kontrolle genomischer Promotoren gelangen. Veränderungen der Promotoraktivität, z.B. nach Behandlung der Zellen mit DNA-schädigenden Noxen, lassen sich dann anhand von Expressionsänderungen des Reporter-gens nachweisen. Dies lässt Rückschlüsse auf die Regulation des durch die Integration getroffenen Gens zu, wobei jedoch berücksichtigt werden muß, daß die Integration mögliche autoregulatorische Mechanismen beeinträchtigen kann. In Säugerzellen werden *Gene trap*-Verfahren seit einiger Zeit erfolgreich angewendet z.B. zur Identifizierung Retinsäure-induzierbarer Gene (Forrester, et al., 1996). In Hefezellen wurde diese Technik nach bislang noch nicht publiziert.

Die Hauptschwierigkeit der Adaption des *Gene trap*-Verfahrens für die Hefe *S. cerevisiae* liegt in der im Vergleich zu Säugerzellen unterschiedlichen Gewichtung der verwendeten Integrationsprozesse. Beide Organismen verfügen über eine ähnliche, hoch konservierte Enzymausstattung, die es ihnen ermöglicht, die Mechanismen der homologen Rekombination (HR) und illegitimen Rekombination (IR) zu nutzen. Tatsächlich werden auch beide Mechanismen in diesen Organismen parallel eingesetzt (Gellert, 1992; Jessberger, et al., 1993). Die Nutzungshäufigkeit der beiden Mechanismen bei der Doppelstrangbruchreparatur ist jedoch unterschiedlich (Übersicht bei (Roth and Wilson, 1989)). Säugerzellen verwenden vor allem die illegitime Rekombination zur Behebung von Doppelstrangbrüchen, und auch die Integration von DNA-Fragmenten findet hier bevorzugt an nichthomologen Bereichen des Genoms statt. In *S. cerevisiae* hingegen werden Doppelstrangbrüche (DSB) überwiegend mittels homologer Rekombination repariert. Homologie-unabhängige Mechanismen wie die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ), bei der Gene wie *YKU70* und *YKU80* involviert sind, spielen dagegen eine untergeordnete Rolle. So zeigt sich ein deutlicher Unterschied im Überleben nach  $\gamma$ -Bestrahlung in einer *yku70*-Mutante erst, wenn durch den Defekt eines Gens der *RAD52*-Epistasisgruppe die homologe Rekombination unterbunden ist (Siede, et al.,

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

---

1996). Ähnliches gilt für die Integration von DNA-Fragmenten, die in Hefe fast ausschließlich durch homologe Rekombination stattfindet. Die Substitution eines Hefegens durch eine DNA-Sequenz, die flankierend Homologien zum zu ersetzenden Gen besitzt, ist zum Beispiel im Gegensatz zu Säugerzellen experimentell mit hoher Erfolgsquote durchführbar.

Wegen der untergeordneten Rolle der illegitimen Rekombination (IR) in Hefe konnte die Integration von nicht-homologen Sequenzen in diesem Organismus erst in den letzten Jahren ausführlicher untersucht werden. Hauptproblem dabei war die extrem niedrige Rate der illegitimen Integration, die in Verbindung mit herkömmlichen Transformationsprotokollen dazu führte, daß kaum Transformanten isolierbar waren. So werden lediglich ca. 0,4 Promille aller nichthomologen DNA-Fragmente, die in eine Hefezelle gelangen, über illegitime Rekombination chromosomal integriert. Diese Schätzung beruht auf dem Befund, daß auf ca. 10000 Kontrolltransformanten, die mit einem episomalen Plasmid transformiert wurden, bei Transformation der gleichen DNA-Menge eines nicht-replikationsfähigen DNA-Fragments lediglich vier genomische Integrationen kommen.

Erst die Optimierung der Transformationstechniken führte zu der Möglichkeit, illegitime Rekombination in Hefe zu studieren (Schiestl, et al., 1993; Schiestl and Petes, 1991). Unter Verwendung von DNA-Fragmenten oder linearisierten Plasmiden, die keinerlei Homologie zum Genom der Zielzelle aufwiesen, konnte die Arbeitsgruppe von R. Schiestl zeigen, daß ein Großteil der integrierten Fragmente an genomischen Stellen inseriert, die Mikrohomologien (1-3 bp) zu den einzelsträngigen Überhängen des integrierten Fragments aufwiesen. Beispielsweise integrierte ein mit *Bam*HI-geöffnetes Plasmid bevorzugt in genomische *Bam*HI-Erkennungssequenzen. Die zweite Klasse von Integrationsfällen zeigte diese Mikrohomologie am Integrationsort nicht. Es konnte aber gezeigt werden, daß ein Teil dieser Integrationen durch Topoisomerase I vermittelt wurden und die Integrationsorte den spezifischen Erkennungsstellen dieses Enzyms entsprachen (Zhu and Schiestl, 1996). Die dritte beschriebene Klasse umfaßte Fälle, in denen es gar nicht zu einer chromosomalen Integration kam. Hier wurden die integrierten Plasmide mit extrachromosomalen DNA-Fragmenten mitochondrialen Ursprungs ligiert. Da die gefundenen mitochondrialen DNA-Sequenzen über Replikationsstartpunkte (ARS-Sequenzen) verfügten, konnte so das Plasmid unabhängig repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben werden, was wie die genomischen Integrationen zur Expression eines Plasmid-kodierten Selektionsgens führte.

Ein wichtiges Kriterium für ein *Screening*-Verfahren ist eine möglichst sequenzspezifische und damit zufällige Integration der transformierten DNA. Dies gewährleistet, daß das gesamte Genom als Integrationssubstrat zur Verfügung steht und nicht bestimmte Bereiche beim Einbau bevorzugt werden. Des weiteren ist es nötig, eine möglichst hohe Integrationseffizienz und Integrantenausbeute zu erzielen. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, welche Parameter die illegitime Rekombination beeinflussen.

## **3.2 UNTERSUCHUNG VON PARAMETERN, DIE DIE NICHT-HOMOLOGE INTEGRATION BEEINFLUSSEN**

### **3.2.1 VERWENDETES INTEGRATIONSSYSTEM**

Für die Voruntersuchung wurde ein System verwendet, das in der Arbeitsgruppe von R. Schiestl bereits erfolgreich zur Untersuchung der illegitimen Rekombination in Hefe benutzt wurde. Plasmid pM151 ([Abbildung 11](#)) trägt als Selektionsmarker das *URA3*-Gen mit endogenem Promotor. Es enthält keine weiteren Hefesequenzen und ist daher in Hefe nicht autonom replizierbar. Transformiert wird dieses Plasmid nach Linearisierung mit *Bgl*III in den Stamm RSY12, bei dem das endogene *URA3*-Gen vollständig deletiert ist (Schiestl, et al., 1993). Die Verwendung dieses Systems sowie Optimierung des Transformationsprotokolls (siehe Material und Methoden) ermöglichten eine Transformationseffizienz von ca. zwei illegitimen Transformanten pro µg eingesetzter DNA. Bei Verwendung des zur Kontrolle eingesetzten episomalen Plasmids YEplac195 wurde mit dieser Methode eine Effizienz von ca. 5000 Transformanten pro µg Plasmid-DNA erzielt.

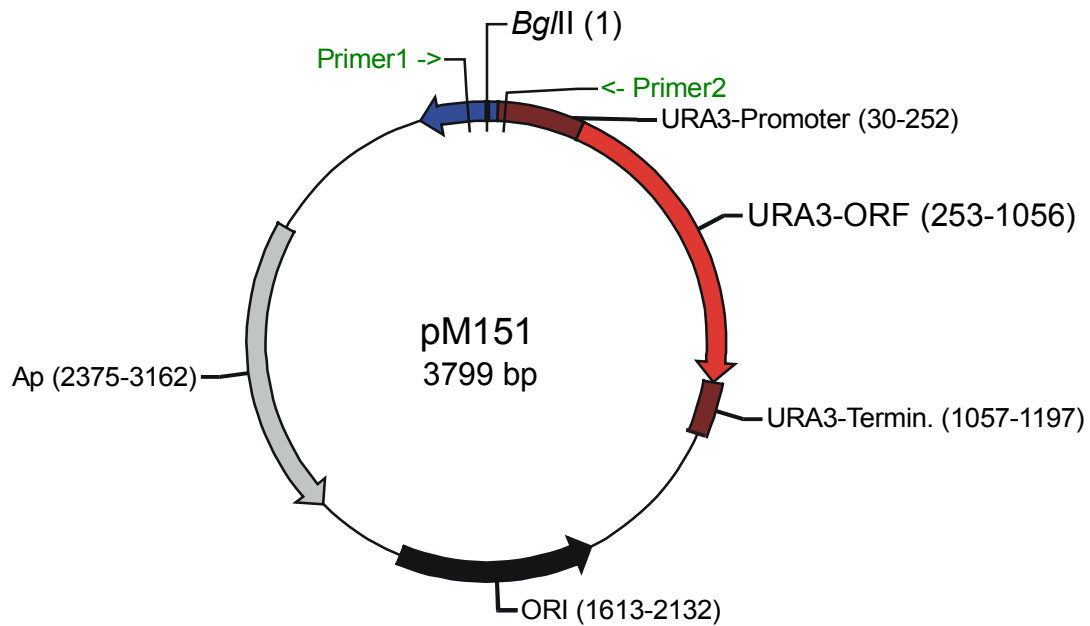


Abbildung 11: Plasmid pM151, mit dem die Integration nicht-homologer DNA in den Stamm RSY12 untersucht wurde. Die Leserichtung der verwendeten Primer zur Identifikation des Integrationsorts sind grün dargestellt.

#### 3.2.2 ERHÖHUNG DER TRANSFORMATIONSFREQUENZ DURCH PARALLELE $\gamma$ -BESTRAHLUNG

Die Zugabe des entsprechenden Restriktionsenzym zum Transformationsansatz führt zu einer deutlichen Erhöhung der Integrationsfrequenz. Dieses Phänomen wurde unter dem Namen *Restriction-Enzyme-Mediated-Integration* (REMI) ausführlich charakterisiert (Manivasakam and Schiestl, 1998). Dies, und die Beobachtung, daß ein beträchtlicher Teil nicht-homologer Integrationen an Topoisomerase I - Erkennungsstellen erfolgt, lässt den Schluss zu, daß das Vorhandensein von Brüchen in der genomischen DNA die Integration erleichtert. Daher lag es nahe, anzunehmen, daß  $\gamma$ -Bestrahlung der Rezipientenzellen ebenfalls einen integrationssteigernden Einfluss haben könnte.

Durch  $\gamma$ -Strahlen verursachte DSB treten nach bisherigem Kenntnisstand unabhängig von der Sequenz zufällig im Genom verteilt auf (Friedl, 1994), was für das *Screening*-Verfahren ein großer Vorteil wäre. Erste Vorversuche, bei denen die Hefezellen direkt nach dem

Hitzeschock mit 200 Gy  $\gamma$ -Strahlung bestrahlt wurden, zeigt eine signifikante Erhöhung der Anzahl illegitimer Transformanten.

Im folgenden wurden verschiedene Parameter variiert, um die Bedingungen für einen möglichst großen Effekt der  $\gamma$ -Strahlung zu ermitteln. Um Unterschiede in der Durchführung der Transformation in verschiedenen Experimenten zu minimieren, wurde parallel ein Aliquot der Hefezellen mit 20 ng eines episomalen Plasmids transformiert. Als Integrationsfrequenz wird der Quotient von illegitimen Transformanten per  $\mu\text{g}$  eingesetzter DNA pro  $10^4$  Kontrollplasmid - Transformanten angegeben.

Zuerst wurde der Einfluss der Dosis auf die Frequenz der IR geprüft. Es zeigte sich, daß die höchste verwendete Dosis von 400 Gy relativ gesehen die stärkste Steigerung der Transformationsrate verursachte, allerdings überlebten bei dieser Dosis auch nur noch 12,9% der Zellen, so daß die Absolutzahl von illegitimen Transformanten hier niedriger war als bei 50 oder 100 Gy. Da für das *Screening*-Verfahren die absolute Zahl an Transformanten entscheidend ist, wurde das *Gene trapping* bei Dosen von 50 und 100 Gy durchgeführt.

Ferner wurde untersucht, ob die Art des einzelsträngigen Überhangs an den Enden des linearisierten Plasmids einen Einfluss auf die Anzahl illegitimer Transformanten hat. Daher wurde das Plasmid mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen linearisiert, die einen 5'-Einzelstrangüberhang (*Bam*HI), einen 3'-Einzelstrangüberhang (*Kpn*I) beziehungsweise ein stumpfes Ende (*Sma*I) erzeugten. Während bei *Bam*HI und *Kpn*I eine Bestrahlung unmittelbar nach dem Hitzeschock gleichermaßen zu einer Steigerung der Integrationseffizienz um ungefähr den Faktor 20 bei 200 Gy und Faktor 30 bei 400 Gy führten, blieb der Effekt bei Plasmiden ohne einzelsträngigen Überhang (*Sma*I) mit Faktor 2,5 beziehungsweise 4,9 geringer.

Schließlich wurde getestet, ob der Zeitpunkt der Bestrahlung einen Einfluss auf die Effizienz der genomischen Integration des mit *Bg*III-linearisierten Plasmids besitzt. Daher wurden die Zellen unmittelbar nach und vor dem Hitzeschock, sowie zu bestimmten Zeitpunkten vor der Transformation mit 200 Gy bestrahlt und der Einfluss auf die Transformationsrate ermittelt. Am deutlichsten war die integrationssteigernde Wirkung der Bestrahlung unmittelbar nach

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

---

dem Hitzeschock, während bei zunehmendem zeitlichem Abstand der Bestrahlung vor der Transformation der Effekt immer geringer wurde (Tabelle 3).

Zeitlicher Abstand der Bestrahlung vor der Transformation in h	Illeg. Transformanten pro $\mu\text{g}$ pro $10^4$ Transformanten des Kontrollplasmids Yeplac195 pro $\mu\text{g}$		Faktor
	0 Gy	200 Gy	
0 (nach Hitzeschock)	0,90	13,3 ( bei 100Gy)	13,3
0 (vor Transformation)	$0,84 \pm 0,08$	$6,11 \pm 0,78$	7,28
1	$0,80 \pm 0,23$	$4,63 \pm 1,53$	5,79
2	$0,79 \pm 0,10$	$1,88 \pm 0,39$	2,38
4	$0,87 \pm 0,07$	$1,76 \pm 0,29$	2,02
8	$0,78 \pm 0,07$	$1,11 \pm 0,58$	1,42

Tabelle 3: Zeitliche Abhängigkeit des Effekts von  $\gamma$ -Strahlung auf die Frequenz der illegitimen Integration bei Verwendung des linearisierten Plasmids pM151.

Diese Vorversuche ergaben also, daß die Verwendung eines linearisierten Plasmids mit einzelsträngigen Überhängen und eine Bestrahlung unmittelbar nach dem Hitzeschock zu einer maximalen Steigerung der Integrationsrate führen.

#### 3.2.3 ILLEGITIME INTEGRATION IM RAD52 $\Delta$ -HINTERGRUND

Eine Gemeinsamkeit aller drei bisher gefundenen Mechanismen zur Erleichterung der illegitimen Integration (REMI, Topoisomerase I und  $\gamma$ -Strahlung) liegt in der Erzeugung von DSB. Vermutlich wird dabei die transformierte DNA im Zuge von DSB-Reparaturprozessen mit genomischen Sequenzen verknüpft. Hier sollte nun untersucht werden, ob die Verwendung von Mutantenstämmen bei gleichzeitigem Einsatz von  $\gamma$ -Strahlung eine zusätzliche Steigerung in der Rate der illegitimen Rekombination bewirkt.

*RAD52* gehört zu den am besten untersuchten Reparaturgenen in Hefe überhaupt und spielt eine Hauptrolle bei der homologen Rekombination. So wurde denn auch die Epistasisgruppe, deren Mitglieder Funktionen in der DSB-Reparatur mittels homologer Rekombination besitzen, nach diesem Gen benannt. Bei keinem anderen Gen dieser Epistasisgruppe führt eine Deletion des Leserahmens zu einer so vollständigen Blockade der homologen Rekombination. In *rad52*-Mutanten ist die meiotische Rekombination (Mao-Draayer, et al., 1996) ebenso gestört wie die meisten Arten mitotischer Rekombination (Jackson and Fink, 1981; Malone and Esposito, 1980). *rad52*-Zellen zeigen erhebliche Defekte in der DSB-Reparatur nach ionisierender Bestrahlung (Game, 1983; Ho, 1975). Lediglich einige wenige Arten intrachromosomaler Rekombination konnten in *rad52*-Mutanten nachgewiesen werden (Mezard and Nicolas, 1994).

Da in *rad52*-Mutanten die homologe Rekombination nicht zur Reparatur von DSB genutzt werden kann, stellte sich die Frage, ob die Zelle versucht, dieser Reparaturdefizienz durch verstärkte Nutzung alternativer Reparaturwege entgegenzuwirken. So wäre zum Beispiel vorstellbar, daß Mechanismen der illegitimen Rekombination, die in WT-Zellen eine stark untergeordnete Rolle bei der Reparatur von DSB spielen, in *rad52*-Mutanten verstärkt genutzt werden. Wenn diese Mechanismen an der Integration von nicht-homologen Fragmenten beteiligt sind, könnte dies zu einer Erhöhung der Frequenz beim Einbau nicht-homologer Sequenzen führen. Ferner wäre vorstellbar, daß DSB in *rad52*-Zellen aufgrund der fehlenden Möglichkeit, diese durch schnelle und effiziente HR zu beheben, als Intermediate länger persistieren als in WT-Zellen. Dies könnte wiederum die Wahrscheinlichkeit erhöhen, daß die Genkassette in die offenen DSB eingebaut wird. Um die Stichhaltigkeit obiger Vermutungen zu überprüfen, wurde das linearisierte Plasmid pM151 (nach *Bgl*III-Verdau) in *rad52*-Zellen transformiert und die Integrationsrate sowohl spontan als auch nach Bestrahlung gemessen. Das Ergebnis dieser Transformationen ist in [Abbildung 12](#) dargestellt.



### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

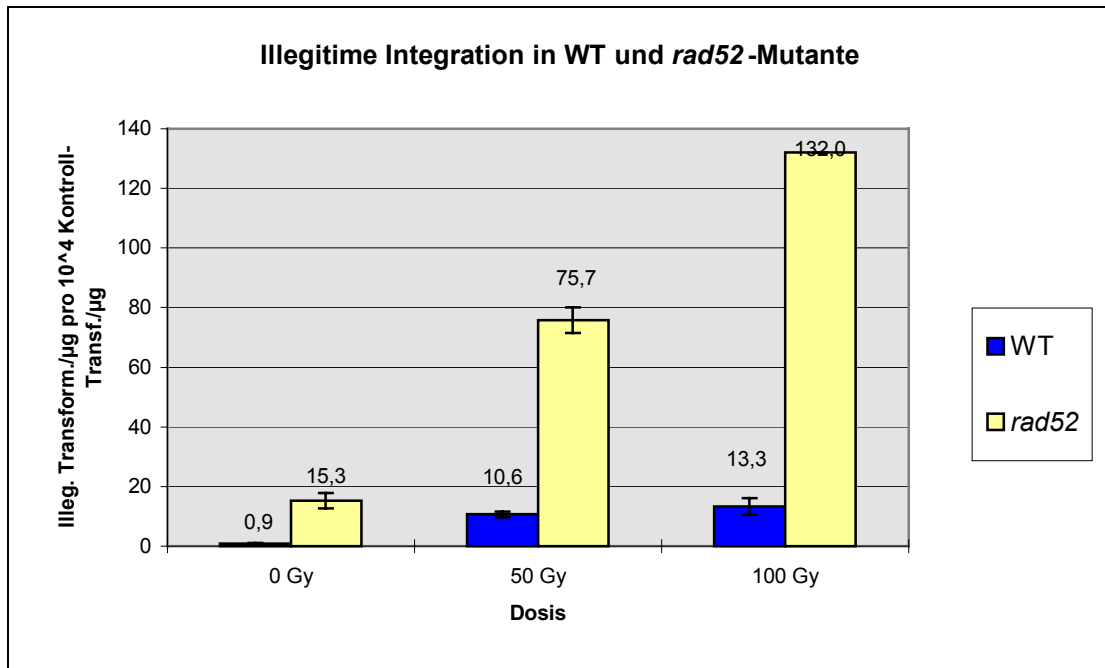


Abbildung 12: Vergleich der Integrationsfrequenz des Plasmids pM151 in Wildtyp- und *rad52*-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Ausnahme von RSY12 *rad52* - 100Gy (ein Experiment).

Die Daten zeigen, daß in der *rad52*-Mutante die Anzahl der illegitimen Transformanten pro  $10^4$  Kontrolltransformaten deutlich höher ist als im Wildtyp. Dieses Ergebnis lässt annehmen, daß eine Unterdrückung der HR den nicht-homologen Einbau fremder DNA sowohl spontan als auch nach DSB-Induktion stark erleichtert. Allerdings geben obige Werte nur Relativwerte an. So wird die Zahl der illegitimen Transformanten pro  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA auf zehntausend Transformaten, die den episomalen Vektor YEplac195 aufgenommen haben, bezogen. Während bei der Untersuchung der später beschriebenen Mutanten diese Kontrollwerte immer ähnlich hoch wie im Wildtyp waren, ergab sich bei *rad52*-Zellen ein deutlicher Unterschied in dieser Kontrollgröße. Die Transformation von einem  $\mu\text{g}$  des Kontrollplasmids führte im WT zu ca.  $1-3 \times 10^4$  URA<sup>+</sup>-Kolonien. Die gleiche Plasmidmenge führte bei *rad52*-Zellen zu lediglich 10-100 URA<sup>+</sup>-Kolonien. Die Effizienz der Transformation eines episomalen Plasmids war somit im *rad52*-Hintergrund um den Faktor  $10^2-10^3$  niedriger als im Wildtyp, was in Einklang mit Ergebnissen ähnlicher Untersuchungen steht (F.Ahne, pers. Auskunft). Damit wird verständlich, daß trotz der höheren relativen Frequenz die Gesamtzahl der illegitimen Transformanten in der *rad52*-Mutante deutlich niedriger war als im Wildtyp, weswegen der Stamm RSY12 *rad52* für einen Einsatz beim

*Gene trapping*-Verfahren, bei dem ja die absolute Zahl der Transformanten entscheidend ist, nicht in Frage kam.

### 3.2.4 ILLEGITIME INTEGRATION IM *RAD5*Δ-HINTERGRUND

*RAD5* ist ein DNA-Reparaturgen, über dessen biochemische Funktion noch wenig bekannt ist. Für Rad5p wird eine Art Schalterfunktion zwischen homologer Rekombination und illegitimer Rekombination diskutiert (Ahne, et al., 1997). Diese Vermutung basierte auf Untersuchungen in einem Plasmidsystem, das die zwei Selektionsgene *TRP1* und *URA3* enthielt. Durch einen *NcoI*-*ApaI*-Doppelverdau wurde ein interner Teil des *URA3*-Gens deletiert. Nach Transformation in *S. cerevisiae* wird im WT diese Lücke über homologe Rekombination mit der chromosomalen Kopie des durch Ty-Insertion im 5'-Bereich mutierten *ura3-52*-Gens als Vorlage sehr effektiv aufgefüllt. So zeigten hier nahezu alle Zellen, die im ersten Schritt auf Trp-Mangelmedium selektioniert wurden, auch den Ura<sup>+</sup>-Phänotyp nach Stempeln auf (-)Ura-Platten, was auf die Rekonstitution des WT-*URA3*-Gens durch homologe Rekombination im Plasmid zurückzuführen ist. In der *rad5*-Mutante ist zwar die Anzahl der Trp<sup>+</sup>-Kolonien und damit der reparierten Plasmide ähnlich hoch wie im WT, jedoch ist der Anteil der Plasmide, die das *URA3*-Gen zum funktionsfähigen WT-Gen rekombinieren konnten, deutlich niedriger. Sequenzanalysen der isolierten Plasmide belegten die Vermutung, daß hier in fast allen Fällen die zwei Enden des Plasmids über nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) verknüpft wurden, so daß die Deletion im *URA3*-Gen erhalten blieb. Da die Gesamtzahl der reparierten Plasmide in WT und *rad5*-Mutante aber ähnlich hoch war, deutete dies auf eine verstärkte Nutzung des NHEJ-Reparaturweges gegenüber der homologen Rekombination im Vergleich zum WT hin.

Falls auch chromosomale DSB in der *rad5*-Mutante bevorzugt über NHEJ repariert werden, könnte dies die Frequenz der illegitimen Integration von nichthomologen DNA-Sequenzen beeinflussen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde eine *rad5*-Mutante des Stammes RSY12 hergestellt, bei der der gesamte *RAD5*-Leserahmen durch eine lacZ-Kan<sup>R</sup>-Kassette substituiert wurde. Die Ergebnisse der Transformationen in diesen Stamm sind in [Abbildung 13](#) zusammengefasst.

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

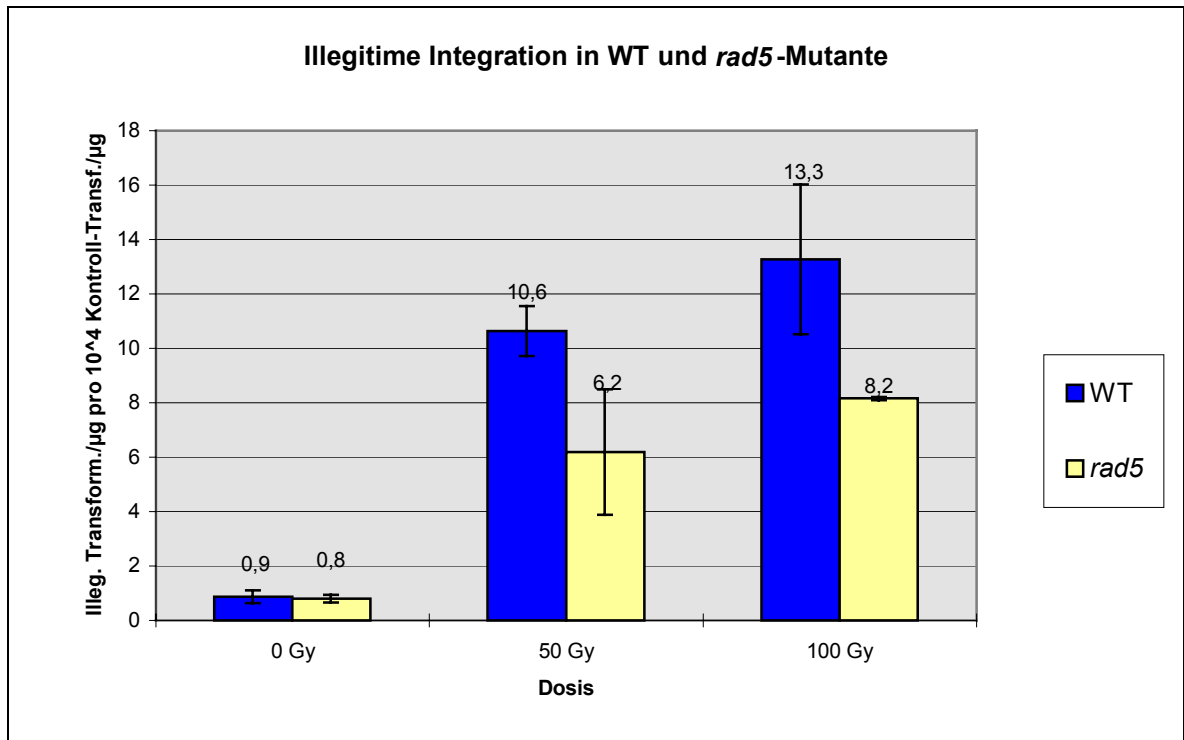


Abbildung 13: Vergleich der Integrationsfrequenz des Plasmids pM151 in Wildtyp- und  $\Delta rad5$ -Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Unabhängig von der Bestrahlung zeigte sich bei *rad5*-Zellen keine Erhöhung der Integrationsfrequenz gegenüber dem WT. Im Gegenteil, nach Bestrahlung war die Rate der illegitimen Transformanten in der *rad5*-Mutante sogar niedriger als im parallel untersuchten WT. Bei der unbestrahlten Probe zeigte sich zwischen *rad5* und WT kein signifikanter Unterschied in der Integrationsrate. Diese Ergebnisse widersprechen der Hypothese, daß eine verstärkte Nutzung der NHEJ bei der DSB-Reparatur im *rad5*-Hintergrund den Fragmenteinbau erleichtern sollte. Dafür gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Erstens könnte die Prozessierung von plasmidalen und chromosomalen DSB unterschiedlich erfolgen und die postulierte Schalterfunktion von Rad5p auf plasmidale DSB beschränkt sein. Zweitens ist es möglich, daß mechanistische Unterschiede zwischen der bloßen Verknüpfung von DNA-Enden und dem Einbau von Fragmenten bestehen, die durch das Fehlen von Rad5p unterschiedlich beeinflusst werden. So wäre es möglich, daß der NHEJ-Mechanismus gar nicht an der illegitimen Integration an Orten vorhandener DSB beteiligt ist. Um zu klären, ob die  $\gamma$ -Strahlen-vermittelte Integration über nichthomologe Endverknüpfung erfolgt, wurde im folgenden der Einfluss des Ku-Proteins auf die Rate der illegitimen Integration untersucht.

### 3.2.5 ILLEGITIME INTEGRATION IM *YKU70*Δ -HINTERGRUND

Sowohl die Zugabe von Restriktionsenzymen als auch  $\gamma$ -Strahlung führen zu einer deutlichen Steigerung der Rate der illegitimen Integration. In beiden Fällen treten Doppelstrangbrüche auf, die offensichtlich den Einbau nicht-homologer DNA-Sequenzen erleichtern. Ein möglicher Mechanismus dieser Integration ist die nicht-homologe Endverknüpfung, die keine oder nur kurze Mikrohomologien zwischen den zwei zu verknüpfenden DNA-Fragmenten benötigt. Tatsächlich führt die Inaktivierung von *RAD50*, das in einigen Prozessen des NHEJ beteiligt ist, zu einer Verringerung der Integrationsrate um den Faktor 20-100 (Schiestl, et al., 1994). Von den Proteinen, bei denen eine Beteiligung in der NHEJ nachgewiesen wurde, ist das heterodimere Ku-Protein am besten charakterisiert worden. In Hefe sind die Bestandteile dieses Proteins durch die zwei Untereinheiten *YKU70* (=HDF1) und *YKU80* (=HDF2) kodiert, die signifikante Homologien zu den Säugergenen Ku70 und Ku80 aufweisen. (Feldmann and Winnacker, 1993; Milne, et al., 1996). Sowohl in Hefe als auch in Säugierzellen bindet das Ku-Heterodimer doppelsträngige DNA-Enden. Abhängig von der Struktur der DNA-Enden führt die Ku-vermittelte Verknüpfung zu einer Ligation ohne Verlust von Nukleotiden oder zu einer Mikrohomologie-vermittelten Ligation, bei der es zum Verlust einiger weniger Nukleotide kommen kann (Featherstone and Jackson, 1999). Dass bei diesem Ku-abhängigen Prozess auch DNA-Fragmente unterschiedlicher Herkunft verknüpft werden, konnte dadurch gezeigt werden, daß das Auftreten von strahleninduzierten Translokations-Aberrationen stark von einem funktionsfähigen Ku abhängig ist. (Friedl, et al., 1998). Daher war es interessant festzustellen, ob die spontane nicht-homologe Integration (NHI) und die  $\gamma$ -vermittelte Integration Ku-abhängige Prozesse darstellen.

#### 3.2.5.1 SPONTANE UND $\gamma$ -INDUZIERTER RATE DER ILLEGITIMEN INTEGRATION IM *YKU70*-HINTERGRUND

Das mit *Bgl*III linearisierte Plasmid pM151 wurde in *yku70*-Mutanten des Stamms RSY12 transformiert. Die Ergebnisse sind in [Abbildung 14](#) zusammengefasst.

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

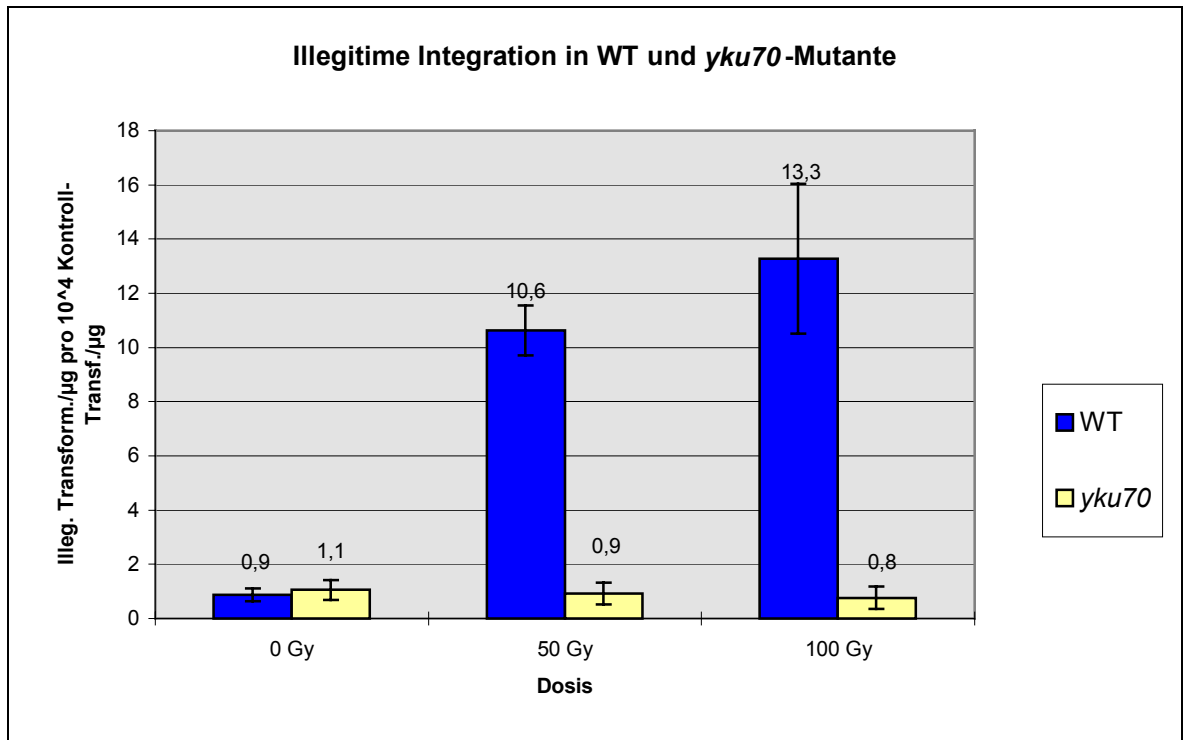


Abbildung 14: Vergleich der Integrationsfrequenz des Plasmids pM151 in Wildtyp- und yku70-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Es zeigte sich, daß die basale Integrationsfrequenz bei unbestrahlten Zellen im WT- und yku70-Hintergrund mit 0,9 bzw. 1,1 vergleichbar war. Eine gleichzeitige  $\gamma$ -Bestrahlung führte in der yku70-Mutante aber im Gegensatz zum Wildtyp zu keiner Erhöhung der Integrationsrate, sie blieb mit 0,9 bei 50 Gy bzw. mit 0,8 bei 100 Gy nahezu unverändert zur spontanen Integrationsrate.

Die Blockade der  $\gamma$ -Strahlen-vermittelten Integration legt die Vermutung nahe, daß dieser Prozess von einem funktionierenden NHEJ-Weg abhängig ist, der in der Ku-Mutante unterbunden ist. Unerwartet war hingegen die nahezu unveränderte Frequenz der spontanen illegitimen Integration in yku70-Zellen. Diese Beobachtung könnte auf zwei mögliche Ursachen zurückzuführen sein. Entweder handelt es sich bei der spontanen illegitimen Integration um einen Prozess, der generell (d.h. auch im WT) unabhängig vom Ku-gebundenen NHEJ abläuft, oder in der yku70-Mutante verläuft die spontane Integration über einen alternativen Mechanismus, der im Wildtyp gar nicht oder zumindest sehr viel seltener vorkommt als in der yku70-Mutante.

Daher wurden im folgenden die Integrationsorte des Plasmids pM151 in den *yku70*-Zellen bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung führten zur Entdeckung eines neuen Mechanismus der illegitimen Integration, der im folgenden beschrieben wird.

### **3.2.5.2 DIE ENTSCHLÜSSELUNG DES MECHANISMUS DER ILLEGITIMEN INTEGRATION IM YKU70-HINTERGRUND**

Um Auskunft über die Integrationsorte des Plasmids pM151 in den isolierten Transformanten zu erhalten, wurden die integrierten Plasmide mit den flankierenden genomischen Sequenzen reisoliert und die Übergänge vom ursprünglichen Plasmid in die unbekannte genomische Region ansequenziert. Dazu wurde das sogenannte *Plasmid rescue* Verfahren verwendet ([Abbildung 15](#)), das in der Arbeitsgruppe Schiestl entwickelt und hier geringfügig modifiziert wurde (siehe Material und Methoden). Aus einer stationären Kultur der betreffenden Transformante wurde genomische DNA isoliert. Ein Teil dieser DNA wurde dann restriktionsverdaut. Als Enzym wurde die Restriktionsendonuklease *ClaI* gewählt, die keine Erkennungssequenz im für die Transformation eingesetzten Vektor besitzt. Nach Waschschritten erfolgte eine Ligation der restringierten DNA. Diese zirkularisierte DNA wurde dann im folgenden mittels Elektroporation in kompetente DH5 $\alpha$ -Bakterienzellen transformiert. Von der Vielzahl der zirkulären DNA-Fragmente, die durch den Restriktionsverdau der genomischen DNA und die anschließende Ligation entstanden sind, sind lediglich diejenigen, die das zuvor integrierte Plasmid pM151 enthielten, aufgrund ihres Replikationsstartpunktes (*ori*) und des Resistenzgens (*Amp<sup>R</sup>*) in der Lage, nach der Transformation in *E.coli* zur Koloniebildung der Bakterien auf Ampicillin-haltigen Platten zu führen.

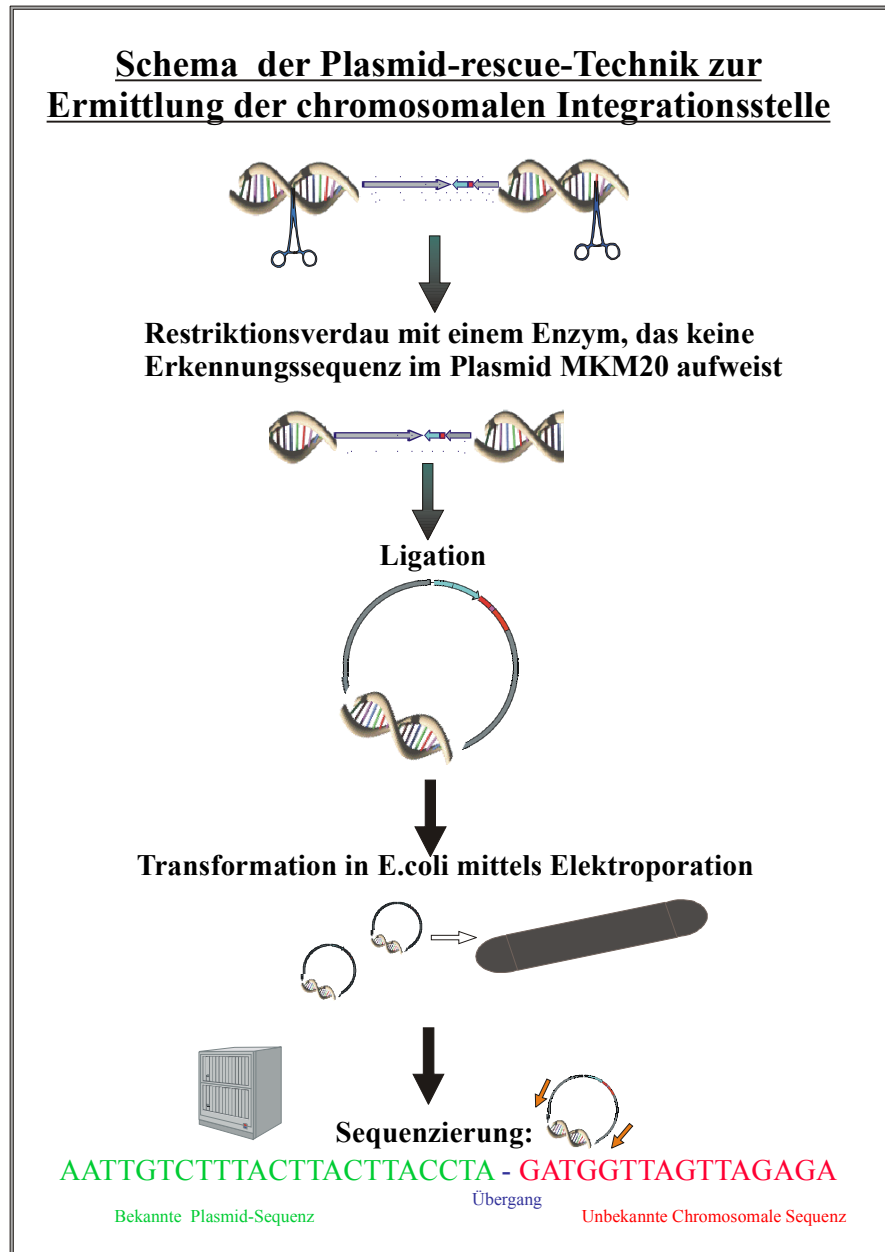


Abbildung 15: Schema des Plasmid-rescue

Das durch die Ligation entstandene neue Plasmid enthält neben der kompletten Sequenz des ursprünglichen Plasmids pM151 flankierende Bereiche genomischer DNA unbekannter Länge. Die Länge dieser Bereiche ist abhängig von der nächsten genomischen Erkennungsstelle des verwendeten Restriktionsenzym. Da sehr große Plasmide nicht mehr transformierbar sind, liegt die Effizienz des *Plasmid rescue* bei ca. 30-50%. Die Länge der reisolierten Plasmide wurde im Agarosegel geprüft. Die anschließende Sequenzierung wurde bei der Fa. Genome Therapeutics, Waltheim, USA durchgeführt. Hierfür wurden Primer P1-Ku70 und P2-Ku70 eingesetzt (siehe Material und Methoden), die zu Sequenzen ungefähr 60 Nukleotide jenseits der *Bgl*III-Erkennungssequenz komplementär sind und in der

Sequenzierreaktion zu einer Leserichtung auf den unbekanntem genomischen Bereich hin führten. Der Übergang in den unbekanntem chromosomalen Bereich wurde ermittelt und mit dem Homologiesuchprogramm „BlastN“ der SGD „*Saccharomyces cerevisiae* Genomic Database“ analysiert. Mit der Technik des *Plasmid rescue* konnten je sieben Plasmide aus bestrahlten Transformanten und unbestrahlten Kontrollen reisoliert werden.

#### 3.2.5.2.1 DIE INTEGRATION DES PLASMIDS IST ASSOZIIERT MIT RETROTRANSPOSON-ELEMENTEN

Für zwölf der 14 untersuchten Plasmide ergab die Sequenzierung mit beiden Primern Sequenzen, die zum Hefegenom homolog waren. Bei den zwei restlichen Plasmide (hier nicht weiter detailliert besprochen) wurden mit dem einen Primer hefespezifische Sequenzen (Ty-Sequenzen) und mit dem anderen Primer pUC-homologe Sequenzen gefunden. In zehn der hier besprochenen 12 Plasmide wurden auf einer oder beiden Seiten an oder nahe den Übergangsstellen vom Plasmid zum genomischem Bereich Sequenzen festgestellt, die von Ty-Retrotransposon-Elementen herkommen. Ty-Elemente sind Hefe-Retrotransposons, die eine hohe Ähnlichkeit zu den Retroviren der Wirbeltiere aufweisen (Überblick bei (Boeke and Chapman, 1991)). Wie Retroviren besitzen diese Elemente terminal lange Sequenzwiederholungen (LTRs), die sich in drei Regionen U3, R und U5 untergliedern. Die Transkription der Ty-Elemente führt zu mRNA-Molekülen, die terminal redundant sind (R-Region), wohingegen die U5- und U3-Region nur am 5'- bzw. 3'-Ende der mRNA auftauchen. Die Synthese der vollständigen c-DNA erfolgt in mehreren Schritten und setzt einen zweifachen Matrizenwechsel voraus. Der größte Unterschied zwischen diesen retrotransposablen Elementen und Retroviren besteht in der fehlenden Infektiosität der Hefe-Elemente aufgrund des fehlenden *env*-Gens. Eine derartige Verknüpfung von NHI und Ty-Sequenzen konnte in keinem der früher untersuchten 66 Fälle, bei denen Transformanten des WT sowie *top1*- und *rad52*-Mutanten untersucht wurden, nachgewiesen werden (Schiestl, et al., 1993; Schiestl and Petes, 1991; Schiestl, et al., 1994; Zhu and Schiestl, 1996). Da kein Unterschied in der Struktur der analysierten Sequenzen zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben erkennbar war und die Frequenz der NHI unabhängig von der Bestrahlung war, wurden die Ergebnisse zusammengefasst.



### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

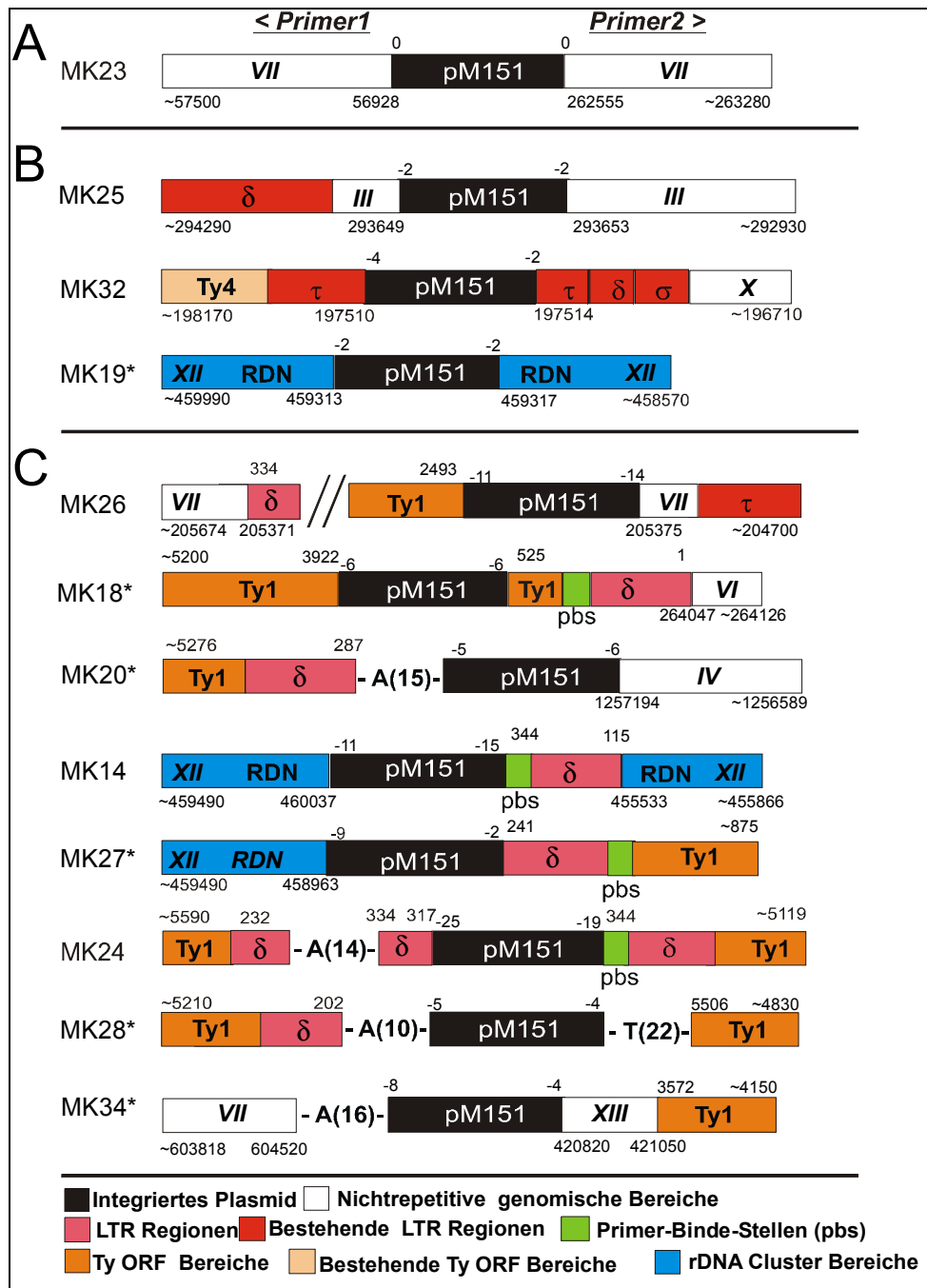


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Sequenzbereiche, die das reisolierete Plasmid pM151 flankieren. Aufgeführt sind die Sequenzen, die mit Primer P1 (links) und P2 erhalten wurden (rechts). Die nicht maßstabsgetreu dargestellten Elemente sind gemäß ihrer Zugehörigkeit zu verschiedenen repetitiven Gruppen farblich gekennzeichnet. Die Zahlen unterhalb der Elemente entsprechen den Koordinaten der jeweiligen Sequenz in der SGD-Datenbank, die Nummern über den Ty-Bereichen kennzeichnen die Position in Relation zu einem vollständigen Ty-Element. Zahlen direkt über dem Plasmidsymbol kennzeichnen die Zahl der Nukleotide des Plasmids, die im Verlauf der Integration verloren gingen. Sternchen (\*) symbolisieren Proben, die mit 50Gy bestrahlt wurden. Die Buchstaben A-C bezeichnen die drei unterschiedlichen Gruppen von Integrationen, die gefunden wurden (s. Text).

```

MK23          GAT CTG CGA - //P1-//-P2// - ACT CAG ATC
              ||| ||| |||
C GGC CTT GAT CTG CGA - //-----// - ACT CAG ATC GAT ATT A
||| ||| |||
C GGC CTT GAT CTG CGA - //-----// - ACT CAG ATC GAT ATT A
||| ||| |||
VII 56937      56928                                VII 262555      262561

MK25          GAT CTG CGA - //P1-//-P2// - ACT CAG ATC
              ||| ||| |||
A GAG AGA AAT CTG CGA - //-----// - ACT CAG AAG AAA ATA G
||| ||| |||
A GAG AGA AA      CG AAA      ATA G
||| ||| |||
III 293657     293649                                III 293653      293645

MK32          GAT CTG CGA - //P1-//-P2// - ACT CAG ATC
              ||| ||| |||
GG TCA TAT TTG CGA - //-----// - ACT CAG AAT ATT AAT T
||| ||| |||
GG TCA TAT T      AT ATT      AAT T
||| ||| |||
X 197518      197510                                X 197514      197506

MK19          GAT CTG CGA - //P1-//-P2// - ACT CAG ATC
              ||| ||| |||
A TTT GTT TTT CTG CGA - //-----// - ACT CAG AGT TTT GCA T
||| ||| |||
A TTT GTT TT      GT TT      GCA T
||| ||| |||
RDN459321     459313                                RDN459317     459309

MK26          Delta 334
              TGA GAA
              ||| |||
TCT TTT TGA GAA - //
||| |||
TCT TTT
VII 205376     205371

              TCT CGA ATT CAC TGG CCG TCG - //P1-//-P2// - TGC AGG TCG
              ||| ||| ||| ||| |||
//- TTT GTA TAT CGA ATT CAC TGG CCG TCG - //-----// - TGC ACT TTT T
||| ||| ||| ||| |||
TTT GTA TAA CCA AGA CAC TGG CC      CT TTT T
||| ||| ||| ||| |||
Ty1 ORF 2497      2483                                VII 205375      205370

MK18          CTG CGA TCT CGA ATT CAC - //P1-//-P2// - TGC AGG TCG ACT CAG ATC
              ||| ||| ||| ||| |||
CTT CGA TCT CGA ATT CAC - //-----// - TGC AGG TCG ACT GTG ACT
||| ||| ||| ||| |||
CTT CGA TCT CG      GG T-G AAT GTG ACT
||| ||| ||| ||| |||
TY1 ORF 3929     3914                                TY1 ORF 532      520

MK20          GAT CTG CGA TCT - //P1-//-P2// - AGG TCG ACT CAG ATC
              ||| ||| ||| |||
TAG CCT TTA (A)15G CGA TCT - //-----// - AGG TCG ACT ATT TTA GGT ATT TC
||| ||| ||| ||| |||
TAG CCT TTA      ACT ATT TTA GGT ATT TC
||| ||| ||| ||| |||
Delta 279      287                                IV 1257194     1257178

MK14          CTG CGA TCT CGA ATT - //P1-//-P2// - GCC TGC AGG TCG ACT CAG
              ||| ||| ||| ||| |||
TTT GTT CTT CGA ATT - //-----// - GCC TGC GGC GCT ACC ATG A
||| ||| ||| ||| |||
TTT GTT CT      GGC GCT ACC ATG A
||| ||| ||| ||| |||
RDN 460044     460037                                Delta/pbs 344      332

MK27          CTG CGA TCT CGA - //P1-//-P2// - ACT CAG ATC
              ||| ||| ||| |||
GGG TGG TCT CGA - //-----// - ACT CAG AGG AGA ACT
||| ||| ||| ||| |||
GGG TGG T      G AGG AGA ACT
||| ||| ||| ||| |||
RDN 458969     458963                                Delta 241      250

MK24          CAC TGG CCG TCG - //P1-//-P2// - CAT GCC TGC AGG
              ||| ||| ||| ||| |||
GGG TGA ATG TCG TCG - //-----// - CAT GCG GCG CTA
||| ||| ||| ||| |||
GGG TGA ATG T      G GCG CTA
||| ||| ||| ||| |||
Delta 326      317                                Delta/pbs 344      338

MK28          GAT CTG CGA TCT - //P1-//-P2// - TCG ACT CAG ATC
              ||| ||| ||| |||
A GAA TTG TGT (A)10G CGA TCT - //-----// - TCG ACT CA(T)22 CAC ATC
||| ||| ||| ||| |||
A GAA TTG TGT      CAC ATC
||| ||| ||| ||| |||
Delta 192      202                                TY1 ORF 5506     5501

MK34          GAT CTG CGA TCT CGA - //P1-//-P2// - TGC AGG TCG ACT CAG ATC
              ||| ||| ||| ||| |||
AGA CCT C(A)16A TCT CGA - //          // - TGC AGG TCG ACT CAA TAT
||| ||| ||| ||| |||
AGA CCT C      TGG CCT AAA TAT
||| ||| ||| ||| |||
VII 604507     604520                                III 420813     420824

```

Abbildung 17: Nukleotidsequenzen der Übergänge zwischen Plasmid- und chromosomalen bzw. Ty- zugehörigen DNA-Bereichen. Sequenzen, die durch Sequenzierung der reisolierten Plasmide erhalten wurden (jeweils mittlere Reihe) sind in 5'-3'-Orientierung dargestellt. Für die dazu komplementären Sequenzen des Plasmids (obere Reihe) bzw. der chromosomalen oder repetitiven Elemente (untere Reihe) wurde ein Sequenzvergleich (Alignment) dargestellt. Die angegebenen Koordinaten wurden wie in Abb.16 gewählt. Rot unterlegte Sequenzen kennzeichnen gesicherte 5bp-Duplikationen des Integrationsorts. Die gelbe Markierung bei MK23 entspricht der möglichen Topoisomerase I Erkennungsstelle.

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

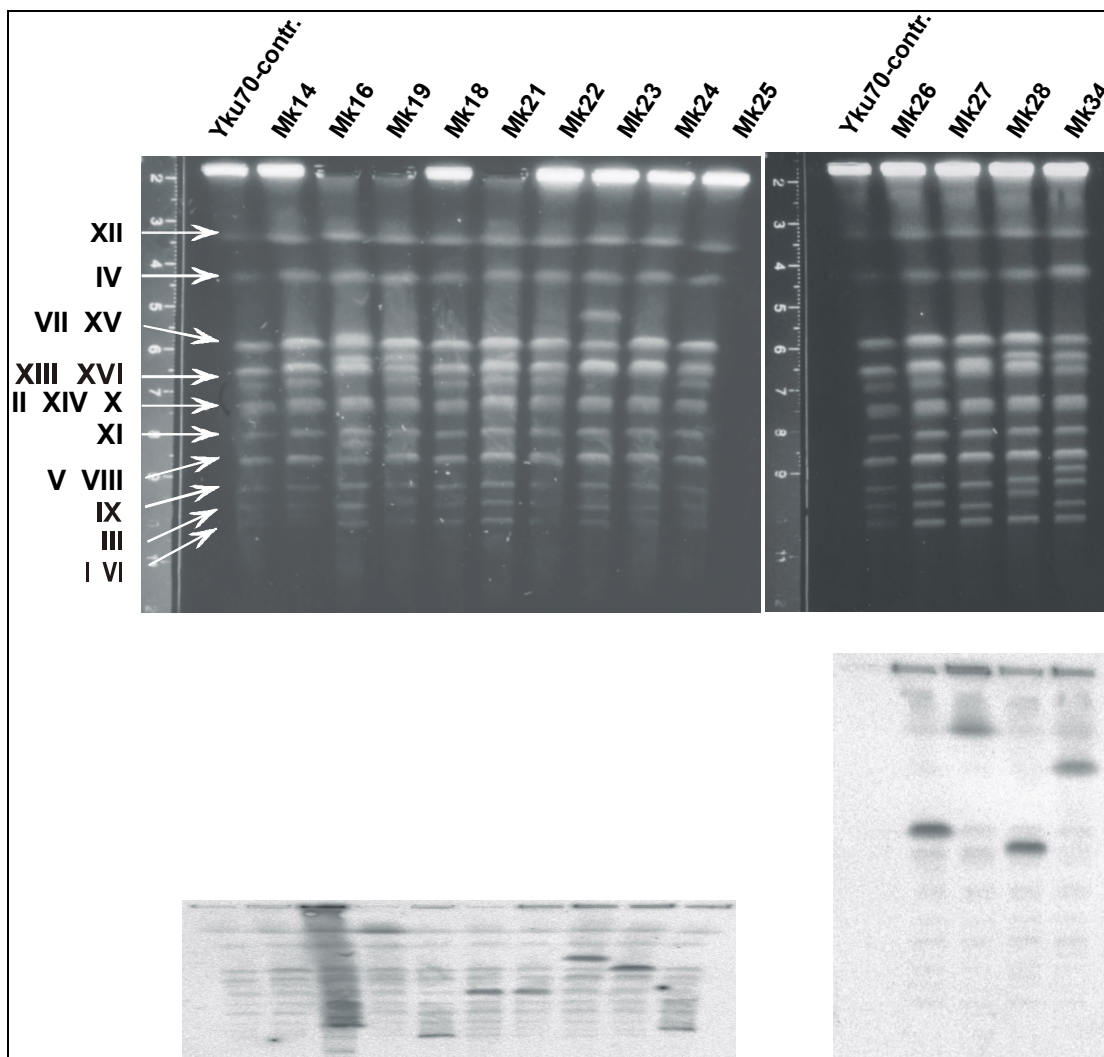
---

DNA-Bereiche, die das integrierte Plasmid flankierten, sind in [Abbildung 16](#) schematisch dargestellt. Die [Abbildung 17](#) zeigt die Sequenzabfolge an den analysierten Übergängen.

MK23 war der einzige Fall, in dem die Integrationsreaktion phänotypische Ähnlichkeit zu in WT-Zellen beobachteten Integrationen aufweist. In diesem Fall waren die beiden Enden des Plasmids intakt und mit verschiedenen Regionen des Chromosoms VII verknüpft. An der P1-Seite (gemeint ist die Seite, die mittels Primer P1-Ku70 sequenziert wurde) konnte eine TopoisomeraseI-Konsensus-Sequenz (5'-CTT-3') detektiert werden und eine Mikrohomologie von drei Basenpaaren wurde beobachtet. Die Ergebnisse der elektrophoretischen Karyotypisierung (Friedl, et al., 1998) mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und die anschließende Hybridisierung mit einem *URA3*-Fragment (dargestellt in [Abbildung 18](#)) waren konsistent mit einer Integration des Plasmids in Chromosom VII. Allerdings zeigte dieses Chromosom im PFGE-Gel eine Verlängerung von ungefähr 200kb gegenüber dem Ausgangsstamm, während die restlichen Chromosomen-Banden unverändert erschienen. Diese Beobachtung sowie der Umstand, daß die genomischen Sequenzen von Chromosom VII, die sich an die beiden Enden des Plasmids anschlossen, in antiparalleler Orientierung vorlagen, sind ein Hinweis auf eine intrachromosomale Aberration, möglicherweise eine größere inverse Duplikation. Solche genomischen Rearrangements wurden bereits in früheren Integrationen im WT nachgewiesen (Schiestl, et al., 1993; Zhu and Schiestl, 1996).

#### 3.2.5.2.2 FÜNF-BASENPAAR-DUPLIKATIONEN DES INTEGRATIONSORTES - EIN CHARAKTERISTIKUM DER TY-INTEGRASE

Mit Ausnahme des oben beschriebenen Falls wurde in allen Fällen, bei denen auf beiden ansequenzierten Seiten der genomische Integrationsort exakt bestimmt werden konnte, eine 5bp-Duplikation der Zielsequenz beobachtet. In den drei Fällen MK25, MK32 und MK19 integrierte das Plasmid in einen nicht-repetitiven fortlaufenden chromosomalen Bereich. Bei MK25 integrierte das Plasmid in Chromosom III. Die Sequenzanalyse offenbarte die Existenz eines delta-LTR-Elements in 77bp Entfernung vom P1-Überhang. Da an gleicher Stelle auf dem Chromosom in der Sequenz, die in der Datenbank abgelegt ist, auch ein delta-Element auftritt, ist es wahrscheinlich, daß diese LTR-Sequenz hier bereits vor der Integration existierte.



**Hybridisierungs-Ergebnisse:**

	# 19	# 18	# 21	# 22	# 23	# 24	# 25	# 26	# 27
<b>Hybr.mit Chr. Nr.</b>	XII	I / VI	II/XIV/ X	II/XIV/ X	VII/ XV*	VII/ XV	III	VII/ XV	XII
<b>Erwartete Chr.Nr. aus Blast Suche</b>	XII	VI	X	X	VII	mehr- ere <sup>+</sup>	III	VII	XII

\* Hybridisation mit neuer verlängerter Bande, in der Chr. VII/XV involviert ist

\*\* Intensität der Chr.IV-Bande (1.6 Mb) ist erhöht wohingegen sie in den Chr.VII/XV- und XIII/XVI-Banden erniedrigt ist. Zusätzlich tritt eine neue Bande bei 0,5 Mb auf.

+ Mehrere Chromosomen ergaben Treffer mit hoher Wahrscheinlichkeit. In allen Fällen waren aber die in der Hybridisierung detektierten Chromosomen unter diesen Treffern mit hoher Wahrscheinlichkeit.

Abbildung 18: Pulsfeldgelelektrophoretische Auftrennung von den Chromosomen einiger yku70-Transformanten und anschließende Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten URA3-Sonde. Die Tabelle vergleicht die Ergebnisse dieser Hybridisierung mit den aus der Datenbankanalyse erwarteten Chromosomen-Nummern.

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

---

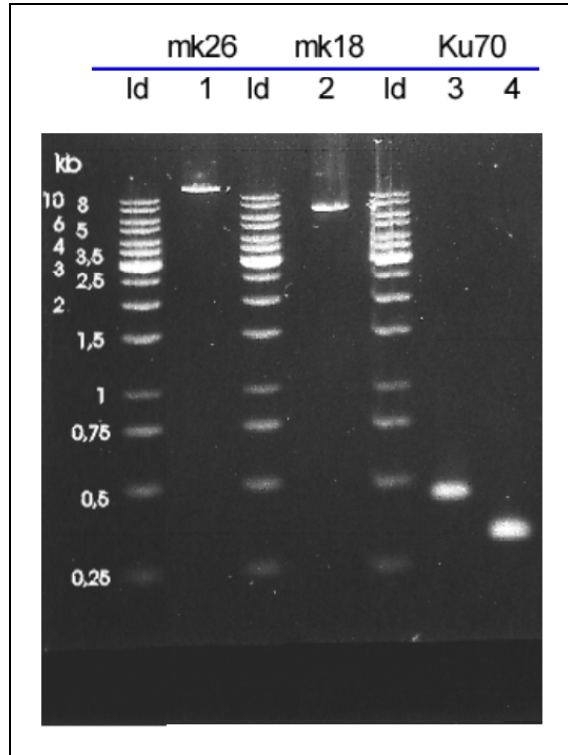
Im Fall von MK32 integrierte das Plasmid in ein tau-Element, wie die LTR-Region von Ty4-Elementen genannt wird. Benachbart zu diesem tau-Element wurde auf der P1-Seite ferner ein kodierender Bereich eines Ty4-Elements gefunden. Auf der P2-Seite folgten auf das tau-Element delta- und sigma- (LTR des Ty3) sowie chromosomalen Sequenzen des Chromosoms X. Eine solche Verschachtelung eines Ty4-ORF mit tau-, delta- und sigma-Elementen findet sich an gleicher chromosomaler Position in der Hefegenom-Datenbank, was vermuten lässt, daß das Plasmid in ein bereits bestehendes tau-Element integriert wurde. Bei MK19 fand die Integration in den rDNA-Lokus ungefähr 300 bp stromaufwärts des 5S rDNA Promotors statt. In allen drei Fällen kam es zu einer 5bp-Duplikation der Sequenz des Integrationsortes (in [Abbildung 17](#) rot markiert), wobei im Fall von Mk25 aufgrund einer Überlappung um ein bp keine ganz exakte Aussage möglich ist. Eine Duplikation des Integrationsorts von 5 bp ist ein Charakteristikum der Ty-Integrase-vermittelten Integration (Farabaugh and Fink, 1980; Gafner and Philippsen, 1980), das meines Wissens nach noch nie in Integrase-unabhängigen Reaktionen beobachtet wurde.

#### 3.2.5.2.3 IN DEN MEISTEN NHI-FÄLLEN KOINTEGRIEREN RETROTRANSPOSON- SEQUENZEN MIT DEM PLASMID

In den meisten Fällen war eine exaktere Analyse des Integrationsorts nicht möglich, da sich hier an mindestens einer Seite die repetitive Sequenz über den gesamten sequenzierten Bereich erstreckte. Daher wurde versucht, in diesen Fällen die vermuteten Integrationsorte mittels elektrophoretischer Karyotypisierung bzw. PCR-Analysen zu bestimmen bzw. zu verifizieren ([Abbildung 18](#) und [Abbildung 19](#)).

Im Fall von MK26 war das Plasmidende P2 mit einer nicht-repetitiven Sequenz verknüpft, die von Chromosom VII herrührte, was auch konsistent mit dem Ergebnis der elektrophoretischen Karyotypisierung war. 34bp entfernt vom Übergang an der P2-Seite lag bei der Sequenzanalyse ein tau-Element, das an dieser Position auch in der Datenbank aufgeführt ist. An der P1-Seite war das Plasmid mit Sequenzen aus dem offenen Leserahmen des TyB-Elements verknüpft. Ein derartiges Ty-Element ist an diesem Locus in der Hefegenom-Datenbank nicht enthalten. Um zu testen, ob die Sequenz des veröffentlichten Stamms hier von dem Stamm RSY12 yku70 abweicht, wurden PCR-Primer konstruiert, die basierend auf

Informationen der Datenbank auf beiden Seiten des vermuteten Integrationsorts binden konnten. Im Ausgangsstamm führte die Amplifizierung mittels Expand-PCR® (Fa. Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) zu einem Produkt der erwarteten Länge von ca. 330 bp ([Abbildung 19](#)). In der Transformante MK26 führte die gleiche



*Abbildung 19: Amplifizierung der vermuteten Integrationsregionen in Transformanten und Ausgangsstamm mittels Expand®-PCR. Spur 1 und 4 zeigen Amplifikate mit Primern, die zu genomischen Sequenzen um den Integrationsort von MK26 komplementär waren. Spur 2 und 3 zeigen Produkte, die mit Primern um den Integrationsort von MK18 erhalten wurden.*

Amplifikation hingegen zu einem PCR-Produkt von mehr als 10kb, was die Annahme einer großen *de novo* Insertion weiter untermauerte. Um auch den zweiten Übergang (P1-Seite) zwischen integrierten Sequenzen und nicht-repetitiven Sequenzen des Chromosoms VII zu charakterisieren, wurde das mehr als 10kb lange PCR-Produkt ansequenziert. Diese Analyse zeigte, daß Sequenzen des Chromosoms VII mit dem 3'-Ende eines 3'-delta-Elements ligiert waren, was vermuten lässt, daß ein zusammengesetztes Element aus Ty1- und pM151-Sequenzen, das auf der einen Seite mit einem LTR-Element endete, in das Chromosom VII integriert hatte. Die chromosomale Sequenz zeigte wieder die 5bp-Duplikation des Integrationsorts, wie sie für Ty-Integrase vermittelte Integrationen charakteristisch ist ([Abbildung 17](#)).

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

---

Im Fall von MK18 wurden an beiden Seiten des integrierten Plasmids Sequenzen gefunden, die von einem Ty1-Element herrührten. An der einen Seite (P1) war das Plasmid mit Sequenzen eines TyB-Leserahmens verknüpft. An der P2- Seite wurden am Übergang Sequenzen aus einem TyA-Leserahmen, einer Primer-Bindestelle (pbs) und eines 5'-LTR-Elements nachgewiesen, gefolgt von Sequenzen, die eindeutig von Chromosom VI stammten. Auch hier stand das Ergebnis der PFGE-Analyse in Einklang mit der Vermutung einer Integration in Chromosom VI. Die publizierte Sequenz in der Hefegenom-Datenbank enthält keinerlei Ty-verwandte Sequenzen am oder nahe dem vermuteten Integrationsort des Plasmids pM151, so daß ich auch hier wieder eine PCR-Analyse des Integrationsorts durchführte. Die Primer wurden wiederum so gewählt, daß sie an beiden Seiten des vermuteten Integrationsorts binden konnten und zu einer Amplifikation dieses Bereichs führten. Die PCR-Reaktion im Ausgangsstamm RSY12 yku70 führte zu dem aufgrund der Datenbankinformationen erwarteten 460 bp langen Fragment, wohingegen die gleiche PCR-Reaktion in MK18 ein Fragment der Länge 7 kb amplifizierte. Dies stützt wiederum die Annahme, daß ein zusammengesetztes Plasmid/Ty-Element inseriert wurde.

Auch im Fall von MK20 scheint es, daß ein zusammengesetztes Element aus Plasmid- und Ty1-Sequenzen integriert ist. Ein Ende des Plasmids (P2) war mit einer genomischen, nichtrepetitiven Sequenz des Chromosoms IV verknüpft, während die P1-Seite über einen PolyA-Schwanz mit dem 3'-Ende des R-Segments eines LTR-Elements verbunden war. Auch in diesem Fall konnte bei der PCR-Analyse für den Ausgangsstamm in diesem Bereich ein Produkt der erwarteten Länge ohne zusätzlich inserierte Sequenzen amplifiziert werden, wohingegen eine PCR-Analyse von MK20 nicht mehr möglich war, da die Transformante nicht aus der Gefrierkultur regeneriert werden konnte.

Ein gemeinsames Merkmal der drei Transformanten MK26, MK18 und MK20 ist der Umstand, daß hier die linearisierten Plasmide an einer oder beiden Seiten mit Ty1-Sequenzen verknüpft waren, die sich offensichtlich vor der Integration noch nicht in dieser Stelle im Genom befanden. Auch in mehreren anderen Fällen war das Plasmid pM151 mit Ty-Sequenzen verknüpft, hier war allerdings aufgrund des ausschließlich repetitiven Charakters der erhaltenen Sequenzen eine PCR-Untersuchung des Integrationsorts nicht möglich.

Bei MK14 war die P1-Seite des Plasmids mit einer 300 bp stromabwärts vom 5S rDNA-Promotor gelegenen *RDN*-Sequenz verknüpft. Die andere Seite des Plasmids war mit einem unvollständigen LTR-Element, beginnend mit dem 3'-Ende einer sogenannten *primer-binding-site* (pbs), ligiert. Benachbart dazu fanden sich wiederum *RDN*-Sequenzen. Die gefundenen *RDN*-Sequenzen an beiden Enden des Plasmids bildeten keine zusammenhängende *RDN*-Einheit. Ob das betroffene *RDN*-Element bereits vor der Integration des Plasmids unvollständig war und/oder ob sich hier bereits Ty-Sequenzen befanden, konnte wegen der repetitiven Natur der *RDN*-Elemente, die eine PCR-Analyse unmöglich machte, nicht abschließend geklärt werden.

Die Verknüpfung des Plasmids mit *RDN*-Sequenzen wurde auch im Fall von Mk27 beobachtet. Hier war die P1-Seite des Plasmids mit einer Region 600bp stromaufwärts des 5S rDNA-Promotors verbunden, während die P2-Seite mit dem R-Segment eines 5'-LTR-Elements ligiert war. In insgesamt drei Fällen wurden Integrationen in den *RDN*-Lokus beobachtet und in jedem dieser Fälle fand die Integration auf wenigstens einer Seite in die nicht-transkribierte Region, die das 5S rDNA-Gen flankiert, statt ([Abbildung 20](#)).

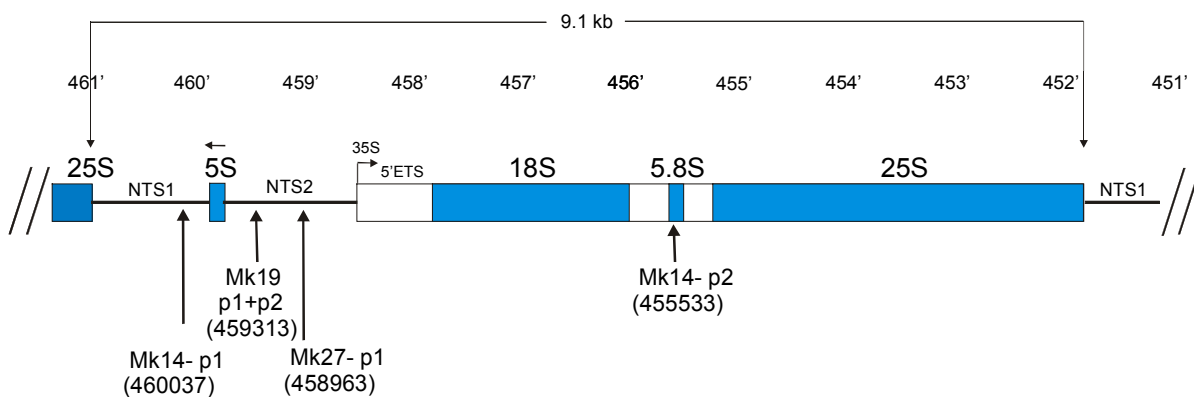


Abbildung 20: Integrations-Loci in Relation zu einem vollständigen *RDN*-Element

Bei den zwei Proben MK24 und MK28 war das Plasmid pM151 von nicht zusammengehörigen Ty1-Sequenzen umgeben und bei der Sequenzierung wurden ausschließlich repetitive Sequenzen festgestellt. Bei MK28 war die Plasmidsequenz von einem Poly(A)- bzw. Poly(T)-Schwanz eingerahmt, während bei MK24 ein Poly(A)-Schwanz in Nähe des P1-Übergangs an der Grenze von zwei unvollständigen LTR-Elementen, die sich in antiparalleler Orientierung befanden, nachgewiesen wurde. Die PFGE-Analyse offenbarte, daß MK24 und MK28 in die Chromosomen VII/XV bzw. XIII/XVI integriert waren. Eine



### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

---

genauere Zuordnung war nicht möglich, da diese Chromosomen aufgrund ähnlicher Längen bei der PFGE lediglich als Doppelbanden aufgelöst werden.

Ein recht komplexer Vorgang hatte sich bei MK34 ereignet. Die P1-Seite war, über einen Poly(A)-Schwanz verbunden, mit nicht-repetitiven Sequenzen des Chromosoms VII verknüpft. Die P2-Seite hingegen war mit Chromosom XIII-spezifischen Sequenzen ligiert. Im Pulsfeldgel fehlten die zu diesen Chromosomen gehörenden Banden (ca. 1100 und 1000 kb lang) und zwei neue Banden der Längen von ca. 1600 kb und 500 kb traten auf ([Abbildung 18](#)), was auf eine reziproke Translokation schließen lässt. Die Hybridisierung mit der URA3-Probe ergab, daß das Plasmid in das 1600 kb lange Chromosom integriert worden ist. Interessanterweise wurden ca. 240 bp von der Übergangsstelle entfernt Sequenzen aus einem Ty-B-Leserahmen gefunden, die weder in der Datenbank noch bei der PCR-Analyse des Ausgangsstammes hier nachgewiesen werden konnten.

Bei insgesamt zehn Übergängen waren die Plasmid-Enden direkt (in sieben Fällen) oder über Poly-A/T-Schwänze mit Ty-Sequenzen verknüpft, von denen in drei Fällen gezeigt werden konnte, daß diese Retrotransposon-Sequenzen neu integriert waren, während in den anderen Fällen aufgrund der Redundanz der gefundenen Sequenzen ein eindeutiger Nachweis dieser Kointegration mit dem Plasmid nicht erfolgen konnte.

In Tabelle 4 sind die chromosomalen Ty-Elemente angegeben, die die beste Übereinstimmung mit den sequenzierten Ty-Fragmenten in der „BlastN“-Suche ergaben. Interessanterweise zeigte sich in neun von zehn Fällen eine Zugehörigkeit der sequenzierten Elemente zu einer Untergruppe der Ty1-Familie, den sogenannten Ty1/2-Elementen. Für ihre Entstehung wird ein sogenannter replikativer Strang-Wechsel-Prozess (replicative strand switch) zwischen Ty1- und Ty2-Elementen postuliert (Jordan and McDonald, 1998; Jordan and McDonald, 1999). Im zehnten Fall war die Homologie mit Elementen der Ty1- und Ty1/2-Gruppe gleich hoch. Die biologische Bedeutung dieser Bevorzugung von Ty1/2-Elementen ist im Moment noch unklar, könnte aber auf eine besonders hohe Transpositionsrate dieser Elemente hindeuten.

<i>Gefundene Ty Sequenz</i>	<i>Beste Übereinstimmung mit Element #</i>	<i>Evolutionäre Gruppe</i>
<b>MK26/p1 (TyB)</b>	A1, P2, G1, D4	gemischt
<b>MK18/p1 (TyB)</b>	P2	Ty1/2
<b>MK18/p2 (LTR + TyA)</b>	P2	Ty1/2
<b>MK20/p1 (TyB + LTR)</b>	A1, E1, M2, P1, L2	Ty1/2
<b>MK14/p2 (LTR + pbs)</b>	M2	Ty1/2
<b>MK27/p2 (LTR + TyA)</b>	E1, P1, L2	Ty1/2
<b>MK24/p1 (TyB + LTR)</b>	L4, D2, Ty2-O2	Ty1/2
<b>MK24/p2 (TyB + LTR)</b>	N2	Ty1/2
<b>MK28/p1 (TyB + LTR)</b>	J1 (delta 12)	Ty1/2
<b>MK28/p2 (TyB)</b>	A1	Ty1/2
<b>MK15/p1 (TyA + LTR)</b>	E2, B2, D4, G1, L1, M4, P3, O2	Ty1
<b>MK34/p2 (TyB)</b>	E1, J1, M2, O1	gemischt

Tabelle 4: Zugehörigkeit der gefundenen Ty-Sequenzen zu Evolutionsgruppen. TyA und TyB kennzeichnen die beiden Leserahmen eines Ty-Elements. Die Buchstaben in der mittleren Spalte entsprechen den Chromosomennummern, die Zahlenwerte geben die fortlaufende Numerierung der Ty-Elemente auf dem jeweiligen Chromosom wieder (Nomenklatur von (Jordan and McDonald, 1998) übernommen).

#### 3.2.5.2.4 PLASMIDSEQUENZEN, DIE DIREKT AN CHROMOSOMALE DNA-BEREICHE ANKNÜPFEN, ENDEN BEVORZUGT MIT EINEM 3'-ENDSTÄNDIGEN ADENIN

Ein typisches Charakteristikum der nichthomologen Integration in Wildtypzellen ist die geringe Prozessierung der Plasmidenden bei der Integration, von seltenen Fällen der Entfernung von Basen des einzelsträngigen Überhangs einmal abgesehen (Schiestl, et al., 1993). Dies zeigt sich auch bei MK23, wo die Plasmidenden als intakt angesehen werden können, wenn man der Integration an der P1-Seite einen initialen Topoisomerase I-vermittelten Bruch zu Grunde legt. In den restlichen elf Fällen gingen zwischen zwei und 25 bp der Plasmidenden verloren ([Abbildung 16](#)). Von den untersuchten 22 Plasmidenden wurden elf direkt an nicht-repetitive chromosomale Sequenzen, RDN-Elemente oder

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

---

retrotransposable Bereiche, die offenbar bereits vor der Integration an diesen Orten existierten, ligiert. In sieben dieser elf Übergänge (P1-Enden von MK32, Mk19, MK14; P2-Enden von MK25, MK32, MK19 und MK26) konnte das Ende der Plasmidsequenz exakt bestimmt werden und in allen diesen Fällen endete das 3'-Ende in der Abfolge 5'-GA-3' oder 5'-CA-3'. In den verbleibenden vier Fällen verhinderten Mikrohomologien die exakte Bestimmung der letzten Plasmidnukleotide. In einem dieser Fälle (MK25/P1) endete die Plasmidsequenz ebenfalls auf 5'-GA-3' bei Zugrundelegung einer 5bp-Duplikation des genomischen Integrationsorts. Da die LTR-Sequenzen der Ty-Elemente ebenfalls auf 5'-GA-3' enden, deutet dies darauf hin, daß Ty-Integrase bevorzugt Substrate mit derartigen Enden integriert.

Sieben Plasmidenden wurden direkt mit Ty1-Sequenzen verknüpft, die offenbar kointegriert sind oder deren Ursprung unklar ist. Unter diesen gab es lediglich bei MK24/P1 keine potentielle Überschneidung mit Ty-Sequenzen und hier endete die Plasmidsequenz auf 5'-CG-3'. An den Übergängen MK26/P1, MK18/P1 und MK18/P2, bei denen in allen drei Fällen Sequenzen aus dem Leserahmen von Ty1-Sequenzen beteiligt waren, fanden sich ausgedehnte (8-15bp), wenngleich nicht immer perfekte, Mikrohomologien. Eine 2bp lange Mikrohomologie wurde im Fall des Plasmid/delta-Übergangs von MK27/P2 nachgewiesen. Ebenfalls 2bp lange Mikrohomologien wurden bei den Verknüpfungen des Plasmids mit 3'-Enden von PBS-Elementen in den Fällen von MK14/P2 und MK24/P2 gezeigt, wenn man von einer Interaktion des Plasmids mit Ty1(+)-Strang-Molekülen, die in einer komplementären 12bp tRNA-Sequenz endeten, ausgeht (eine genauere Diskussion hierzu findet sich bei (Kiechle, et al., 2000)).

In [Abbildung 21](#) ist die Lage der Übergänge von Plasmid zu neu integrierten Ty1-Sequenzen in Relation zu einem vollständigen Ty1-Element dargestellt. Sechs dieser zehn Übergänge liegen in LTR-Regionen, obwohl LTR-Elemente nur ungefähr zehn Prozent der Länge eines Ty-Elements ausmachen.

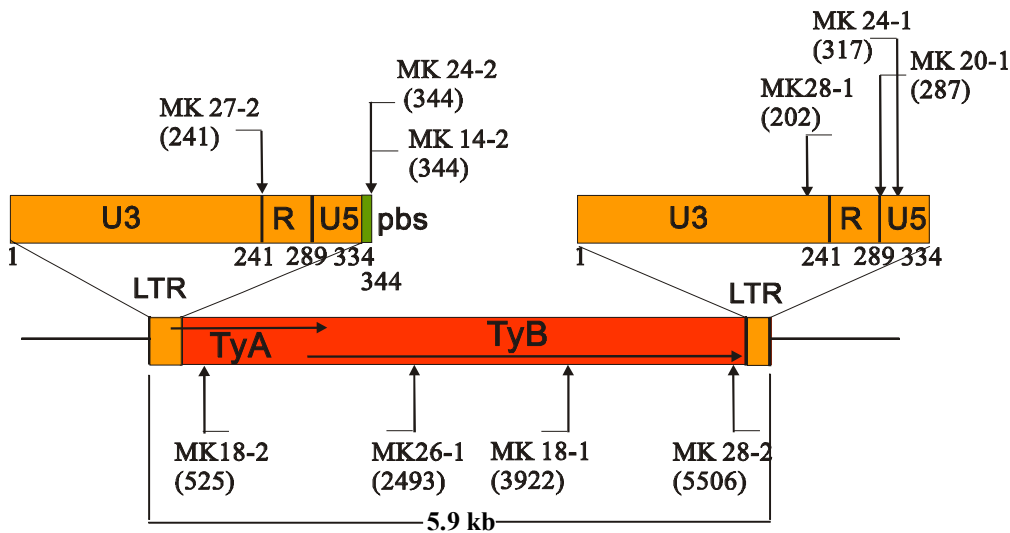


Abbildung 21: Integrations-Loci in Relation zu einem vollständigen Ty1-Element

### 3.2.5.2.5 EIN GROßTEIL DER ILLEGITIMEN INTEGRATIONEN IN YKU70-MUTANTEN IST VON TY1-TRANSKRIPTION ABHÄNGIG

Obige Daten ließen vermuten, daß in einem Großteil der beobachteten Integrationen in Ku-defizienten Zellen der Ty1-Metabolismus beteiligt ist. Deshalb wurde das *SPT3*-Gen in den Stämmen RSY12 und RSY12 *yku70* deletiert, um zu testen, ob Ty1-Transkription notwendig für die Integration fremder DNA ist. *SPT3* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der unter anderem für die Transkription natürlicher Ty1- und Ty2-Elemente benötigt wird (Winston, et al., 1984). Im WT-Hintergrund führte die Deletion des *SPT3*-Gens zu keiner Verringerung der NHI-Frequenz, wohingegen in der *yku70*-Mutante die Inaktivierung von *SPT3* zu einer Reduktion der relativen NHI-Rate um ungefähr 90% führte ([Abbildung 22](#) und [Tabelle 5](#)). Dies bestätigt die Vermutung, daß die meisten Integrationsfälle in Abwesenheit eines funktionellen Ku-Proteins Ty1 mRNA und wahrscheinlich Ty1-kodierte Proteine sowie häufig Ty-cDNA für die Integration benötigen.

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

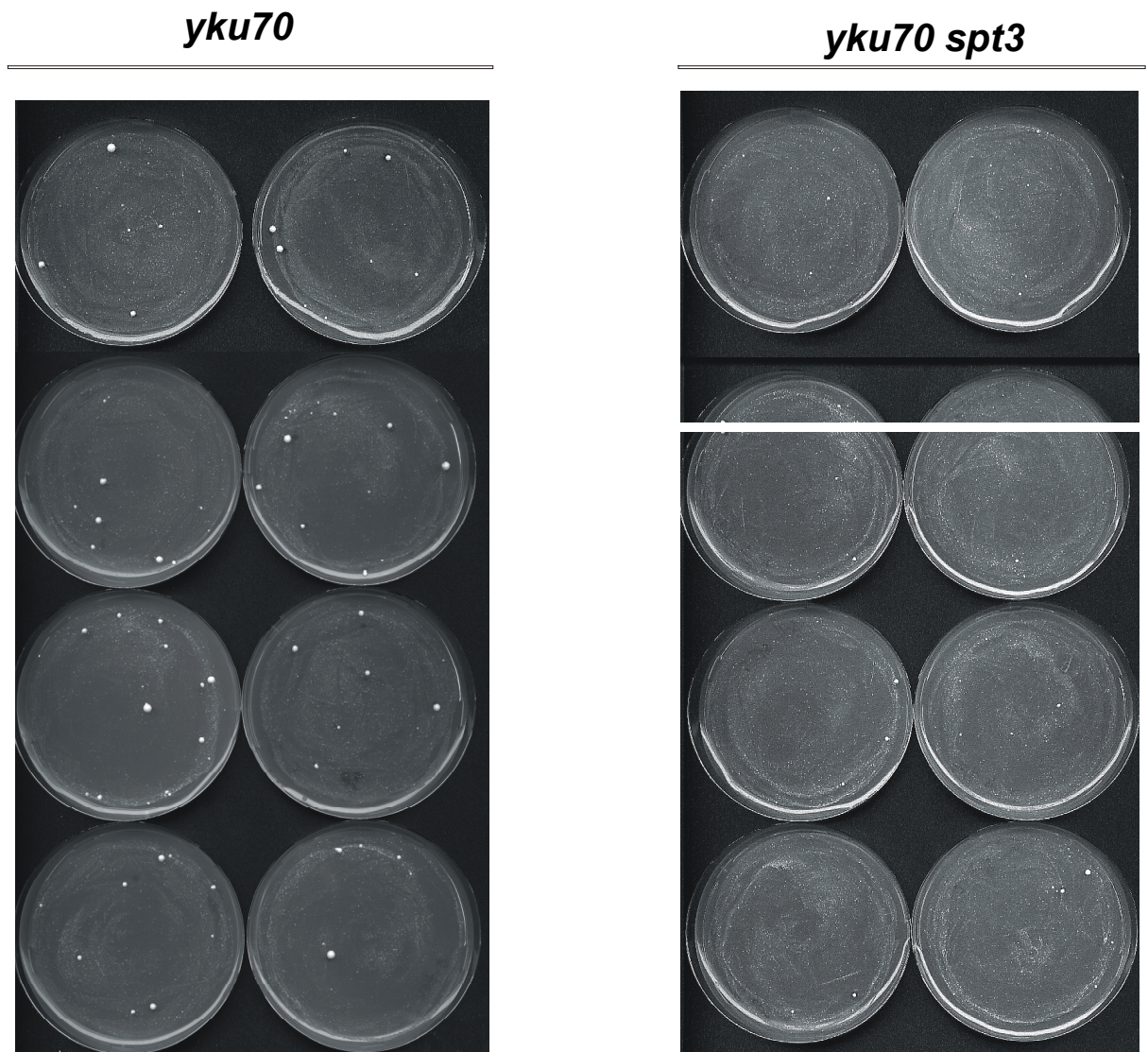


Abbildung 22: Illegitime Transformation des Plasmids pM151 in Mutanten des Stamms RSY12

<i>Stamm</i>	<i>NHI-Rate pro µg DNA pro 10<sup>4</sup> Kontroll-Transformanten</i>
<b>RSY12</b>	<b>0,86 ± 0,24</b>
<b>RSY12 <i>yku70</i></b>	<b>1,06 ± 0,45</b>
<b>RSY12 <i>spt3</i></b>	<b>1,51</b>
<b>RSY12 <i>yku70 spt3</i></b>	<b>0,11 ± 0,09</b>

Tabelle 5: Frequenz der Ura<sup>+</sup>-Transformanten nach Transformation mit linearisiertem pM151. Die Werte sind aus drei unabhängigen Experimenten mit Ausnahme von RSY12 *spt3* (1 Exp.)

### 3.2.5.3 MODELLE ZUR TY-VERMITTELTEN INTEGRATION VON DNA-FRAGMENTEN IM *YKU70*-HINTERGRUND

Die Charakterisierung der Plasmid-Integrationsorte im *yku70*-Hintergrund zeigte, daß zwei unterschiedliche Mechanismen zu der Verbindung von Plasmid- und Ty-Sequenzen führen können: A) Im Fall von MK32, Mk25/P1 und MK26/P2 integrierte das Plasmid in oder nahe bei retrotransposablen Sequenzen, die am gleichen Ort auch in der Datenbank beschrieben waren und sich offensichtlich hier bereits vor der Integration des Plasmids befanden. B) In den Fällen MK18, MK26/P1, MK20/P1 und MK34/P2 konnte die in der Sequenzierung gefundene retrotransposable Sequenz an dem entsprechenden chromosomalen Locus in der Datenbank nicht nachgewiesen werden und auch die PCR-Analyse dieser genomischen Region im Ausgangsstamm belegte, daß sich im Stamm RSY12 *yku70* vor der Integration hier keine derartigen Sequenzen befunden hatten. Daher ist in diesen Fällen offensichtlich das Plasmid mit den Ty-Sequenzen kointegriert.

In den übrigen Ty-assoziierten Fällen war aufgrund des Fehlens nicht-repetitiver Sequenzen keine Aussage über die Herkunft der Retrotransposon-Sequenzen möglich. Da die Ty-Sequenzen aber meist nur bruchstückweise vorlagen, ist anzunehmen, daß zumindest in einem Teil dieser Fälle ebenfalls eine Kointegration stattgefunden hat.

#### 3.2.5.3.1 MODELLE ZUR ENTSTEHUNG DER ZUSAMMENGESetzten PLASMID/TY-ELEMENTE

Wie könnten zusammengesetzte Ty/Plasmid-Elemente entstehen? Eine Möglichkeit wäre die Verknüpfung des Plasmids mit Ty cDNA durch den nichthomologen Endverknüpfungsmechanismus (NHEJ). Da aber gerade dem Ku-Protein eine Schlüsselrolle in diesem Prozess zugesprochen wird, erscheint diese Erklärung als unwahrscheinlich. Ich favorisiere daher ein Modell, bei dem zusammengesetzte Plasmid/Ty-Elemente durch Ty-Replikations-assoziierte Vorfälle entstanden sind, die einen Matrizenwechsel und /oder die fehlerhafte Bindung von 3'-Enden beinhalteten.

Ty-Viren-ähnliche-Partikel (*virus like particles*, VLPs) beinhalten wie Retroviren zwei genomische RNA-Moleküle, die als Vorlage für die reverse Transkription dienen. Während



### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

---

der Bildung der cDNA sind zwei sogenannte Strangwechsel notwendig, die sowohl intra- als auch intermolekular ablaufen können. Es gibt auch Hinweise auf zahlreiche Strangwechsel bei der Synthese des (-)-Strangs (Wilhelm, et al., 1999). Falls die zwei vorliegenden RNA-Matrizen unterschiedlich sind, kann ein intermolekularer Strangwechsel zu rekombinanten cDNA-Molekülen führen. So ergab beispielsweise die Analyse aller Ty1 und Ty2-Elemente, die in der Hefegenom-Datenbank aufgeführt sind, daß 14 von 32 Ty1-Elementen Sequenzabschnitte aus Ty2-Elementen enthalten, die durch intermolekulare Strangwechsel-Prozesse eingebaut worden sein könnten (Jordan and McDonald, 1998; Jordan and McDonald, 1999). Außerdem sind mehrere Fälle bekannt, in denen eine Verknüpfung von Retrovirus- bzw. Retrotransposon-Elementen mit Gensequenzen nachgewiesen wurde. Als Erklärung hierfür wird ein Matrizenwechsel von Virus/Transposon-RNA auf versehentlich mit in den V(L)P verpackte zelluläre RNA angenommen (Derr, et al., 1991; Hajjar and Linial, 1993; Temin, 1993). Es kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß durch gelegentliche fehlerhaft fortgeführte Transkription jenseits der Terminationssequenzen des *URA3*-Gens ein fast vollständiges Transkript des Plasmids pM151 erzeugt wurde. Wenn ein solches Transkript in den Strangwechsel während der reversen Transkription des Ty-Elements involviert wäre, sollte man aber bei den gefundenen P2-Seiten des integrierten Plasmids pM151 eine Lücke zwischen der *Bgl*III-Erkennungssequenz und der *URA3*-Transkriptions-Startstelle (ca. 180bp) nachweisen können. Die gefundenen Deletionen betragen aber maximal 19 bp, was eine Interaktion der Plasmid-DNA (statt RNA) mit den Ty-Replikations-Intermediaten als sehr viel wahrscheinlicher erscheinen lässt. Ein einzelsträngiger 3'-Überhang der Plasmid-DNA könnte zu einer Basenpaarung mit einem neusynthetisierten Ty1-Strang führen, was dann zu einem Überspringen der reversen Transkriptase auf die Plasmid-DNA führen könnte. Außerdem könnten diese Überhänge als Primer für die Synthese eines zweiten, komplementären cDNA-Strangs dienen. In einem solchen Fall würden die Verknüpfungen zwischen Plasmid- und Ty-Sequenz durch Polymerasen (Reverse Transkriptase und evt. zelluläre DNA Polymerasen) erzeugt und nicht durch Proteine des NHEJ-Mechanismus. Ein gleicher Mechanismus wurde vorgeschlagen, um das „Einfangen“ von Ty-Sequenzen in durch HO-Endonukleasen erzeugte Doppelstrangbrüche zu erklären (Lauerma, 1997; Moore and Haber, 1996; Teng, et al., 1996). Hier wurde postuliert, daß das chromosomale 3'-Ende die Ty cDNA-Synthese initiieren könnte. Auch für die reverse Transkription und Integration von Retroelementen ohne terminale Wiederholungen (LTRs)

wie beispielsweise LINE-Elemente wird ein derartiger Mechanismus angenommen (Finnegan, 1997).

Wenn ein fehlerhafter Strangwechsel zur Erzeugung der Plasmid/Ty-Mischelemente führt, sollte man annehmen, daß diejenigen Ty Replikationsintermediate, die auch häufig Substrate für natürlich auftretende Strangwechsel sind, im Prozess dieser fehlerhaften Verknüpfung eine Rolle spielen. Tatsächlich fand ich mehrere Ty/Plasmid-Mischelemente, bei deren Entstehung offenbar Ty1 Replikationsintermediate beteiligt waren (Ein neuerer Überblick über Replikationsintermediate findet sich bei (Mules, et al., 1998)). Da die Erklärungsmodelle ein großes Detailwissen der Ty-Replikation voraussetzen, möchte ich an dieser Stelle interessierte Leser auf die eingereichte Publikation (Kiechle, et al., 2000) verweisen und diese Ergebnisse hier aus Platzgründen nicht detailliert ausführen.

Im Moment ist nicht feststellbar, ob Strangwechsel- und/oder fehlerhafte „Priming“-Reaktionen in Ku-defizienten Zellen häufiger stattfinden als im Wildtyp. Da bekannt ist, daß das Ku-Protein mit hoher Affinität einzelsträngige DNA binden kann, könnte es auf diese Weise eine Interaktion der Plasmidenden mit Ty RNA, neuentstandener cDNA oder reverser Transkriptase verhindern. Nicht ausgeschlossen ist ferner die Möglichkeit, daß Ku durch die gezeigte Assoziierung mit VLPs (Downs and Jackson, 1999) ein Eintreten der DNA in diese Virus-ähnlichen Partikel unterbindet. Vorstellbar wäre auch, daß fehlerhafte Matrizenwechsel in WT- und *yku70*-Zellen gleich häufig auftreten, aber die Integration der resultierenden Mischelemente in Gegenwart von Ku blockiert ist.

#### 3.2.5.3.2 KU70 IST AN DER ERHALTUNG DER SUBSTRATSPEZIFITÄT DER TY INTEGRASE BETEILIGT

Mehrere Befunde sprechen für eine Reduzierung der Substratspezifität von Ty-Integrase in Abwesenheit eines funktionellen Ku-Proteins. In vier Fällen (MK25, MK32, MK19 und MK26) konnten beide chromosomalen Integrationsstellen bestimmt werden und in allen Fällen zeigte sich eine 5bp-Duplikation des Integrationsorts. Solche Sequenz-Duplikationen sind ein Charakteristikum von Integrationsprozessen, die durch Transposasen oder Integrasen hervorgerufen sind. Diese Enzyme produzieren hierbei ähnlich wie viele Restriktionsendonukleasen einen versetzten Schnitt im Doppelstrang des Integrationsorts, so



### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

---

daß nach der Ligation der mobilen Elemente an die überstehenden Enden einzelsträngige Lücken zurückbleiben, die durch Auffüllmechanismen geschlossen werden müssen. Das Ausmaß der duplizierten Region ist abhängig von dem Integrationsenzym, im Fall von Ty Integrase vermittelten Reaktionen beträgt sie fünf Basenpaare (Farabaugh and Fink, 1980; Gafner and Philippsen, 1980). In drei Fällen, in denen eine 5bp-Duplikation gezeigt werden konnte, wurden lediglich Plasmidsequenzen, nicht aber zusätzliche neu integrierte Ty-Fragmente am Integrationsort gefunden. Dass die Integration einer Sequenz, die keinerlei Homologie zum Genom des Rezipienten aufweist, mit einer 5bp-Duplikation des Integrationsorts verknüpft ist, wurde meines Wissens bislang noch nie beobachtet.

*In vitro*-Untersuchungen ergaben, daß die Effizienz der Ty1 Integrase am größten ist, wenn das zu integrierende Substrat auf 3'-A endet (Braiterman and Boeke, 1994; Moore, et al., 1995). Ferner wurde gezeigt, daß Integrase auch einzelsträngige Überhänge des Substrats prozessieren kann, wenn die doppelsträngige Region auf 3'-A endet (Moore, et al., 1995). An sieben von zwölf Übergängen konnte das Ende der Plasmidsequenz eindeutig bestimmt werden. In allen sieben Fällen war das letzte Nukleotid des integrierten Plasmids ein Adenin, was eine gute Entsprechung zur Substratspezifität der Ty-Integrase darstellt. Im Fall einer Integration des Plasmids bzw. Mischelements durch Ty1 Integrase sollte auch das dritte bekannte Kriterium einer Integrase-vermittelten Reaktion, die Bevorzugung bestimmter genomischer Integrationsorte, erfüllt sein. Zwar konnte bislang für die Ty1, 2, 3 und 4-Elemente keine Bevorzugung einer bestimmten Sequenzabfolge des Integrationsorts gezeigt werden, aber die Integration erfolgte bevorzugt stromaufwärts von genomischen RNA-PolIII Promotor-Regionen (Kim, et al., 1998). Die Loci der genomischen Ty1-4 bzw. ihrer LTR-Elemente stellen somit Orte dar, die von Ty1 Integrase bevorzugt sein könnten. Tatsächlich fand in drei Fällen die Integration in oder nahe von bereits bestehenden delta-, sigma- oder tau- LTR Elementen statt. Zusätzlich zeigten drei Fälle eine Integration in rDNA-Elemente ([Abbildung 20](#)). Vier von den fünf Übergängen zwischen der rDNA und den integrierten Sequenzen lagen in nicht transkribierten sogenannten *Spacer*-Regionen, die als bevorzugte Ziele von Ty1 Integrationen bekannt sind (Bryk, et al., 1997; Smith and Boeke, 1997).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, daß der Großteil der Plasmidintegrationen in *yku70*-defizienten Mutanten offenbar durch Ty Integrase vermittelt wurde. Dies wurde bislang noch nie in Wildtypzellen beobachtet. Da gezeigt wurde, daß aus VLPs aufgereinigte Ty1 Integrase

*in vitro* integrationsähnliche Prozesse mit Plasmidsequenzen ausführen kann, legt dies die Existenz eines zellulären Faktors nahe, der solche Integrationen *in vivo* normalerweise verhindert. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß es sich bei diesem zellulären Faktor um Ku handelt und die Abwesenheit des funktionellen Ku-Proteins zur Reduzierung dieser Substratspezifität führt. In den Fällen, in denen die Plasmid-DNA mit chromosomaler DNA auf der einen Seite und Ty-Sequenzen auf der anderen Seite verknüpft vorlag, könnte die Integration unter Nutzung eines normalen LTR-Endes erfolgt sein. Da aber in drei Fällen die Integration des „nackten“ Plasmids ohne flankierende Sequenzen auch alle Charakteristika eines Ty-Integrase vermittelten Einbaus aufweist, sind LTR-Elemente offensichtlich zumindest im *yku70*-Hintergrund dafür nicht zwingend notwendig. Ku könnte somit der Faktor sein, der verhindert, daß Integrase-Proteine extrachromosomale Nicht-Ty-DNA Fragmente als Substrate verwenden. Da die Integration fremder DNA die genomische Stabilität der Zelle gefährdet, würde die hier vorgeschlagene Funktion einen dritten Mechanismus darstellen, mit dem Ku-Proteine neben ihrer Funktion bei der DNA-Reparatur und Telomerstabilisierung die genomische Integrität gewährleisten.

Darüber hinaus könnte dieser Mechanismus evolutionär eine gewisse Rolle spielen. So wäre vorstellbar, daß in einer WT-Zelle extrachromosomale fremde DNA-Sequenzen endständig mit Ku-Proteinen besetzt sind und somit als Substrat für Integrasen unzugänglich sind. Damit würde sich der Anteil der möglichen Ty-Integrase-Substrate auf diejenigen DNA-Moleküle reduzieren, die innerhalb der VLPs durch reverse Transkription neu entstehen und zu diesem Zeitpunkt wahrscheinlich noch über „nackte“, nicht von Ku gebundene Enden verfügen. Da solche cDNAs immer die vorherige Existenz einer mRNA voraussetzen und somit dem Informationsgehalt eines ganzen Gens entsprechen, könnte die Zelle somit die Integration fremder DNA auf die Aufnahme gesamter Gene beschränken. Damit würde verhindert, daß DNA-Sequenzen ohne nutzbaren Informationsgehalt über Integrase eingebaut werden, denn Ty1 Integrase selbst zeigte ja in den *in vitro*-Versuchen keinerlei derartige Spezifität. Diese Schlussfolgerung bleibt beim momentanen Kenntnisstand allerdings lediglich ein Modell, das erst in zukünftigen Arbeiten überprüft werden muß.

#### **3.2.6 ZUSAMMENFASSUNG DER UNTERSUCHUNGEN ZUR NICHT-HOMOLOGEN INTEGRATION**

Die NHI von DNA-Fragmenten ist ein bisher in Hefe wenig untersuchter Prozess. Im vorliegenden Kapitel wurde versucht, den NHI-Weg weiter zu charakterisieren. Während diese Arbeiten hauptsächlich darauf abzielten, Verfahren zu finden, die die Etablierung einer *Gene trap*-Methode in Hefe zu erleichtern, führten die Ergebnisse auch zum Gewinn grundlegender Erkenntnisse über den NHI-Prozess, die hier zusammenfassend diskutiert werden sollen:

Bereits die früheren Versuche der Arbeitsgruppe Schiestl legten die Vermutung nahe, daß zwischen der Anzahl von DSB und der Häufigkeit der Integration nicht-homologer Sequenzen ein Zusammenhang bestehen könnte. In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, daß  $\gamma$ -Strahlung, die DSB im Genom hervorruft, eine Steigerung der NHI um den Faktor 10-30 ermöglicht. Dies erhärtet den Verdacht, daß offene Chromosomenstrukturen den Einbau fremder DNA-Abschnitte begünstigen. Möglicherweise erfolgt diese Integration im Zuge von nichthomologen zellulären Reparaturprozessen, bei denen die chromosomale DNA mit den transformierten DNA-Bereichen verknüpft wird.

Um zu testen, ob Defekte in bestimmten DSB-Reparaturproteinen einen Einfluss auf die Frequenz des NHI-Prozesses besitzt, wurden die Transformationen in verschiedenen Mutanten-Hintergründen durchgeführt. Obwohl die Gesamtzahl an Transformanten in *rad52*-Mutanten niedriger war als im WT, war der prozentuale Anteil von NHI-Transformanten zu Kontrolltransformanten, die mit einem selbstreplizierenden Plasmid transformiert wurden, deutlich erhöht. In haploiden Stämmen kann HR nur während der G2-Phase nach der Verdopplung des Genoms erfolgen. In anderen Zellzyklusstadien fehlt die intakte Kopie des Chromosoms, die als Matrize verwendet werden könnte, weshalb nur ein geringer Teil der DSB in haploiden Zellen über HR repariert werden kann. Offensichtlich ist die erhöhte Frequenz der NHI in haploiden *rad52*-Zellen nicht allein auf die Anzahl zusätzlich verfügbarer DSB zurückzuführen. Eine Erklärung hierfür könnte in Zusammenhang mit der möglichen Fähigkeit von Rad52p stehen, doppelsträngige DNA-Enden zu binden. Zwar wurde bislang diese DSB-Bindung von Rad52p erst in Säugerzellen gezeigt (Van Dyck, et al., 1999),

es erscheint angesichts der hohen Homologie aber durchaus möglich, daß auch in Hefe Rad52p in der Lage ist, DSB zu binden.

Auch das für die NHEJ essentielle yKu70p bindet an DNA-Enden und könnte in WT-Zellen mit Rad52p um freie Enden konkurrieren. Wenn Rad52p fehlt, könnte dies möglicherweise zu einer häufigeren Bindung von DNA-Enden durch yKu70p führen und somit die Ku-abhängige Prozesse (z.B. NHEJ) initiieren. Tatsächlich zeigte die ebenfalls untersuchte *yku70*-Mutante im Gegensatz zum WT keine erhöhte Frequenz der NHI nach  $\gamma$ -Bestrahlung. Beim Vorhandensein von DSB ist yKu70p offenbar tatsächlich notwendig für die illegitime Integration. Paradox erschien anfangs der Befund, daß die spontane Rate der IR in *yku70*-Mutanten gegenüber dem WT kaum verändert ist. Durch Sequenzanalysen konnte gezeigt werden, daß hier aber ein völlig anderer Mechanismus genutzt wird. Interessanterweise waren in *yku70*-Mutanten ca. 90% aller Integrationen auf Ty-vermittelte Prozesse zurückzuführen (ausführliche Diskussion in [Kapitel 3.2.5.3](#)).

Da die Verwendung von *rad52*-Mutanten aufgrund der niedrigen Gesamtzahl von Transformanten für das *Gene trap*-Verfahren nicht in Frage kam, wurde nach Mutanten gesucht, in denen die Plasmid/DNA-Aufnahme nicht gestört ist. Aussichtsreich erschien insbesondere die Untersuchung der NHI-Frequenz im *rad5*-Hintergrund, da hier in Plasmidsystemen eine verstärkte Nutzung des NHEJ-Weges gegenüber der HR gezeigt wurde. Leider zeigte sich jedoch in *rad5*-Mutanten keine Erhöhung der NHI. Die Ursache hierfür ist unklar, könnte aber auf unterschiedliche Mechanismen der Prozessierung von plasmidalen und genomischen DSB beruhen. Ein weiteres Indiz für diese Vermutung ergibt sich aus Untersuchungen der Reparatur von chromosomalen DSB, die durch HO-Endonukleasen erzeugt wurden. Sie werden ähnlich wie im WT effizient über HR behoben (pers. Auskunft, A. Friedl).

## 3.3 TEST DER EIGNUNG VON LACZ ALS REPORTERGEN DURCH GEZIELTE INTEGRATION

Zur Etablierung eines *Gene trap*-Verfahrens in Hefe wurde im nächsten Schritt die Funktionalität des gewählten Reportergens lacZ geprüft. Das bakterielle Gen lacZ kodiert für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase, das in eukaryotischen Zellen nicht vorkommt. Das Enzym, das aus vier gleichen Untereinheiten aufgebaut ist, spaltet den Milchzucker Lactose in Galaktose und Glucose. Wenn das promoterlose lacZ-Gen dergestalt in ein Hefegen eingebaut wird, daß es zu keiner Leserahmenverschiebung kommt, lässt sich die Promotoraktivität des Hefegens über eine enzymatische Farbreaktion bestimmen. Als Substrat in quantitativen Tests wird häufig o-Nitrophenyl-Pyranogalaktose (ONPG) oder das noch sensitivere Chloro-Phenol-Red-Galaktopyranosid (CPRG) eingesetzt, dessen Umsetzung photometrisch verfolgt und quantifiziert werden kann.

Als Selektionsgen bei der gezielten Integration wurde KanR verwendet, das stabil transformiert in Eukaryonten eine Geneticin-Resistenz vermittelt. Das Selektionsgen besitzt auf der Integrationskassette einen eigenen Promotor, der eine vom Integrationsort unabhängige Expression zulässt.

Um die Funktionalität des lacZ-Reportergens zu prüfen, sollte es im richtigen Leseraster in das *RAD54*-Gen inseriert werden, da die Strahleninduzierbarkeit dieses Gens ausführlich dokumentiert ist (Averbeck and Averbeck, 1994; Cole and Mortimer, 1989; Cole, et al., 1987; Cole, et al., 1989).

### 3.3.1 KLONIERUNG EINES PLASMIDS FÜR DIE GEZIELTE INTEGRATION IN DEN *RAD54*-LOKUS

Das *RAD54*-Gen mit endogenem Promotor (von C. Klaus zur Verfügung gestellt) wurde als *EcoRI-PstI*-Fragment in die MCS des Vektors pGem4 inkloniert (MKM1). Aus dem Plasmid pCM159 (F. Herrero) wurde durch einen *SalI-BamHI*-Doppolverdau das 3,1 kb lange promoterlose lacZ-Fragment isoliert und in die entsprechend geöffnete (*BamHI/SalI*) MCS des

Plasmids pFA6-KanMX6 (Wach, et al., 1994) einkloniert (=MKM9). Durch einen *Bam*HI-Verdau von MKM1 wurde ein internes Fragment des *RAD54*-Gens entfernt und durch den 7,0 kb langen *Bam*HI/*Bgl*III-geöffneten Vektor MKM9 mit dem Kan<sup>R</sup>-und lacZ-Gen ersetzt (MKM10). Damit die Sequenz des lacZ-Gens im gleichen Leserahmen wie das RAD54-Gen vorliegt, wurde dann ein *Bam*HI/*Dra*I-Fragment des lacZ-Gens gegen ein *Bam*HI/*Dra*I-Fragment aus dem Vektor PT1geo (Freundlicherweise von W. Wurst zur Verfügung gestellt), der eine kurze Deletion im extremen N-Terminus des lacZ-Gens aufweist, ausgetauscht (MKM12). Um eines der zwei Rückgrate des Plasmids MKM12 zu entfernen, wurde ein NotI-Fragment mit dem pFA6a-Rückgrat deletiert. Das so resultierende Plasmid MKM14 ist in [Abbildung 23](#) dargestellt und wurde für die weiteren Transformationen eingesetzt.

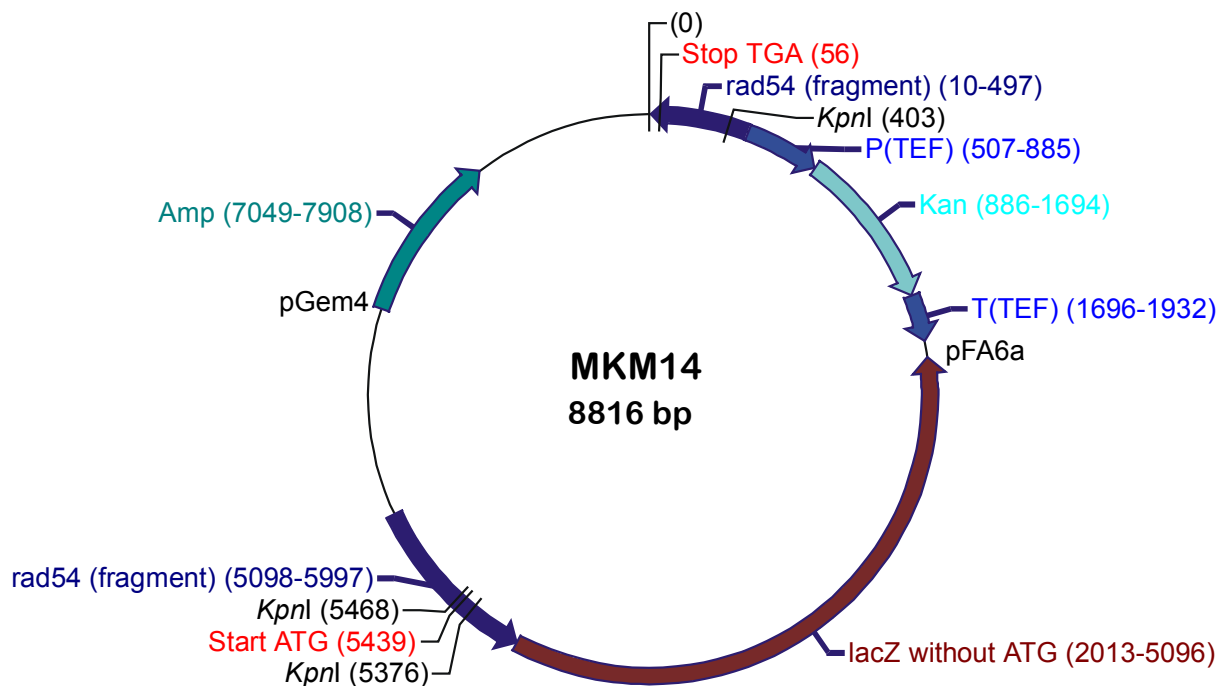


Abbildung 23: Plasmid MKM14, mit dem die Transformationen in den Stamm *mk166* zur Messung der Promotoraktivität des *RAD54*-Gens durchgeführt wurde

Für die Transformation wird MKM14 mit dem Restriktionsenzym *Kpn*I verdaut, das in diesem Vektor drei Erkennungssequenzen besitzt. Das 4,9 kb lange Fragment von 403-5376 enthält das Selektionsgen Kan<sup>R</sup> mit TEF-Promotor und in entgegengesetzter Orientierung das promoterlose lacZ-Gen, das im Leserahmen des flankierenden *RAD54*-Gens eingebettet ist.

#### **3.3.2 INTEGRATION VON LACZ-KANMX IN DAS *RAD54*-GEN, DESSEN INDUZIERBARKEIT BEKANNT IST**

Das 4,9 kb lange *KpnI*-Fragment von MKM14 wurde mittels Standardtechniken in den Hefestamm mk166 (Liefshitz, et al., 1998) transformiert. Geneticin-resistente Kolonien wurden mittels Southern-Hybridisierung auf korrekte Integration in den *RAD54* Locus geprüft. Ferner wurde die Funktionalität des lacZ-Gens durch eine X-Gal-Überschichtung demonstriert. Dabei wurden die Platten nach zwei bis drei Tagen Inkubation replikagestempelt. Die Originalplatten wurden mit einer Agaroselösung wie in Material und Methoden beschrieben, überschichtet. Die Agaroselösung enthielt eine Suspension von 4-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (X-Gal), einem Substrat der  $\beta$ -Galaktosidase, die das farblose X-Gal bei der enzymatischen Umsetzung in einen blauen Farbstoff umwandelt.

Die Kinetik der lacZ-Expression wurde sowohl nach UV-C- als auch nach  $^{60}\text{Co}$ -gamma-Strahlung untersucht. Da für viele Gene gezeigt werden konnte, daß in logarithmisch wachsenden Zellen eine deutlich stärkere Induktion erfolgt als in stationären Zellen (Fichter, 1999), wurden logarithmisch wachsende Zellen verwendet. Es ist bekannt, daß DNA-Schädigungen zu einem Zellzyklusarrest führen können (Friedberg, et al., 1995) und dieser wird erst nach abgeschlossener Reparatur wieder aufgehoben. Daher stellt sich das Problem, daß eine Expressionsveränderung nach Bestrahlung auch als sekundärer Effekt der unterschiedlichen Zellphysiologie einer arretierten Zelle interpretiert werden könnte und nicht als direkte Folge der Schädigung. Auch bei einer zellzyklusabhängigen Expression des untersuchten Gens könnte der Arrest zur Akkumulierung von Zellen in bestimmten Stadien und damit zu einer Veränderung der Expression führen, die aber ursächlich nicht direkt auf der schädigenden Wirkung der Noxe beruht (Johnston and Johnson, 1995). Um diese Probleme zu minimieren, wurden die Zellen nach der Bestrahlung in einen sogenannten LHR-Puffer (Liquid Holding Recovery) überführt, der zwar DNA-Reparatur, aber kein weiteres Wachstum der Zellen zuläßt. B. Fellerhoff zeigte in ihrer Promotionsarbeit die wachstumshemmende Wirkung dieses mit Glukose versetzten Phosphat-Puffers. Dass die

Reparaturkompetenz von geschädigten Zellen in LHR-Puffer aber erhalten bleibt, wurde bereits ausführlich untersucht (Fellerhoff, 1999; Friedl, 1994).

Für die quantitative Expressionsmessung des Rad54-lacZ-Fusionsproteins wurden logarithmisch wachsende Zellen bis zu einem Titer von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml angezogen und geerntet. Bei der Resuspension in LHR-Puffer wurde eine Zelldichte von  $1,5 \times 10^8$  Zellen/ml eingestellt. Die Proben wurden gemäß der Anzahl der untersuchten Dosiswerte aliquotiert. Für ultraviolettes Licht wurden Dosen von 0, 20 und  $40 \text{ J/m}^2$  verwendet, die Messung der  $\gamma$ -Induktion erfolgte bei 0, 10, 30, 50 und 100 Gy. Nach der Bestrahlung wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots entnommen, die nach einem Waschschrift sofort bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren wurden. Am darauffolgenden Tag wurden alle Proben gemeinsam aufgetaut und die Zelldichte wurde photometrisch bestimmt, um Unterschiede in der Zellzahl bei den einzelnen Proben zu eliminieren. Danach erfolgte die kolorimetrische Analyse der lacZ-Expression.

In Abbildung 24 und Abbildung 25 sind die zeitlichen Verläufe der Induktion dargestellt. Die Meßwerte wurden hierzu auf den unbestrahlten Kontrollwert nach 0 bzw. 0,5 Stunden normiert.

Im Verlauf der Messung ist eine Abnahme der lacZ-Menge in der unbestrahlten Kontrolle erkennbar. Da die Inkubation nach Bestrahlung unter Nicht-Wuchsbedingungen (LHR-Puffer) erfolgte, die Zellen sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung aber im logarithmischen Wachstum (VM) befanden, deutet dieser Befund auf eine erhöhte Expression des *RAD54*-Gens in wachsenden Zellen hin. Gut erkennbar ist ferner die Dosisabhängigkeit der Induktion. So konnte bei den verwendeten Maximaldosen von 40 J bzw. 100 Gy die höchste Induktionsrate festgestellt werden.



### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

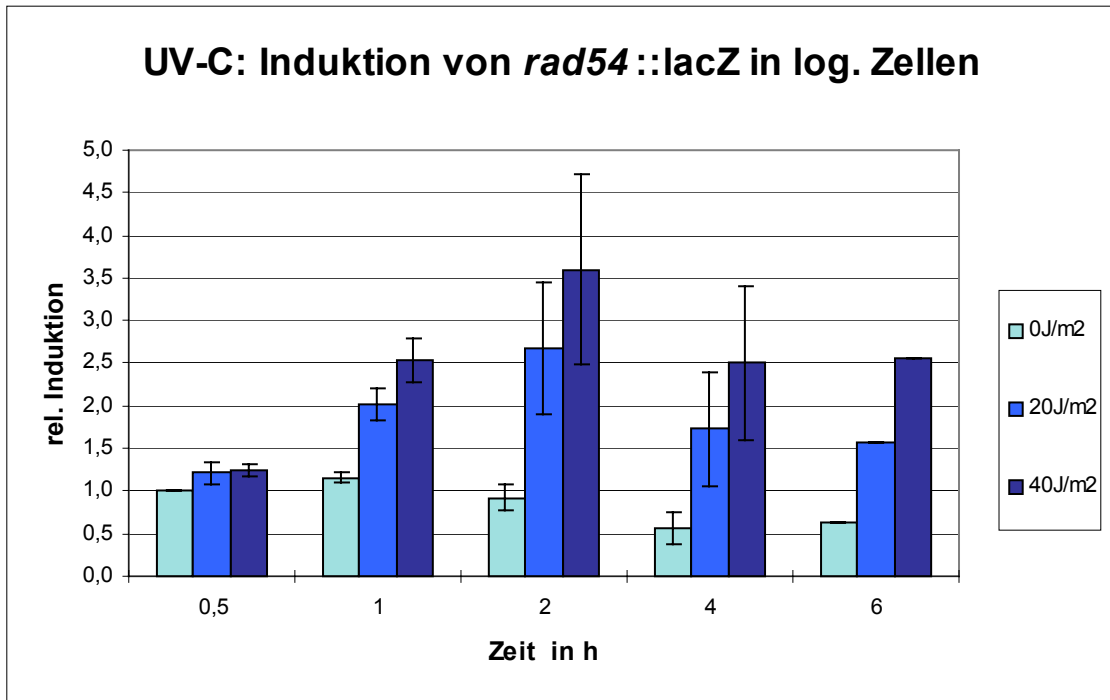


Abbildung 24: Zeitlicher Ablauf der Induktion nach UV-C-Bestrahlung. Für den Zeitwert sechs Stunden nach Bestrahlung wurde lediglich ein Experiment durchgeführt, weswegen hier keine Standardabweichung angegeben ist. Alle anderen Meßwerte sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Alle Werte sind auf den 0,5 h-Wert der unbestrahlten Probe bezogen.

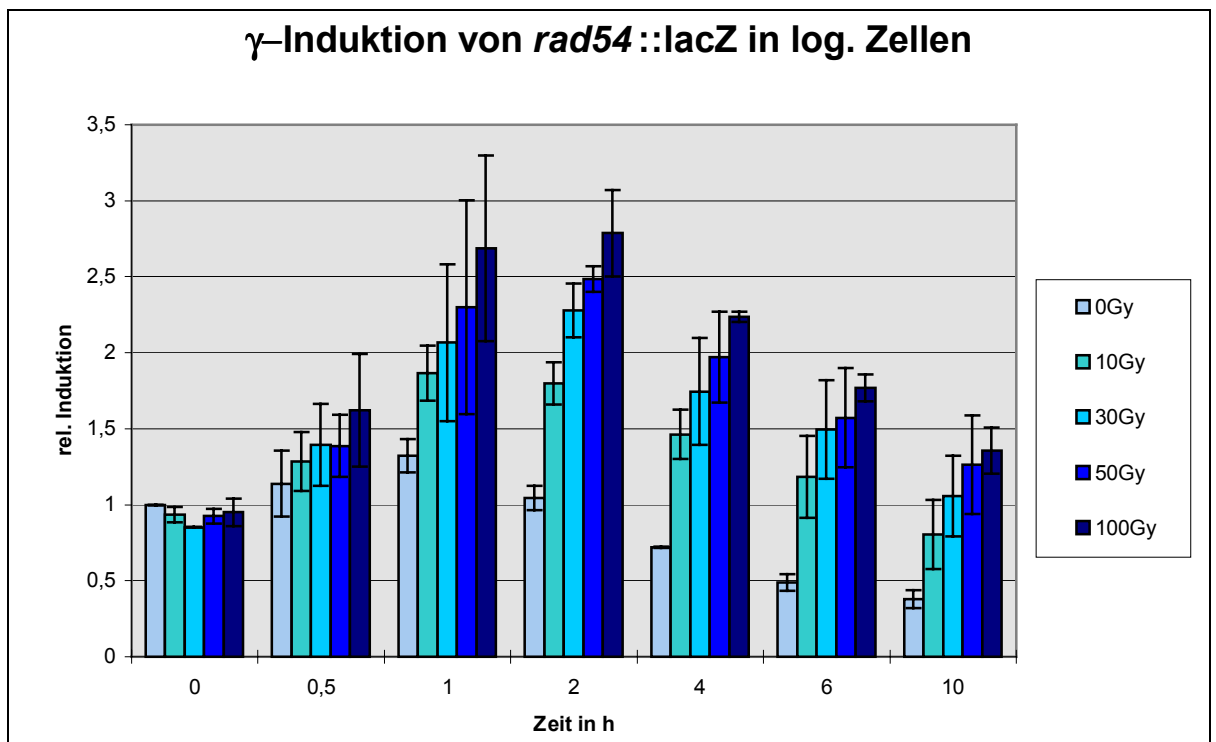


Abbildung 25: Zeitlicher Ablauf der Induktion nach Co60- $\gamma$ -Bestrahlung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Sowohl nach UV- als auch nach  $\gamma$ -Bestrahlung wird ein Maximum der lacZ-Expression bereits nach zwei Stunden erreicht, was eine sehr rasche transkriptionelle Aktivierung impliziert, zumal bei diesem Assay die Proteinaktivität des Reportergens und nicht die mRNA-Menge gemessen wird. Bedingt durch die Abnahme der lacZ-Menge in der unbestrahlten Kontrolle ist der relative Unterschied zwischen bestrahlter Probe und Kontrolle zu späteren Zeitpunkten zwar noch grösser, bezogen auf die Absolutmenge des Fusionsproteins liegt das Maximum aber bereits nach zwei Stunden vor. Die maximale relative Induktion bezogen auf den unbestrahlten 0h-Wert beträgt bei UV-Strahlen ca. Faktor 3,5, bei  $\gamma$ -Strahlen ca. 2,5.

Die UV-Induzierbarkeit wurde auch in stationär angewachsenen Zellen getestet. [Abbildung 26](#) zeigt, daß bei keiner der verwendeten Dosen eine Induktion des Reportergens stattfand. Allenfalls ist kurzfristig nach der Bestrahlung eine verminderte Abnahme der lacZ-Menge in den bestrahlten Proben zu beobachten.

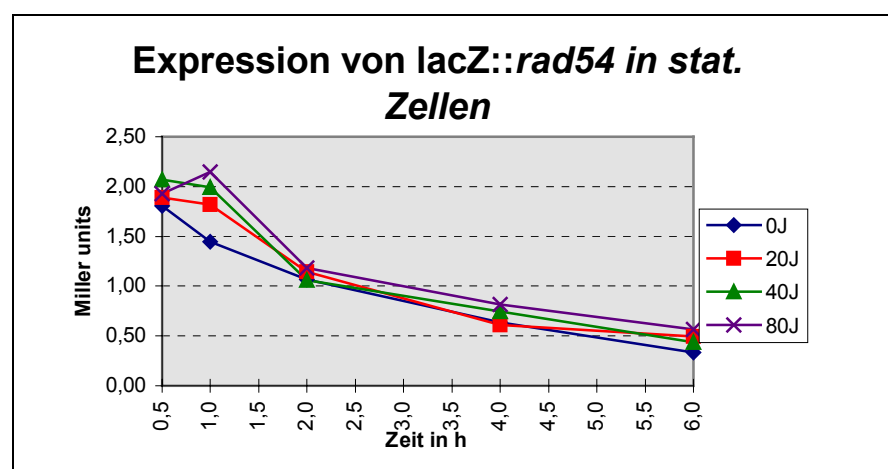


Abbildung 26: Fehlende Induktion von stationär angewachsenen Zellen nach UV-C-Bestrahlung

Die hier erzielten Ergebnisse decken sich gut mit früheren Untersuchungen der Induzierbarkeit des RAD54-Gens. So fanden Cole *et al.* (Cole, et al., 1987) bei einer Dosis von 60 Gy eine 3,7 fache Induktion eines genomisch integrierten Rad54-lacZ-Fusionsproteins vier Stunden nach  $\gamma$ -Bestrahlung. Bei einer Dosis von 35 J/m<sup>2</sup> zeigten sie für ultraviolettes Licht eine 1,9 fache Induktion vier Stunden nach Bestrahlung. Ähnliche Ergebnisse ergaben auch die Untersuchungen von Averbeck et al (Averbeck and Averbeck, 1994), wengleich sie die höchsten Induktionsraten erst vier bis acht Stunden nach Bestrahlung feststellten. Diese

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

---

Unterschiede könnten auf die unterschiedlichen Bedingungen der Inkubation (Vollmedium vs. LHR-Puffer) nach Bestrahlung zurückzuführen sein. Da speziell für die Expression des *RAD54*-Gens eine Zellzyklusabhängigkeit nachgewiesen wurde (Johnston and Johnson, 1995), erscheint die Verwendung von LHR-Puffer im Inkubationszeitraum nach der Bestrahlung als sinnvoll, um die zwei möglichen Ursachen der Expressionsveränderung zu entkoppeln.

Da die durch  $\gamma$ -Strahlen erzeugten DSB zu einem Großteil in einem Zeitraum von 0-4 h nach Schädigung repariert werden (Friedl, 1994), scheint die Induktion des *RAD54*-Gens in Zusammenhang mit der DSB-Reparaturfunktion von Rad54p zu stehen. Unklar bleibt in diesem Zusammenhang aber weiterhin, warum eine Deletion des Promotorbereichs, der für die Induktion notwendig ist, zu keinem Unterschied im Überleben der Zellen nach radioaktiver Bestrahlung führt (Cole and Mortimer, 1989).

#### **3.3.3 INTEGRATION EINER LACZ-KANMX-KASSETTE IN GENE, DEREN INDUZIERBARKEIT VERMUTET WIRD: *RAD5* UND *SMF3***

*RAD5* und *SMF3* sind zwei Gene, die in enger Nachbarschaft in entgegengesetzter Orientierung auf dem rechten Arm des Chromosoms XII lokalisiert sind. Beide Gene wurden mit den Methoden der Northern-Hybridisierung bzw. der RT-PCR bereits in unserem Labor auf transkriptionelle Aktivierung hin untersucht (Fichter, 1999; Wendel, 1990). Um zu überprüfen, inwieweit Ergebnisse, die auf Anwendung des lacZ-Reportergens beruhen, mit solchen vergleichbar sind, die auf mRNA-Quantifizierungen beruhen, sollte das Reportergenkonstrukt auch in diese Gene inseriert werden.

Um die umständliche Klonierung weiterer Plasmide mit anderen flankierenden Genen zu umgehen, wurde auf eine erstmals von Achim Wach (Wach, et al., 1994) beschriebene PCR-Technik zurückgegriffen. Diese nutzt den Umstand aus, daß für den Prozess der homologen Rekombination in Hefe bereits 30-40 bp Homologie zwischen den Enden der Kasette und der genomischen DNA ausreichen, um eine gezielte Integration durchzuführen. Es wurden jeweils zwei ca. 60 bp lange Hybrid-Oligonukleotide verwendet, die 40bp Homologie zum 5' bzw. 3'-Bereich des zellulären Zielgens und 20 bp Homologie zum 5' Terminus des lacZ-Gens bzw.

Promotorbereich des Kan<sup>R</sup>-Gens besitzen. Bei einer PCR-Reaktion, bei der MKM14 als Vorlage diente, entsteht so ein lineares Produkt, das den Bereich der Basen 507-5096 des auf Seite 100 gezeigten Plasmids MKM14 enthält, flankiert von je 40 bp, die zum extremen 5' bzw. 3'-Bereich des gewählten Hefegens homolog sind. Mit dieser Methode wurde die Promotoraktivität des *RAD5*- und *SMF3*-Gens untersucht.

### 3.3.3.1 *RAD5*

Rad5p wird aufgrund seiner strukturellen Merkmale zur SWI/SNF2-Proteinfamilie gerechnet. Diese DNA-abhängigen ATPasen werden neben der Prozessierung von DNA-Schäden auch für andere zelluläre Prozesse wie transkriptionelle Aktivierung und Erhaltung der genomischen Stabilität benötigt. Die Sequenz des *RAD5*-Gens enthält im C-terminalen Bereich eine hoch konservierte DNA-Bindestelle, ein charakteristisches RING-Finger-Motiv sowie sieben konservierte Helikase-Domänen, die für die SMF-Familie charakteristisch sind. Epistatisch wird *RAD5* in die *RAD6*-Gruppe eingeordnet. Diese vergleichsweise inhomogene Gruppe von Genen wird funktionell unter dem Überbegriff der postreplikativen Reparatur zusammengefasst. *rad5*-Mutanten zeigen bei Untersuchungen der Reparatur von künstlich eingeführten Doppelstrangbrüchen in einem Plasmidsystem einen gegenüber dem WT deutlich erhöhten Anteil von fehlerhaft reparierten Schäden (Ahne, et al., 1997).

Die Kasette für die Substitution des WT-*RAD5*-Gens durch ein *rad5*-Fusionskonstrukt wurde mit der oben beschriebenen PCR-Technik erzeugt. Der Primer RAD5-lacZ-N enthielt komplementäre Sequenzen zum 5'-Bereich des *RAD5*-Gens beginnend mit dem Startkodon ATG. Der zweite Primer RAD5-kanMX-C wurde so gewählt, daß er, auf das Stopkodon TAG endend, zum extremen 3'-Bereich des *RAD5*-Gens komplementär war. Die Transformation erfolgte nach Standardprotokoll. Beim Austausch des *RAD5*-Gens wurde somit bis auf 13 bzw. 14 Kodons der vollständige Leserahmen des 3,5 kb langen *RAD5*-Gens gegen die lacZ-KanMX-Kasette ausgetauscht. Geneticin-resistente Transformanten wurden mittels Southern-Hybridisierungen auf korrekte Integration in den *RAD5*-Lokus geprüft. Die UV-Induzierbarkeit wurde sowohl in stationären als auch in logarithmisch wachsenden Zellen untersucht. Bei den logarithmischen Zellen wurde ferner die  $\gamma$ -Induzierbarkeit bei 100 Gy geprüft. Die Ergebnisse sind in [Abbildung 27](#) und [Abbildung 28](#) zusammengefasst. Die

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

Induktion nach  $\gamma$ -Bestrahlung folgt einem ähnlichen kinetischen Verlauf wie die UV-C-Induktion. Auffällig ist die zeitliche Länge der Induktion, die sich über den Zeitraum eines gesamten Tages erstreckt und erst nach 24h ihr Maximum erreicht. Das Rad5::*lacZ* Fusionsprotein ist in logarithmisch wachsenden und stationär angewachsenen Zellen in ähnlichem Maß induzierbar, die maximale Induktion bezogen auf die unbestrahlte Kontrolle zum entsprechenden Zeitpunkt beträgt Faktor drei bis fünf.

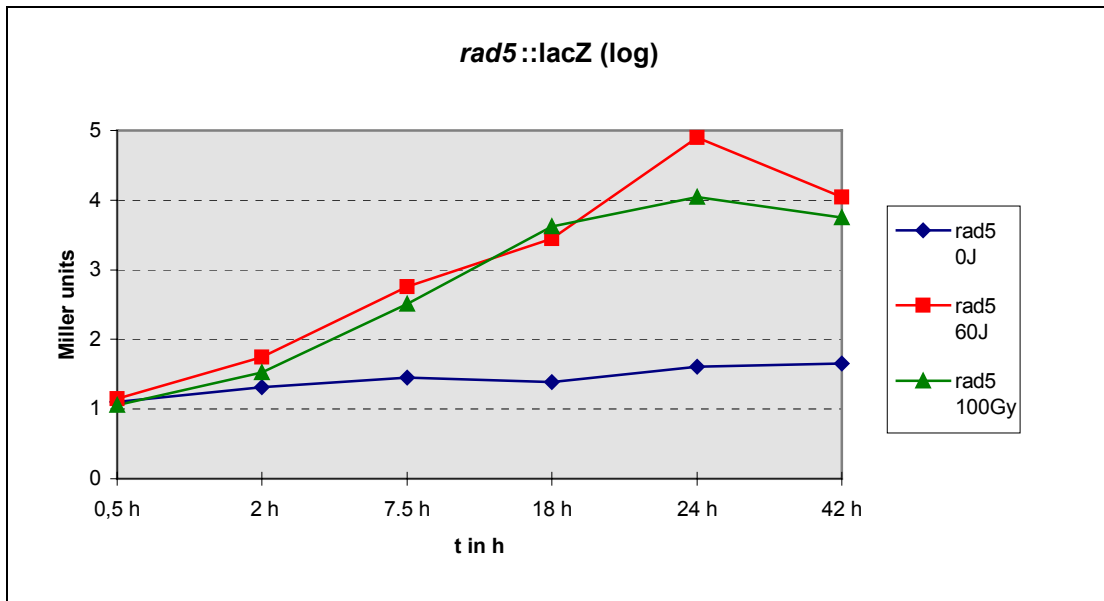


Abbildung 27: Induktion des RAD5-Gens nach UV-C- und  $\gamma$  Bestrahlung in logarithmisch wachsenden Zellen

Neben UV-C wurden als weitere Induktoren UV-A und UV-B getestet. Während UV-B bei einer äquitoxischen Dosis von  $840\text{J/m}^2$  eine vergleichbare Induktion verursacht wie UV-C, ist bei einer UV-A-Dosis von  $30000\text{J/m}^2$  keinerlei Induktion feststellbar (Daten nicht gezeigt). Allerdings bewirkte selbst diese maximal getestete Dosis von  $30\text{kJ/m}^2$  UV-A-Strahlung bei den vorangegangenen Überlebensexperimenten keine erhöhte Sensibilität der Zellen.

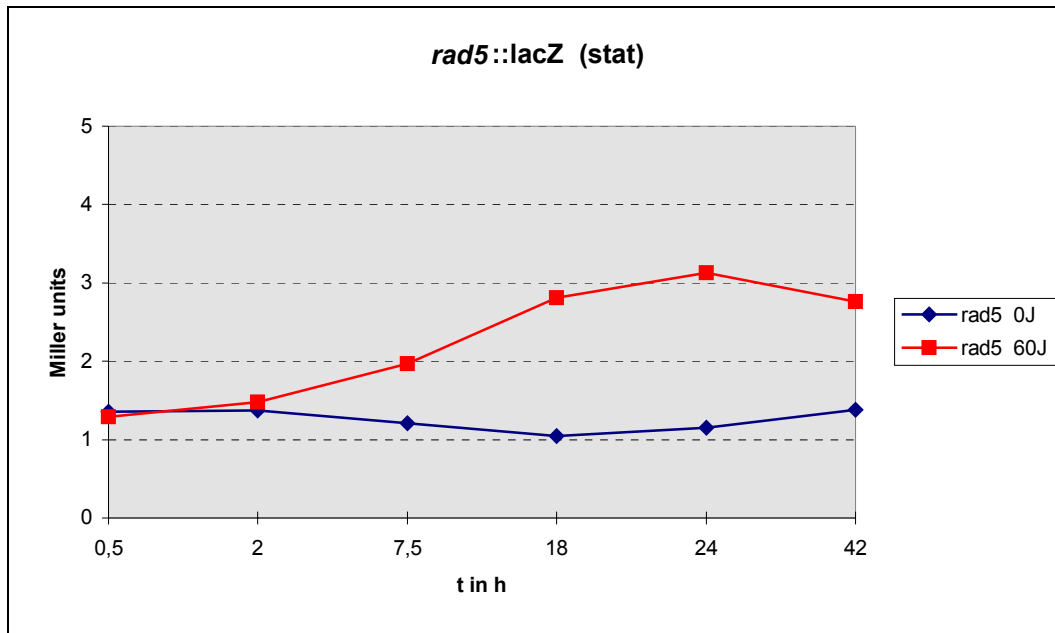


Abbildung 28: Induktion des RAD5-Gens nach UV-C- Bestrahlung in stationär angewachsenen Zellen

Ein Vergleich obiger Ergebnisse mit *RAD5*-mRNA-Quantifizierungen mittels RT-PCR (Fichter, 1999) ergibt eine gute Übereinstimmung in Bezug auf die Induktion in logarithmisch wachsenden Zellen. So fand Fichter für das *RAD5*-Gen eine bis zu siebenfache Induktion nach Bestrahlung mit  $40\text{J/m}^2$  UV-C. Die unterschiedlichen Induktionsfaktoren lassen sich durch die unterschiedliche Meßmethode erklären. Bei der RT-PCR ist die Bezugsgröße die mRNA-Menge, während hier die Enzymaktivität, letztlich also die Proteinmenge bestimmt wird. So soll eine zweifache Erhöhung der Proteinmenge mit einer vier- bis sechsfachen Zunahme der mRNA-Menge korrelieren (pers. Mitteilung K.D. Entian). Eine Diskrepanz ergibt sich hingegen bei den stationär angewachsenen Zellen: S. Fichter konnte für diese Zellen keine Induktion der *RAD5*-mRNA-Menge mehr nachweisen, während die Induktion des Reportergens nur geringfügig niedriger ausfällt als bei logarithmisch wachsenden Zellen.

### 3.3.3.2 *SMF3*

*SMF3* (Suppressor of Mitochondrial Function) wurde kürzlich als Homolog zu den beiden Hefegenen *SMF1* und *SMF2* (51% beziehungsweise 48% Identität bezogen auf die Aminosäuresequenz) charakterisiert (Publikation in Vorbereitung). *SMF1* und *SMF2* gehören zur N Ramp-Familie integraler Membranproteine. Diese in Eukaryonten weit verbreitete Proteinfamilie rief besonderes Interesse hervor, als gezeigt wurde, daß Mitglieder dieser

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

Familie mit einer natürlichen Resistenz gegenüber Infektionen durch intrazelluläre Pathogene wie *Salmonella typhimurium*, *Leishmania donovani* oder *Mycobacterium* assoziiert sind. Ursprünglich wurden *SMF1* und *SMF2* als Suppressoren einer temperatursensitiven Mutante beschrieben, die einen Defekt in der Prozessierung mitochondrialer Proteine durch die Mangan-abhängige Matrix-Peptidase aufzeigt. Für *SMF1* wurde eine Funktion als Mangan-Transporter hoher Affinität postuliert. Die erhöhte Mn-Konzentration in den Mitochondrien von *smf1*-Mutanten könnte somit die niedrigere Affinität der Peptidase zu diesem Schwermetall in der temperatursensitiven Mutante partiell komplementieren und somit den Suppressorphänotyp erklären.

Die Konstruktion der *smf3*-Mutante erfolgte ähnlich wie bei der Deletion des *RAD5*-Gens über die Ein-Schritt-Disruptions-PCR-Methode (Wach, et al., 1994). Die Amplifikation mit MKM14 als Matrize führte zu einem DNA-Fragment, das neben *lacZ* und KanMX die Nukleotide 81-120 und 1401-1440 des *SMF3*-ORFs enthielt. Während die Disruption somit den vollständigen C-Terminus des *SMF3*-Gens einschließlich 20 Nukleotiden aus dem 3'-untranslatierten Bereich deletierte, blieb der N-Terminus bis Nukleotid 81 des *SMF3*-Leserahmens erhalten. Dies geschah, um die potentielle Transkriptionsfaktor AP1-Bindestelle bei Nukleotid 57-64 im Leserahmen des *SMF3*-Gens zu erhalten, da dieses Sequenzmotiv möglicherweise einen Einfluss auf die Transkription des Gens besitzt.

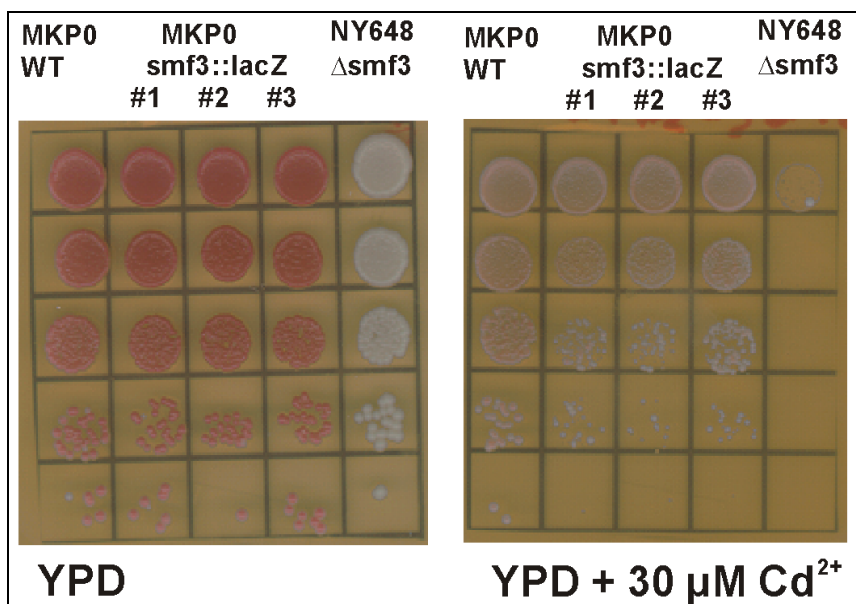


Abbildung 29:  $Cd^{2+}$ -Sensitivität verschiedener *smf3*-Mutantenzellen

Für *SMF3* wird aufgrund einer  $Cd$ -Sensitivität eine Funktion im Transport dieses Schwermetalls vermutet. Interessanterweise zeigte die von mir konstruierte *smf3::lacZ*-Mutante eine deutlich niedrigere  $Cd^{2+}$ -Sensitivität als der Stamm NY648  $\Delta smf3$

(West, et al., 1992), bei dem lediglich eine partielle Disruption dieses Gens vorlag ([Abbildung](#)

29). Eine mögliche Erklärung wäre die Existenz eines alternativen Transporters, der im Fall der Totaldisruption die Transportfunktion des Smf3p komplementiert, wohingegen bei der partiellen Deletion das unvollständige Genprodukt diesen alternativen Mechanismus hemmt. Da die Stammhintergründe dieser beiden Mutanten aber nicht isogen sind, kann die Differenz in der Sensitivität auch ein stammspezifisches Phänomen darstellen. Auf eine nähere Untersuchung dieser Beobachtung wurde verzichtet, da das Hauptinteresse der Fragestellung der Induzierbarkeit des *SMF3*-Gens galt. Die Induktionsexperimente wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Es wurde bei logarithmisch wachsenden Zellen sowohl die UV- als auch die  $\gamma$ -Induzierbarkeit geprüft, während bei den stationär angewachsenen Zellen lediglich die UV-Induzierbarkeit untersucht wurde. In [Abbildung 30](#) und [Abbildung 31](#) sind die Ergebnisse dieser Induktionsexperimente zusammengefasst.

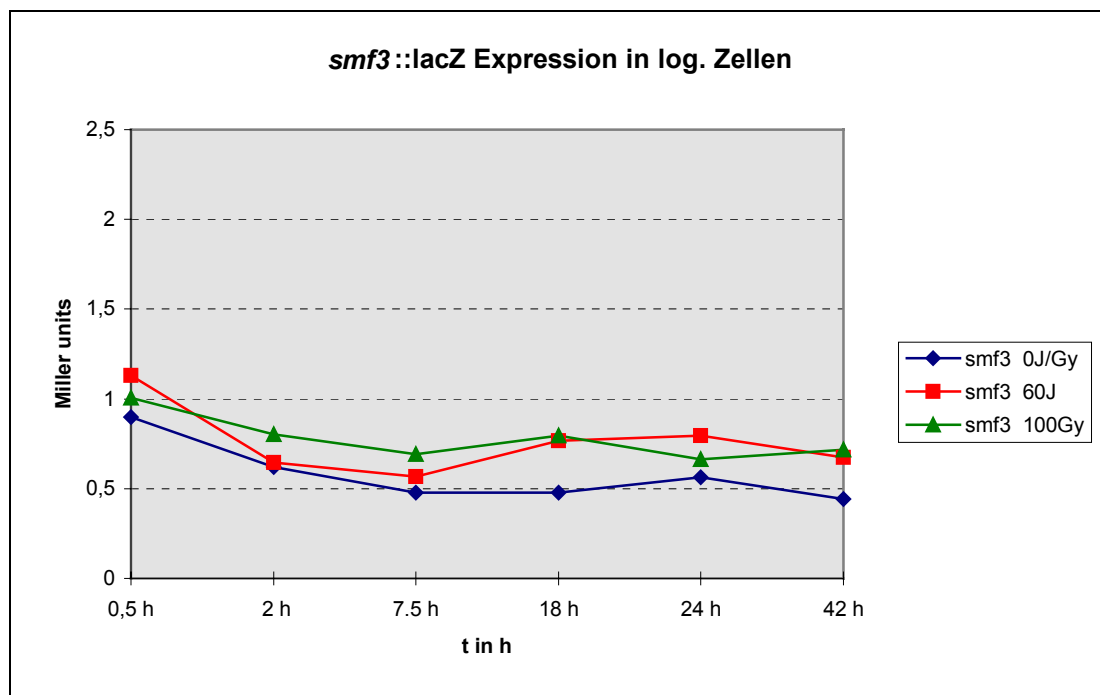


Abbildung 30: Fehlende Induktion des SMF3-Gens in logarithmisch wachsenden Zellen

Interessanterweise zeigt die Induktion des *SMF3*-Gens bezüglich der Abhängigkeit von der Wachstumsphase ein genau umgekehrtes Verhalten wie das *RAD54*-Gen. *RAD54* ist in logarithmisch wachsenden, nicht aber stationären Zellen induzierbar, wohingegen *SMF3* ausschließlich in stationär angewachsenen Zellen induziert wird. Der zeitliche Ablauf der Induktionsreaktion ist mit dem des *RAD5*-Gens vergleichbar, ein Maximum wird hier ebenfalls erst nach vierundzwanzig Stunden mit Faktor 3,5 erreicht.



### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

Ein Vergleich mit früheren Arbeiten von S. Wendel (Wendel, 1990), die die Induzierbarkeit des *SMF3*-Gens mit Northern-Hybridisierungen untersuchte, zeigten eine gute Übereinstimmung zu den hier gefundenen Ergebnissen. So führte eine Bestrahlungsdosis von  $80\text{J/m}^2$  zu einer sechsfachen Zunahme der Transkriptmenge in stationären Zellen, wohingegen die gleiche Dosis in logarithmischen Zellen lediglich zu einer Zunahme um den Faktor zwei führte.

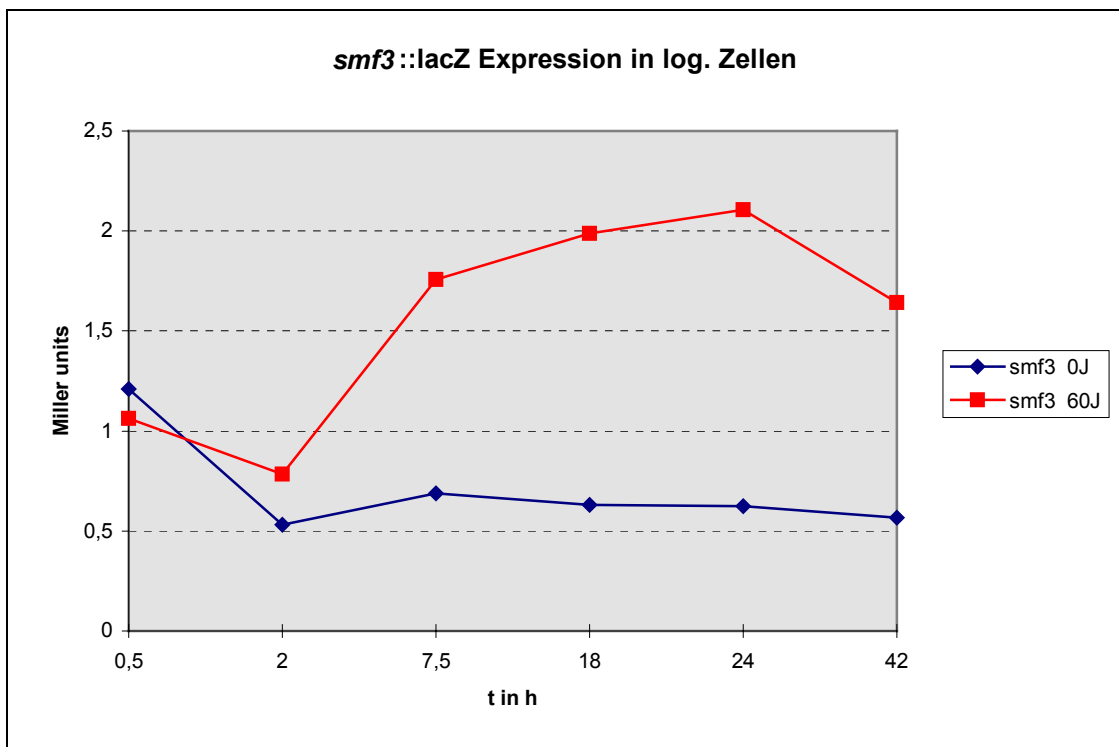


Abbildung 31: Induktion des *SMF3*-Gens nach UV-C-Bestrahlung in stationär angewachsenen Zellen

Um zu klären, ob die beobachtete Induktion als generelle Antwort auf oxidativen Streß interpretiert werden kann, wurde auch der Einfluss von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{HOCl}$  auf die Expression von *smf3::lacZ* untersucht. Die Zugabe von  $1\text{mM}$  und  $0,1\text{mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  zu stationär angewachsenen Zellen erzeugte ebenso wie die Zugabe von  $10$ ,  $1$  und  $0,1\text{mM}$   $\text{HOCl}$  keine Induktion von *lacZ* im Untersuchungszeitraum von  $24$  Stunden (Daten nicht gezeigt). Daher scheint die Induktion des *smf3-lacZ*-Fusionsgens in stationären Zellen nach UV-Bestrahlung nicht im Rahmen einer allgemeinen Reaktion auf oxidativen Streß zu liegen.

### 3.3.4 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER GEZIELTEN INTEGRATIONEN

Ziel der in diesem Kapitel beschriebenen Arbeiten war, zu prüfen, ob sich mittels Integration von lacZ als Reporter gen Expressionsänderungen nach DNA-Schädigung erfassen lassen, und ob die erzielten Daten in Einklang stehen mit publizierten Ergebnissen. Dazu wurden gezielte Integrationen einer Genkassette mit lacZ und KanMX in drei unterschiedliche Gene untersucht. Hierbei wurde das Hefegen jeweils größtenteils entfernt und der N-Terminus des Hefegens im richtigen Leseraster mit dem Reporter gen lacZ der Genkassette fusioniert. Daher lässt sich die transkriptionelle Regulation des ursprünglichen Hefegens durch Aktivitätsmessung des Fusionsproteins bestimmen.

Als Referenz diente das erste untersuchte Gen - *RAD54* - das bezüglich Strahleninduktion zu den am besten charakterisierten Genen in der Hefe *S. cerevisiae* gehört. Es konnte sowohl nach UV-C- als auch  $\gamma$ -Bestrahlung eine deutliche (Faktor 3-5) Induktion in log. Zellen nachgewiesen werden. Bereits nach einer Stunde zeigte sich bei beiden Strahlenarten eine Differenz zwischen bestrahlter Proben und Kontrolle, wobei nach zwei Stunden die höchste Induktion gefunden wurde. Danach nahm die Menge des Fusionsproteins bis zum Ende des Versuchs kontinuierlich ab. Bemerkenswert war ferner die strikte Dosisabhängigkeit der Induktion. Die gefundenen Werte stehen in gutem Einklang mit publizierten Werten zur Induktion des *RAD54*-Gens in logarithmisch wachsenden Zellen (Averbeck and Averbeck, 1994; Cole, et al., 1987).

Dieses Ergebnis bestätigte, daß Expressionsveränderungen über das Aktivitätsmessung des Fusionsproteins aus zellulärem Gen und integriertem lacZ-Gen detektierbar sind. Zusätzlich wurde die gezielte Integration in zwei weiteren Genen durchgeführt, von denen aufgrund von Expressionsmessungen mit anderen Techniken eine Strahleninduktion vermutet wurde.

Die Induzierbarkeit des *RAD5*-Gens wurde von S. Fichter mit der Technik der RT-PCR (Fichter, 1999) untersucht. Sie zeigte dabei eine maximal siebenfache Zunahme der mRNA-Menge nach UV-Bestrahlung in logarithmisch wachsenden Zellen. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Bezugsgrößen (mRNA bei RT-PCR, Proteinaktivität bei Reportergentechnik) waren die von mir gefundenen Induktionen bei logarithmisch wachsenden Zellen in guter Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen. Warum allerdings in

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

---

stationären Zellen mittels der Reportergentechnik eine Induktion gezeigt werden konnte, bei der RT-PCR hingegen nicht, bleibt vorerst unklar.

Das dritte untersuchte Gen war *SMF3*, das vermutlich für einen Metallionen-Transporter kodiert. Anhaltspunkte für eine Induktion nach Bestrahlung ergaben sich durch Northern-Analysen von S. Wendel (Wendel, 1990). Auch hier konnten diese Ergebnisse mit der Reportergentechnik weitgehend verifiziert werden. Besonders interessant waren die übereinstimmenden Ergebnisse der Induzierbarkeit in Abhängigkeit vom Wachstumsstadium. So wurde mit beiden Techniken lediglich bei Zellen der stationären Phase eine signifikante Induzierbarkeit gefunden.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß alle drei untersuchten Gene unabhängig von der eingesetzten Strahlenart eine Induzierbarkeit zeigten. Dass trotz der unterschiedlichen Schäden, die UV- und  $\gamma$ -Strahlung auslösen, eine Induktion der getesteten Gene erfolgte, könnte mehrere Ursachen haben. So könnten die getesteten Gene zumindest zusätzlich zu einer möglichen Funktion bei der Reparatur der Strahlenschäden eine weitere Funktion im Metabolismus einer geschädigten Zelle besitzen, die eine von der DNA-Schadensart unabhängige Induktion sinnvoll erscheinen lassen. Auch die Induktion selbst könnte im Rahmen einer eher allgemeinen Antwort der Zelle auf Streß begründet sein und somit die Induzierbarkeit bei unterschiedlichen Noxen erklären. Zumindest bei *SMF3* zeigte aber die unveränderte Expression nach  $H_2O_2$ - und  $HOCl$ -Behandlung, daß die Induktion keine allgemeine Reaktion auf oxidativen Streß darstellt.

Bemerkenswert sind die unterschiedlichen Muster der Induktion sowohl in ihrem zeitlichen Verlauf als auch bezüglich ihrer Wachstumsphasenabhängigkeit. So zeigte sich bei *RAD54* eine sehr schnelle (Maximum nach zwei Stunden) Induktion, die ausschließlich in logarithmisch wachsenden Zellen auftrat. Im Gegensatz hierzu war ein Maximum der Induktion bei *RAD5* und *SMF3* jeweils erst nach vierundzwanzig Stunden feststellbar. Dies legt die Vermutung nahe, daß die beiden Gene koreguliert sein könnten, zumal sie in unmittelbarer räumlicher Nähe auf dem rechten Arm des Chromosoms XII lokalisiert sind. Hiergegen spricht freilich die unterschiedliche Induzierbarkeit in stationären Zellen. So war *RAD5* nahezu unabhängig von der Wachstumsphase der Zellen induzierbar, während *SMF3* ausschließlich in stationären Zellen aktivierbar war, also genau umgekehrt wie *RAD54*. Dass

bei drei untersuchten Genen hinsichtlich der Kinetik und den Induktionsbedingungen drei unterschiedliche Induktionsmuster auftraten, legt die Vermutung nahe, daß viele verschiedene Mechanismen der transkriptionellen Induktion in Hefe existieren.

### **3.4 ANWENDUNG DES *GENE TRAP*-VERFAHRENS IN HEFE**

Die in [Kapitel 3.2](#) und [3.3](#) beschriebenen Vorversuche wurden mit unterschiedlichen Integrationssystemen durchgeführt. Bei den gezielten Integrationen wurde ein Plasmid verwendet, das neben dem promoterlosen lacZ-Gen als Expressionsreporter ein KanMX-Modul als Marker für eine erfolgte Integration enthielt. Vorversuche zeigten jedoch, daß bei Verwendung der KanMX-vermittelten Geneticin-Resistenz als Selektionsmarker generell deutlich geringere Transformationsraten erzielbar waren als bei Verwendung von Prototrophie-Markern, wie dem in pM151 vorliegenden *URA3*-Gen. Für die Anwendung des *Gene trap*-Verfahrens wurde daher ein Plasmid hergestellt, das das *URA3*-Gen als Selektionsmarker und das lacZ-Gen als Reporter gen enthielt. Dieses wurde dann nach Linearisierung in den Stamm RSY12 transformiert, bei dem das gesamte *URA3*-Gen deletiert ist.

#### **3.4.1 KONSTRUKTION DES PLASMIDS MKM20 FÜR DIE DURCHFÜHRUNG DES *GENE TRAP*-VERFAHRENS**

Die Klonierung des Vektors erfolgte basierend auf dem bereits für die Vorarbeiten verwendeten Plasmid pM151. Das lacZ-Gen wurde mittels PCR amplifiziert. Der Primer lacZ-Nterm-*Bgl*III enthielt komplementäre Sequenzen vom 5'-Ende des lacZ-Gens ab Nukleotid 20 des offenen Leserahmens. Zusätzlich enthielt der Primer in 5'-Richtung eine *Bgl*III-Erkennungssequenz. Da viele Restriktionsenzyme endständige Erkennungssequenzen mit deutlich niedrigerer Effizienz restringieren, wurden zusätzlich sieben weitere Nukleotide am 5'-Ende angefügt. Primer lacZ-Cterm-*Bam*HI war so gewählt, daß die PCR-Reaktion mit MKM14 als Matrize den vollständigen C-Terminus des lacZ-Gens sowie 20 weitere Nukleotide aus dem nicht-translatierten 3'-Bereich amplifizierte. Bei diesem Primer wurden in 5'-Richtung eine *Bam*HI-Erkennungssequenz und sieben weitere Nukleotide angefügt.

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

Resultat der Amplifikation war ein Produkt, das neben dem fast vollständigen, funktionsfähigen lacZ-Gen N-terminal die *BgIII*-Restriktionsschnittstelle und C-terminal die *BamHI*-Schnittstelle enthielt. Der *BamHI/BgIII*-Doppelverdau des PCR-Produkts ergab ein Fragment, das an beiden Enden einen einzelsträngigen GATC-Überhang aufwies. Aufgrund der komplementären Enden war es möglich, diese Kassette in den mit *BgIII* geöffneten Vektor pM151 zu klonieren. Durch die Ligation der 3'-*BamHI*-Schnittstelle des lacZ-Gens mit der *BgIII*-Schnittstelle des Vektors wurden die Enden derart verknüpft, daß hier die Erkennungssequenz für beide Restriktionsenzyme verloren ging. Dagegen blieb die *BgIII*-Erkennungssequenz am 5'-Ende des lacZ-Gens auch nach der Ligation mit dem Plasmid erhalten. Die korrekte Orientierung des lacZ-Gens (gegenläufig zum *URA3*-Gen) wurde durch *EcoRV/BgIII* - Verdau verifiziert. Der so erhaltene Vektor MKM20 ist in [Abbildung 32](#) dargestellt.

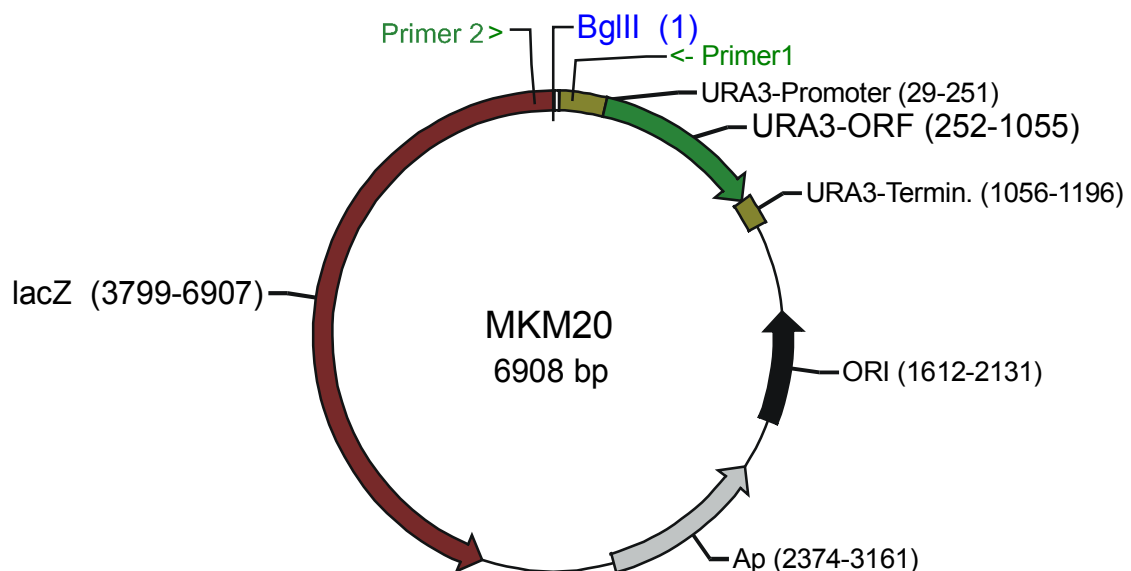


Abbildung 32: Vektor MKM20, der im *Gene trap*-Verfahren eingesetzt wurde

#### 3.4.2 ISOLIERUNG VON TRANSFORMANTEN, DIE DAS LACZ-GEN EXPRIMIEREN

Plasmid MKM20 wurde in den haploiden Hefestamm RSY12 transformiert. In diesem Stamm ist der gesamte Leserahmen des *URA3*-Gens durch das *HIS3*-Gen substituiert. Da das bakterielle lacZ-Gen in Hefe nicht vorkommt und auch die restlichen Plasmidbestandteile keinerlei Homologie zum Genom des verwendeten Hefestamms besitzen, kann das

linearisierte Plasmid nur über illegitime Integration eingebaut werden. Das eingesetzte Plasmid enthält keine Sequenzen für eine autonome Replikation in Hefe, so daß es im Verlauf der weiteren Zellteilungen verloren geht, wenn es nicht stabil genomisch integriert wird.

Das Plasmid wurde mit der Restriktionsendonuclease *Bgl*III vollständig linearisiert und mit dem in Material und Methoden beschriebenen optimierten High-efficiency-Protokoll in RSY12 transformiert. Direkt im Anschluß an den Hitzeschock wurden die zentrifugierten Zellpellets mit 50 Gy <sup>60</sup>Co- $\gamma$ -Strahlung bestrahlt und anschließend auf Uracil-Mangelmedium ausplattiert. Nach Inkubation bei 30°C für drei bis vier Tage wurden Einzelkolonien isoliert und nochmals auf Uracil-Mangelmedium ausgestrichen.

Das Anwachsen auf den Platten ist auf die Expression des *URA3*-Gens der transformierten Kasette zurückzuführen. Da das *URA3*-Gen im Gegensatz zum *lacZ*-Gen über eigene Promotorsequenzen verfügt, wird es nahezu unabhängig vom genomischen Integrationsort exprimiert. Daher ist mit der Fähigkeit zur Koloniebildung noch keine Aussage darüber möglich, ob das *lacZ*-Gen in einen bestehenden Leserahmen eingebaut wurde. Von Interesse für das *Screening*-Verfahren sind jedoch diejenigen Fälle, bei denen die Integration des *lacZ*-Gens im korrekten Leseraster eines Hefegens erfolgt ist. Bei einer derartigen *in-frame*-Integration wird ein Fusionsprotein aus dem betroffenen Hefegen und *lacZ* gebildet, dessen Promotorregulation der des Hefegens entspricht. Aus diesem Grund war eine zweite Selektion auf Integration in bestehende Leserahmen nötig. Dazu wurden die ausgestrichenen Kolonien replika-gestempelt und mit einer X-Gal-Agarose-Lösung überschichtet. Transformanten, bei denen das *lacZ*-Gen im richtigen Leseraster in ein exprimiertes Hefegen integriert sind, färben sich, abhängig von der basalen Expression des betroffenen Gens, unterschiedlich stark blau. Einige dieser Platten sind in [Abbildung 33](#) dargestellt. Die unterschiedlich starke Blaufärbung der einzelnen Kolonien, die durch die unterschiedliche Basalexpression der betroffenen Hefegene hervorgerufen wird, ist hier gut erkennbar. Ca. 2000 Transformanten wurden auf diese Weise nachselektioniert. 102 dieser Kolonien zeigten eine Blaufärbung, was einem Gesamtanteil von 5,1 % entspricht. Da ca. 60-70% des Hefegenoms aus offenen Leserahmen besteht und durch die Tripletstruktur nur jede dritte Integration im richtigen Raster erfolgt sowie ferner zwei Orientierungen des integrierten Plasmids möglich sind, sollte rein rechnerisch ungefähr jede zehnte genomische Integration zu einer *lacZ*-Expression führen.

## Non Homologous Integration of MKM20 in RSY12

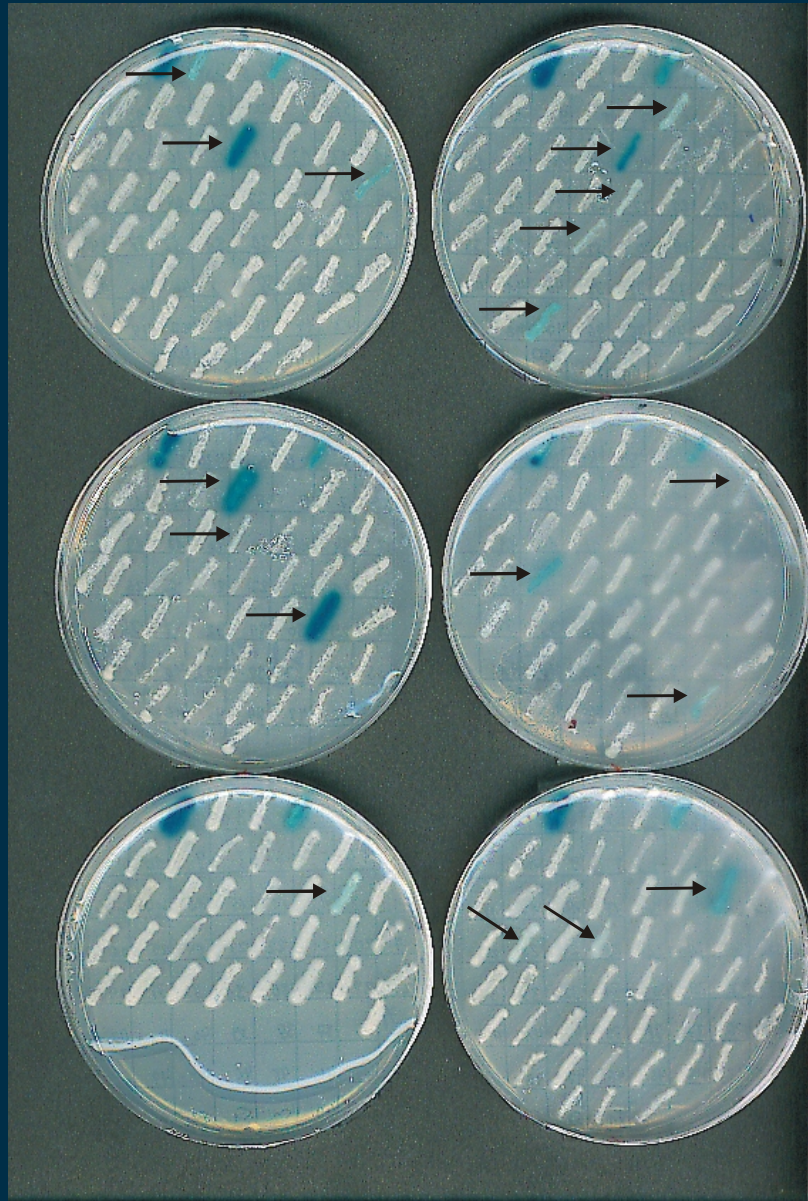


Abbildung 33: X-Gal-Overlay zur Nachselektion auf Transformanten, in denen *lacZ* ins Leseraster des getroffenen Hefegens integriert wurde. Als Kontrolle wurde auf jeder Platte in der obersten Reihe links und rechts je eine Kolonie ausgestrichen, von der bekannt war, daß *lacZ* exprimiert wird. Die Pfeile zeigen auf Kolonien, die *lacZ* in unterschiedlicher Menge exprimieren.

Berücksichtigt man weiterhin den Umstand, daß die Zahl der tatsächlich exprimierten Gene niedriger sein dürfte als die Zahl der über Sequenzdaten ermittelten offenen Leserahmen und daß trotz der vergleichsweise hohen Sensitivität des Reportersystems sehr schwach



exprimierte Gene bei dem X-Gal-Overlay unentdeckt bleiben könnten, so entspricht die Quote von 5,1% recht gut dem erwarteten Wert. Von den 102 Transformanten wurde ein halbquantitativer Test auf Induktion durchgeführt.

### 3.4.3 HALBQUANTITATIVES *SCREENING* AUF UV-C-INDUZIERBARKEIT

Beim halbquantitativen *Screening* wurde darauf verzichtet, die Zelldichte bei der Bestrahlung exakt zu ermitteln. Stattdessen wurden logarithmisch wachsende Zellen in LHR-Puffer resuspendiert. Eine Hälfte der Suspension wurde mit  $60 \text{ J/m}^2$  UV-C bestrahlt, die zweite Hälfte diente als unbestrahlte Kontrolle. Nach zweistündiger Inkubation der Proben erfolgte der Aufschluß der Zellen und die Zugabe des Substrates CPRG. Kontrolle und bestrahlte Probe wurden mit dem Auge auf einen farblichen Unterschied geprüft. Bei interessanten Kandidaten wurde dann die optische Dichte bei 574 nm bestimmt.

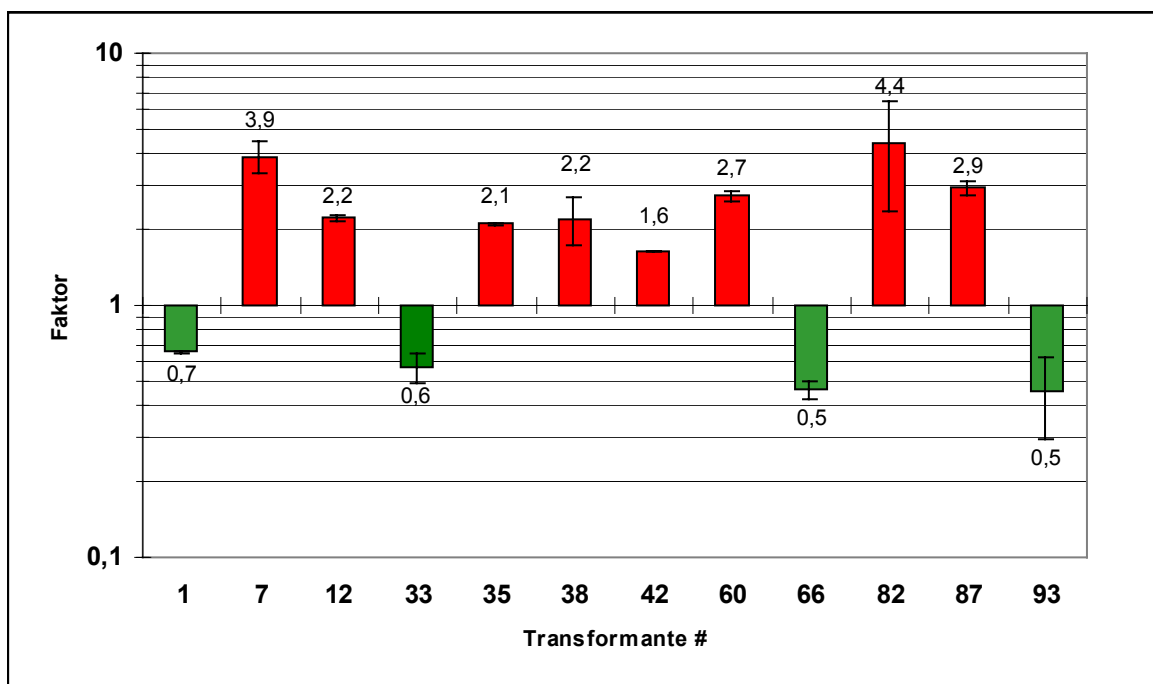


Abbildung 34: Halbquantitative Induktionsmessung der Transformanten mit *lacZ*-Expression. Angegeben ist die relative Veränderung der *lacZ*-Expression nach UV-C-Bestrahlung mit  $60 \text{ J/m}^2$  und Inkubation für zwei Stunden nach Bestrahlung im Vergleich zu einer unbestrahlten Kontrolle



### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

---

Bei 12 Klonen wurde eine Veränderung der lacZ-Aktivität in der bestrahlten Probe gegenüber der unbestrahlten Probe nach UV-Bestrahlung detektiert, die in einem Wiederholungsexperiment bestätigt werden konnte ([Abbildung 34](#)). In acht Transformanten zeigte sich eine Erhöhung der lacZ-Expression in bestrahlten Proben um Faktor 1,6-4,4, bei vier Transformanten war die Expression in bestrahlten Proben bis zu 50% reduziert.

#### **3.4.4 ERMITTLUNG DER GENOMISCHEN INTEGRATIONSORTE IN TRANSFORMANTEN MIT VERÄNDERTER LACZ-EXPRESSION NACH BESTRAHLUNG**

Um den zu diesem Zeitpunkt noch unbekanntem Integrationsort zu ermitteln, wurde mit den zwölf nach Bestrahlung transkriptionell veränderten Kolonien ein modifiziertes *Plasmid rescue*, das in Kapitel 2.2.6 ausführlich dargestellt ist, durchgeführt. Die Technik blieb gegenüber dem zur Identifizierung der illegitimen Transformanten im *yku70*-Hintergrund durchgeführten *Plasmid rescue* bis auf die Hinzufügung zusätzlicher Waschschritte zu Beginn der DNA-Isolierung unverändert.

Die Länge der neu entstandenen Plasmide ist abhängig von der Entfernung des Integrationslokus bis zur nächsten genomischen Erkennungssequenz des verwendeten Enzyms. Da mit zunehmender Länge des Plasmids die Effizienz der Transformation abnimmt, liegt die Ausbeute bei diesem Verfahren unter optimalen Bedingungen bei circa 30%-50%. Um diesen Wert zu erhöhen und möglichst viele Integrationsloci mit dieser Technik bestimmen zu können, wurden verschiedene Restriktionsenzyme eingesetzt. Durch Einsatz von *Bam*HI, *Xho*I, *Nhe*I und *Kpn*2I konnten von elf der zwölf untersuchten Transformanten Plasmide isoliert werden. Lediglich bei Transformante #07 konnte kein Plasmid reisoliert werden.

Die Längen der reisolierten Plasmide wurden dann nach einer *Eco*RI-Restriktionsverdau, die im Ausgangsplasmid MKM20 zur Linearisierung führt, im Agarosegel abgeschätzt. Sie sind in [Tabelle 6](#) angegeben.

Klon #	MKM 20	#1-1	#12-1	#33-1	#35-1	#38-1	#42-1	#60-1	#66-1	#82-1	#87-1	#93-1
Benütztes Restr. enzym		BamHI	BamHI	XhoI	XhoI	BamHI	NheI	BamHI	NheI	Kpn2I	XhoI	BamHI
Ungefähre Fragment längen		3,3 / 4,2 / 6,0	4 / 4 / 2,1 / 1,7	3,0 / 5,0 / 6,0 / 7,0	3,3 / 4,5 / 0,75	5,25 / 6,5 / 0,25	4,0 / 4,8	8,0 / 13	1,2 / 3,7 / 5,0 / 9,0	0,75 / 1,4 / 3,7 / 5,5 / 7,0	3,3 / 3,4 / 5,2	4,3 / 4,5 / 4,5
Geschätzte Plasmid länge	<b>6,9</b>	<b>13,5</b>	<b>11,8</b>	<b>21,0</b>	<b>8,6</b>	<b>12,0</b>	<b>8,8</b>	<b>21,0</b>	<b>22,0</b>	<b>18,3</b>	<b>11,9</b>	<b>13,3</b>

Tabelle 6: Größenabschätzung der reisolierten Plasmide

Zur Feststellung der Integrationsorte wurden dann die unbekannt genomischen DNA-Bereiche der gewonnenen Plasmide ansequenziert. Hierzu wurden Primer gewählt, die in der bekannten Plasmidsequenz nahe der *Bgl*III-Erkennungsequenz verankert sind (siehe [Abbildung 32](#)). Die Sequenzierreaktion selbst wurde von der Firma MediGenomix durchgeführt. Da die vollständige Sequenzabfolge des Hefegenoms bekannt und über das Internet verfügbar ist, konnte der Integrationsloкус mittels einer automatisierten Homologiesuche (BlastN) bestimmt werden.

### 3.4.5 SEQUENZIERUNG UND ZUORDNUNG MITTELS DATENBANKANALYSE

Zur Ermittlung des Gens, dessen Expression mittels des Reportergens bestimmt wurde, wäre nur eine Ansequenzierung ausgehend vom N-terminalen Bereich des lacZ-Gens nötig gewesen. Da jedoch zur Effizienzsteigerung der illegitimen Integration eine  $\gamma$ -Bestrahlung durchgeführt wurde und vermutlich die induzierten Doppelstrangbrüche zur Erhöhung der Integrationsrate geführt haben, erschien die Analyse beider Übergänge vom Plasmid in die unbekannt genomische Region sinnvoll. Im Vergleich mit der chromosomalen Wildtyp-Sequenz des betroffenen Gens sollten so eventuell Rückschlüsse über den Mechanismus der Integration auf Sequenzebene möglich sein. Daher wurde der zweite Sequenzierungsprimer so

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

---

gewählt, daß er zu Sequenzen aus der Promotorregion des URA3-Gens komplementär ist und somit die Sequenzierung in 3' Richtung des betroffenen Hefegens ermöglicht. Von den eingesandten elf DNA-Proben, die im Anschluß an den *Plasmid rescue* aus den *E.coli*-Transformanten isoliert wurden, konnten neun Proben problemlos sequenziert werden. Bei den Transformanten Nr.87 und Nr. 93 konnte trotz Wiederholung der Sequenzierreaktion lediglich die Sequenz der P1-Seite ermittelt werden. Da lediglich in einem einzigen anderen Fall (#66) eine größere Aberration auftrat, ist es wahrscheinlich, daß auch die jeweils nicht sequenzierbare Seite von #87 und #93 dem gleichen Leserahmen wie dem auf der P1-Seite zuzuordnen ist.

Zur Identifizierung des Integrationslokus wurde die per e-mail übermittelte komplette Sequenz in das Homologiesuche-Programm „BLASTN“ der „*Saccharomyces-Genome-Database*“ kopiert (<http://genome-www2.stanford.edu/cgi-bin/SGD/nph-blast2sgd>). Der dortige Rechner untersuchte die eingegebene Sequenz auf signifikante Homologiebereiche mit dem dort abgelegten gesamten Hefegenom. Alle eingegebenen Sequenzen bis auf Klon Nr. 01 konnten so eindeutig zugeordnet werden. Die Ergebnisse dieser Sequenzanalysen sind in Abbildung 35 zusammengefasst.

Einschränkend muß festgehalten werden, daß Sequenzunterschiede zwischen dem in der Datenbank beschriebenen Stamm und dem für die Transformation verwendeten Stamm RSY12 vorliegen können. Daher können Sequenzunterschiede, die hier im folgenden besprochen werden, stammspezifische Ursachen haben und nicht auf eine Veränderung durch den Integrationsprozeß zurückzuführen sein. Da aber die Übereinstimmung der Nukleotidabfolge in den Bereichen, die nicht direkt am Integrationsort liegen, mit über 99,9% sehr hoch ist, sind die gefundenen Veränderungen am Integrationsort sehr wahrscheinlich auf den Prozess der Integration und nicht auf Polymorphismen zurückzuführen.

## Struktureller Sequenzvergleich der Gene *trap*-Klone mit SGD-BLAST

PLASMID-SEQUENZ Primer 1: TGC CTG CAG GTC GAC TCA **GATC**  
 PLASMID-SEQUENZ Primer 2: GTA AAA CGA CGG CCA GTA **GATC**

MK01-p1:	CTC <b>GATC</b> - TACTCTATTGAT
MK01-P2:	AGT <b>AGATC</b> - ACAAAGAGTGG
MK12-P1:	CTC <b>GATC</b> - <b>GTGTGT</b> TGGATG
MK12-P2:	AGT <b>AGATC</b> - <b>ATGATA</b> CTTCTC
WT-ChrVII:	162650-AGAAG <b>TATCATA</b> <b>GTGTGT</b> TGGATGAA-162675
MK33-P1:	CTC <b>GATC</b> - <b>AAACCG</b> CTATCT
MK33-P2:	AGT <b>AGATC</b> - <b>TATCGA</b> TGGAAC
WT-CHRV:	216890-CA <b>TCGATA</b> <b>GAGCCAT</b> <b>TCAAACCG</b> CTA- 216915
MK35-P1:	CTC <b>GATC</b> - <b>FTCATC</b> GAGGAA
MK35-P2:	AGT <b>AGATC</b> - <b>TTAGCT</b> CACCCT
WT-CHRXI:	178770-AGGGTG <b>GAGCTAA</b> <b>ATTTCATC</b> GAGGAA-178795
MK38-P1:	CTC <b>GATC</b> - <b>STATCA</b> TCTAAA
MK38-P2:	AGT <b>AGATC</b> - <b>TGATCA</b> AAGTGT
WT-CHRII:	651770-AACACTT <b>TGATCA</b> <b>AGTATCA</b> TCTAAA-651795
MK42-P1:	CTC <b>GATC</b> - <b>TGAGCC</b> GTCACA
MK42-P2:	AGT <b>AGATC</b> - <b>AGACGAAA</b> ACGT
WT-CHRIV:	629945-CGTTT <b>TCGTC</b> <b>TGAGCC</b> GTCACACTCT-629970
MK60-P1:	CTC <b>GATC</b> - <b>GTA</b> CTCGTTATA
MK60-P2:	AGT <b>AGATC</b> - <b>GGATC</b> TATTTTT
WT-CHRVIII:	374794- <b>ATGTACTC</b> -...-T <b>AGATCCGA</b> -491212
MK66-P1:	TGC <b>CTG</b> - <b>AAAA</b> TATGGCA PLASM:-16Nt
MK66-P2:	AGT <b>AGATC</b> - <b>TGGGAGA</b> ATTGG
WT-CHRX:	598777-TC <b>TCCCA</b> AGTGCTTAATAAT <b>CTGAAAA</b> TA-598807
MK82-P1:	CTC <b>GATC</b> - <b>TTTTC</b> TATAAA
MK82-P2:	AGT <b>AGATC</b> - <b>TGCATT</b> AGTTTT
WT-CHRII:	339110-TTATAG <b>GAAA</b> <b>ATCTGC</b> ATTAGTTTT-339135
MK87-P1:	CTC <b>AG</b> - <b>CACCGACT</b> TGTT
WT:	CHR. IV-1415807-CAAGTC <b>GGTGCT</b> CCTAGCCT
MK93-P1:	CTC <b>GATC</b> - <b>GTCGG</b> ATAGTAT
WT:	CHRXIV-211921-CAGAAT <b>ATGTCGG</b> ATAG
Gelb: Mikrohomologie Grün: Übergang P1 Blau: Übergang P2 Rot: Duplikation	

Abbildung 35: Für jedes reisolierte Plasmid sind hier die Ergebnisse der zwei Ansequenzierungen zusammengefasst (Primer 1(P1) und Primer 2 (P2)). Die jeweils dritte Zeile gibt die Sequenzabfolge des in der Datenbank abgelegten chromosomalen Bereichs der Integration wieder. Der Beginn des Sequenzbereiches auf dem Plasmid, der zum Genom homolog ist, wurde grün (P1) beziehungsweise blau (P2) markiert. Die noch vorhandenen Nukleotide der BglII-Erkennungssequenz des Plasmids wurden fett dargestellt. Mikrohomologien zwischen Plasmidsequenz und chromosomaler Sequenz am Integrationsort wurden gelb markiert. Im Fall einer Duplikation von chromosomalen Sequenzen ist dies durch eine rote Markierung dargestellt. In den Fällen von MK87 und MK93 konnte trotz Wiederholung lediglich die Sequenzierung mit P1 erfolgreich durchgeführt werden.

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

---

Zusammenfassend lässt sich feststellen, daß häufig eine Mikrohomologie zwischen den einzelsträngigen Überhängen des integrierten Plasmids und dem chromosomalen Integrationsort vorliegt, die eine ganz exakte Festlegung des Integrationsorts nicht zuläßt. So würde sowohl eine enzymatische Entfernung von Nukleotiden des einzelsträngigen Plasmidüberhangs als auch die Deletion kurzer genomischer Sequenzen zur gefundenen Sequenzabfolge bei der Sequenzierung führen. Da sowohl chromosomale Deletionen (gesichert in #12, #33 und #66) als auch die Entfernung einzelsträngiger Nukleotide des Plasmids (z.B. in #35 P1+P2, #38 P2 und #60 P1) nachgewiesen wurden, kann über die Herkunft dieser, in [Abbildung 35](#) gelb markierten, Nukleotide keine Aussage getroffen werden. Offenbar begünstigen Mikrohomologien aber den Einbau nichthomologer DNA bei diesem Mechanismus der  $\gamma$ -Strahlen -vermittelten illegitimen Integration. In einem Fall (#42) wurde statt einer Deletion die Duplikation eines chromosomalen Nukleotids (Thymin) beobachtet. Ebenfalls in nur einem Fall (#66 P1) wurde eine längere Deletion von Plasmidsequenzen festgestellt. Während die Verkürzung der Plasmidsequenz in allen anderen Fällen auf den Bereich der *Bgl*III-Schnittstelle beschränkt blieb, kam es hier im Verlauf der Integration zu einer Deletion von 16 Nukleotiden. In einem Fall wurde auch eine größere chromosomale Aberration beobachtet (#60). Hierbei liegen die zwei in den Ansequenzierungen gefundenen Sequenzen 115kb voneinander entfernt auf Chromosom VIII. Ob der dazwischen liegende Bereich deletiert oder auf ein anderes Chromosom transloziert wurde, lässt sich aus den Ergebnissen der Sequenzierung nicht feststellen. Aufgrund der Größe des fehlenden Bereichs erscheint eine Translokation aber wahrscheinlicher.

Wie bei spontanen illegitimen Integrationen scheinen auch bei diesen durch  $\gamma$ -Strahlung induzierten Integrationen Mikrohomologien eine wichtige Rolle bei der Verknüpfung zu spielen. Die Mikrohomologien sind oft sehr kurz (<10bp), was wiederum ähnlich zur Situation bei der spontanen IR ist. Während jedoch bei der IR ohne Bestrahlung die chromosomale Sequenz meist nicht verändert wird (Schiestl, et al., 1993), treten hier in mindestens der Hälfte der charakterisierbaren Fälle (#12, #33, #60 und #66 sowie evt. #35 und #38) kurze chromosomale Deletionen auf. Die gefundenen Deletionen könnten auf die durch die  $\gamma$ -Strahlung hervorgerufenen DSB zurückzuführen sein, wobei sowohl die Enden des Plasmids als auch des Chromosoms im Verlauf der Integration offenbar exonukleolytisch verkürzt worden sind.

Aus dem Integrationsort konnte direkt auf die Identität des dort lokalisierten offenen Leserahmens geschlossen werden. Die zugeordneten offenen Leserahmen sind mit einer kurzen Beschreibung der Genfunktion (sofern bekannt) und Angabe des betroffenen Chromosoms in [Tabelle 7](#) dargestellt.

Klon	Primer1 (URA3)	Primer2 (lacZ)	Integ. rel. zum ORF	Chr. orient. <sup>1</sup>	Beschreibung/ YPD-Report ( <a href="http://www.proteome.com/databases/YPD.html">http://www.proteome.com/databases/YPD.html</a> )
#01 UV↓	2μ Plasmid	2μ Plasmid	-	-	-
#12 UV↑	APG1	APG1	3'	VII, W	<ul style="list-style-type: none"> <li>• für Selbstauflösung (autophagy) benötigt</li> <li>• Proteinkinase</li> <li>• arbeitet „downstream“ von Tor1p and Tor2p (31774)</li> <li>• benötigt zum Überleben unter Hunger-Streß</li> <li>• benötigt zur Derepression einiger Streß-induzierter Gene inkl. UBI4</li> <li>• benötigt für die Degradierung von Peroxisomen</li> <li>• Sequenzanalyse-basierte Methoden sagen eine mögliche N-terminale Acetylierung voraus</li> <li>• keine Induktion nach MMS-Behandlung</li> </ul>
#33 UV↓	FIR1	FIR1	Mitte	V; W	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Funktion: RNA Prozessierung/Modifizierung</li> <li>• 5' stromaufwärts gelegene Region hat ein konservierte Proteasomen-assoziiertes Kontroll Element (PACE; 5'-GGTGGCAAA-3'), was auf eine mögliche Regulation durch Rpn1p hindeutet</li> <li>• Starke Interaktion mit REF2p im 2-Hybrid-Screen</li> <li>• Genprodukt partipiziert möglicherweise in der 3' mRNA Prozessierung</li> <li>• Phenotyp: Null-Mutante lebensfähig, zeigt verlangsamtes Wachstum in allen untersuchten Medien</li> </ul>
#35 UV↑	MRP8	MRP8	Mitte	XI, W	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zelluläre Rolle: Protein-Synthese</li> <li>• Biochemische Funktion: RNA-bindendes Protein; Ribosomale Untereinheit</li> <li>• Lokalisierung: Mitochondrial; RNA-assoziiert; Ribosomen-assoziiert</li> <li>• Sequenzanalyse-basierte Methoden sagen eine mögliche N-terminale Acetylierung voraus</li> <li>• 2,9-fache Induktion nach MMS-Behandlung</li> </ul>
#38 UV↑	SDS24	SDS24	Mitte	II, W	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Funktion unbekannt,</li> <li>• Überproduktion in E. coli leitet SOS Reparatur ein</li> <li>• Transkription ist durch Flavopiridol reprimiert</li> <li>• Sequenzanalyse-basierte Methoden sagen eine mögliche N-terminale Acetylierung voraus</li> <li>• 3,9-fache Induktion nach MMS-Behandlung</li> </ul>
#42 UV↑	UBC13	UBC13	5'	IV, W	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zelluläre Rolle: DNA Reparatur; Protein Modifizierung, Protein Degradierung</li> <li>• Biochemische Funktion: Protein-Konjugations-Faktor</li> <li>• Lokalisierung: Kern</li> <li>• Interaktion mit MMS2p</li> <li>• Sequenzanalyse-basierte Methoden sagen eine mögliche N-terminale Acetylierung voraus</li> <li>• arbeitet möglicherweise mit MMS2p im Rad6p-Reparaturweg der postreplikativen, fehlerfreien DNA Reparatur zusammen</li> <li>• 6,2-fache Induktion nach MMS-Behandlung</li> <li>• Null Mutante zeigt erhöhte UV-Sensitivität</li> </ul>

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

#60 UV ↑	SPL2	VAB36	Aberrat.	VIII, C-W	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vac8p-bindendes Protein</li> <li>• Zelluläre Rolle: unbekannt</li> <li>• Biochemische Funktion: unbekannt</li> <li>• Zwei mögliche Streß-Antwort-Motive (stress response elements (STRE)) liegen im Promotorbereich</li> </ul>
#66 UV ↓	BUD4	BUD4	5'	X, W	<ul style="list-style-type: none"> <li>• könnte eine Komponente des transienten Positionierungssignals für die axiale Knospung sein, die Mutter- und Tochterzelle markiert</li> <li>• Promotor besitzt stromaufwärts regulatorische Sequenzen, die denen von SWI5 und CLB2 gleichen</li> <li>• Stromaufwärts gelegene Regulationseinheiten führen wahrscheinlich zur zell-zyklus-abhängigen Transkription</li> <li>• mRNA Konzentration schwankt im Zellzyklus mit einem Maximalwert in der M-Phase</li> </ul>
#82 UV ↑	YBR052 C	YBR052 C	5'	II, C	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protein with Ähnlichkeiten zu Ycp4p, S. pombe obr1, und E. coli trp Repressor bindendem Protein</li> <li>• 3,4-fache Induktion nach MMS-Behandlung</li> </ul>
#87 UV ↑	YDR479 C	nicht seq.		IV, C	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hat Ähnlichkeit zu Yhr150p</li> <li>• Zwei mögliche Streß-Antwort-Motive (stress response elements (STRE)) liegen im Promotorbereich</li> <li>• Sequenzanalyse-basierte Methoden sagen eine mögliche N-terminale Acetylierung voraus</li> </ul>
#93 UV ↓	BNI4	nicht seq.	Aberrat.	XIV, W	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protein, daß in der Anheftung von Chitin Synthase an Septine beteiligt sein könnte</li> <li>• interagiert mit Cdc10p, Cdc12p, Chs4p im 2-Hybrid Syst.</li> <li>• Sequenzanalyse-basierte Methoden sagen eine mögliche N-terminale Acetylierung voraus</li> <li>• mRNA Häufigkeit schwankt im Zellzyklus mit Maximalwert in der späten G1-Phase</li> <li>• 2,2-fache Induktion nach MMS-Behandlung</li> </ul>

Tabelle 7: Übersicht der von der Integration betroffenen Gene, bzw. offenen Leserahmen. Gelb unterlegt sind publizierte Erkenntnisse über Zusammenhänge mit Antwort auf DNA-Schädigung oder Regulation. <sup>1</sup>W- und C- symbolisieren den Watson- bzw. Crick-Strang, die römischen Ziffern beziehen sich auf die Nummer des beteiligten Chromosoms. Die Symbole UV ↑, UV ↓ symbolisieren erhöhte bzw. verringerte Transkriptmengen nach UV-Bestrahlung, die im halbquantitativen Screening festgestellt wurden.

Da mit Ausnahme von *UBC13* (#42) keines der gefundenen und in [Tabelle 7](#) aufgeführten Gene bislang in direkte Verbindung mit zellulärer Antwort auf DNA-Schäden gebracht wurde, sollte im folgenden die Induzierbarkeit dieser Gene genauer untersucht werden. Hierzu wurde eine quantitative Expressionsmessung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung durchgeführt.

Im Fall von Transformante #1 entstammten die unbekannt Sequenzen nicht chromosomalen Hefesequenzen, sondern einem Hefepiasmid. Dieses „Doppelplasmid“ konnte sich aufgrund seines 2 $\mu$ -Replikationsstartpunkts autonom vervielfältigen und wurde an die Tochterzellen

weitergegeben, wodurch eine Koloniebildung auf Mangelmedium möglich war. Aus diesem Grund wurde auf eine weitere Untersuchung dieses Klons verzichtet.

### **3.4.6 EXPRESSIONS-KINETIK DER TRANSFORMANTEN NACH UV-BESTRAHLUNG**

Das Prinzip der Expressionsmessung wurde gegenüber der Untersuchung der Transformanten bei der gezielten Integration ([Kap.3.3](#)) nicht verändert. Im Vergleich zum halbquantitativen *Screening* sind die Werte hier aber auf den 0h-Wert der Kontrolle beziehbar, so daß nicht nur der relative Unterschied zwischen Kontrolle und bestrahlter Probe zu den verschiedenen Zeitwerten ersichtlich ist. In [Abbildung 36](#) ist die Enzymaktivität des lacZ-Fusionsproteins als Funktion der Zeit aufgetragen. Bei den unbestrahlten Kontrollen fällt auf, daß die Expression des lacZ-Gens im Versuchszeitraum nicht konstant bleibt. In den meisten Kontrollen zeigt sich eine Abnahme der lacZ-Aktivität, mit Ausnahme von #38, wo ein leichter Anstieg feststellbar ist. Offensichtlich hat hier die Überführung in den LHR-Puffer und der damit verbundene Wachstumsstop einen Einfluss auf die basale Expression der getroffenen Gene.

Bei allen Transformanten, für die im halbquantitativen *Screening* eine Expressionserhöhung nach Bestrahlung gefunden wurde, konnte dies auch in der quantitativen kinetischen Untersuchung bestätigt werden. Bezogen auf den 0h-Wert zeigen mehrere Proben (#12, #35, #38, #60 und #82) einen echten Anstieg der lacZ-Aktivität, wohingegen in den Transformanten #42 und #87 gegenüber der Kontrolle lediglich eine verlangsamte bzw. verringerte Abnahme der Expression gefunden wird. Da bei Transformante #42 im gezeigten Experiment kein 0h-Wert ermittelt werden konnte, wurde das Experiment mit verkürzter Gesamtdauer wiederholt. Die Wiederholung offenbarte keinen Unterschied in der basalen Expression zum Zeitpunkt 0h zwischen Kontrolle und bestrahlter Probe und auch der kinetische Ablauf der Induktion war vergleichbar.



### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

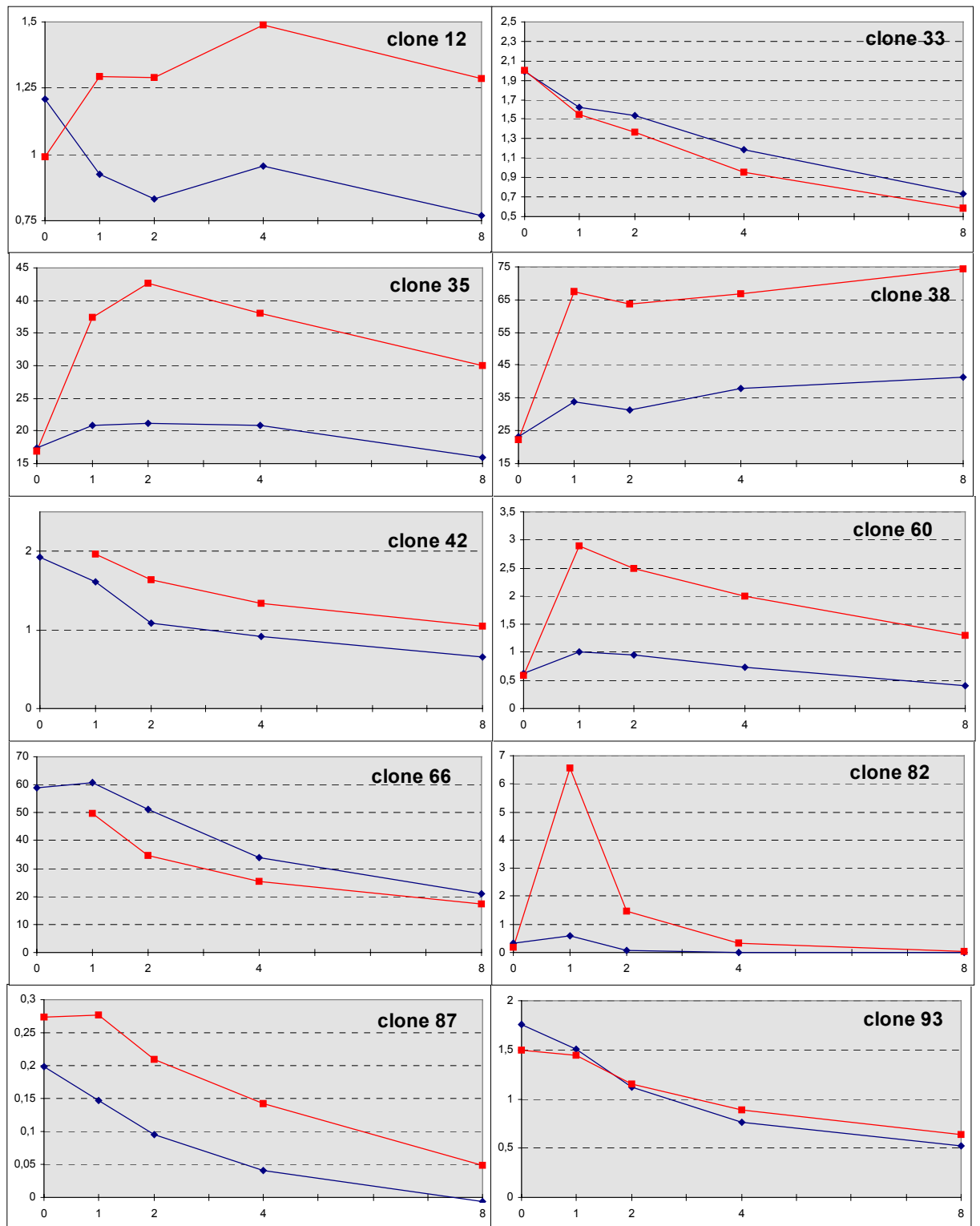


Abbildung 36: Expressionskinetiken der Transformanten mit veränderter Expression nach UV-C-Bestrahlung. Auf der X-Achse ist die Zeit der Inkubation nach Bestrahlung in Stunden, auf der Y-Achse die Enzymaktivität in Miller Units angegeben. Die rote Linie (☐) zeigt den Verlauf der mit 60 J/m<sup>2</sup> bestrahlten Probe, die blaue Linie (▴) den der unbestrahlten Kontrolle

Bei den Transformanten, für die im halbquantitativen *Screening* eine verminderte lacZ-Expression nach UV-Bestrahlung gemessen wurde, konnte dieses Ergebnis lediglich im Fall von #66 bestätigt werden. Da bei #66 ebenfalls kein Nullwert im gezeigten Experiment ermittelt werden konnte, wurde der Versuch ebenfalls wiederholt und wiederum zeigte sich kein Unterschied in der Basalexpression zwischen Kontrolle und bestrahlter Probe unmittelbar nach der Bestrahlung (0h). Bei #33 betrug die Verminderung der lacZ-Expression in der bestrahlten Probe gegenüber der Kontrolle im quantitativen Experiment nur noch 10-20%, wogegen im halbquantitativen Versuch eine 40% verringerte lacZ-Expression der bestrahlten Probe gemessen wurde. Bei Transformante #93 zeigte sich im quantitativen Experiment überhaupt kein Unterschied mehr in der lacZ-Expression zwischen Kontrolle und bestrahlter Probe. Die Ursache hierfür ist unklar, könnte aber durch die ungenauere Meßmethodik (keine Zelltitierbestimmung) im halbquantitativen *Screening*, bei dem über hundert Transformanten getestet wurden, bedingt sein. Ein Vorteil des *Gene trap*-Verfahrens liegt in der Erzeugung von Transformanten, in denen das getroffene Hefegen durch die Insertion der Genkassette in den meisten Fällen funktionell beeinträchtigt ist. Dies ermöglicht ohne weitere Klonierungsschritte eine Untersuchung des Phänotyps. Daher wurden im folgenden das Wachstumsverhalten der Zellen und die Fähigkeit zur Koloniebildung nach  $\gamma$ - und UV-C-Strahlung untersucht.

### **3.4.7 PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER UNTERSUCHTEN TRANSFORMANTEN**

Um zu testen, ob die Integration der Genkassette zu einem veränderten Phänotyp der mutierten Zelle geführt hat, wurden phänotypische Untersuchungen zur Sensitivität gegenüber UV- und  $\gamma$ -Strahlung durchgeführt. Ferner wurde die Morphologie der Zellen und ihr Wachstumsverhalten bei unterschiedlicher Temperaturen untersucht.

#### **3.4.7.1 SENSITIVITÄT GEGENÜBER UV-C- UND $\gamma$ -STRAHLUNG**

Da die identifizierten Transformanten eine Expressionsveränderung nach UV-Bestrahlung zeigten, stellte sich die Frage, ob die Mutation des Gens, in das die Kassette integriert wurde, zu einer veränderten Überlebensrate nach Bestrahlung führt. Daher wurde die Fähigkeit zur

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

Koloniebildung nach  $\gamma$ - und UV-C-Strahlung untersucht. Hierfür wurden die stationär angewachsenen Zellen gezählt und eine Verdünnungsreihe mit Faktor 10 auf Vollmediumplatten getropft. Die Zellzahl wurde so eingestellt, daß in den verschiedenen Verdünnungen zwischen durchschnittlich zehn und 100000 Zellen enthalten waren. Als Kontrolle wurde immer eine Verdünnungsreihe des untransformierten Ausgangsstammes RSY12 mit aufgetropft.

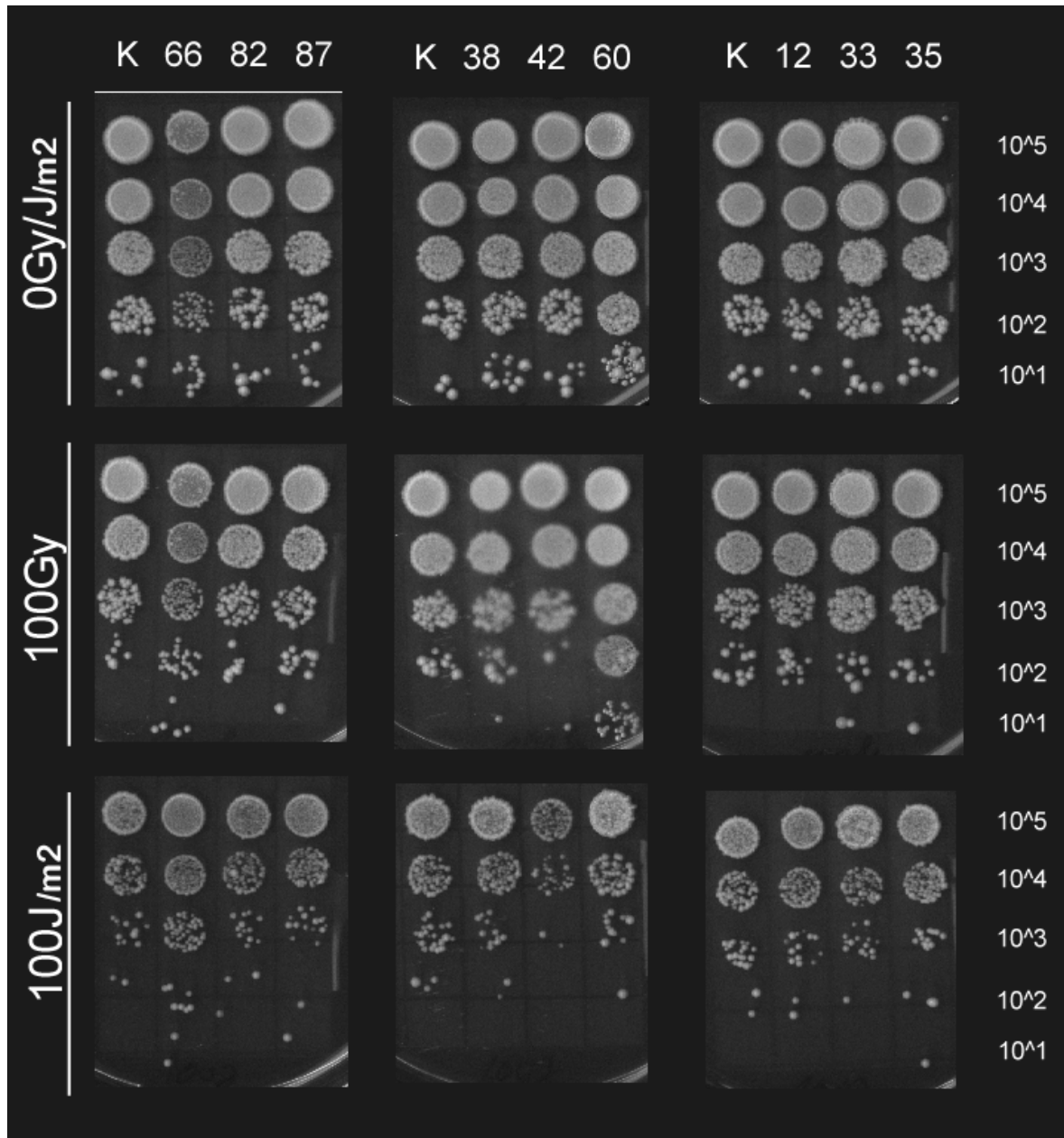


Abbildung 37: Fähigkeit der Transformanten zur Koloniebildung nach Bestrahlung. K symbolisiert den Kontrollstamm RSY12

Nach dem Auftropfen wurden die Petrischalen mit Dosen von 0Gy, 50Gy, 100Gy beziehungsweise  $0\text{J/m}^2$ ,  $50\text{J/m}^2$  und  $100\text{J/m}^2$  bestrahlt und drei Tage bei  $30^\circ\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. Diese Methode liefert eine halbquantitative Aussage über die Fähigkeit zur Koloniebildung der verschiedenen Stämme. Die Ergebnisse sind in [Abbildung 37](#) dargestellt und werden bei der Beschreibung der einzelnen Transformanten genauer diskutiert.

Im Vergleich zur Kontrolle zeigte lediglich Klon #42 (*ubc13*) eine erhöhte Sensibilität, die vor allem nach UV-Bestrahlung deutlich wird. Alle anderen Transformanten zeigen keine erhöhte Sensibilität. Da nicht ausgeschlossen werden kann, daß das Fusionsprotein zumindest partiell noch die Funktion des Wildtypgens erfüllen kann, kann eine Beeinträchtigung der Strahlenresistenz im Fall einer vollständigen Deletion des Gens nicht absolut ausgeschlossen werden. Da in Fällen, bei denen aufgrund von Mutationen ein verkürztes Protein gebildet werden kann (z.B. *rad5-7*) (Drexler, 1998), oft ein intermediärer Phänotyp beobachtet wird, ist diese Möglichkeit aber eher unwahrscheinlich.

#### **3.4.7.2 WACHSTUM UND MORPHOLOGISCHE BESONDERHEITEN DER TRANSFORMANTEN**

Zur Kontrolle, ob Transformanten eine Beeinträchtigung im Wachstum aufgrund der Insertion der Kasette aufweisen, wurde das Wachstum mikroskopisch analysiert. Berücksichtigt wurden hier neben der Zelldichte der Anteil und die Größe von Knospen sowie weitere morphologische Auffälligkeiten wie Kettenbildung oder Verklumpung der Zellen. Nur Klon #66 (*bud4*) zeigte hierbei eine Auffälligkeit gegenüber dem zur Kontrolle untersuchten Wildtyp. Das Wachstum dieses Stammes ist gegenüber dem des Wildtyps gestört. Nach Animpfen mit einer stationären Kultur zeigte dieser Stamm eine deutlich stärkere Verzögerung bis zum Eintritt in die logarithmische Wachstumsphase als der WT. Die Zelldichte bei #66 war fünf Stunden nach dem Animpfen mit  $5,3 \times 10^5$  Zellen/ml nahezu unverändert gegenüber dem Ausgangswert von  $4,9 \times 10^5$  Zellen/ml wohingegen sich die Zelldichte beim WT mit  $1,11 \times 10^6$  Zellen/ml gegenüber  $6 \times 10^5$  Zellen zu Beginn der Messung nahezu verdoppelt hatte. Auffällig ist weiterhin die deutlich niedrigere Zelldichte einer stationären Kultur bei dieser Transformante. So blieb die Zellzahl mit  $7,2 \times 10^7$  Zellen/ml am dritten Tag nahezu unverändert gegenüber der Zelldichte von  $6,6 \times 10^7$  Zellen/ml am zweiten Tag, was das Erreichen der stationären Phase signalisiert. Der Wildtyp erreicht diese Plateauphase erst bei einer Konzentration von  $2 \times 10^8$  Zellen.

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

#### 3.4.7.3 TEMPERATURSENSITIVITÄT DER TRANSFORMANTEN

Von verschiedenen Mutantenstämmen in der Hefe sind Wachstumsdefekte bei erhöhter oder verringerter Inkubationstemperatur beschrieben (z.B. [Feldmann H, 1993 #119]). Zur Klärung, ob die Insertionsmutagenese durch MKM20 in den hier untersuchten Transformanten einen Einfluss auf das Wachstum bei veränderten Temperaturen hat, wurde ein Tropftest durchgeführt. Neben einer unbestrahlten Versuchsreihe wurde auch getestet, ob eine veränderte Temperatur nach Behandlung mit UV-C bzw.  $\gamma$ -Strahlung eine veränderte Fähigkeit zur Koloniebildung im Vergleich zum Wildtyp verursacht. Die Platten wurden 48-72 Stunden bei Temperaturen von 20°C, 30°C beziehungsweise 37°C im Brutschrank inkubiert.

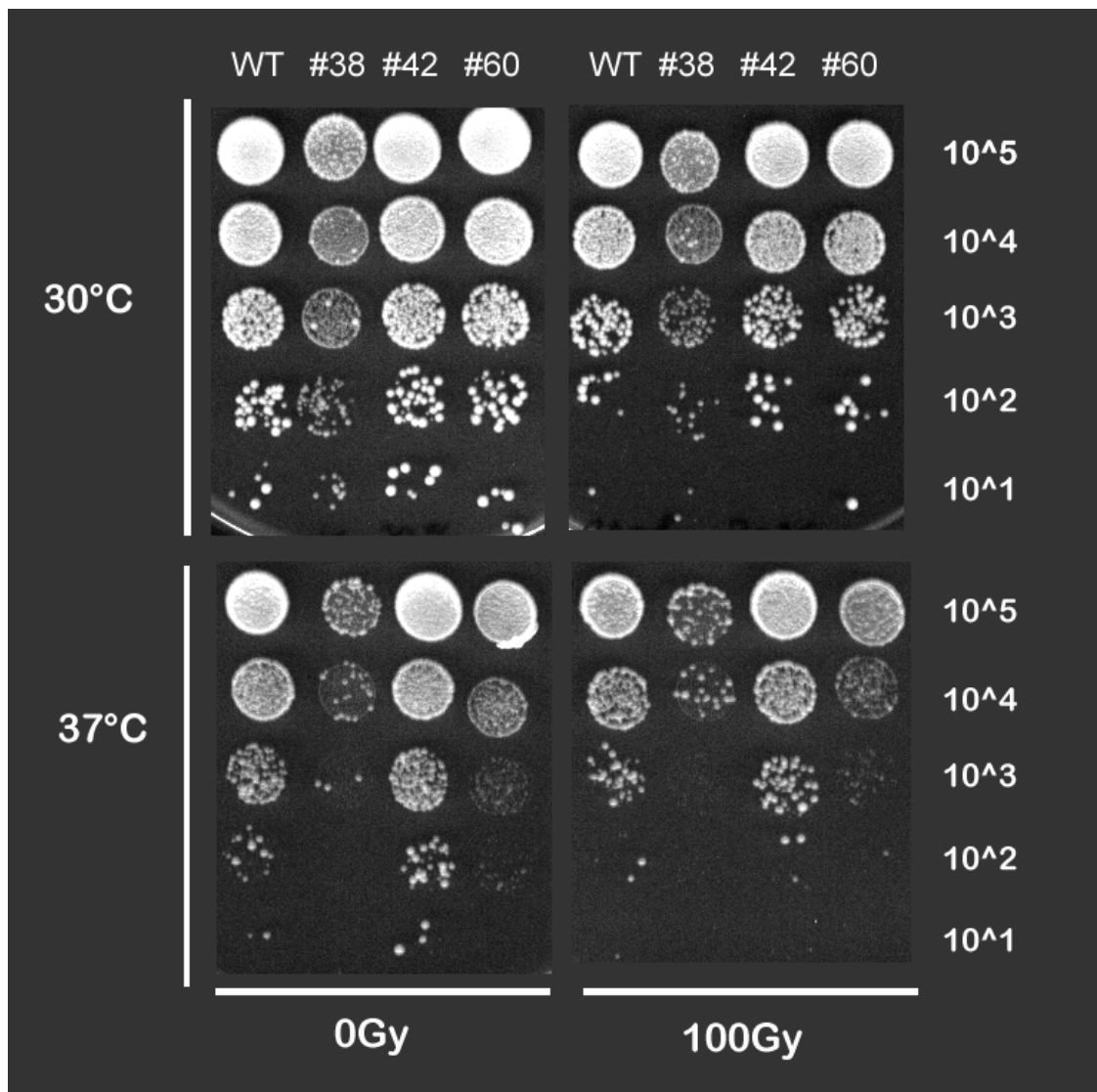


Abbildung 38: Temperaturabhängigkeit des Wachstums bei den Transformanten #38 und #60

Bis auf Transformante #38 (*sds24*) und #60 (*vab36*) zeigten alle anderen Transformanten im Vergleich zum Wildtyp ein unauffälliges Wachstumsverhalten. Sowohl bei Klon #38 als auch bei Klon #60 zeigte sich hingegen eine deutliche Beeinträchtigung des Wachstums bei erhöhter Temperatur (Abbildung 38). Dieser Effekt wurde gleichermaßen bei unbestrahlter Kontrolle als auch bei den bestrahlten Kolonien beobachtet.

Um die Resultate aus den phänotypischen Charakterisierungen und Expressionsmessungen mit den Ergebnissen der Sequenzierung übersichtlich darzustellen, sind im folgenden die Transformanten einzeln hinsichtlich ihres Phäno- und Genotyps besprochen.

### **3.4.8 DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER TRANSFORMANTEN**

#### **3.4.8.1 TRANSFORMANTE #01 - 2 $\mu$ PLASMID**

In Transformante #1 sind beide Enden von MKM20 mit Sequenzen verknüpft, die von endogenen 2 $\mu$ -Plasmiden der Hefe stammen. Eine solche Verknüpfung zwischen transformierter DNA und extrachromosomalen, replizierbaren Sequenzen wurde schon früher beobachtet (Schiestl and Petes, 1991). Beobachtete Expressionsunterschiede im halbquantitativen Test sind offenbar auf unterschiedliche Kopienzahl nach Wegfall des Selektionsdrucks zurückzuführen und wurden nicht weiter untersucht.

#### **3.4.8.2 TRANSFORMANTE #12 - *APG1***

In diesem Klon erfolgte die Integration in Chromosom VII bei Position 162661. Das an dieser Position in der veröffentlichten Sequenz befindliche Nukleotid Adenosin konnte bei der Sequenzierung nicht nachgewiesen werden und ist vermutlich im Zuge der Integration der Kasette deletiert worden. Der aus dem *Bgl*II-Verdau resultierende einzelsträngige GATC-Überhang von MKM20 ist bei der Integration auf beiden Seiten zu einer doppelsträngigen Sequenz aufgefüllt worden. Der Integrationsort entspricht dem C-Terminus des Gens *APG1*, das für eine Proteinkinase kodiert. Dieses Gen wird neben seiner Funktion in der Selbstauflösung für die Derepression einiger Streß-induzierter Gene wie *UBI4* benötigt. Die Analyse der Expression nach UV-Bestrahlung ergab eine leichte Induktion (ca. 1,5-fach) des Fusionsproteins. Im Gegensatz hierzu wurde bei der Untersuchung mit *Microarrays* keine

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

---

Expressionsveränderung nach Behandlung mit der alkylierenden Chemikalie MMS nachgewiesen (Jelinsky and Samson, 1999). Trotz der vergleichsweise geringen Induzierbarkeit könnte dieses Gen eine Rolle bei der zellulären Antwort auf Strahlungsstress spielen. Bezüglich des Wachstums, der UV-,  $\gamma$ - und Temperatur-Sensitivität zeigte die Transformante keine Auffälligkeiten im Vergleich zum Wildtyp.

#### **3.4.8.3 TRANSFORMANTE #33 - *FIR1***

Hier erfolgte die Integration unter Deletion von fünf bis neun Nukleotiden im Bereich 216898-216907 auf Chromosom V. Eine genauere Angabe über die Anzahl der deletierten Nukleotide ist aufgrund einer beidseitigen Mikrohomologie von zwei Basen zwischen den einzelsträngigen Überhängen von MKM20 und der genomischen Sequenz des Integrationsortes nicht möglich. Die Integration erfolgte in den mittleren Bereich des Gens *FIR1*, das eine Funktion bei der RNA-Prozessierung bzw. Modifizierung besitzt. Aufgrund eines Proteasomen-assoziierten Kontrollelements im 5'-Bereich des Gens wird eine Regulation durch Rpn1p diskutiert. In der YPD-Datenbank wird für eine Nullmutante von *FIR1* ein verringertes Wachstum beschrieben, was in dieser Arbeit nicht gefunden wurde. Die Ursache hierfür könnte darin liegen, daß der Wachstumsdefekt erst bei einer vollständigen Deletion des Gens beobachtet wird oder daß dieser Phänotyp vom genetischen Stammhintergrund abhängig ist. Nach UV-Bestrahlung zeigte das Fusionsprotein eine leichte Repression bei einer insgesamt deutlichen Abnahme der Expression im Versuchszeitraum, was auf eine niedrigere Expressionsrate in nicht wachsenden Zellen hindeutet.

#### **3.4.8.4 TRANSFORMANTE #35 - *MRP8***

Im Fall von Transformante #35 erfolgte eine Degradierung des einzelsträngigen Überhangs von MKM20 um mindestens ein Nukleotid. Die Integration erfolgte bei Nukleotid 178782-178783 auf Chromosom XI. Ähnlich der Situation bei Klon #33 ist eine eindeutige Aussage über eine potentielle chromosomale Deletion von maximal zwei Nukleotiden aufgrund einer Mikrohomologie zwischen integriertem Plasmid und genomischer Sequenz nicht möglich. Das getroffene Gen ist *MRP8*, das für ein RNA-bindendes Protein kodiert, welches Bestandteil einer mitochondrialen ribosomalen Untereinheit ist. Bei einer relativ hohen Basalexpression (17 Miller Units) zeigte das Fusionsprotein eine etwas mehr als zweifache Induktion zwei Stunden nach UV-C-Bestrahlung, die bis zum Ende des Versuchs nach acht

Stunden anhielt. Die Induzierbarkeit dieses Gens könnte in Zusammenhang mit dem erhöhten Bedarf verschiedener Proteine (z.B. DNA-Reparaturproteine und Ersatz geschädigter Proteine) nach Schädigung durch Noxen stehen, wofür die Aktivierung der Proteinbiosynthese-Maschinerie, an der Mrp8p beteiligt ist, nötig wäre. Bezüglich der anderen untersuchten Phänotypen verhielt sich die Transformante unauffällig.

#### **3.4.8.5 TRANSFORMANTE #38 - *SDS24***

Die Integration erfolgte bei Position 651783 auf Chromosom II. Während der Einzelstrangüberhang auf der Seite des *URA3*-Primers (P1) vollständig aufgefüllt wurde, ist auf der Seite des *lacZ*-Primers (P2) mindestens ein Nukleotid des Überhangs entfernt worden. Integrationsort ist der mittlere Bereich des Gens *SDS24*, über dessen Funktion noch nichts bekannt ist. Sehr interessant ist aber der Umstand, daß eine Überproduktion des Genprodukts von *SDS24* in *E.coli* zur Einleitung der SOS-Reparatur führt. Für das Fusionsprotein konnte eine deutliche UV-Induktion (Faktor 2,5-3 gegenüber dem Nullwert) gezeigt werden. Ungewöhnlich ist ferner die leichte Zunahme der basalen Transkriptmenge der Kontrolle im Versuchszeitraum des Induktionsexperiments, was auf eine erhöhte Expression in nicht wachsenden Zellen hindeutet. Die Transformante #38 zeigte eine deutliche Sensitivität gegenüber dem WT im Wachstum bei 37°C, nicht aber bei 30°C. Dagegen konnte bei  $\gamma$ - und UV-Strahlung keine erhöhte Sensitivität festgestellt werden. Weitere Untersuchungen könnten Aufschluß darüber geben, ob und gegebenenfalls welche Rolle *SDS24*, über dessen Funktion bislang sehr wenig bekannt ist, in der Reparatur von UV-Schäden spielt.

#### **3.4.8.6 TRANSFORMANTE #42 - *UBC13***

Transformante #42 zeigte als einzige untersuchte Transformante die chromosomale Duplikation eines Nukleotids. Bei der Integration von MKM20 wurde hier am Integrationsort das Thymin-Nukleotid an Position 629955 auf Chromosom IV dupliziert. Beide einzelsträngigen Überhänge des Plasmids MKM20 wurden im Zuge der Integration vollständig aufgefüllt. Das Gen, in dessen 5'-Bereich die Integration erfolgte, ist *UBC13*, dessen Genprodukt als Protein-Konjugations-Faktor bei der Ubiquitinierung mitwirkt. Das Protein Ubc13p ist ein DNA-Reparaturprotein mit Funktion in der sogenannten postreplikativen Reparatur, für das eine Protein-Interaktion mit Mms2p gezeigt worden ist [Brusky J, 2000 #120]. Für die Nullmutante ist eine erhöhte UV-Sensitivität beschrieben



### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

---

worden, die hier auch für die Transformante #42 gezeigt werden konnte (Kap.3.4.7.1). Die Transformante zeigte lediglich eine verringerte Abnahme der *lacZ*-Expression nach UV-Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle, wohingegen die Induktion von *UBC13* nach MMS-Behandlung mit Faktor 6,2 sehr viel deutlicher ausfällt (Jelinsky and Samson, 1999). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Zellen bei der Untersuchung mittels *Microarrays* nach der Behandlung in Vollmedium inkubiert wurden und somit weiter wachsen konnten.

#### **3.4.8.7 TRANSFORMANTE #60 - *VAB36***

Die Auswertung der Sequenzierung bei dieser Transformante zeigte, daß die beiden genomischen Bereiche, die an den Insertionsstellen des Plasmids MKM20 liegen, aus unterschiedlichen Regionen des Chromosom VIII stammen. Dies deutet auf eine größere Aberration hin. So zeigte die Sequenz, die mit Primer 1 (aus dem Promotorbereich des *URA3*-Gens) ermittelt wurde, eine Insertion bei Position 374794, wohingegen die Sequenz, die mit Primer 2 (aus dem *lacZ*-Gen heraus) erhalten wurde, eine Integration bei Nukleotid 491212 anzeigt. Offensichtlich erfolgte hier eine Substitution des 116kb langen chromosomalen Bereichs durch die Genkassette. Ob das fehlende Chromosomenfragment auf ein anderes Chromosom transloziert wurde oder ob es sich um eine Deletion dieser Region handelt, kann aus den Ergebnissen der Sequenzierung nicht gefolgert werden. Da bei der Expressionsmessung die Aktivität des *lacZ*-Fusionsproteins gemessen wurde, ist der chromosomale Bereich, der in 5'-Richtung vom *lacZ*-Gen liegt, für die Zuordnung ausschlaggebend. Dieser Integrationspunkt (Nukleotid 491212) liegt im Gen *VAB36*, dessen biochemische und zelluläre Funktion unbekannt ist. In der Promotorregion dieses Gens wurden aber zwei *stress response elements* (SRE) entdeckt, die eine transkriptionelle Aktivierung in zellulären Stresssituationen möglich erscheinen lassen. Tatsächlich zeigte Transformante #60 eine dreifache Induktion des Fusionsproteins bereits eine Stunde nach Bestrahlung mit UV-C-Licht. Ob der beobachtete Wachstumsdefekt bei 37°C auf die gestörte Funktion des nativen *VAB36*-Gens zurückzuführen ist oder aber mit der in diesem Zusammenhang beobachteten Aberration in Zusammenhang steht, kann hier nicht geklärt werden. Gegenüber  $\gamma$ - und UV-Strahlung konnte keine erhöhte Sensitivität festgestellt werden.

#### **3.4.8.8 TRANSFORMANTE #66 - *BUD4***

Transformante #66 ist der einzige Fall, bei dem durch die Sequenzierung eine mit mindestens 16 bp deutliche Degradierung des integrierten Plasmids festgestellt werden konnte. Das andere Ende des linearisierten Plasmids ist lediglich im einzelsträngigen Überhang um ein oder zwei Nukleotide verkürzt, wobei wiederum aufgrund von Mikrohomologien zwischen Plasmid und genomischer Sequenz auf beiden Seiten keine ganz exakte Aussage möglich ist. Ferner fehlt ein 13-17 Nukleotide langes chromosomales Fragment am Integrationsort im Vergleich zum Wildtyp. Offensichtlich fand hier bei der Integration eine vorausgehende Prozessierung sowohl des Plasmids als auch des potentiellen DSB statt. Die Integration erfolgte im Bereich von Nukleotid 598784 bis 598801 auf Chromosom X. Das hier lokalisierte Gen ist *BUD4*, das eine Funktion bei der Vermehrung durch Knospung besitzt. Für dieses Gen wurde bereits eine zellzyklus-abhängige Expression gezeigt, die deutliche Abnahme der lacZ-Expression im Versuchszeitraum der Induktionsmessung deutet ferner auf eine verminderte Transkription in stationären Zellen hin. Die gemessene schwache Reprimierung dieses Gens könnte daher auch durch einen beschleunigten Wachstumstopp in den bestrahlten Zellen hervorgerufen sein.

#### **3.4.8.9 TRANSFORMANTE #82 - *YBR052C***

Eine Mikrohomologie von 3bp zwischen genomischem Integrationsort und Plasmidsequenz ermöglicht auch bei dieser Transformante keine basengenaue Bestimmung der Insertionsstelle. Der Bereich erstreckt sich von Nukleotid 339121 bis 339123 in Chromosom II. An dieser Stelle ist auf dem Chromosom der offene Leserahmen *YBR052C* lokalisiert, der für ein Protein unbekannter Funktion mit Homologie zu *Ycp4p* und dem „trp-repressor-binding- protein“ aus *E.coli* kodiert. Besonders interessant war daher die Feststellung, daß das Fusionsprotein eine sehr schnelle (Höhepunkt der Induktion bereits eine Stunde nach Bestrahlung) und mit Faktor neun sehr starke Induktion nach UV-Bestrahlung zeigt. Eine nähere Charakterisierung dieses Gens, über dessen Funktion nahezu nichts bekannt ist, erscheint daher sehr interessant.

#### **3.4.8.10 TRANSFORMANTE #87**

In dieser Transformante konnte lediglich die P1-Seite sequenziert werden. Daher ist eine Zuordnung des gefundenen Expressionsprofils zu dem offenen Leserahmen *YDR479C* nur

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

---

eingeschränkt möglich, da eine Aberration nicht ausgeschlossen werden kann. Interessant ist aber, daß für YDR479C im Promotorbereich 2 Motive gefunden wurden, die mit Streßantwort in Verbindung gebracht werden und bereits bei Transformante #60 (*VAB36*) gefunden wurden.

#### **3.4.8.11 TRANSFORMANTE #93**

Auch in diesem Fall konnte lediglich die P1-Seite sequenziert werden. Da im quantitativen Experiment zudem keine transkriptionelle Veränderung mehr gegenüber der unbestrahlten Kontrolle gefunden wurde, wird hier auf eine nähere Charakterisierung verzichtet.

### **3.5 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DES *GENE TRAP*-VERFAHRENS**

Das in dieser Arbeit durchgeführte *Gene trap*-Experiment führte nach Untersuchung von ca. 2000 Transformanten zur Identifizierung von neun Klonen, in denen das Fusionsprotein eine mehr oder minder deutliche Veränderung der Expression nach UV-C-Bestrahlung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle zeigte. Bei fünf dieser Klone (#12, 35, 38, 60, 82) war nach Bestrahlung eine deutliche (Faktor 1,5-9) Zunahme der lacZ-Aktivität gegenüber dem 0h-Zeitwert feststellbar, so daß eindeutig von Induktion gesprochen werden kann. Die übrigen Klone zeigten lediglich eine verminderte (#42, 87, 33) bzw. verstärkte (#66) Abnahme der lacZ-Aktivität gegenüber zum gleichen Zeitpunkt genommenen Kontrollwerten aus unbestrahlten Proben. Inwieweit hier von Induktion (bzw. Repression) gesprochen werden kann, bleibt unklar, solange die jeweils expressionsregulierenden Faktoren (insbesondere der Einfluss von Zellzykluskontrolle und Wachstumsstop) nicht bekannt sind. In jedem Fall zeigen diese Ergebnisse, daß die Erstellung einer Expressionskinetik einer bloßen Gegenüberstellung der Expression in bestrahlten und unbestrahlten Proben zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Bestrahlung vorzuziehen ist. Interessanterweise war unter den hier identifizierten Genen keines, das bisher als UV-induzierbar beschrieben wurde; bei einigen (siehe Tabelle 7) wurde jedoch zumindest nach Anwendung der *Microarray*-Technik, eine erhöhte mRNA-Menge nach Behandlung mit MMS beschrieben (Jelinsky and Samson, 1999).

Mit Ausnahme von *UBC13* wurde keines der hier identifizierten Gene bislang in direkten Zusammenhang mit DNA-Reparatur gebracht. Inwieweit die Induzierbarkeit dieser Gene nach UV-Bestrahlung einen Zusammenhang mit einer möglichen Beteiligung bei der DNA-Reparatur besitzt, wird die weitere funktionelle Untersuchung dieser Gene zeigen. Lediglich bei der Integration in das *UBC13*-Gen konnte ein negativer Effekt auf das Überleben der Transformante nach UV-Bestrahlung gezeigt werden, was vermuten lässt, daß die anderen untersuchten Gene zumindest keine zentrale Rolle in der Reparatur von UV-Schäden spielen. Gerade aber die nähere Untersuchung des *SDS24*-Gens, für das bei Überexpression in *E.coli* ein Effekt auf die Einleitung der SOS-Reparatur gezeigt wurde, erscheint neben der ausführlicheren Charakterisierung des offenen Leserahmens YBR052C, für den eine sehr schnelle und starke Induzierbarkeit bei niedriger Basalexpression gezeigt wurde, als interessant.

Neben der Identifizierung von Genen, deren Expression nach UV-Bestrahlung verändert ist, erbrachte das *Gene trap*-Experiment auch Informationen zur  $\gamma$ -Strahlenvermittelten NHI. In zehn Fällen erfolgte die Integration ausschließlich in offene Leserahmen der Hefezellen, wobei in drei Fällen (#12, #33, #66) nachweislich Nukleotide chromosomalen Ursprungs der Länge zwischen ein und dreizehn Basenpaaren am Integrationsort bei der Sequenzierung fehlten und vermutlich im Prozess der Integration abgebaut wurden. In drei weiteren Fällen (#35, #38 und #82) ist aufgrund von Mikrohomologien zwischen Integrationslokus und Einzelstrangüberhang des Vektors keine Aussage darüber möglich, ob es hier ebenfalls zu einer kleinen chromosomalen Deletion gekommen ist. Hier könnte auch die Degradierung der einzelsträngigen Überhänge zur beobachteten Sequenz geführt haben. Insgesamt gesehen wurde das integrierte Plasmid nur geringfügig prozessiert und in den meisten Fällen wurde der aus dem *Bgl*III-Verdau resultierende einzelsträngige Überhang durch Auffüllmechanismen zu einer doppelsträngigen Sequenz rekonstituiert. So beschränken sich die Deletionen des Plasmids mit Ausnahme von #66 ausschließlich auf die endständigen Nukleotide dieses Überhangs. Bei #66 wurde hingegen auf der Seite des *URA3*-Primers auch doppelsträngige DNA degradiert; insgesamt 16 Nukleotide fehlen bei der Sequenz des reisolierten Plasmids im Vergleich zum Ausgangsplasmid.

In einem Fall (#60) gibt es Indizien für eine größere genomische Aberration. So stammen die Sequenzen, die das integrierte Plasmid flankieren, aus chromosomalen Regionen, die in der

### 3. Etablierung eines *Gene trap* Verfahrens in Hefe

---

Datenbanksequenz ca. 116 kb voneinander entfernt liegen. Da  $\gamma$ -Strahlung eine Erhöhung der Aberrationsrate bewirkt (Friedl, et al., 1998), könnte die  $\gamma$ -Strahlenvermittelte NHI häufiger von genomischen Veränderungen begleitet sein als dies bei der spontanen Integration der Fall ist. Unter Umständen könnten solche Rearrangements auch einen Einfluss auf die gemessene Aktivität des Fusionsproteins haben. Insbesondere aber sind Veränderungen des Phänotyps bei diesen Transformanten nur bedingt aussagekräftig, da diese Unterschiede im Vergleich zum WT auch durch die Aberration verursacht sein können.

Da das Verfahren des *Gene trapping* insgesamt betrachtet zwar Vorteile besitzt, eine vollständige Untersuchung aller Gene aber sehr aufwendig ist, wurde ein weiteres *Screening*-Verfahren erprobt, das die gleichzeitige Expressionsanalyse sehr vieler Gene erlaubt und im folgenden Kapitel beschrieben wird.

## 4 EINSATZ VON *MICROARRAYS* ZUR IDENTIFIZIERUNG STRAHLENINDUZIERBARER GENE

### 4.1 WAS SIND *MICROARRAYS*?

Die Technik der Expressionsmessung mit *Microarrays* stellt ein sehr neues Verfahren dar. (Übersicht bei (Lander, 1999)). Möglich wurde diese Untersuchungsmethode vor allem durch zwei Faktoren. Der Einsatz von Pipettierrobotern ermöglichte das Auftropfen sehr kleiner Probevolumina auf einer vergleichsweise kleinen Fläche. So ist es technisch mittlerweile möglich, mehr als zehntausend unterschiedliche Proben mit einem jeweiligen Volumen im Nanoliterbereich auf der Fläche eines Objektträgers unterzubringen. Der zweite Faktor, der die derzeitige Entwicklung ermöglichte, beruht auf der sprunghaft gestiegenen Kenntnis von kodierenden DNA-Sequenzen. So ist seit mehreren Jahren das gesamte Genom der Hefe *S. cerevisiae* sequenziert und es konnten bei diesem Projekt über 6000 offene Leserahmen identifiziert werden (Mewes, et al., 1997). Mittels PCR-Amplifikation ist damit die künstliche Synthese aller potentiellen Hefegene durch Wahl geeigneter Primer möglich. Zwar ist die Entschlüsselung des menschlichen Genoms noch nicht völlig abgeschlossen, doch ist mittlerweile auch für Säugerzellen ein Großteil der Gene über cDNA-Banken zugänglich, um spezifische Sonden zu produzieren.

Durch die Technik der *Microarray*-Hybridisierung wird im Vergleich zu konventionellen Northern-Analysen eine Untersuchung der Expressionsmuster sehr vieler Gene parallel möglich. Bei Northern-Analysen wird die gesamte RNA der Zellen gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Anschließend wird die Membran mit einer spezifischen, meist radioaktiv markierten Probe eines bestimmten Gens hybridisiert. Daher ist pro Hybridisierung lediglich die Expressionsmessung eines Gens möglich. Durch Entfernen der Probe (Strippen) kann zwar die Membran mehrfach verwendet werden, mehr als ca. fünf Hybridisierungen sind aber selbst unter optimalen Konditionen kaum realisierbar. Bei *Microarray*-Hybridisierungen kommt es quasi zu einer Vertauschung von fixierter und mobiler Phase im Vergleich zu Northern-Analysen. Hierbei wird die isolierte Gesamt-RNA in Form von revers transkribierter

#### 4. Einsatz von Microarrays zur Identifizierung strahleninduzierbarer Gene

---

und markierter cDNA als Probe eingesetzt. Auf dem Objektträger sind mehrere hundert oder tausend DNA-Sequenzen, die für bekannte Gensequenzen spezifisch sind, in Form winziger Punkte aufgetropft und somit nach Fixierung immobilisiert. Daher kann die Expression aller aufgetragenen Gene in einem einzigen Experiment parallel untersucht werden.

Für die Herstellung der fixierten Gensonden existieren momentan zwei verschiedene Techniken (Lander, 1999). Bei der ersten Methode werden die kompletten Gene als PCR-Produkte oder Klone aufgebracht, während bei der von Affymetrix, Inc. entwickelten Technologie lediglich ca. 20bp lange Oligonukleotide der jeweiligen Gene verwendet werden. Dies erfordert allerdings die Verwendung von mehreren unterschiedlichen Oligonukleotiden pro Gen (Lipshutz, et al., 1999). Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren basierte auf der Verwendung von PCR-Amplifikaten der Hefegene (Shalon, et al., 1996). Durch die Kenntnis des Hefegenoms konnten zu allen potentiellen Genen Primer konstruiert werden. Mit 6218 Primerpaaren aus dem jeweiligen C- und N-Terminus der kodierenden Bereiche wurden alle offenen Leserahmen von Hefe amplifiziert. Die Spezifität der Amplifizierung wurde in Agarosegelen kontrolliert. Nach Aufreinigung und Denaturierung wurden diese Proben maschinell aufgetropft und fixiert. Die Herstellung der Arrays erfolgte durch unseren Kooperationspartner (*Microarray-Labor* des NIEHS, N.C., USA). Bedingt durch die Geometrie des *Spotters* waren die Genproben auf diesen Arrays in jeweils acht Quadranten verteilt. Jedes Hefegen ist somit auf dem Array in Form eines winzigen, aus amplifizierter DNA bestehenden Punktes repräsentiert.

Ein weiterer Vorteil der *Microarray*-Technologie neben der hohen Parallelität ist die Möglichkeit der kompetitiven Hybridisierung. Durch Verwendung von Glas als Trägermaterial für die Gensequenzen und die Markierung der RNA-Proben mit Fluoreszenzfarbstoffen können zwei cDNA-Proben gleichzeitig hybridisiert werden. Hierbei werden die beiden unterschiedlichen Proben mit verschiedenen Farbstoffen (meist Cy3 und Cy5) markiert. Diese markierten cDNA-Moleküle konkurrieren dann um die jeweiligen komplementären Bindestellen der fixierten Genproben auf dem Array.

Das eigentliche Experiment erfolgt folgendermaßen (siehe auch [Abbildung 39](#)): Eine Zellkultur wird geteilt und die eine Hälfte mit dem Agens, dessen Wirkung auf die Expression untersucht werden soll, behandelt. Die restlichen Zellen verbleiben als unbehandelte

Kontrolle. Es folgt eine Inkubationsphase, die es den behandelten Zellen ermöglicht, durch Expressionsveränderungen auf das Agens zu reagieren. Danach wird eine Gesamt-RNA-Isolierung sowohl aus den behandelten als auch den unbehandelten Zellen durchgeführt.

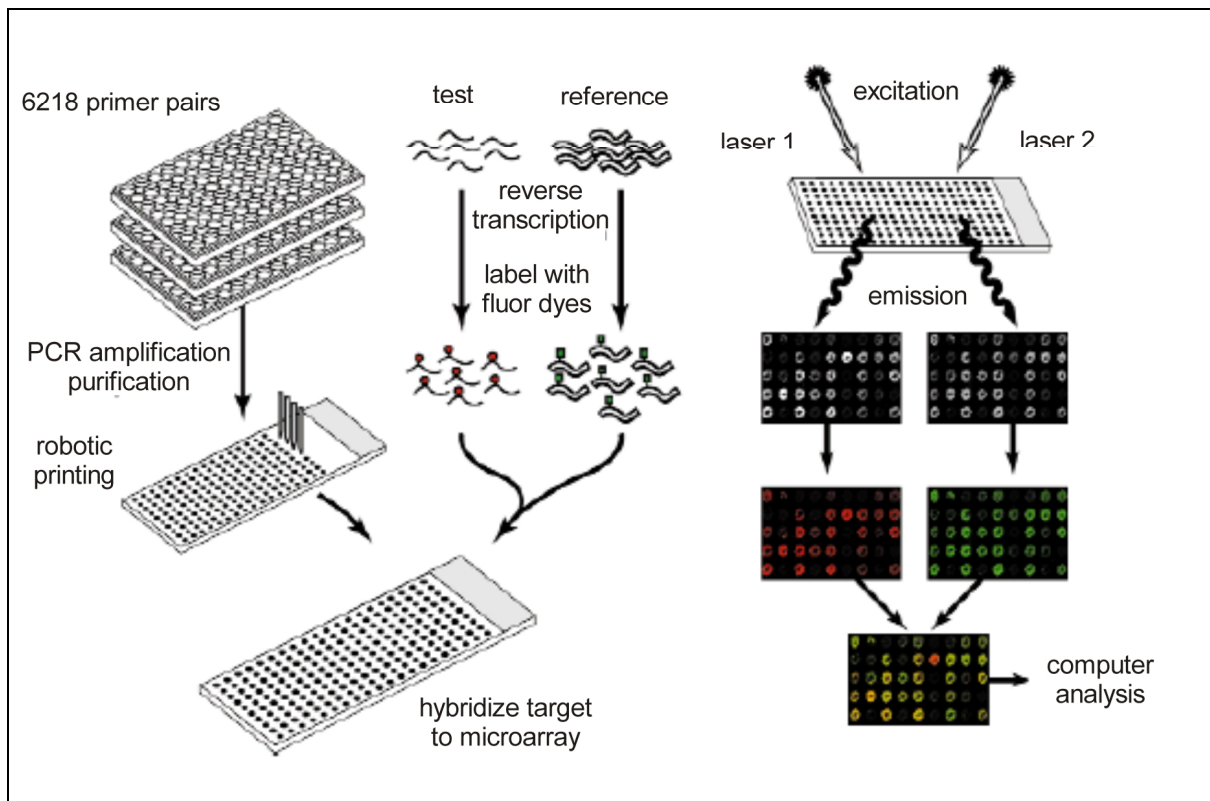


Abbildung 39: Schema der Microarray-Technik zur kompetitiven Expressionsmessung (nach (Duggan, et al., 1999), verändert)

Zusätzlich wird im Anschluß daran die mRNA von den anderen Ribonukleinsäuren abgetrennt. Die zwei mRNA Proben werden revers transkribiert und in diesem Schritt die Fluoreszenzfarbstoffe in die entstehende cDNA eingebaut. Da sowohl die reverse Transkription als auch die Fluoreszenzmarkierung in behandelter Probe und Kontrolle gleich effizient ablaufen, ist im Fall eines induzierten Gens mehr markierte cDNA dieses Gens in der bestrahlten Probe als in der Kontrolle vorhanden. Folglich binden bei der anschließenden Hybridisierung mehr mit dem für die behandelte Probe spezifischen Farbstoff markierte cDNA-Moleküle an die komplementäre Sequenz auf dem Array. Nach erfolgter Hybridisierung wird der *Microarray* zweimal durch Laser mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen „abgetastet“. Die spezifische Anregung der Farbstoffe führt zur Emission von Licht leicht versetzter Wellenlänge. Das emittierte Licht wird über „Photomultiplier“ (PMTs) registriert und quantifiziert. Somit werden für jede Genprobe auf



## 4. Einsatz von Microarrays zur Identifizierung strahleninduzierbarer Gene

dem Array zwei Signale gemessen, die nach Kalibrierung der Anzahl der cDNA-Moleküle des jeweiligen Gens in behandelter und unbehandelter Probe entsprechen. Diese Signale werden dann in Form von Falschfarben dargestellt, so daß Orte auf dem Array mit erhöhter Menge der jeweiligen cDNA in der behandelten Probe rot, Orte mit verringerter cDNA-Menge grün dargestellt werden. Die Zuordnung dieser Farben ist in der Auswertungssoftware frei wählbar, im Rahmen dieser Arbeit wurde die Darstellung jedoch stets so gewählt, daß induzierte Gene durch rote Punkte, reprimierte Gene durch grüne Punkte erkennbar sind. Eine Mischfarbe von gelb bis bräunlich signalisiert eine nahezu unveränderte Expression des jeweiligen Gens in behandelter Probe und Kontrolle. Neben dieser grafischen Darstellung erfolgt eine automatisierte Zuordnung der einzelnen Punkte zu den entsprechenden Genbezeichnungen und die numerische Ausgabe der Induktionsfaktoren in Form von Quotienten der bereinigten Intensitäten.

### **4.2 EINSATZ DER *MICROARRAY*-TECHNIK ZUM VERGLEICH DES EXPRESSIONSPROFILS NACH VERSCHIEDENARTIGER BESTRAHLUNG**

Der Einfluss verschiedener Strahlenarten auf das Expressionsmuster des gesamten Hefegenoms sollte untersucht werden. Neben UV-C- und  $\gamma$ -Strahlung, die hier an der GSF verfügbar waren, wurden in Kooperation mit P. Quicken im Tandem Beschleuniger der LMU München in Garching Protonen und die zu den schweren Ionen zählenden  $C^{6+}$ -Kerne erzeugt und damit logarithmisch wachsende Hefezellen bestrahlt.

#### **4.2.1 ERMITTLUNG ÄQUITOXISCHER DOSEN BEI VERSCHIEDENEN STRAHLEN-ARTEN**

Um die unterschiedlichen Strahlenarten vergleichen zu können, mußten in einem ersten Schritt die äquitoxischen Dosen ermittelt werden, das heißt, es wurde getestet, welche Dosis der jeweiligen Strahlenqualität ein Überleben von 35% aller Zellen bewirkt. Der Wert von 35 % Überleben wurde gewählt damit die Zellen nicht zu stark geschädigt werden und sie andererseits einem ausreichend hohen Streß ausgesetzt sind, der zur Aktivierung von schadensinduzierten Prozessen nötig ist. Eine 35 prozentige Überlebensrate im Stamm RSY12

korreliert mit einer Dosis von 50 Gy  $\gamma$ -Strahlung (Daten nicht gezeigt). Die Überlebensraten bei Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen von UV-C- und Protonenstrahlen sowie  $C^{6+}$ -Ionen sind in [Abbildung 40](#), [Abbildung 41](#) und [Abbildung 42](#) dargestellt. Die äquitoxischen Dosen zu 50 Gy  $\gamma$ -Strahlung lagen für UV-C bei  $84 \text{ J/m}^2$ , für Protonen bei ca. 56 Gy sowie ungefähr 96 Gy im Fall von  $C^{6+}$ . Diese Dosen wurden bei dem eigentlichen Bestrahlungsexperiment eingesetzt.

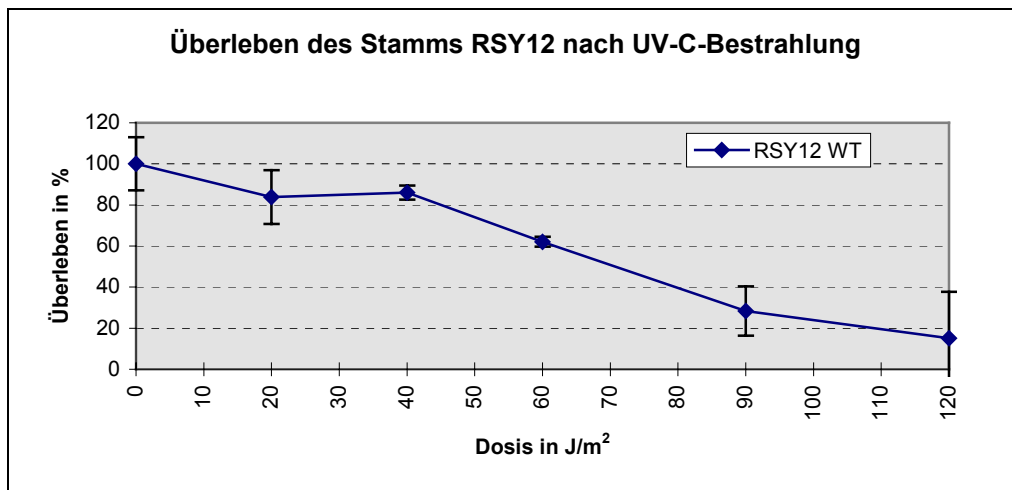


Abbildung 40: Überlebenskurve des Stammes RSY12 nach Bestrahlung mit verschiedenen UV-C-Dosen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Experimenten.

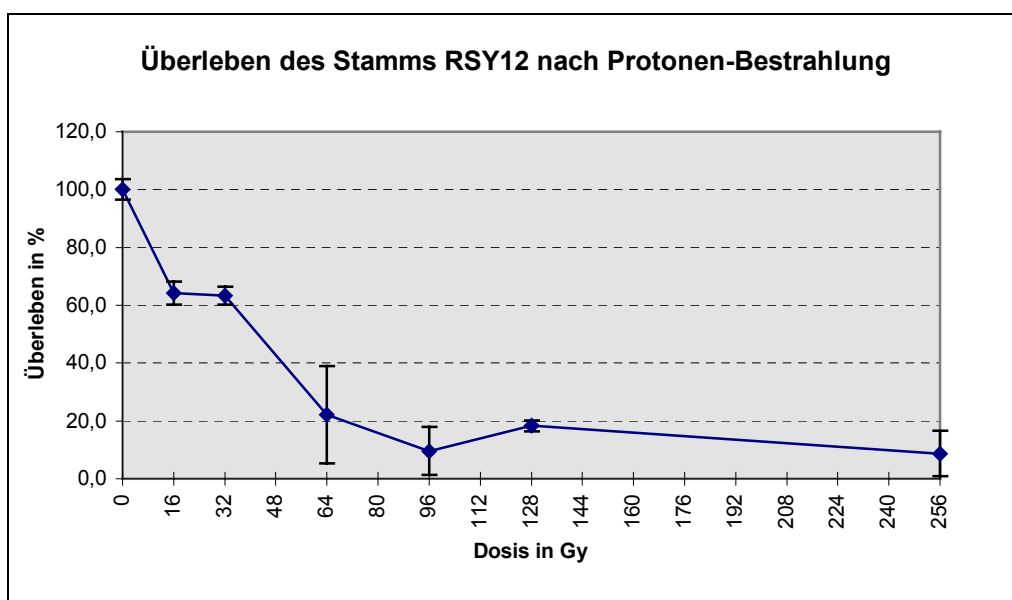


Abbildung 41: Überlebenskurve des Stammes RSY12 nach Protonen-Bestrahlung mit verschiedenen Dosen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Experimenten.

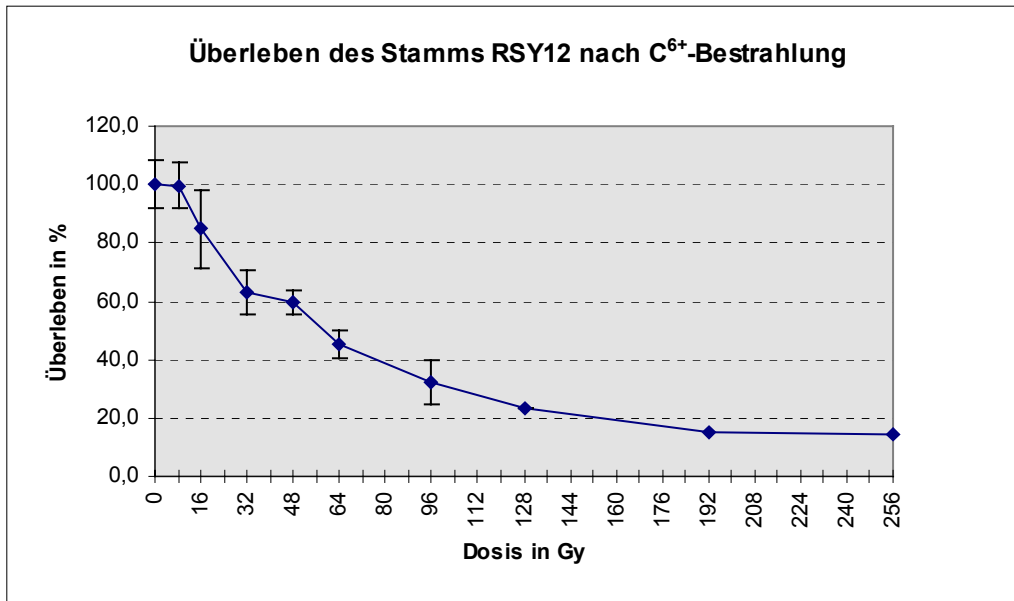


Abbildung 42: Überlebenskurve des Stammes RSY12 nach  $C^{6+}$ -Bestrahlung mit verschiedenen Dosen. Für Dosen bis 96 Gy sind die Mittelwerte aus zwei Experimenten dargestellt, bei höheren Dosen wurde nur ein Experiment durchgeführt.

### 4.3 VERGLEICH DER EXPRESSIONSPROFILE NACH VERSCHIEDEN-ARTIGER BESTRAHLUNG

Nach Durchführung der Bestrahlungen, wie oben beschrieben, wurde aus den Proben RNA isoliert (siehe Material und [Methoden](#)). Nachdem die Qualität der mRNA durch Northern-Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten *ACT1*-Sonde kontrolliert war, wurden die Proben bis zum Transport in die USA bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Der Transport der Proben erfolgte auf Trockeneis. Im *Microarray*-Labor des NIEHS erfolgte die reverse Transkription der mRNA-Proben bei gleichzeitiger Markierung der entstehenden cDNA-Moleküle, wie in Material und Methoden beschrieben. Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Objektträger *gescannt* und die Signale mittels spezieller Software den entsprechenden Leserahmen zugeordnet.

### 4.3.1 EXPRESSIONSPROFIL NACH MMS-BEHANDLUNG - EINE KONTROLLE

Neben den verschiedenartigen Bestrahlungen wurde als Kontrolle ein bereits publiziertes Experiment wiederholt (Jelinsky and Samson, 1999), das den Einfluss der alkylierenden Chemikalie Methyl-Methoxysulfonat (MMS) auf das Expressionsverhalten aller Hefegene untersuchte. Ein Vergleich der beiden Experimente sollte erste Rückschlüsse auf die Qualität der Hybridisierungen ermöglichen. Um vergleichbare Daten ermitteln zu können, wurde die Durchführung dieses Experiments nach den Bedingungen, die in der Veröffentlichung angegeben waren, durchgeführt. Dies bedingte eine Variation des von mir für die bestrahlten Proben verwendeten Protokolls. So erfolgte die Inkubation der Hefezellen nach Zugabe von MMS in Vollmedium für eine Stunde, während bei den Bestrahlungsexperimenten LHR-Puffer für die Inkubation verwendet wurde. Eine exakte Reproduktion des Experiments von Jelinsky und Samson war allerdings wegen der Verwendung unterschiedlicher Stämme und *Microarray*-Techniken (Jelinsky verwendete die Affymetrix - Oligonukleotid-Arrays) trotz der weitestgehenden Anpassung des Protokolls nicht möglich.

Die zehn in der ersten Hybridisierung am stärksten induzierten (im Sinne von RNA-Menge) Gene sind in Tabelle 8 dargestellt. Die zweite Spalte von rechts zeigt die Induktionsfaktoren der betreffenden Gene in einem Wiederholungsexperiment. Hierbei zeigt sich, daß nahezu alle Gene, die in der ersten Hybridisierung sehr stark induzierbar waren, auch in der zweiten Hybridisierung, bei der die gleiche mRNA als Ausgangsmaterial für die RT-Reaktion verwendet wurde, als stark induzierbar gefunden wurden. Die Werte in Klammern geben die Position in der Rangliste der am stärksten induzierbaren Gene bei dieser zweiten Hybridisierung an. Zwar weichen die Zahlenwerte der Induktionsfaktoren teilweise etwas voneinander ab, insgesamt ist aber eine gute Korrelation zwischen den beiden unabhängigen Experimenten festzustellen.

Die letzte Spalte von rechts stellt die Induktionsfaktoren dar, die für die jeweiligen Gene in der publizierten Arbeit von Jelinsky und Samson gefunden wurden. Fünf offene Leserahmen (YNL335W, YPL171C, YFL061W, YNR064C und YFL056C), die sich in meinen Experimenten als stark induzierbar herausstellten, wurden auch in der Publikation als mindestens 10-fach induziert gefunden. Für vier Leserahmen (YMR013C, YNL334C,

#### 4. Einsatz von Microarrays zur Identifizierung strahleninduzierbarer Gene

YFL060C und YNR063W) wurde allerdings in dem publizierten Experiment keine Induktion nachgewiesen. Die Identifikationsnummer eines Leserahmens (YCRX21C) konnte in dem Datensatz von Jelinsky nicht gefunden werden. Eventuell sind die gefundenen Unterschiede auf die Verwendung unterschiedlicher Hefestämme zurückzuführen oder durch die unterschiedlicher Array-Techniken bedingt.

Auffallend bei den sehr stark induzierten Genen ist der Umstand, daß in vielen Fällen ein auf dem gleichen Chromosom benachbarter Leserahmen ebenfalls zu den am stärksten induzierten Genen gehört. So handelt es sich bei YNL335W/YNL334C und YNR063W/YNR064C ebenso um direkt benachbarte Leserahmen wie bei YFL060C/YFL061W, wobei hier zusätzlich noch der nicht direkt benachbarte Leserahmen YFL056C sehr stark induzierbar war. Da bei dem automatisierten Auftropfen der Genproben bei der Herstellung der Arrays benachbarte Leserahmen in unterschiedlichen Sektoren des Objektträgers (siehe [Abbildung 43](#)) platziert werden, kann ein lokaler Hybridisierungseffekt als Ursache hierfür ausgeschlossen werden.

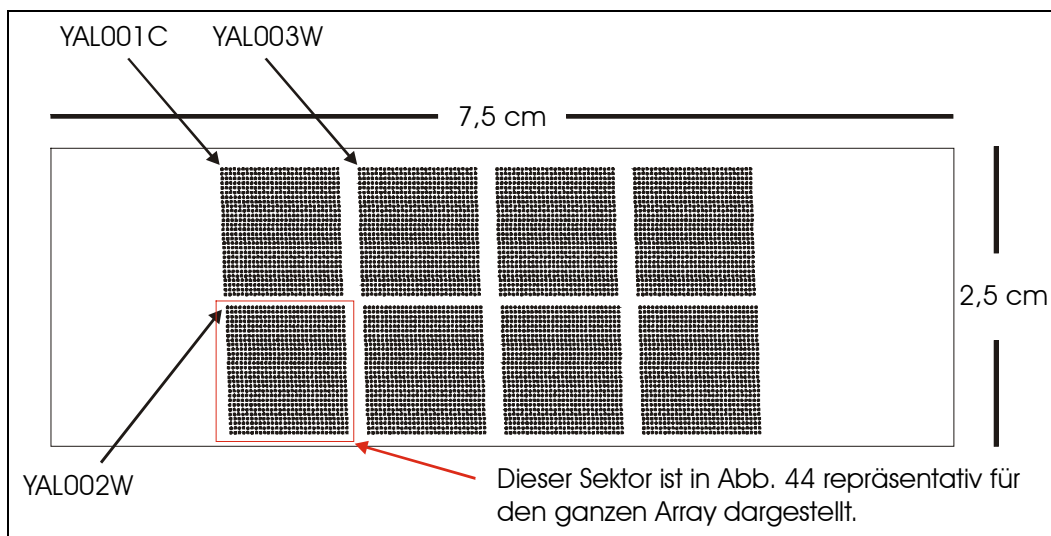


Abbildung 43: Skizze der verwendeten Microarrays, die zeigt, daß auf dem Chromosom benachbarte Leserahmen auf dem Array in unterschiedlichen Sektoren platziert sind. Der rot umrandete Bereich ist der in [Abbildung 44](#) gezeigte Sektor.

Nicht nur die räumliche Nähe, sondern auch die Sequenzhomologie ist auffällig. So wurde auf Aminosäureebene für YNL335W und YFL061W eine hundertprozentige Sequenzidentität beschrieben (<http://www.proteome.com/databases/YPD/blastsw/yeast/yeast/YNL335W.html>).

Auch für YNL334C (*SNO2*) und YFL060C (*SNO3*) ist die Sequenzhomologie mit 99% sehr groß (<http://www.proteome.com/databases/YPD/blasts/yeast/yeast/SNO2.html>).

	<i>Gen-Name</i>	<i>Gen-ID</i>	<i>Funktion (YPD)</i>	<i>Verhältn. 1.Hybr.</i>	<i>Verhältn. 2. Hybr.</i>	<i>„Jelinsky“ Ergebn.</i>
1		YNL335W	Ähnlichkeit zu M.verrucaria Cyanamidehydratase, identisch mit hypothetischem Protein YFL061W	68.5	79.7 (1)	10.3 ind
2	SEC59	YMR013C	Dolichol Kinase	51.1		Keine Veränd.
3	SNO2	YNL334C	Starke Ähnlichkeit zu Proteinen YFL060C und YMR095c	38.9	18.1 (7)	Keine Veränd.
4	OYE3	YPL171C	NAPDH dehydrogenase (old yellow enzyme), Isoform 3	36.3	42.7 (3)	10.3 ind.
5		YFL061W	identisch zu M.verrucaria Cyanamidhydratase	31.1	53.7 (2)	251 ind.
6		YNR064C	Ähnlichkeit zu R.capsulatus 1-Chlor-Alkanalidohydrolase	28.2	36.4 (5)	28.9 ind.
7	SNO3	YFL060C	Genfamilie, die durch stat. Phase induziert wird	17.5	14.9 (8)	Keine Veränd.
8		YNR063W	leichte Ähnlichkeit zu CYC1	16.1	12.2 (11)	Keine Veränd.
9		YCRX21C		12.3	11.5 (12)	Nicht analy.
10		YFL056C	starke Ähnlichkeit zu Arylalkohol Dehydrogenases	11.4	36.7 (4)	13.7 ind.

Tabelle 8: Dargestellt sind die am stärksten induzierten Gene eine Stunde nach 0,1% MMS-Behandlung bei Inkubation in Vollmedium (1.Exp.). Die zweite Spalte von rechts zeigt die Ergebnisse, die bei der zweiten Hybridisierung erzielt wurden. Die Werte in Klammern geben die entsprechende Reihenfolge der Induzierbarkeit in diesem Experiment an. Die 1.Spalte von rechts vergleicht die hier gefundenen Werte mit den publizierten Ergebnissen (Jelinsky and Samson, 1999). Farbiger unterlegt sind Gene, bei denen nächste Nachbarn auf dem Chromosom ebenfalls zu den zehn am stärksten induzierten Genen gehören.

## 4. Einsatz von Microarrays zur Identifizierung strahleninduzierbarer Gene

---

Tatsächlich zeigten alle vier Leserahmen eine derart starke Induktion nach MMS-Behandlung, daß sie in bei den zehn am stärksten induzierten Genen in [Tabelle 8](#) aufgeführt sind.

### **4.3.2 EINFLUSS DER GETESTETEN STRAHLENARTEN AUF DIE EXPRESSION VON HEFEGENEN**

Neben dem Induktionsexperiment mit MMS wurde der Einfluss verschiedener Strahlenarten auf das Expressionsprofil der Zellen untersucht. In [Abbildung 44](#) sind Ausschnitte von den eingesetzten *Microarrays* gezeigt, die repräsentativ für die gesamten Arrays waren. Es wurde hier jeweils nur einer der acht Quadranten pro Array gezeigt, um die Auswirkung mehrerer Strahlenarten in einer Abbildung gegenüberstellen zu können.

Überraschend ist der Befund, daß sämtliche (auch die nicht gezeigten  $C^{6+}$ -Ionen) ionisierende Strahlenarten lediglich eine sehr moderate Veränderung der Expression bewirkten. So zeigten die mit UV-C behandelten Proben eine deutlich stärkere Veränderung der Expression vieler Gene. Nochmals wesentlich stärker sind die Expressionsunterschiede bei Zellen nach Behandlung mit MMS.

Da sehr geringe Expressionsunterschiede grundsätzlich schwer nachweisbar sind und auch bei dieser Technik bislang nur Unterschiede von Faktor zwei (Lipshutz, et al., 1999) verlässlich nachgewiesen werden können, wurden in den nachfolgenden Tabellen nur Unterschiede von Faktor zwei und höher als signifikant betrachtet.



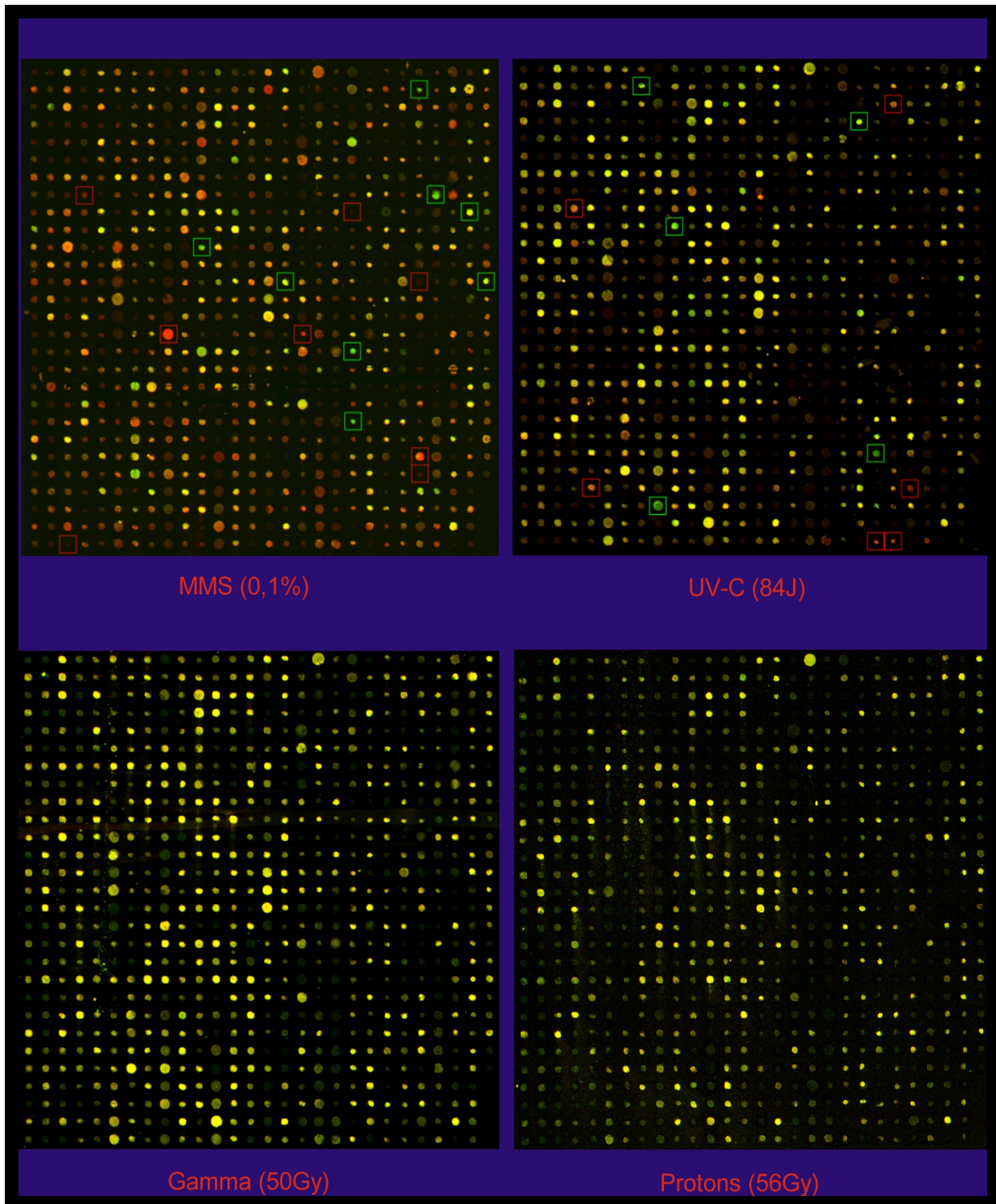


Abbildung 44: Vergleich der Expressionsprofile nach verschiedenartiger Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Rote Punkte signalisieren Gene mit erhöhter Expression, grüne Punkte mit verringerter Expression 2h nach der angegebenen Behandlung. Gene, die in behandelter und un behandelter Probe annähernd gleich stark exprimiert sind, erscheinen bei dieser Darstellung gelb bis bräunlich. Gezeigt ist lediglich ein Ausschnitt des Arrays, der ein Achtel des gesamten Genoms repräsentiert.



### 4.3.2.1 EINFLUSS VON UV-C-STRAHLUNG AUF DIE EXPRESSION

In [Tabelle 9](#) sind die Gene mit den stärksten Expressionsunterschieden nach UV-C-Bestrahlung dargestellt. Als Aufnahmekriterium wurde hier eine Erhöhung der RNA-Menge um mindestens Faktor drei bzw. eine Reduktion um mindestens Faktor vier gewählt, da die Darstellung ansonsten mehrere Seiten (mehr als 600 Gene!) umfassen würde.

Von den gefundenen Genen mit erhöhter Expression nach UV-Bestrahlung ist bislang lediglich für *RNR3* (Elledge, et al., 1993) und *RNR4* (Huang and Elledge, 1997) eine Induzierbarkeit durch UV-Strahlung gezeigt worden. *RNR3* wurde mit Faktor 9,47 als am stärksten induziertes Gen überhaupt gefunden, während die RNA-Menge von *RNR4* mit Faktor 3,66 deutlich weniger stark erhöht war.

Weiterhin wurden mit *RAD55* und *DUN1* zwei Gene mit erhöhter Expression gefunden, von denen eine Beteiligung bei der DNA-Reparatur bzw. der Signaltransduktion von DNA-Schäden bekannt ist. Die Bezeichnung *DUN* (von damage uninducible) ist hierbei irreführend, da sich die Bezeichnung auf die fehlende Induzierbarkeit des *RNR3*-Gens im *dun1*-Mutantenhintergrund bezieht.

Interessanterweise sind unter den identifizierten Genen mit der höchsten Zunahme der Transkriptmenge viele, deren Funktion bislang unbekannt ist. So finden sich mit YGR156W (7,84-fach erhöht), YNR051C (Faktor 5,12), YLL030C (Faktor 4,89) und YPR015C (Faktor 3,65) vier Leserahmen unter den zehn am stärksten induzierten Genen, für die bislang keinerlei Funktion gezeigt werden konnte. Für YPR015C wird eine strukturelle Ähnlichkeit mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren beschrieben, von denen die meisten Zinkfinger-Motive besitzen (<http://genome-www.stanford.edu/cgi-bin/SGD/genehunter>). Auch für YPR015C sind zwei Tandem C2H2-Zinkfinger-Motive gefunden worden (Bohm, et al., 1997). Momentan ist unklar, ob die beobachtete Induzierbarkeit von YPR015C und seine mögliche Rolle als Transkriptionsfaktor in einem Zusammenhang stehen, weitere Analysen dieses Leserahmens scheinen aber lohnenswert.

<b>84J/m<sup>2</sup> UV-C</b>	<b>Identifikations nummer</b>	<b>Genname (soweit bekannt)</b>	<b>Induktions faktor</b>	<b>Funktion des Genprodukts (nach YPD-Datenbank)</b>
1	YII 066C	<i>RNR3</i>	<b>9.47</b>	große IIF Ribonukleotidreduktase
1	YGR156W		<b>7.84</b>	Protein mit unbek. Funktion
1	YDR380W	<i>ARO10</i>	<b>5.44</b>	mögl. Indol 3-Pyruvat Decarboxylase
1	YNR051C		<b>5.12</b>	leichte Homologie zum Huhn-Nukleolin
1	YLL030C		<b>4.89</b>	Hypoth. Protein
1	YCLX09W		<b>4.24</b>	unbekannt
1	YDR501W	<i>PLM2</i>	<b>4.06</b>	Protein nötig für Plasmid-Erhaltung
1	YDL101C	<i>DUN1</i>	<b>3.70</b>	Protein Kinase
1	YGR180C	<i>RNR4</i>	<b>3.66</b>	kleine UE Ribonukleotidreduktase
1	YPR015C		<b>3.65</b>	Ähnlichkeit zu Transkriptionsfaktoren
1	YLR167W	<i>RPS31 (UBI3)</i>	<b>3.59</b>	Fusions-Prot. aus ribos. Prot. S31 und Ubiquitin
1	YNL155W		<b>3.53</b>	Prot. unbekannter Funktion
1	YHR089C	<i>GAR1</i>	<b>3.53</b>	Prot. beteiligt in Prozessier. der 35S rRNA
1	YAR040C		<b>3.51</b>	unbekannt
1	YOL120C	<i>RPL18A</i>	<b>3.41</b>	Ribosomales Prot. L18
1	YCR031C	<i>RPS14A</i>	<b>3.38</b>	Ribosomales Prot. S14A
1	YDR076W	<i>RAD55</i>	<b>3.29</b>	Bestandteil des „Rekombinosoms“. homol. Rek.
1	YLL026W	<i>HSP104</i>	<b>3.15</b>	Hitzeschockprotein benötigt für Temp-Toleranz
1	YKL006W	<i>RPL14A</i>	<b>3.11</b>	Ribosomales Prot. L14
1	YCR061W		<b>3.11</b>	Prot. unbekannter Funkt.
1	YDR064W	<i>RPS13</i>	<b>3.05</b>	Ribosomales Prot. S13
1	YNL194C		<b>3.03</b>	Prot. homolog zu Sur7p
1.	YNL327W	<i>EGT2</i>	<b>0.09</b>	Zellzyklus regul. Prot.
1.	YIR028W	<i>DAL4</i>	<b>0.12</b>	Allantoin Permease
1.	YHL016C	<i>DUR3</i>	<b>0.15</b>	Urea-Transp.-Prot.
1.	YJR016C	<i>ILV3</i>	<b>0.15</b>	Dihydroxycid Dehydratase
1.	YGL028C	<i>SCW11</i>	<b>0.16</b>	Mitglied der Glucanase-Genfamilie
1.	YDR055W		<b>0.16</b>	starke Homol. zu SPS2p
1.	YBL002W	<i>HTB2</i>	<b>0.18</b>	Histon H2B2
1.	YBL003C	<i>HTA2</i>	<b>0.19</b>	Histon H2A
1.	YOL058W	<i>ARG1</i>	<b>0.20</b>	Arginosuccinat-Synthetase
1.	YGL117W		<b>0.20</b>	Hypot. Prot.
1.	YHR143W		<b>0.20</b>	DNA gerichtete RNA Polymerasen I.II.III
1.	YIR030C	<i>DCG1</i>	<b>0.21</b>	an Stickstoff-Katabolit-Metabolismus beteil.
1.	YOR303W	<i>CPA1</i>	<b>0.21</b>	Arginin spez. Phosphat-Synthetase
1.	YDL210W	<i>UGA4</i>	<b>0.21</b>	GABA-spez. Hoch-Affinitäts-Permease
1.	YER073W	<i>ALD5</i>	<b>0.22</b>	Aldehyd-Dehydrogenase
1.	YLR355C	<i>ILV5</i>	<b>0.22</b>	Ketol-acid Redukto-Isomerase
1.	YDR224C	<i>HTB1</i>	<b>0.23</b>	Histon H2B
1.	YIL117C		<b>0.23</b>	homolog zu YNL058C
1.	YER175C		<b>0.23</b>	mögl. Methyl-Transferase
1.	YNL004W	<i>HRB1</i>	<b>0.24</b>	starke Ähnlichkeit zu Gbp2p
1.	YOR108W		<b>0.24</b>	mögliche Isoform von Leu4p
1.	YIL116W	<i>HIS5</i>	<b>0.25</b>	Histidinol-Phosphat-Aminotransferase

Tabelle 9: Induzierte/reprimierte Gene 2h nach UV-C-Bestrahlung (84J/m<sup>2</sup>) bei Inkubation in LHR-Puffer. Gezeigt sind die Gene, die eine stärkere Induktion als Faktor drei bzw. stärkere Reprimierung als Faktor vier aufweisen. Die angegebenen Faktoren sind Mittelwerte aus zwei verschiedenen Hybridisierungen.

Unter den Genen, die nach UV-Bestrahlung eine starke Abnahme der Transkriptmenge zeigen, finden sich viele Gene mit zellulären Stoffwechselfunktionen. Inwieweit diese Reprimierung eine spezifische Antwort auf DNA-Schädigung darstellt, ist unklar.

#### 4. Einsatz von Microarrays zur Identifizierung strahleninduzierbarer Gene

Viele Gene, von denen eine Induzierbarkeit nach UV-Bestrahlung (bzw. entsprechenden Strahlenmimetika) bekannt ist (z.B. *RAD2*, *PHR1* oder *RAD7*), wurden, vermutlich wegen des hier gesetzten Minimalfaktors, nicht erfaßt. Gerade bei den oft niedrig exprimierten Reparaturgenen (Fenech, et al., 1991; Friedberg, et al., 1995) könnte auch die vergleichsweise niedrige Sensitivität der verwendeten *Microarray*-Technik dafür verantwortlich sein, daß induzierbare Gene mit geringer Expression nicht identifiziert werden können. Zudem korreliert eine mit *Microarrays* gemessene zweifache Veränderung der Transkriptmenge mit einer ca. sechsfachen Veränderung bei Northernanalysen (pers. Auskunft E. Nuwaysir), so daß nur Gene mit einer deutlichen Induktion (bzw. Reprimierung) identifiziert werden können.

Ein Indiz für die biologische Relevanz der hier gezeigten Daten ergibt sich aber auch daraus, daß mehrere Gene mit ähnlich veränderter Expression gefunden wurden, die aufgrund funktioneller Kriterien bereits früher in Genfamilien zusammenfaßt worden sind.

ORF-Nr	Gename	Induktionsfaktor nach UV-C-Bestrahlung	Beschreibung
YBL002W	<i>HTB2</i>	0,18	Histon H2B
YBL003C	<i>HTA2</i>	0,19	Histon H2A
YDR224C	<i>HTB1</i>	0,23	Histon H1B
YDR225W	<i>HTA1</i>	0,40	Histon H1A
YJR016C	<i>ILV3</i>	0,15	Dihydroxvacid-Dehydratase
YLR355C	<i>ILV5</i>	0,22	Ketolacid-Reduktoisomerase
YKL164C	<i>PIR1</i>	0,30	für Hitzeschocktoleranz benötigt
YKL163W	<i>PIR3</i>	0,40	Mitglied der Pir1/2/3p Familie
YGL028C	<i>SCW11</i>	0,16	Mitglied der Glucanase-Genfamilie
YMR305C	<i>SCW10</i>	0,50	Mitglied der Glucanase-Genfamilie
YLR167W	<i>RPS31</i>	3,59	Fusionsprotein aus ribosomalem Prot. S31 und Ubiquitin
YOL120C	<i>RPL18A</i>	3,41	Ribosomales Prot. L18A
YCR031C	<i>RPS14A</i>	3,38	Ribosomales Prot. S14A
YKL006W	<i>RPL14A</i>	3,11	Ribosomales Prot. L14A
YDR064W	<i>RPS13</i>	3,05	Ribosomales Prot. S13
YIL148W	<i>RPL40A</i>	2,97	Fusionsprotein aus ribosomalem Prot. L40 und Ubiquitin
YJL136C	<i>RPS21B</i>	2,83	Ribosomales Prot. S21B
YGL030W	<i>RPL30</i>	2,81	Ribosomales Prot. L30

Tabelle 10: Genfamilien, bei denen mehrere Gene nach UV-Bestrahlung ähnlich reguliert werden. Die angegebenen Faktoren sind Mittelwerte aus zwei verschiedenen Hybridisierungen

So wurde neben dem Gen *SCW11* auch das ebenfalls zur Glucanasen-Genfamilie gehörende Gen *SCW10* als reprimierbar gefunden. Weitere Beispiele von ähnlich regulierten Genen, die zu jeweils gleichen Genfamilien gehören, sind in [Tabelle 10](#) gezeigt.

In einigen Fällen sind die Mitglieder der Genfamilie auch räumlich auf dem Chromosom benachbart (so z.B. bei den Histon-Genen *HTB2/HTA2* und *HTB1/HTA1* oder bei den *PIR*-Genen), in anderen Fällen (bei den *SCW10/11*- und *ILV3/5*-Genen) besteht dieser räumliche Zusammenhang hingegen nicht. Auch die acht ähnlich stark induzierten Gene für ribosomale Proteine sind auf acht verschiedenen Chromosomen lokalisiert. Für räumlich benachbarte Paare ribosomaler Gene wurde in jüngster Zeit eine starke Korrelation der Expression im Zellzyklusverlauf gezeigt (Kruglyak and Tang, 2000). Offenbar ist die ähnliche Expression ribosomaler Gene aber vorwiegend nicht auf räumliche Nähe, sondern auf funktionelle Gemeinsamkeiten zurückzuführen.

#### 4.3.2.2 EINFLUSS VON IONISIERENDER STRAHLUNG AUF DIE EXPRESSION

Die nach Bestrahlung mit  $\gamma$ -Strahlen, Protonen und  $C^{6+}$ -Ionen am stärksten in ihrer Transkriptmenge veränderten Gene sind in den Tabellen 11-13 dargestellt.

<b>50 Gy</b> $\gamma$	<b>Identifikationsnummer</b>	<b>Genname (soweit bekannt)</b>	<b>Induktionsfaktor</b>	<b>Funktion des Genprodukts (nach YPD-Datenbank)</b>
1	YII 066C	<i>RNR3</i>	<b>3.55</b>	große UE Ribonukleotidreduktase
2	YGR180C	<i>RNR4</i>	<b>3.51</b>	kleine UE Ribonukleotidreduktase
3	YCR021C	<i>HSP30</i>	<b>2.84</b>	Hitzeschockprotein 30
4	YPR015C		<b>2.62</b>	Ähnlichkeit zu Transkriptionsfaktoren
5	YLL030C		<b>2.60</b>	unbekannt
6	YBR072W	<i>HSP26</i>	<b>2.19</b>	Hitzeschockprotein 26
1	YMR316W		<b>0.39</b>	unbekannt
2	YHR143W		<b>0.42</b>	DNA gerichtete RNA-Polymerasen I.II.III
3	YNL327W	<i>EGT2</i>	<b>0.46</b>	Zell-Zyklus regulierendes Protein
4	YBR005W		<b>0.50</b>	unbekannt

Tabelle 11: Induzierte/reprimierte Gene 2h nach  $\gamma$ -Bestrahlung (50Gy) bei Inkubation in LHR-Puffer. Gezeigt sind die Gene, die eine stärkere Induktion/Reprimierung als Faktor zwei aufweisen. Die angegebenen Faktoren sind Mittelwerte aus drei verschiedenen Hybridisierungen

<b>56 Gy</b> <b>Protonen</b>	<b>Identifikationsnummer</b>	<b>Genname (soweit bekannt)</b>	<b>Induktionsfaktor</b>	<b>Funktion des Genprodukts (nach YPD-Datenbank)</b>
1	YII 066C	<i>RNR3</i>	<b>6.48</b>	große UE Ribonukleotidreduktase
2	YGR180C	<i>RNR4</i>	<b>4.39</b>	kleine UE Ribonukleotidreduktase

#### 4. Einsatz von Microarrays zur Identifizierung strahleninduzierbarer Gene

3	YJR026	<i>RNR2</i>	<b>4.16</b>	kleine UE Ribonukleotidreduktase
4	YPR015C		<b>3.18</b>	Ähnlichkeit zu Transkriptionsfaktoren
1	YHR143W		<b>0.22</b>	DNA gerichtete RNA-Polymerasen I,II,III
1	YGL028C	<i>SCW11</i>	<b>0.24</b>	Mitglied der Glucanase-Genfamilie
1	YNL327W	<i>EGT2</i>	<b>0.28</b>	Zell-Zyklus regulierendes Protein
1	YJL078C	<i>PRY3</i>	<b>0.39</b>	Homologie zu Pflanzen PR1-Klasse-Prot.
1	YDR055W		<b>0.42</b>	starke Homol. zu SPS2p
1	YCR021C	<i>HSP30</i>	<b>0.42</b>	Hitzeschockprotein 30
1	YDL055C	<i>PSA1</i>	<b>0.42</b>	Mannose-1-Phosphat-Guanyltransferase
1	YNL300W		<b>0.43</b>	Hypoth. Prot.
1	YPL163C	<i>SVS1</i>	<b>0.46</b>	Vanadat-sensit. Prot.

Tabelle 12: Induzierte/reprimierte Gene 2h nach Protonen-Bestrahlung (56Gy) bei Inkubation in LHR-Puffer. Gezeigt sind die Gene, die eine stärkere Induktion als Faktor drei bzw. stärkere Reprimierung als Faktor zwei aufweisen. Die angegebenen Faktoren sind Mittelwerte aus zwei verschiedenen Hybridisierungen

<b>96 Gy</b> <b>C<sup>6+</sup></b>	<b>Identifikationsnummer</b>	<b>Genname (soweit bekannt)</b>	<b>Induktionsfaktor</b>	<b>Funktion des Genprodukts (nach YPD-Datenbank)</b>
1	YII.066C	<i>RNR3</i>	<b>7.01</b>	große UE Ribonukleotidreduktase
1.	YGR180C	<i>RNR4</i>	<b>4.90</b>	kleine UE Ribonukleotidreduktase
1.	YLL034C		<b>3.42</b>	unbekannt
1.	YPR015C		<b>3.12</b>	Ähnlichkeit zu Transkriptionsfaktoren
1.	YJR026	<i>RNR2</i>	<b>2.88</b>	kleine UE Ribonukleotidreduktase
1.	YPL153C	<i>RAD53</i>	<b>2.42</b>	Ser-Thr-Tyr-Kinase
1.	YDL101C	<i>DUN1</i>	<b>2.22</b>	Protein Kinase
1.	YGR256W	<i>GND2</i>	<b>2.19</b>	6-Phospho-gluconat Dehydrogenase
1.	YLL030C		<b>2.14</b>	Hypoth. Protein
1.	YER095W	<i>RAD51</i>	<b>2.09</b>	DNA Reparatur-Protein
1.	YIR038C	<i>GTT1</i>	<b>2.01</b>	Glutathion S-Transferase
1	YCR021C	<i>HSP30</i>	<b>0.41</b>	Hitzeschockprotein 30
1	YNL327W	<i>EGT2</i>	<b>0.43</b>	Zell-Zyklus regulierendes Protein
1	YGR156W		<b>0.43</b>	Prot. unbekannter Fkt.
1	YDR033W		<b>0.44</b>	starke Homol. zu YRO2
1	YMR305C	<i>SCW10</i>	<b>0.45</b>	Mitglied der Glucanase-Genfamilie
1	YGL028C	<i>SCW11</i>	<b>0.45</b>	Mitglied der Glucanase-Genfamilie
1	YBL003C	<i>HTA2</i>	<b>0.45</b>	Histon H2A
1	YNL046W		<b>0.49</b>	Hypoth. Prot.
1	YBR054W	<i>YRO2</i>	<b>0.51</b>	Ähnlichkeit zu HSP30 Hitzeschockprot. Yro1p
1	YBL002W	<i>HTB2</i>	<b>0.52</b>	Histon H2B

Tabelle 13: Induzierte/reprimierte Gene 2h nach Kohlenstoff-Ionen-Bestrahlung (96Gy) bei Inkubation in LHR-Puffer. Gezeigt sind die Gene, die eine stärkere Induktion/Reprimierung als Faktor zwei aufweisen. YRO2 und HTB2 sind mit annähernd zweifacher Reprimierung ebenfalls gezeigt. Die angegebenen Faktoren sind Mittelwerte aus zwei verschiedenen Hybridisierungen

Es ist deutlich, daß hier im Vergleich zur UV-Bestrahlung nur eine geringe Zahl von Genen mit Veränderungen in ihrer Transkriptmenge um Faktor zwei oder höher identifiziert werden konnte. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der geringen Homogenität der Energiedisposition liegen, die dazu führen könnte, daß die DNA-Schadensmenge in den

einzelnen Zellen stark variiert. Bei einer angenommenen DSB-Induktionsrate von ca.  $3 \times 10^{-9}$  DSB Gy<sup>-1</sup> bp<sup>-1</sup> (Friedl, 1994) nach  $\gamma$ -Bestrahlung führt eine Bestrahlung mit 50Gy zu durchschnittlich etwa zwei DSB pro Zelle, wobei in einem beträchtlichen Anteil der Zellen gar kein DSB induziert wird. Noch stärker ist die erwartete Inhomogenität der Schadensinduktion nach dicht-ionisierender Bestrahlung, zum Beispiel bei C<sup>6+</sup>-Ionen. Insgesamt könnte dieser Effekt zu einer „Verwässerung“ der beobachteten Expressionsunterschiede führen, und es bleibt zu prüfen, ob sich durch Verwendung höherer Bestrahlungsdosen deutlichere Effekte erzielen lassen. Natürlich sind auch andere Ursachen denkbar. So könnten beispielsweise unterschiedliche Primärsignale nach UV- und IR-Bestrahlung zu den beobachteten Unterschieden führen.

Die Gene der Ribonukleotidreduktase *RNR3* und *RNR4* sind bei allen ionisierenden Strahlenarten als am stärksten induzierbar gefunden worden. Zudem wurden für das *RNR2*-Gen nach Protonen- und C<sup>6+</sup>-Bestrahlung deutlich erhöhte Transkriptmengen festgestellt. Gerade die *RNR*-Gene gehören zu den am besten untersuchten strahleninduzierbaren Genen (siehe Einleitung) und besonders im Fall der C<sup>6+</sup>-Bestrahlung wurden weitere, für Proteinkinasen kodierende Gene, die an der Signaltransduktion für die Aktivierung der *RNR*-Gene beteiligt sind, gefunden (*DUNI*, *RAD53*).

Neben den *RNR*-Genen konnten weitere Gene identifiziert werden, die bei allen getesteten Strahlenarten eine veränderte Expression aufwiesen. So zeigte der offene Leserahmen YPR015C, von dem bislang lediglich bekannt war, daß er Ähnlichkeit zu bekannten Transkriptionsfaktoren aufweist, eine deutlich erhöhte Expression nach Behandlung mit sämtlichen getesteten Strahlenarten. Auch für YLL030C konnte bei allen ionisierenden Strahlenarten mit Ausnahme von Protonen-Strahlung eine erhöhte Transkriptmenge nach Behandlung nachgewiesen werden. Da über die Funktion dieser beiden Leserahmen noch wenig bekannt ist, erscheint eine weitergehende Analyse dieser Gene als aussichtsreich.

Interessant ist auch das Expressionsverhalten des Hitzeschockgens *HSP30*. So wurde nach Protonen- und Kohlenstoff-Ionen-Bestrahlung eine verminderte Transkriptmenge (Faktor 0,42 bzw. 0,41) festgestellt, wohingegen der Einsatz von  $\gamma$ -Strahlung zu einer Erhöhung der mRNA-Menge (Faktor 2,84) führte. Ob die Ursache hierfür in den unterschiedlichen verwendeten Noxen liegt oder ob beispielsweise geringfügige Temperaturunterschiede

#### 4. Einsatz von Microarrays zur Identifizierung strahleninduzierbarer Gene

---

zwischen bestrahlter Probe und Kontrolle einen größeren Einfluss auf die Expression des *HSP30*-Gens ausüben, müssen zukünftige Experimente zeigen.

Das Gen *EGT2* zeigte hingegen nach allen Bestrahlungsarten eine stark verringerte Expression. Für *Egt2p* wurde eine Funktion bei der Regulation des Zellzyklus gezeigt (Kovacech, et al., 1996). Die Expression des *EGT2*-Gens wird in Abhängigkeit von *SWI5* in der frühen G1-Phase transkriptionell induziert. Eine Verringerung der Transkriptmenge, wie hier beobachtet, wurde dagegen nach Behandlung mit Flavopyridol, einem Alkaloid, das zur Krebsbekämpfung eingesetzt wird, nachgewiesen (Gray, et al., 1998). Offensichtlich wird *EGT2* durch verschiedene Stressoren reprimiert. So zeigte sich auch nach MMS-Behandlung, daß *EGT2* in der behandelten Probe mehr als 13-fach schwächer exprimiert ist als in der unbehandelten Kontrolle (Mittelwert aus zwei Hybridisierungen).

Die hier gezeigten Experimente wurden in einem relativ kurzen Zeitraum (Oktober - November 99) während meines Aufenthalts am NIEHS durchgeführt. Obwohl alle Hybridisierungen mindestens einmal wiederholt wurden, kann nicht davon ausgegangen werden, daß alle transkriptionell regulierten Gene entdeckt wurden. Tatsächlich blieben viele Gene (vor allem DNA-Reparatur-Gene), von denen mit anderen Methoden eine Induktion nach Bestrahlung gezeigt wurde, hier unentdeckt. In einigen Fällen könnte dies auf unterschiedliche Inkubationsmethoden nach der Bestrahlung (Vollmedium oder LHR-Puffer) zurückzuführen sein. Oftmals dürfte die Ursache aber in der relativ niedrigen Expression der an Streßantwort beteiligten Gene liegen (Friedberg, et al., 1995). Zumindest das hier verwendete *Microarray*-System zeigte Probleme bei der Detektion schwach exprimierter Gene. Einschränkend muß daher festgehalten werden, daß sowohl schwach exprimierte Gene als auch Gene mit geringfügig veränderter Expression nach Bestrahlung nicht detektiert werden konnten. Obige Tabellen erheben daher keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

#### **4.3.3 STICHPROBENARTIGE ÜBERPRÜFUNG DER GEFUNDENEN GENE MIT VERÄNDERTER EXPRESSION DURCH NORTHERN-HYBRIDISIERUNGEN**

Um zu prüfen, ob die gefundenen Expressionsveränderungen mit herkömmlichen Techniken bestätigt werden können, wurden stichprobenartig für drei Gene, die nach Behandlung

veränderte Transkriptmengen in den *Microarray*-Experimenten aufwiesen, Northern-Hybridisierungen durchgeführt. Die Hybridisierungen erfolgten mit radioaktiv markierten PCR-Sonden, die durch Amplifikation mit jeweils spezifischen Primern (EGT2-fw, EGT2-rev; HSP30-fw, HSP30-rev; YPR015C-fw, YPR015C-rev) unter Verwendung genomischer DNA des Stammes RSY12 als Matrize hergestellt wurden.

#### 4.3.3.1 EGT2

Das Gen *EGT2* zeigte nach Behandlung der Zellen mit allen verwendeten Strahlenarten eine deutlich verringerte Transkriptmenge gegenüber unbehandelten Kontrollzellen. Für die Northern-Analyse wurde die gleiche RNA-Charge eingesetzt, die für die *Array*-Hybridisierung verwendet wurde.

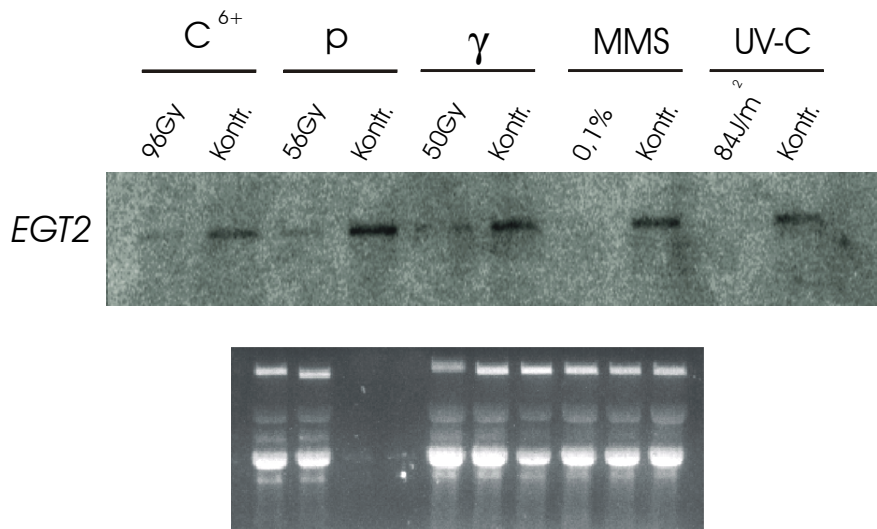


Abbildung 45: Northern-Hybridisierung zur Verifizierung der Array-Daten mit einer radioaktiv markierten Sonde von *EGT2* und 15µg Gesamt-RNA je Spur aus dem *Microarray*-Experiment. Da keine Hybridisierung mit *ACT1* durchgeführt wurde, ist als Kontrolle der eingesetzten RNA-Menge das Gelphoto gezeigt. Spuren 3 und 4 wurden mit je 1µg mRNA beladen.

Da keine Kontrollhybridisierung mit einem „Haushaltsgen“ wie *ACT1* durchgeführt wurde, ist ein Photo des Gels gezeigt, in dem die RNA elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Das Photo belegt, daß in den Spuren vergleichbare RNA-Mengen vorlagen. Da von der Protonenbestrahlung keine Gesamt-RNA mehr zur Verfügung stand, wurde hier 1µg mRNA aufgetragen.



#### 4. Einsatz von Microarrays zur Identifizierung strahleninduzierbarer Gene

---

In [Tabelle 14](#) sind die Werte der Reprimierung, die durch Quantifizierung der Hybridisierungssignale mit der „Phospho Imager“ Software ermittelt worden sind, dargestellt. Da keine interne Kontrolle vorliegt, stellen die angegebenen Faktoren aber nur ungefähre Werte dar.

<i>EGT2</i>	$C^{6+}$ 96Gy	p 56Gy	$\gamma$ 50Gy	MMS 0,1%	UV-C 84J/m <sup>2</sup>
Microarray	0,43	0,28	0,46	0,07	0,09
Northern	~0,17	~0,17	~0,09	~0,017	~0,08

*Tabelle 14: Überprüfung der mit Microarrays festgestellten Verringerung der Transkriptmenge des EGT2-Gens in bestrahlten bzw. MMS-behandelten Zellen durch Northern-Hybridisierung.*

Für alle behandelten Proben konnte somit die Verringerung der Transkriptmenge von *EGT2* nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien durch die Northern-Hybridisierung bestätigt werden.

##### 4.3.3.2 *HSP30*

Das Hitzeschock-Gen *HSP30* wurde ausgewählt, da bei Behandlung von Zellen mit MMS, Protonen und  $C^{6+}$ -Ionen eine Verringerung der Transkriptmengen festgestellt wurde, wohingegen nach  $\gamma$ -Bestrahlung eine erhöhte Expression gefunden wurde. Wie bei der unter [4.3.3.1](#) beschriebenen Hybridisierung ist zur Kontrolle der eingesetzten RNA-Menge ein Gelphoto gezeigt. Daher sind die ermittelten Faktoren auch hier nur ungefähre Werte. Die eingesetzte RNA stammte wiederum aus der gleichen Charge, mit der die *Microarray*-Experimente durchgeführt wurden.

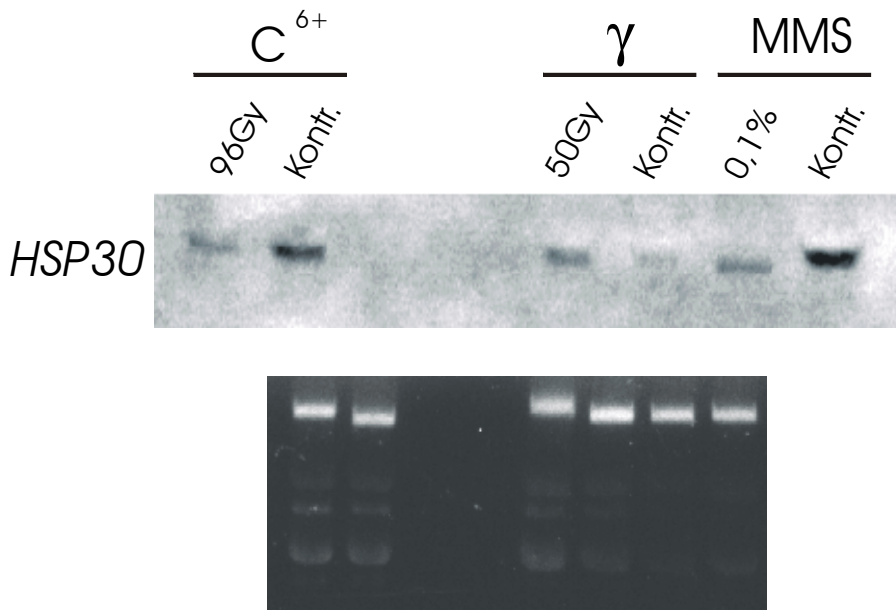


Abbildung 46: Northern-Hybridisierung zur Verifizierung der Array-Daten mit einer radioaktiv markierten Sonde von HSP30 unter Verwendung von Gesamt-RNA (15µg) aus dem Microarray-Experiment. Da keine Hybridisierung mit ACT1 durchgeführt wurde, ist als Kontrolle der eingesetzten RNA-Menge das Gelphoto gezeigt. In den Spuren 3 und 4 wurde keine RNA aufgetragen.

<i>HSP30</i>	C <sup>6+</sup> 96Gy	γ 50Gy	MMS 0,1%
Microarray	0,41	2,84	0,78
Northern	~0,44	~2,54	~0,37

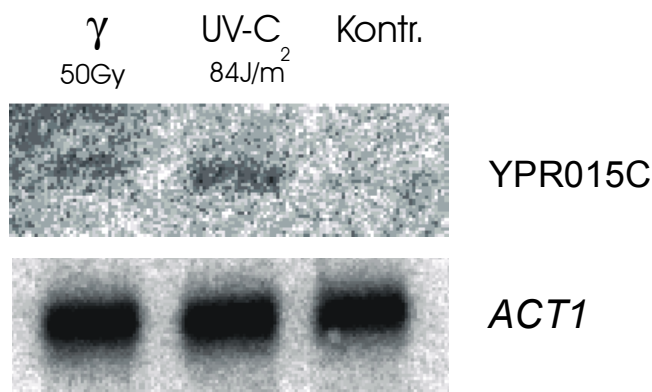
Tabelle 15: Überprüfung der Microarray-Daten zur Expression des HSP30-Gens mittels Northern-Hybridisierung.

Wie die [Tabelle 15](#) zeigt, ergibt sich auch hier eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der *Microarray*-Hybridisierung. Ein Meßfehler kann daher als Ursache für die festgestellten Unterschiede im Expressionsverhalten nach γ-Bestrahlung gegenüber Behandlung mit MMS bzw. C<sup>6+</sup>-Ionen ausgeschlossen werden. Unklar ist, warum der Basalwert der *HSP30*-Expression in der unbestrahlten Kontrolle des γ-Bestrahlungsexperiments niedriger ist als bei den anderen Kontrollproben, obwohl das Photo keinen Anhaltspunkt dafür gibt, daß in dieser Spur weniger RNA vorlag. Vielleicht stehen die beobachteten Expressionschwankungen gar nicht mit der Bestrahlung in Zusammenhang, sondern sind durch geringfügige Variation anderer Parameter (z.B Temperatur) bei der Versuchsdurchführung bedingt.

## 4. Einsatz von Microarrays zur Identifizierung strahleninduzierbarer Gene

### 4.3.3.3 YPR015C

Das dritte mit Northern-Hybridisierungen überprüfte Gen war YPR015C, das nach Behandlung mit sämtlichen Agenzien eine transkriptionelle Erhöhung zeigte. Hier wurde das gesamte Experiment einschließlich Bestrahlung und RNA-Isolierung wiederholt, um zumindest in einem Fall zeigen zu können, daß die festgestellte Transkriptveränderung auch in einem unabhängigen Experiment reproduzierbar ist.



Northern-Hybridisierung zur Verifizierung der Array-Daten mit einer radioaktiv markierten Sonde von YPR015C. Als Kontrolle wurde der Blot auch mit einer ACT1-Sonde hybridisiert.

	Signalintensität pro mm <sup>2</sup> (korrigiert um die Hintergrundintensität)		korr. Faktor	Induktionsfaktor <i>Microarray</i>
	YPR015C	ACT1		
<b>Kontr.</b>	2,89	239,50	1	
<b>UV-C (84J/m<sup>2</sup>)</b>	37,81	290,88	10,77	3,65
<b><math>\gamma</math> (50Gy)</b>	30,07	275,61	9,04	2,62

Tabelle 16: Überprüfung der mit Microarrays festgestellten Transkriptzunahme von YPR015C nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien durch Northern-Hybridisierungen

Zudem wurde als Kontrolle mit einer ACT1-Gensonde hybridisiert. Daher ist es in diesem Fall möglich, die gemessene Signalintensität auf die Menge des nicht induzierbaren ACT1-Gens (Fichter, 1999) zu normieren. Allerdings könnte die geringe Signalstärke der Kontrollprobe, die nahe der Nachweisgrenze liegt, eine mögliche Fehlerquelle bezüglich der Reproduzierbarkeit des Induktionsfaktors darstellen. Trotzdem ist auch hier eine Bestätigung

der *Microarray*-Ergebnisse möglich, wobei der Induktionsfaktor bei der Northern-Hybridisierung sogar noch höher ausfällt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aller drei durchgeführten Northern-Hybridisierungen eine gute Übereinstimmung mit den Resultaten der *Microarray*-Hybridisierung. Da hier Gene mit relativ deutlichen Expressionsveränderungen ausgewählt wurde, müssen weitergehende Bestätigungsexperimente durchgeführt werden, um zu zeigen, ob der relativ willkürlich gewählte Grenzwert der Transkriptveränderung für eine Aufnahme in die gezeigten Tabellen sinnvoll ist.

#### **4.4 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER *MICROARRAY*-TECHNIK ALS *SCREENING*-METHODE**

Die *Microarray*-Technik stellt eine sehr neue Technologie dar, die zwei wesentliche Vorteile gegenüber herkömmlichen Techniken besitzt. Zum einen ist durch Fluoreszenzmarkierung eine kompetitive Hybridisierung möglich, so daß die behandelte Probe und die zugehörige Kontrolle in einem Experiment unter exakt gleichen Bedingungen untersucht werden können. Der noch größere Vorteil dieser Technik liegt in der Möglichkeit, die Expression mehrerer tausend Gene gleichzeitig untersuchen zu können.

In diesem Kapitel wurde der Einfluß verschiedener Strahlenarten (UV-C,  $\gamma$ -, Protonen- und  $C^{6+}$ -Ionen-Strahlung) auf die Expression von Hefegenen getestet. In einem ersten Schritt wurden für die verschiedenen Noxen die äquitoxischen Dosen ermittelt, um die Strahlenarten miteinander vergleichen zu können. Als Kontrolle wurde zusätzlich zu den verwendeten Strahlenarten der Einfluß der alkylierenden Chemikalie MMS auf die Expression untersucht. Hierzu liegt bereits eine publizierte Arbeit vor (Jelinsky and Samson, 1999), mit der die hier erzielten Ergebnisse verglichen werden konnten. Fünf der zehn am stärksten induzierten Gene wurden bereits von Jelinsky und Samson als stark induzierbar (Faktor >10) beschrieben. Die Diskrepanz bei den fünf restlichen Genen könnte trotz weitgehender Adaption des „Jelinsky“-Protokolls durch die Verwendung eines anderen Stammes oder durch die unterschiedliche *Microarray* Technik (hier cDNA-Arrays, bei Jelinsky und Samson Oligonukleotid-Arrays) erklärbar sein. Eine Wiederholung der Hybridisierung ergab, daß die Expressionsunterschiede

#### 4. Einsatz von Microarrays zur Identifizierung strahleninduzierbarer Gene

---

von den zehn am stärksten induzierten Genen im ersten Experiment im Wiederholungsexperiment in neun Fällen bestätigt werden konnten. Interessanterweise ließen sich sieben dieser Gene in drei Gruppen einordnen, die räumlich auf dem Chromosom direkt benachbart angeordnet sind und vermutlich koreguliert werden.

Während bei MMS-behandelten Zellen die stärksten Expressionsunterschiede beobachtet wurden, zeigten sämtliche verwendete ionisierende Strahlenarten einen geringen Effekt auf das Expressionsprofil. UV-Strahlung bewirkte ein intermediäres Expressionsmuster bezüglich der Transkriptmengen - es waren deutlich mehr Gene induziert bzw. reprimiert als bei den ionisierenden Strahlenarten, wohingegen im Vergleich zur MMS-Behandlung signifikant weniger Expressionsveränderungen festgestellt wurden. Die Analyse der Gene mit stark veränderten Transkriptmengen ergab, daß viele Gene, deren Induktion nach Bestrahlung bereits früher publiziert worden ist, hier nicht als induzierbar gefunden wurden. Mehrere Faktoren könnten dafür verantwortlich sein: Niedrig exprimierte Gene (viele der DNA-Reparaturgene sind niedrig exprimiert!) sind wie bei vielen anderen Methoden der Expressionsmessung schwer detektierbar. Zudem können geringe Expressionsunterschiede (kleiner Faktor zwei) bislang nicht festgestellt werden. Ferner konnten aufgrund des zeitlichen Rahmens meines Aufenthalts am NIEHS alle Hybridisierungen nur einmal (bei  $\gamma$ -Strahlung zweimal) wiederholt werden, wodurch eine statistisch verlässliche Aussage im Fall von geringen Expressionsunterschieden erschwert ist. Daher wurden in diesem Kapitel nur Expressionsunterschiede von mindestens Faktor zwei berücksichtigt.

Trotz dieser Schwierigkeiten gibt es einige Indizien, die für eine biologische Relevanz der gezeigten Ergebnisse sprechen. So wurden in mehreren Fällen Genpaare (bzw. -gruppen) identifiziert, deren Transkriptmengen nach Bestrahlung ähnlich stark verändert vorlagen und die bereits früher aufgrund funktioneller Ähnlichkeiten in Genfamilien zusammengefasst wurden (z.B. wurden fünf ribosomale Gene mit mehr als dreifach erhöhter Transkriptmenge nach UV-Bestrahlung gefunden).

Außerdem wurden die *RNR*-Gene bei allen getesteten Strahlenarten als stark induzierbar eingestuft, was aus früheren Expressionsmessungen bereits bekannt ist (Endo-Ichikawa, et al., 1996; Huang and Elledge, 1997; Hurd and Roberts, 1989). Nach UV- und  $C^{6+}$ -Ionen - Bestrahlung konnten zudem mit *DUNI* und *RAD53* zwei Gene als induzierbar eingestuft

werden, die an der Signaltransduktion, die zur Induktion der RNR-Gene notwendig ist, beteiligt sind.

Schließlich zeigte auch die stichprobenartige Überprüfung der mit *Microarrays* erzielten Expressionsdaten durch Northern-Hybridisierungen eine gute Übereinstimmung. So konnten die in den drei untersuchten Genen (*EGT2*, *HSP30* und *YPR015C*) gefundenen Transkriptionsveränderungen nach Bestrahlung bzw. Behandlung mit MMS verifiziert werden.

Neben den Genen mit bekannter Funktion in der DNA-Schadensprozessierung wurden einige Gene identifiziert, die bislang nicht in Verbindung mit DNA-Schädigung gebracht worden sind. So zeigte sich nach Behandlung mit allen untersuchten Strahlenarten (auch MMS) eine deutliche Verringerung der Transkriptmenge des *EGT2*-Gens, für das eine Rolle in der Zellzykluskontrolle gezeigt wurde (Kovacech, et al., 1996). Eine erhöhte Transkriptmenge wurde für den Leserahmen *YLL030C* nach UV-,  $C^{6+}$ - und  $\gamma$ -Bestrahlung gefunden. Bei sämtlichen verwendeten Strahlenarten wurde eine ebenfalls deutlich erhöhte Transkriptmenge für den Leserahmen *YPR015C* gezeigt, der aufgrund von Sequenzhomologien als möglicher Transkriptionsfaktor diskutiert wird (Bohm, et al., 1997).

Inwieweit Gene, die lediglich bei einer Bestrahlungsart induziert bzw. reprimiert vorlagen, tatsächlich strahlenspezifisch reguliert sind, muß erst durch weitergehende Analysen geklärt werden.

## **5 ABSCHLIESSENDE DISKUSSION UND AUSBLICK**

In dieser Arbeit wurden zwei Hochdurchsatzverfahren zur Identifizierung von Genen mit veränderter Expression nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien für Hefe etabliert und erste Ergebnisse bei der Anwendung erzielt. Hier sollen Vor- und Nachteile der beiden angewendeten *Gene trap*- und *Microarray*-Techniken dargestellt und diskutiert werden, bevor auf die erzielten Ergebnisse abschliessend eingegangen wird.

### **5.1 GENE TRAPPING**

Das *Gene trap* Verfahren beruht auf der zufälligen Integration eines promotorlosen Reportergens (hier *lacZ*) in ein chromosomales Gen und nachfolgende Messung der Reporterenzymaktivität. Damit ein funktionsfähiges Reporterenzym exprimiert wird, ist es nötig, daß das Reportergen in der richtigen Orientierung und im richtigen Leserahmen in das zelluläre Gen inseriert, und daß das dann gebildete Fusionsprotein die Reporteraktivität aufweist. Die erwartete Häufigkeit von *lacZ* exprimierenden Transformanten berechnet sich aus der Gendichte in *S. cerevisiae* und der Wahrscheinlichkeit der Integration in richtiger Orientierung und im richtigen Leseraster. Zudem muß berücksichtigt werden, daß Integrationen in essentiellen Genen in den meisten Fällen letal sind, daß der Anteil des zellulären Proteins am Fusionsprotein gelegentlich die *lacZ*-Aktivität maskieren kann, sowie daß ein Teil der Hefegene unter Standardwachstumsbedingungen nicht oder in zu geringem Ausmaß exprimiert werden, um durch den X-Gal *Overlay* detektierbar zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, daß ca. 5% aller Transformanten unter Standardbedingungen *lacZ*-Aktivität aufweisen. Dieser Wert könnte eventuell noch erhöht werden, wenn die Vorselektion auf *lacZ*-Expression nicht wie hier unter Standardwuchsbedingungen, sondern nach Behandlung mit Stressoren durchgeführt würde. Dies würde die zusätzliche Detektion von Genen ermöglichen, die nur nach Induktion in detektierbarem Ausmaß exprimiert werden. In diesem Fall könnte jedoch die Detektion von Genen, deren Transkriptmengen nach Behandlung verringert sind, erschwert sein. Eine

weitere Möglichkeit, um die Anzahl lacZ-exprimierender Transformanten zu erhöhen, läge in der Verwendung diploider Hefestämme, da hierdurch in vielen Fällen auch essentielle Gene auf Expressionsveränderungen hin untersucht werden könnten. Erwartet man 5-10% lacZ-exprimierender Transformanten, müßte man, um statistisch eine weitgehende Abdeckung des gesamten Genoms zu erzielen, 180000 bis 360000 Transformanten analysieren. Dies zeigt deutlich die Limitationen des *gene trap* Verfahrens in der hier durchgeführten Form. Durch den Einsatz von Automatisierungsverfahren (Pipettierroboter, Anzucht und Vorselektion auf lacZ-Expression in Mikrotiterplatten in Verbindung mit automatischer Erfassung von Farbumschlägen) ließe sich eine solche Anzahl von Transformanten jedoch bearbeiten. Realistischerweise muß man aber nicht zuletzt auch aufgrund der hohen Kosten für die Anschaffung der entsprechenden Gerätschaften davon ausgehen, daß es individuellen Labors nicht möglich sein wird, Klonbanken anzulegen, die alle Hefegene umfassen. Der aufwendigste Schritt des *Gene trap* Verfahrens ist die Plasmid-Reisolierung zur Identifizierung des Integrationsortes. Beim gegenwärtigen Stand der Technik ist hier leider auch durch Automatisierung keine deutliche Arbeitserleichterung vorstellbar. Ist der Integrationsort eines lacZ-exprimierenden Klons erst einmal bekannt, kann ein solcher Klon natürlich für Expressionsstudien unter verschiedenartigsten Bedingungen (veränderte Wachstumsbedingungen, verschiedene Noxen etc.) genutzt werden.

Ein großer Vorteil des *Gene trap* Verfahrens liegt darin, daß durch die Insertion der Reporter genkassette gleichzeitig eine Insertionsmutante hergestellt wird, die sich phänotypisch untersuchen läßt. Allerdings kann der beobachtete Phänotyp in Abhängigkeit vom Integrationsort möglicherweise Differenzen zum Phänotyp der entsprechenden Nullmutante aufweisen. So wird in der Regel die Funktion des getroffenen Gens am stärksten bei einer Insertion der Reporter genkassette im N-terminalen Bereich des Leserahmens beeinträchtigt sein. Je näher die Integration zum 3'Ende des getroffenen Gens auftritt, desto höher ist der Anteil des zellulären Gens am Fusionsprotein, womit auch die Wahrscheinlichkeit steigt, daß zumindest partiell Funktionen des getroffenen Gens erhalten bleiben. Einschränkend muß zudem gesagt werden, daß durch die Verwendung von  $\gamma$ -Strahlung zur Effizienzsteigerung der Integration weitere, von der Insertion unabhängige Mutationen gesetzt werden können. Ob beobachtete Phänotypen auf die Insertion zurückzuführen sind, muß daher durch Kopplungsanalysen verifiziert werden. Für die phänotypische Charakterisierung der Transformanten ergeben sich Vorteile bei Verwendung



## 5. Abschließende Diskussion und Ausblick

haploider Stämme, wie sie in dieser Arbeit verwendet worden sind, da hier der Phänotyp des betroffenen Gens nicht durch eine zweite intakte Kopie des Gens auf dem homologen Chromosom maskiert werden kann.

Ein Vorteil der *Gene trap* Methode besteht darin, daß das Reportergen chromosomal integriert wird. Einflüsse der Chromatinstruktur auf die Transkription (z. B. durch *Chromatin remodelling*) können so, im Gegensatz zu früher angewendeten Plasmidsystemen mit Reportergenfusionen, detektiert werden. Dies ist von besonderem Interesse, da in den letzten Jahren die Bedeutung der Chromatinstruktur für die Regulation der Expression zunehmend erkannt worden ist (Überblick bei (Svaren and Hörz, 1996)). Wiederum muß hier aber einschränkend erwähnt werden, daß durch die Insertion der Genkassette die Chromatinstruktur der Integrationsregion bereits gestört werden kann und die Chromatinregulation dadurch verändert vorliegen kann. Diese Einschränkung gilt im übrigen nicht nur für Veränderungen der Chromatinstruktur; auch Autoregulationsprozesse, bei denen das Genprodukt die eigene transkriptionelle Regulation beeinflussen kann, sind möglicherweise durch die Expression des Fusionsproteins anstatt des zellulären Genprodukts beeinträchtigt.

Da eine Vielzahl verschiedener Regulationsmechanismen existiert (siehe Einleitung), ist theoretisch ein funktioneller Nachweis der Enzymaktivität des untersuchten Proteins die genaueste Methode, um alle möglichen Regulationsfaktoren mit einzuschliessen. In der Praxis ist aber die Funktion eines untersuchten Proteins selten so gut verstanden, daß Möglichkeiten zur spezifischen Enzymaktivitätsmessung bestehen. Westernanalysen ermöglichen zumindest eine Quantifizierung der Proteinmenge, setzen aber die Existenz spezifischer Antikörper voraus, die sehr aufwendig in der Herstellung sind. Als Hochdurchsatzverfahren auf Proteinebene eignet sich dagegen die in [Kapitel 1.5.3](#) beschriebene zweidimensionale Gelelektrophorese, ist aber mit dem Nachteil verbunden, daß ein Rückschluß auf die Identität von Proteinen mit veränderter Menge nach Bestrahlung schwierig ist.

Das *Gene trap*-Verfahren ermöglicht durch den Einsatz von Reportergenen eine vergleichsweise exakte Quantifizierung des Genprodukts, da die Aktivität des Proteins mittels einfacher biochemischer Farbreaktionen photometrisch bestimmt werden kann. Da die Substratumsetzung zeitlich linear erfolgt, kann durch entsprechende Verlängerung der

Inkubationszeit nach dem Zellaufschluß auch die Expression schwächer exprimierter Gene bestimmt werden. Da die Aktivitätsmessung des Reporters vergleichsweise einfach erfolgt, können auch umfangreichere kinetische Experimente ohne großen Aufwand durchgeführt werden. Die Erstellung von Kinetiken besitzt den großen Vorteil, daß auch Expressionsveränderungen der unbehandelten Probe im zeitlichen Verlauf gemessen werden können und somit der Einfluß der Inkubationsbedingungen festgestellt werden kann. Auch für Expressionsveränderungen, die nur kurzfristig auftreten (wie im Fall von #82, YBR015C), ist die Erstellung einer Kinetik der punktuellen Expressionsmessung zu einem bestimmten Zeitpunkt eindeutig vorzuziehen.

Bei der Etablierung der *Gene trap* Methode konnten zwei neue Erkenntnisse zur illegitimen Rekombination erzielt werden. Erstens konnte gezeigt werden, daß  $\gamma$ -Strahlung wie die Zugabe von Restriktionsenzymen einen steigernden Effekt auf die Effizienz der nichthomologen Integration ausübt, was die Vermutung erhärtet, daß die Existenz von DSB integrationsfördernd wirkt. Zweitens konnte gezeigt werden, daß in Abwesenheit des bei der nicht-homologen Endverknüpfung beteiligten Ku-Proteins die illegitime Integration bei nahezu unveränderter Integrationseffizienz über Nutzung des retrotransposablen Enzyms Integrase erfolgt. Durch die Sequenzierung des Integrationsorts ist bei der *Gene trap* Methode zudem ein verbessertes Verständnis über den molekularen Ablauf der illegitimen Rekombination in Hefe vorstellbar. Auch in diesen funktionellen Erkenntnissen liegt ein Vorzug der *Gene trap* Methode im Vergleich zu anderen *Screening* Verfahren wie der im folgenden diskutierten *Microarray* Technik.

## **5.2 MICROARRAYS**

In der Möglichkeit, die Expression sehr vieler Gene gleichzeitig zu untersuchen, liegt eine der großen Neuerungen der *Microarray*-Technik. Auf einer Fläche von 7,5 x 2,5 cm können heute durch extreme Miniaturisierung und Einsatz von Pipettierrobotern mehr als zehntausend Gensonden plaziert werden. Statt des *Screenings* von 180000 Transformanten wie dies beim *Gene trapping* notwendig wäre, würden hier theoretisch einige wenige Experimente ausreichen, um alle aufgebrachten Gene auf eine noxenspezifische Induzierbarkeit (oder Repression) hin zu untersuchen. Da in den letzten Jahren die Anzahl der bekannten offenen

## 5. Abschließende Diskussion und Ausblick

Leserahmen (z. B. im Rahmen des *Human Genome Project* (HUGO)) sprunghaft gestiegen ist, ist die Effizienz der Expressionsmessung ein wichtiges Kriterium für *Screening* Methoden. Mit der Array-Technologie wird es wohl in Kürze möglich sein, Gensonden für das gesamte menschliche Genom auf einigen wenigen DNA-Chips unterzubringen und zu untersuchen. Problematisch indes dürfte die Auswertung der großen Datensätze werden. So war die Analyse der Gene mit unterschiedlichen Transkriptmengen nach Bestrahlung, die in dieser Arbeit gezeigt wurde, noch relativ leicht möglich, da die ionisierenden Strahlenarten nur geringfügige Änderungen der Expression hervorgerufen haben. Wären allerdings die Expressionsunterschiede bei allen verwendeten Strahlenarten ähnlich hoch gewesen wie nach MMS-Behandlung, wäre ein manueller Vergleich der Ergebnisse kaum mehr möglich gewesen. Die Entwicklung entsprechender Computerprogramme, die nicht nur die Auswertung einzelner Experimente ermöglichen, sondern beispielsweise über Algorithmen verfügen, die mittels *Cluster*-Analysen verschiedene Experimente zusammenfassen und vergleichen können, sind daher ein wichtiger Schritt, um aus den Rohdaten interessante Informationen zu generieren.

Der zweite große Vorteil dieser Technik liegt in der Möglichkeit, kompetitive Hybridisierungen durchzuführen. Damit lassen sich interexperimentelle Unterschiede, die sich bei zwei verschiedenen Hybridisierungen ergeben würden, minimieren. Durch Entwicklung weiterer Fluoreszenzfarbstoffe und entsprechender Scanner wird es möglich sein, sogar mehr als zwei Proben parallel zu hybridisieren. Die neueste Generation von Scannern ermöglicht sogar ein paralleles Auslesen verschiedener Wellenlängen, so dass der Zeitaufwand für das Einlesen der Daten weiter minimiert werden konnte.

Ein weiterer Pluspunkt von *Microarrays* sind die relativ niedrigen Unterhaltskosten, wenn man die Fülle von Daten, die sich mit wenigen Experimenten erzielen läßt, in Relation setzt. Dem stehen freilich hohe Investitionskosten gegenüber. Neben den Kosten für die Geräte (Spotter, Scanner, EDV und evt. Hybridisierungsstation) müssen auch die Preise für die Erzeugung der Arrays berücksichtigt werden. So mußten beispielsweise für die Herstellung von Hefe-Arrays fast 12500 Primer bezogen werden. Hinzu kommen die Kosten, die für die Amplifikation der Sonden anfallen. Die gemeinsame Nutzung einer *Microarray*-Station durch mehrere Labors erscheint daher sinnvoll.

Zumindest bei Verwendung der mir zur Verfügung stehenden Methoden war die Sensitivität des Systems noch nicht ausreichend, um auch schwächer exprimierte Gene zuverlässig detektieren zu können. Da gerade viele DNA-Reparaturgene, für die eine Induzierbarkeit vermutet wird, jedoch niedrig exprimiert sind, liegt hier momentan noch eine große Schwäche des Systems. Hier könnten in Zukunft verbesserte Fluoreszenzfarbstoffe zu einer Steigerung der Nachweisgrenze führen. Die momentan hauptsächlich eingesetzten Cy3 und Cy5 Farbstoffe sind auch durch einen relativ frühen Sättigungsbereich gekennzeichnet. So sind zwischen der Nachweisgrenze und dem Sättigungsbereich bislang maximal Expressionsunterschiede um den Faktor 70 detektierbar (pers. Auskunft E. Nuwaysir, NIEHS), was deutlich geringer ist als bei radioaktiven Markierungen. Daher ergibt sich bereits ein systemimmanentes Problem bei der gleichzeitigen Analyse aller Hefegene, da die Expressionsunterschiede zwischen sehr schwach und sehr stark exprimierten Genen deutlich grösser als Faktor 100 sind. Zudem liegt bislang die untere Grenze der Nachweisgenauigkeit der Induktion bzw. Reprimierung bei Faktor zwei, so daß geringe Expressionsunterschiede nicht nachgewiesen werden können.

Dies sind vermutlich auch die Ursachen dafür, daß die meisten Gene mit veränderter Expression, die beim *Gene trapping* identifiziert wurden, bei den angewandten Signifikanzlimits nicht auch bei den Analysen mit *Microarrays* gefunden werden konnten. Eine retrospektive Einzelspotanalyse zeigte jedoch, daß die jeweils ca. zweifache UV-Induzierbarkeit der betroffenen Gene von den Transformanten #35 (*MRP8*) und #38 (*SDS24*), die beide mit ca. 20 Miller Units basal schon relativ stark exprimiert wurden, auch mit *Microarrays* gezeigt werden konnte. Selbst die Induktionsfaktoren waren hier mit 1,5 bzw. 2 ähnlich hoch wie beim *Gene trapping*, lagen aber im UV-*Microarray*-Experiment dennoch unterhalb der gewählten Ausschlußgrenze (Faktor 3 bzw. 4) für die Darstellung in Tabelle 9. Die niedrige basale Expression bei #82 (*YBR052C*) mit weniger als 0,5 Miller Units ist vermutlich die Ursache, daß selbst dieses im *Gene trapping* als stark induzierbar (Faktor 9) eingestufte Gen mit *Microarrays* nicht als signifikant verändert identifiziert wurde.

Eine weitere Ursache für mögliche Diskrepanzen beim Vergleich der mit beiden Techniken erzielten Ergebnisse liegt in der unterschiedlichen Art der Expressionsmessung. Bei der *Microarray* Technik wird letztlich die mRNA-Menge bestimmt, wohingegen beim *Gene trapping* die Aktivität eines Fusionsproteins bestimmt wird. Autoregulationsprozesse oder

## 5. Abschließende Diskussion und Ausblick

Regulationsmechanismen, die eine Stabilisierung der mRNA bewirken, werden daher bei der *Microarray* Technik registriert, wohingegen beim *Gene trapping* in Abhängigkeit vom Integrationsort zumindest eine Verzerrung gegenüber der natürlichen Regulation entstehen kann.

Unklar ist bislang (zumindest bei Verwendung der hier eingesetzten cDNA-*Microarrays*), inwieweit Kreuzhybridisierungen die Ergebnisse verfälschen können. Solche unspezifische Bindungen könnten gerade im Fall von niedrig exprimierten Genen eine Verfälschung der Expressionsmessung bewirken. Die von Affymetrix entwickelte Technik, bei der statt PCR-Produkten des gesamten Gens genspezifische Oligonukleotide eingesetzt werden, könnte diese Probleme durch geschickte Auswahl der Sequenzen minimieren. Auf den von Affymetrix hergestellten *Arrays* sind zudem als Kontrolle Oligonukleotide mit einer Basensubstitution aufgebracht, so daß die Spezifität der Hybridisierung geprüft werden kann. Daß aber auch diese Technik noch Schwächen aufweist, wird an folgendem Beispiel deutlich: Unter den zehn am stärksten induzierten Genen nach MMS-Behandlung fanden sich sowohl in dem von Jelinsky und Samson publizierten Datensatz wie auch in den hier vorgestellten Daten die zwei Leserahmen YNL335W und YFL061W. Beide Leserahmen haben eine Länge von 667 bp und sind bis auf eine einzige Base auf Nukleotidebene identisch. Daher sollte die Expression der beiden Gene fast nicht unterscheidbar sein. In der publizierten Arbeit ist aber für die Induzierbarkeit von YFL061W der Faktor 251, für YNL335W hingegen „nur“ der Faktor 10,3 angegeben. Daß diese Diskrepanz um einen Faktor von fast 25 auf einer einzigen Basensubstitution beruht, erscheint unwahrscheinlich. Auch in den hier gezeigten Experimenten sind die Induktionsfaktoren (Mittelwerte aus 2 Hybridisierungen) mit 42,4 und 79,7 nicht gleich hoch, der relative Unterschied zueinander ist mit Faktor zwei aber deutlich geringer.

### **5.3 BISHER IDENTIFIZIERTE GENE MIT VERÄNDERTER EXPRESSION**

Die, wenngleich in ihrem Umfang limitierte, Anwendung der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Hochdurchsatzverfahren ermöglichte die Identifizierung einer Reihe von Genen, deren Expression nach DNA-schädigender Behandlung verändert war. Darunter befanden sich einige Gene, für die eine strahleninduzierte Expressionsveränderung bereits bekannt war (z.B.

die *RNR*-Gene) oder, aufgrund der Genfunktionen in schadensabhängigen Regulationsprozessen bzw. Reparatur, vermutet war (z.B. *UBC13*, *DUN1*, *RAD53*). Für mehrere weitere Gene sind zwar Informationen über Funktionen der von ihnen kodierten Produkte verfügbar, aber sie wurden bisher nicht mit der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung in Verbindung gebracht. Inwieweit die hier gefundenen Expressionsveränderungen biologisch relevant sind, und ob sie spezifisch durch die DNA-Schädigungen verursacht wurden, muß in weiteren Untersuchungen (z.B. Expressionskinetiken unter Berücksichtigung des möglichen Einflusses von verändertem Wachstumsverhalten; phänotypische Untersuchung von Mutanten) geklärt werden. Dies gilt insbesondere für die große Anzahl von Stoffwechselgenen, die nach UV-C-Bestrahlung vermindert exprimiert erscheinen. Gerade bei basal stark transkribierten Genen ist es möglich, daß eine Inhibierung der RNA-Polymerase durch noch vorhandene DNA-Schäden zu einer augenscheinlich starken Verminderung der entsprechenden RNA-Menge führt. Desweiteren wurden verschiedene Gene bzw. offene Leserahmen als expressionsverändert identifiziert, über deren Funktion bislang gar nichts bekannt war. Auch hier sind natürlich weitergehende Untersuchungen zur Bestätigung der Relevanz dieser Daten nötig. Dennoch wird hier besonders die Bedeutung von Expressionstudien für die funktionelle Analyse bisher nicht-charakterisierter Gene deutlich.

Insbesondere unter Einsatz der *Microarray*-Technik können aber nicht nur einzelne expressionsveränderte Gene identifiziert und einer weiteren funktionellen Analyse zugänglich gemacht werden. Von entscheidender Bedeutung ist, daß mit dieser Technologie auch die umfassende Aufklärung von Regulationsnetzwerken möglich wird. So können z.B. Ko-Expressionsmuster benachbarter Gene entdeckt werden, wie es auch im Rahmen dieser Arbeit der Fall war. Dies, sowie generell die Sequenzanalyse der regulatorischen Elemente von Genen mit ähnlichem Expressionsmuster, wird die Identifizierung sogenannter *Stress responsive elements* erleichtern und zeigen, ob sich die expressionsveränderten Gene in bestimmte, eventuell z.T. schadensspezifische Antwortgruppen einteilen lassen. Zudem ist es mittels *Microarray*-Technik möglich, den Einfluß der Inaktivierung von bestimmten Kandidatengenen auf die Expressionsmuster zu testen, wodurch sich die an Schadenserkenkung und Signalweitergabe beteiligten Faktoren identifizieren lassen werden.

## 5. Abschließende Diskussion und Ausblick

Da *Microarray*- und *Gene trap* Verfahren Expressionsänderungen auf unterschiedlichen Regulationsebenen detektieren (mRNA-Menge bzw. Proteinmenge), können eventuell beobachtete Unterschiede zwischen den mit den beiden Methoden gefundenen Daten auch Rückschlüsse auf zugrunde liegende Regulationsmechanismen zulassen. Dies setzt jedoch voraus, daß Artefakte technischer Art ausgeschlossen werden können.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, C. C. and Workman, J. L. (1993). Nucleosome displacement in transcription. *Cell* **72**, 305-8.
- Ahne, F., Jha, B. and Eckardt-Schupp, F. (1997). The RAD5 gene product is involved in the avoidance of non-homologous end-joining of DNA double strand breaks in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* **25**, 743-9.
- Allen, J. B., Zhou, Z., Siede, W., Friedberg, E. C. and Elledge, S. J. (1994). The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast. *Genes Dev* **8**, 2401-15.
- Arbel, A., Zenvirth, D. and Simchen, G. (1999). Sister chromatid-based DNA repair is mediated by RAD54, not by DMC1 or TID1. *Embo Journal* **18**, 2648-58.
- Averbeck, D. and Averbeck, S. (1994). Induction of the genes RAD54 and RNR2 by various DNA damaging agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research* **315**, 123-38.
- Bender, K., Blattner, C., Knebel, A., Iordanov, M., Herrlich, P. and Rahmsdorf, H. J. (1997). UV-induced signal transduction. *Journal Of Photochemistry And Photobiology. B, Biology* **37**, 1-17.
- Boeke, J. D. and Chapman, K. B. (1991). Retrotransposition mechanisms. *Current Opinion In Cell Biology* **3**, 502-7.
- Bohm, S., Frishman, D. and Mewes, H. W. (1997). Variations of the C2H2 zinc finger motif in the yeast genome and classification of yeast zinc finger proteins. *nucleic acids research* **25**, 2464-9.
- Bradshaw, V. A. and McEntee, K. (1989). DNA damage activates transcription and transposition of yeast Ty retrotransposons. *Molecular And General Genetics* **218**, 465-74.
- Braiterman, L. T. and Boeke, J. D. (1994). Ty1 in vitro integration: effects of mutations in cis and in trans. *Molecular And Cellular Biology* **14**, 5731-40.
- Bryk, M., Banerjee, M., Murphy, M., Knudsen, K. E., Garfinkel, D. J. and Curcio, M. J. (1997). Transcriptional silencing of Ty1 elements in the RDN1 locus of yeast. *Genes And Development* **11**, 255-69.
- Carlberg, C. (1999). Lipid soluble vitamins in gene regulation. *Biofactors* **10**, 91-97.



- Cho, R. J., Campbell, M. J., Winzeler, E. A., Steinmetz, L., Conway, A., Wodicka, L., Wolfsberg, T. G., Gabrielian, A. E., Landsman, D., Lockhart, D. J. and Davis, R. W. (1998). A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *mol cell* **2**, 65-73.
- Clever, B., Schmuckli-Maurer, J., Sigrist, M., Glassner, B. J. and Heyer, W. D. (1999). Specific negative effects resulting from elevated levels of the recombinational repair protein Rad54p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**, 721-40.
- Cole, G. M. and Mortimer, R. K. (1989). Failure to induce a DNA repair gene, RAD54, in *Saccharomyces cerevisiae* does not affect DNA repair or recombination phenotypes. *Molecular And Cellular Biology* **9**, 3314-22.
- Cole, G. M., Schild, D., Lovett, S. T. and Mortimer, R. K. (1987). Regulation of RAD54- and RAD52-lacZ gene fusions in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage. *Molecular And Cellular Biology* **7**, 1078-84.
- Cole, G. M., Schild, D. and Mortimer, R. K. (1989). Two DNA repair and recombination genes in *Saccharomyces cerevisiae*, RAD52 and RAD54, are induced during meiosis. *Molecular And Cellular Biology* **9**, 3101-4.
- Colman, M. S., Afshari, C. and Barrett, C. (2000). Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress. *Mutat. Res.* **462**, 179-188.
- Derr, L. K., Strathern, J. N. and Garfinkel, D. J. (1991). RNA-mediated recombination in *S. cerevisiae*. *Cell* **67**, 355-64.
- Downs, J. A. and Jackson, S. P. (1999). Involvement of DNA end-binding protein Ku in Ty element retrotransposition. *Molecular And Cellular Biology* **19**, 6260-8.
- Drexler, G. (1998). Molekulare Charakterisierung des rad5-7 Allels, das DNA-Reparaturdefizienz in *Saccharomyces cerevisiae* verursacht, Ludwig-Maximilians-Universität.
- Duggan, D. J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. and Trent, J. M. (1999). Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genetics supplement* **21**, 10-14.
- Eckardt-Schupp, F. and Klaus, C. (1999). Radiation inducible DNA repair processes in eukaryotes. *Biochimie* **81**, 161-71.
- Elledge, S. J. and Davis, R. W. (1989). Identification of the DNA damage-responsive element of RNR2 and evidence that four distinct cellular factors bind it. *Molecular And Cellular Biology* **9**, 5373-86.

- Elledge, S. J., Zhou, Z., Allen, J. B. and Navas, T. A. (1993). DNA damage and cell cycle regulation of ribonucleotide reductase. *Bioessays* **15**, 333-9.
- Endo-Ichikawa, Y., Kohno, H., Furukawa, T., Ueda, T., Ogawa, Y., Tokunaga, R. and Taketani, S. (1996). Requirement of multiple DNA-protein interactions for inducible expression of RNR3 gene in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage. *Biochemical And Biophysical Research Communications* **222**, 280-6.
- Fantino, E., Marguet, D. and Lauquin, G. J. (1992). Downstream activating sequence within the coding region of a yeast gene: specific binding in vitro of RAP1 protein. *Molecular And General Genetics* **236**, 65-75.
- Farabaugh, P. J. and Fink, G. R. (1980). Insertion of the eukaryotic transposable element Ty1 creates a 5-base pair duplication. *Nature* **286**, 352-6.
- Featherstone, C. and Jackson, S. P. (1999). Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions? *Mutation Research* **434**, 3-15.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* , 6-13.
- Feldmann, H. and Winnacker, E. L. (1993). A putative homologue of the human autoantigen Ku from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Of Biological Chemistry* **268**, 12895-900.
- Fellerhoff, B. (1999). Die Rolle des *HDF1*-Gens für die Stabilität des Hefegenoms, Ludwig-Maximilians-Universität.
- Fenech, M., Carr, A. M., Murray, J., Watts, F. Z. and Lehmann, A. R. (1991). Cloning and characterization of the rad4 gene of *Schizosaccharomyces pombe*; a gene showing short regions of sequence similarity to the human XRCC1 gene. *nucleic acids research* **19**, 6737-41.
- Fichter, S. (1999). Vergleich der Transkriptmengen verschiedener Reparaturgene nach DNA-Schädigung in Wildtyp und *rad5*-Mutanten der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit Hilfe der RT-PCR, Ludwig-Maximilians-Universität.
- Finnegan, D. J. (1997). Transposable elements: how non-LTR retrotransposons do it. *Current Biology* **7**, R245-8.
- Forrester, L. M., Nagy, A., Sam, M., Watt, A., Stevenson, L., Bernstein, A., Joyner, A. L. and Wurst, W. (1996). An induction gene trap screen in embryonic stem cells: Identification of genes that respond to retinoic acid *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1677-1682.

- Frankenberg-Schwager, M., Frankenberg, D., Blöcher, D. and Adamczyk, C. (1980). Repair of DNA double-strand breaks in irradiated yeast cells under nongrowth conditions. *Radiation Research* **82**, 498-510.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C. and Siede, W. (1995). *DNA repair and mutagenesis*. ASM Press.
- Friedl, A. A. (1994). Entwicklung von Simulationsmethoden und deren Anwendung zur quantitativen Analyse von DNA-Doppelstrangbrüchen in niederen und höheren Eukaryonten., Ludwig-Maximilians-Universität.
- Friedl, A. A., Beisker, W., Hahn, K., Eckardt-Schupp, F. and Kellerer, A. M. (1993). Application of pulsed field gel electrophoresis to determine gamma-ray-induced double-strand breaks in yeast chromosomal molecules. *International Journal Of Radiation Biology* **63**, 173-81.
- Friedl, A. A., Kiechle, M., Fellerhoff, B. and Eckardt-Schupp, F. (1998). Radiation-induced chromosome aberrations in *Saccharomyces cerevisiae*: influence of DNA repair pathways. *Genetics* **148**, 975-88.
- Gafner, J. and Philippsen, P. (1980). The yeast transposon Ty1 generates duplications of target DNA on insertion. *Nature* **286**, 414-8.
- Gailit, J. (1990). Identification of proteins whose synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* is induced by DNA damage and heat shock. *International Journal Of Radiation Biology* **57**, 981-92.
- Game, J. C. (1983). Radiation-sensitive mutants and repair in yeast in Spencer, J. F. T., Spencer, D.M., Smith, A.R.W. (Ed), *Yeast Genetics: Fundamental and Applied Aspects*, Axel Springer Verlag, pp. 109-137.
- Gellert, M. (1992). Molecular analysis of V(D)J recombination. *annual review of genetics* **26**, 425-46.
- Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R. A. and Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research* **20**, 1425.
- Gietz, R. D. and Schiestl, R. H. (1995). Transforming yeast with DNA. *Methods in Molecular and Cellular Biology* **5**, 255-269.
- Gray, N. S., Wodicka, L., Thunnissen, A. M., Norman, T. C., Kwon, S., Espinoza, F. H., Morgan, D. O., Barnes, G., LeClerc, S., Meijer, L., Kim, S. H., Lockhart, D. J. and Schultz, P. G. (1998). Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *science* **281**, 533-8.

- Hajjar, A. M. and Linial, M. L. (1993). A model system for nonhomologous recombination between retroviral and cellular RNA. *Journal Of Virology* **67**, 3845-53.
- Herrlich, P. and Rahmsdorf, H. J. (1994). Transcriptional and post-transcriptional responses to DNA-damaging agents. *Current Opinion In Cell Biology* **6**, 425-31.
- Hill, D. P. and Wurst, W. (1993a). Gene and enhancer trapping: mutagenic strategies for developmental studies. *current topics in developmental biology* **28**, 181-206.
- Hill, D. P. and Wurst, W. (1993b). Screening for novel pattern formation genes using gene trap approaches. *Methods In Enzymology* **225**, 664-81.
- Ho, K. S. (1975). Induction of DNA double-strand breaks by X-rays in a radiosensitive strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research* **30**, 327-34.
- Hoffman, C. S. and Winston, F. (1987). A ten minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia Coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Huang, M. and Elledge, S. J. (1997). Identification of RNR4, encoding a second essential small subunit of ribonucleotide reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *molecular and cellular biology* **17**, 6105-13.
- Hurd, H. K. and Roberts, J. W. (1989). Upstream regulatory sequences of the yeast RNR2 gene include a repression sequence and an activation site that binds the RAP1 protein. *Molecular And Cellular Biology* **9**, 5359-72.
- Ivanov, E. L., Sugawara, N., Fishman-Lobell, J. and Haber, J. E. (1996). Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **142**, 693-704.
- Jackson, J. A. and Fink, G. R. (1981). Gene conversion between duplicated genetic elements in yeast. *Nature* **292**, 306-11.
- Jelinsky, S. A. and Samson, L. D. (1999). Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **96**, 1486-91.
- Jessberger, R., Podust, V., Hubscher, U. and Berg, P. (1993). A mammalian protein complex that repairs double-strand breaks and deletions by recombination. *journal of biological chemistry* **268**, 15070-9.
- Johnston, L. H. and Johnson, A. L. (1995). The DNA repair genes RAD54 and UNG1 are cell cycle regulated in budding yeast but MCB promoter elements have no essential role in the DNA damage response. *Nucleic Acids Research* **23**, 2147-52.

- Jordan, I. K. and McDonald, J. F. (1998). Evidence for the role of recombination in the regulatory evolution of *Saccharomyces cerevisiae* Ty elements. *Journal Of Molecular Evolution* **47**, 14-20.
- Jordan, I. K. and McDonald, J. F. (1999). The role of interelement selection in *Saccharomyces cerevisiae* Ty element evolution. *J Mol Evol* **47**, 14-20.
- Kaback, D. B. and Feldberg, L. R. (1985). *Saccharomyces cerevisiae* exhibits a sporulation-specific temporal pattern of transcript accumulation. *Molecular And Cellular Biology* **5**, 751-61.
- Kanaar, R., Troelstra, C., Swagemakers, S. M. A., Essers, J., Smit, B., Franssen, J. H., Pastink, A., Bezzubova, O. Y., Buerstedde, J. M., Clever, B., Heyer, W. D. and Hoeijmakers, J. H. J. (1996). Human and mouse homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD54 DNA repair gene: Evidence for functional conservation. *Current Biology* **6**, 828-838.
- Kiechle, M., Friedl, A. A., Palaniyandi, M., Eckardt-Schupp, F. and Schiestl, R. H. (2000). DNA integration by Ty integrase in *yku70* mutant *Saccharomyces cerevisiae* cells. *submitted*.
- Kim, J. M., Vanguri, S., Boeke, J. D., Gabriel, A. and Voytas, D. F. (1998). Transposable elements and genome organization: a comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome Research* **8**, 464-78.
- Kovacech, B., Nasmyth, K. and Schuster, T. (1996). EGT2 gene transcription is induced predominantly by Swi5 in early G1. *molecular and cellular biology* **16**, 3264-74.
- Kruglyak, S. and Tang, H. (2000). Regulation of adjacent yeast genes. *Trends Genet.* **16**, 109-11.
- Lander, E. S. (1999). Array of hope. *Nature Genetics Supplement* **21**, 3-4.
- Lauerman, V. (1997). DNA repair by recycling reverse transcripts [letter; comment]. *Nature* **386**, 31-2.
- Lederberg, E. M. and Cohen, S. N. (1974). Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal Of Bacteriology* **119**, 1072-4.
- Lewin, B. (2000). *Genes VII*. Oxford University Press.
- Liebhaber, S. A. (1997). mRNA stability and the control of gene expression. *nucleic acids symposium series*, 29-32.

- Liefshitz, B., Steinlauf, R., Friedl, A., Eckardt-Schupp, F. and Kupiec, M. (1998). Genetic interactions between mutants of the 'error-prone' repair group of *Saccharomyces cerevisiae* and their effect on recombination and mutagenesis. *mutation research* **407**, 135-45.
- Lipshutz, R. J., Fodor, S. P. A., Gingeras, T. R. and Lockhart, D. J. (1999). High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature Genetics supplement* **21**, 20-24.
- Lustig, A. J. (1998). Mechanisms of silencing in *Saccharomyces cerevisiae* [published erratum appears in *Curr Opin Genet Dev* 1998 Dec;8(6):721]. *Current Opinion In Genetics And Development* **8**, 233-9.
- Madura, K. and Prakash, S. (1990). The *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD2 is regulated in meiosis but not during the mitotic cell cycle. *Molecular And Cellular Biology* **10**, 3256-7.
- Maga, J. A., McClanahan, T. A. and McEntee, K. (1986). Transcriptional regulation of DNA damage responsive (DDR) genes in different rad mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular And General Genetics* **205**, 276-84.
- Malone, R. E. and Esposito, R. E. (1980). The RAD52 gene is required for homothallic interconversion of mating types and spontaneous mitotic recombination in yeast. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **77**, 503-7.
- Manivasakam, P. and Schiestl, R. H. (1998). Nonhomologous end joining during restriction enzyme-mediated DNA integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular And Cellular Biology* **18**, 1736-45.
- Mao-Draayer, Y., Galbraith, A. M., Pittman, D. L., Cool, M. and Malone, R. E. (1996). Analysis of meiotic recombination pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **144**, 71-86.
- McClanahan, T. and McEntee, K. (1984). Specific transcripts are elevated in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage. *Molecular And Cellular Biology* **4**, 2356-63.
- McClanahan, T. and McEntee, K. (1986). DNA damage and heat shock dually regulate genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular And Cellular Biology* **6**, 90-6.
- Mewes, H. W., Albermann, K., Bahr, M., Frishman, D., Gleissner, A., Hani, J., Heumann, K., Kleine, K., Maierl, A., Oliver, S. G., Pfeiffer, F. and Zollner, A. (1997). Overview of the yeast genome [published erratum appears in *Nature* 1997 Jun 12;387(6634):737]. *nature* **387**, 7-65.

- Mezard, C. and Nicolas, A. (1994). Homologous, homeologous, and illegitimate repair of double-strand breaks during transformation of a wild-type strain and a rad52 mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular And Cellular Biology* **14**, 1278-92.
- Mieczkowski, P. A., Fikus, M. U. and Ciesla, Z. (1997). Characterization of a novel DNA damage-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*, DIN7, which is a structural homolog of the RAD2 and RAD27 DNA repair genes. *Molecular & General Genetics* **253**, 655-665.
- Milne, G. T., Jin, S., Shannon, K. B. and Weaver, D. T. (1996). Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular And Cellular Biology* **16**, 4189-98.
- Moore, J. K. and Haber, J. E. (1996). Capture of retrotransposon DNA at the sites of chromosomal double-strand breaks [see comments]. *Nature* **383**, 644-6.
- Moore, P. A., Ruben, S. M. and Rosen, C. A. (1993). Conservation of transcriptional activation functions of the NF-kappa B p50 and p65 subunits in mammalian cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *molecular and cellular biology* **13**, 1666-74.
- Moore, S. P., Powers, M. and Garfinkel, D. J. (1995). Substrate specificity of Ty1 integrase. *Journal Of Virology* **69**, 4683-92.
- Mules, E. H., Uzun, O. and Gabriel, A. (1998). In vivo Ty1 reverse transcription can generate replication intermediates with untidy ends. *Journal Of Virology* **72**, 6490-503.
- Noolandi, J. (1992). Polymer dynamics in electrophoresis of DNA. *Annual Review Of Physical Chemistry* **43**, 237-56.
- Paesi-Toresan, S. O., Maris, A. F., Brendel, M. and Henriques, J. A. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* gene PSO5/RAD16 is involved in the regulation of DNA damage-inducible genes RNR2 and RNR3. *Current Genetics* **34**, 124-7.
- Ptashne, M. and Gann, A. (1997). Transcriptional activation by recruitment. *Nature* **386**, 569-77.
- Rhodes, D. and Klug, A. (1993). Zinc fingers. *scientific american* **268**, 56-9, 62-5.
- Robinson, G. W., Nicolet, C. M., Kalainov, D. and Friedberg, E. C. (1986). A yeast excision-repair gene is inducible by DNA damaging agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 1842-6.
- Rolfe, M. (1985). UV-inducible proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* **9**, 529-32.

- Rolfe, M., Spanos, A. and Banks, G. (1985). Induction of yeast Ty element transcription by ultraviolet light. *Nature* **319**, 339-340.
- Roth, D. and Wilson, J. (1989). Illegitimate recombination in mammalian cells in Kucherlapati, R. and Smith, G. R. (Eds), *Genetic Recombination*, Am. Soc. of Microbiology, pp. 621-653.
- Rotwein, P., Bichell, D. P. and Kikuchi, K. (1993). Multifactorial regulation of IGF-I gene expression. *molecular reproduction and development* **35**, 358-63; discussion 363-4.
- Ruby, S. W. and Szostak, J. W. (1985). Specific *Saccharomyces cerevisiae* genes are expressed in response to DNA-damaging agents. *Molecular And Cellular Biology* **5**, 75-84.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. edition edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez, Y., Desany, B. A., Jones, W. J., Liu, Q., Wang, B. and Elledge, S. J. (1996). Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science* **271**, 357-360.
- Scheinert, P., Behrens, B. and Kahle, B. (1995). Optimierung von DNA-Amplifikations-Protokollen. *Biospektrum* **5**, 53-63.
- Schiestl, R. H., Dominska, M. and Petes, T. D. (1993). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* with nonhomologous DNA: illegitimate integration of transforming DNA into yeast chromosomes and in vivo ligation of transforming DNA to mitochondrial DNA sequences. *Molecular And Cellular Biology* **13**, 2697-705.
- Schiestl, R. H. and Petes, T. D. (1991). Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **88**, 7585-9.
- Schiestl, R. H., Zhu, J. and Petes, T. D. (1994). Effect of mutations in genes affecting homologous recombination on restriction enzyme-mediated and illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular And Cellular Biology* **14**, 4493-500.
- Sebastian, J., Kraus, B. and Sancar, G. B. (1990). Expression of the yeast PHR1 gene is induced by DNA-damaging agents. *Molecular And Cellular Biology* **10**, 4630-7.



- Shalon, D., Smith, S. J. and Brown, P. O. (1996). A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *genome research* **6**, 639-45.
- Siede, W. and Friedberg, E. C. (1992). Regulation of the yeast RAD2 gene: DNA damage-dependent induction correlates with protein binding to regulatory sequences and their deletion influences survival. *Molecular And General Genetics* **232**, 247-56.
- Siede, W., Friedl, A. A., Dianova, I., Eckardt-Schupp, F. and Friedberg, E. C. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* Ku autoantigen homologue affects radiosensitivity only in the absence of homologous recombination. *Genetics* **142**, 91-102.
- Siede, W., Robinson, G. W., Kalainov, D., Malley, T. and Friedberg, E. C. (1989). Regulation of the RAD2 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **3**, 1697-707.
- Skarnes, W. C. (1993). The identification of new genes: gene trapping in transgenic mice. *current opinion in biotechnology* **4**, 684-9.
- Smith, J. S. and Boeke, J. D. (1997). An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes And Development* **11**, 241-54.
- Southern, E. M. (1974). An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose. *Analytical Biochemistry* **62**, 317-8.
- Struhl, K., Kadosh, D., Keaveney, M., Kuras, L. and Moqtaderi, Z. (1998). Activation and repression mechanisms in yeast. *cold spring harbor symposia on quantitative biology* **63**, 413-21.
- Svaren, J. and Hörz, W. (1996). Regulation of gene expression by nucleosomes. *Current Opinion In Genetics And Development* **6**, 164-70.
- Tang, X., Nakata, Y., Li, H. O., Zhang, M., Gao, H., Fujita, A., Sakatsume, O., Ohta, T. and Yokoyama, K. (1994). The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E. coli*. *Nucleic Acids Research* **22**, 2857-8.
- Temin, H. M. (1993). Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **90**, 6900-3.
- Teng, S. C., Kim, B. and Gabriel, A. (1996). Retrotransposon reverse-transcriptase-mediated repair of chromosomal breaks [see comments]. *Nature* **383**, 641-4.
- Van Dyck, E., Stasiak, A. Z., Stasiak, A. and West, S. C. (1999). Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein [see comments]. *nature* **398**, 728-31.

- Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R. and Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 1793-808.
- Wendel, S. (1990). Molekulare Analyse der *REV2*-kontrollierten Mutagenese und Reparatur in Hefe, Ludwig-Maximilians-Universität.
- West, A. H., Clark, D. J., Martin, J., Neupert, W., Hartl, F. U. and Horwich, A. L. (1992). Two related genes encoding extremely hydrophobic proteins suppress a lethal mutation in the yeast mitochondrial processing enhancing protein. *Journal Of Biological Chemistry* **267**, 24625-33.
- Wilhelm, M., Boutabout, M., Heyman, T. and Wilhelm, F. X. (1999). Reverse transcription of the yeast Ty1 retrotransposon: the mode of first strand transfer is either intermolecular or intramolecular. *Journal Of Molecular Biology* **288**, 505-10.
- Winston, F., Durbin, K. J. and Fink, G. R. (1984). The SPT3 gene is required for normal transcription of Ty elements in *S. cerevisiae*. *Cell* **39**, 675-82.
- Xiao, W., Singh, K. K., Chen, B. and Samson, L. (1993). A common element involved in transcriptional regulation of two DNA alkylation repair genes (MAG and MGT1) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**, 7213-21.
- Yanofsky, C. (2000). Transcription attenuation: once viewed as a novel regulatory strategy. *J Bacteriol.* **182**, 1-8.
- Yanofsky, C., Konan, K. V. and Sarsero, J. P. (1996). Some novel transcription attenuation mechanisms used by bacteria. *biochimie* **78**, 1017-24.
- Zhou, Z. and Elledge, S. J. (1992). Isolation of crt mutants constitutive for transcription of the DNA damage inducible gene RNR3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **131**, 851-66.
- Zhou, Z. and Elledge, S. J. (1993). DUN1 encodes a protein kinase that controls the DNA damage response in yeast. *Cell* **75**, 1119-27.
- Zhu, J. and Schiestl, R. H. (1996). Topoisomerase I involvement in illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular And Cellular Biology* **16**, 1805-12.

## Anhang

### Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cDNA	copy DNA
Ci	Curie (1 Ci = $3.7 \times 10^{10}$ Becquerel)
CPRG	Chloro-Phenol-Red-Galaktopyranosid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat-Gemisch
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
g	Gramm
Gy	Gray
h	Stunde
HR	Homologe Rekombination
HU	Hydroxy-Harnstoff
IR	Illegitime Rekombination
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LHR	liquid holding recovery
log.	logarithmisch

Lsg	Lösung
M	Molar (Mol pro Liter)
m	milli-
mA	Milliampere
mg	Milligramm
μ	micro
MCS	engl. multiple cloning site
min	Minuten
MMS	Methylmethansulfonat
MW	Molekulargewicht
NaAc	Natriumacetat
n	nano-
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NHEJ	Nichthomologe Endverknüpfung (engl. non-homologous end joining)
NHI	Nichthomologe Integration
OD	Optische Dichte
pbs	Primer-Binde-Stelle (engl. primer binding site)
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1
PCR	Polymerasekettenreaktion
p	pico
RACE	engl. rapid amplification of cDNA ends
REMI	Restriktions-Enzym vermittelte Interation (engl. restriction enzyme mediated integration)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase oder Raumtemperatur
SCE	Schwesterchromatid Austausch (engl. sister chromatid exchange)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden

---

ssA	Einzelstrangverknüpfung (engl. single strand annealing)
SSC	Standard Saline Citrat
stat.	stationär
Tab	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
UAS	Stromaufwärts gelegene aktivierende Sequenz (engl. upstream activating sequence)
ÜK	Übernachtskultur
URS	Stromaufwärts gelegene reprimierende Sequenz (engl. upstream repressing sequence)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VM	Vollmedium
VLP	Viren-ähnlicher Partikel (engl. virus like particle)
Vol	Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
YPD	Hefe-Vollmedium

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zwei neue Verfahren zur Identifizierung induzierbarer Gene in Hefe etabliert und angewendet. Es konnte gezeigt werden, daß die Effizienz der illegitimen Integration, auf der das *Gene trap* Verfahren basiert, durch  $\gamma$ -Bestrahlung kurz nach der Transformation um das zwanzigfache gesteigert werden kann. Durch Untersuchung der illegitimen Integration in Mutantenstämmen wurde gezeigt, daß das retrotransposable Enzym Integrase in Abwesenheit eines funktionellen Ku-Proteins bei über 90% der Integrationsfälle beteiligt ist, was bislang noch nie in Wildtypzellen beobachtet wurde. Offenbar schützt das Ku-Protein Zellen vor der Aufnahme von Fremd-DNA durch Integrase und limitiert somit die genomische Integration nicht-homologer DNA durch Ty-Integrase auf cDNA Moleküle. Die Durchführung des *Gene trapping* führte zur Identifizierung von neun Genen mit veränderter Expression nach UV-Bestrahlung. Zur näheren Charakterisierung der Genfunktionen wurden einige phänotypische Untersuchungen durchgeführt. Mit der *Microarray* Technik wurde die Auswirkung verschiedener Strahlenarten (UV-C,  $\gamma$ , p, C<sup>6+</sup>) auf die Expression aller Hefegene untersucht. UV-Strahlung bewirkte dabei eine deutlich stärkere Veränderung des Expressionsprofils als alle verwendeten ionisierenden Strahlenarten (bei äquivalenten Dosen). Eine Reihe von transkriptionell stärker veränderten Genen wurde identifiziert, von denen erst in wenigen Fällen ein Zusammenhang mit der Tolerierung von DNA-Schädigung bekannt war. Die Untersuchung des Expressionsprofils nach Behandlung der Zellen mit MMS zeigte, daß bei einigen der stark induzierten Gene (Faktor 10-70) ein auf dem Chromosom benachbartes Gen ähnlich hohe Transkriptmengen aufwies, was auf eine Koregulierung stark induzierter Gene hindeutet.

## Lebenslauf

Name	Markus Kiechle
Geburtsdatum	10.09.1969
Geburtsort	München
Schulbildung	
1975-1979	Grundschule Garching Ost
1979-1989	Werner-Heisenberg-Gymnasium Garching Abschluß mit allgemeiner Hochschulreife
Wehrdienst	
1989-1990	Ableistung des Grundwehrdienstes in Bad Bergzabern und München
Hochschulausbildung	
1990-1996	Studium für Lehramt an Gymnasien Fachrichtung Biologie / Chemie
November 1996	Abschluß mit 1. Staatsexamen
März 1997- Mai 2000	Promotion bei Frau Prof. Dr. F. Eckardt-Schupp Institut für Strahlenbiologie GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit