Neue Funktionen von Xrs2 für die Aufrechterhaltung genomischer Stabilität in der Hefe *S. cerevisiae*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
an der Ludwig-Maximilian-Universität München

Vorgelegt von
Sylvia Steininger
Januar 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Eckardt-Schupp

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Leonhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 2009

Die vorliegende Dissertation wurde von Dezember 2005 bis Januar 2009 unter der Leitung von Frau Prof. Dr. F. Eckardt-Schupp am Helmholtz Zentrum München im Institut für Strahlenbiologie angefertigt. Ein wesentlicher Teil der Arbeit wurde in folgender Publikation veröffentlicht:

Steininger, S., Gomez-Paramio, I., Braselmann, H., Fellerhoff, B., Dittberner, D., Eckardt-Schupp, F. und Mörtl, S. (2008). Xrs2 facilitates crossovers during DNA double-strand gap repair in yeast. *DNA Repair (Amst)* **7,** 1563-77.

INHALTSVERZEICHNIS:

1 ZUSAMMENFASSUNG 1

2 EINLEITUNG 3
2.1 Bedeutung von DNA-Schäden 3
2.2 DNA-Reparaturprozesse 4
2.2.1 Doppelstrangbruchreparatur 5
2.2.1.1 Erkennung des DSB 5
2.2.1.2 Homologie-unabhängige Reparatur 6
2.2.1.3 Homologe Rekombination 7
2.2.1.4 Regulation von DSB-Reparaturmechanismen 9
2.2.2 Basenexcisionsreparatur 11
2.3 Apoptose 14
2.4 Das Xrs2-Protein und der MRX-Komplex 17
2.4.1 Aufbau des MRX-Komplexes 17
2.4.2 Funktionen des MRX-Komplexes 19
2.5 Zielsetzung 21

3 MATERIAL UND METHODEN 22
3.1 Material 22
3.1.1 Geräte und Computerprogramme 22
3.1.1.1 Geräte 22
3.1.1.2 Computerprogramme 22
3.1.2 Chemikalien 23
3.1.3 Verwendete Puffer und Lösungen 24
3.1.4 Enzyme, Längenstandards und Kits 27
3.1.5 Medien und Stämme 28
3.1.5.1 Hefe 28
3.1.5.2 Bakterien 31
3.1.6 Oligonukleotide 32
3.1.6.1 Oligonukleotide zur Generierung von Deletionsmutanten 32
3.1.6.2 Oligonukleotide zur Überprüfung von Gendeletionen 33
3.1.6.3 Oligonukleotide für die Konstruktion des Vektors YIpXRS2 33
3.1.6.4 Oligonukleotide zur Überprüfung eines Crossover-Ereignisses 33
3.1.6.5 Oligonukleotide für *in vitro*-BER-Analysen 34
3.1.7 Vektoren 34
3.1.7.1 Vektoren zur Amplifizierung von Marker-Kassetten für Genaustausch 34

3.1.7.2 Vektor für die *NTG2*-Gendisruption ... 35
3.1.7.3 Vektoren für die Konstruktion von Mutanten mit verkürzten *XRS2*-Allelen 36
3.1.7.4 Vektor zur Analyse der Reparatur von Mikrodeletionen in *S. cerevisiae* ... 37
3.2 Methoden ... 38
3.2.1 Mikrobiologische Methoden ... 38
3.2.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen zur Transformation ... 38
3.2.1.2 Transformation von *E. coli*-Zellen mittels Hitzeschock ... 38
3.2.1.3 Flüssigkultur zur Anzucht und Plasmidpräparation von *E. coli* ... 39
3.2.1.4 Anlegen von Gefrierkulturen ... 39
3.2.2 Molekularbiologische Methoden ... 39
3.2.2.1 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration ... 39
3.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ... 40
3.2.2.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen ... 40
3.2.2.4 Reinigung von PCR-Produkten bzw. Restriktionsansätzen ... 41
3.2.2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten ... 41
3.2.2.6 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen ... 42
3.2.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (Miniprep) ... 43
3.2.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA in großem Maßstab (Midiprep) ... 43
3.2.2.9 Präzipitation von DNA ... 44
3.2.2.10 Klonierung ... 44
3.2.2.10.1 Ligation von Restriktionsfragmenten mit Vektoren ... 44
3.2.2.10.2 Religation von Plasmid-DNA ... 44
3.2.3 Zellbiologische Methoden mit *S. cerevisiae* ... 45
3.2.3.1 Hefezellkultur ... 45
3.2.3.2 Zellzahlbestimmung bei Hefen ... 45
3.2.3.3 Herstellung einer Hefezellgefrierkultur ... 45
3.2.3.4 Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe ... 46
3.2.3.5 Transformation von Hefezellen ... 46
3.2.4 Bestimmung des Zellüberlebens ... 47
3.2.4.1 Anzucht ... 47
3.2.4.2 Behandlung mit verschiedenen DNA-schädigenden Agenzien ... 48
3.2.4.2.1 ^{60}Co-γ-Bestrahlung ... 48
3.2.4.2.2 MMS-Behandlung ... 48
3.2.4.2.3 H_2O_2-Behandlung ... 48
3.2.4.3 Auswertung ... 49
3.2.5 Analyse chromosomaler DSB und hitze-labiler Stellen ... 49
3.2.5.1 Anzucht, Behandlung und LHR-Inkubation ... 49

3.2.5.2 Präparation chromosomaler DNA in Agaroseblöckchen 50
3.2.5.3 Pulsfeld-Gelelektrophorese 50
3.2.5.4 Auswertung 51
3.2.6 Analyse der Reparatur von Mikrodeletionen 52
3.2.7 Analyse des Apoptoseverhaltens 54
3.2.7.1 Anzucht und H_2O_2-Behandlung 54
3.2.7.2 Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) 55
3.2.7.3 Quantifizierung apoptotischer Zellen mittels Annexin V-Färbung 55
3.2.8 Bestimmung der Mutationsfrequenz 56
3.2.9 Analyse der Basenexcisionsreparatur *in vitro* 57
3.2.9.1 Aufbereitung von zellfreien Proteinextrakten 57
3.2.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford 57
3.2.9.3 Substratvorbereitungen für *in vitro*-Versuche 58
3.2.9.3.1 Radioaktive Markierung der 5´-Enden 58
3.2.9.3.2 Annealing der Oligonukleotide 59
3.2.9.4 *In vitro*-Versuche 59
3.2.9.4.1 Bestimmung der BER-Effizienz 59
3.2.9.4.2 Analyse des Incision-Schritt 60
3.2.9.4.3 Untersuchung der Strang-Elongation 60

4 ERGEBNISSE 61
4.1 Empfindlichkeit der *xrs2*-Mutante gegenüber DNA-schädigen-den Agenzien 61
4.2 Einfluss von Xrs2 auf die Apoptose 62
4.2.1 Quantifizierung des oxidativen Stress 62
4.2.2 Analyse apoptotischer Zellen mittels Annexin V-Färbung 64
4.3 Einfluss von Xrs2 auf die DSB-Reparatur 66
4.3.1 Analyse der chromosomalen DSB-Reparatur 66
4.3.1.1 Strahlenempfindlichkeit von MRX-Mutanten 67
4.3.1.2 Quantifizierung der DSB-Reparatur mittels PFGE 68
4.3.2 Analyse der Reparatur von Mikrodeletionen 70
4.3.2.1 Bestimmung der Reparatureffizienz und -genauigkeit 71
4.3.2.2 Quantifizierung von Crossover-Ereignissen 73
4.3.3 Einfluss funktioneller Domänen des Xrs2-Proteins auf die DSB-Reparatur 75
4.3.3.1 Analyse der chromosomalen DSB-Reparatur 75
4.3.3.2 Analyse der Reparatur von Mikrodeletionen 77
4.3.4 Epistasisanalysen von *XRS2* mit *SRS2* und *SGS1* 78
4.3.4.1 Analyse der Strahlenempfindlichkeit 78

4.3.4.2 Analyse der Reparatur von Mikrodeletionen ... 79
4.4 Einfluss von Xrs2 auf die Basenexcisionsreparatur ... 81
4.4.1 Bestimmung der Mutationsfrequenz und der MMS-Empfindlichkeit ... 81
4.4.2 Analyse der Reparatur von hitze-labilen Stellen ... 83
4.4.3 Analyse der Basenexcisionsreparatur *in vitro* ... 87
4.4.4 Untersuchungen zur Rolle des MRX-Komplexes in der Basen-excisionsreparatur ... 90
4.4.4.1 Bestimmung der MMS-Empfindlichkeit ... 90
4.4.4.2 Analyse der Basenexcisionsreparatur *in vitro* ... 91
4.4.5 Epistasisanalysen von *XRS2* mit unterschiedlichen BER-Genen ... 92
4.4.5.1 Bestimmung der MMS-Empfindlichkeit ... 93
4.4.5.2 Analyse der Basenexcisionsreparatur *in vitro* ... 94
4.4.6 Analyse der Rolle von Xrs2 im BER-Mechanismus ... 95
4.4.6.1 Untersuchung des *Incision*-Schrittes ... 95
4.4.6.2 Untersuchung der Strang-Elongation ... 96

5 DISKUSSION ... 99
5.1 Rolle von Xrs2 in der Apoptose ... 100
5.1.1 Geringe Apoptose-Induktion in WT-Zellen ... 100
5.1.2 Xrs2 hat keinen Einfluss auf die Apoptose ... 101
5.2 Rolle von Xrs2 in der DSB-Reparatur ... 102
5.2.1 Deletion von *XRS2* reduziert die DSB-Reparatureffizienz ... 103
5.2.2 WT und MRX-defiziente Zellen bevorzugen HR ... 104
5.2.3 Xrs2 fördert die Crossover-Bildung in einer frühen Phase der HR ... 105
5.2.4 Beeinflusst der MRX-Komplex die Crossover-Bildung über die *Checkpoint*-Aktivierung? ... 107
5.2.5 Beeinflusst der MRX-Komplex die Crossover-Bildung über die Endenprozessierung? ... 109
5.3 Rolle von Xrs2 in der Basenexcisionsreparatur ... 111
5.3.1 Xrs2 ist direkt in die BER involviert ... 113
5.3.2 Xrs2 aktiviert die BER *downstream* von Ntg1 und Ntg2 ... 114
5.3.3 Xrs2 arbeitet in der BER zusammen mit seinen Komplexpartnern ... 117
5.3.4 Fördert der MRX-Komplex die BER über die Rekrutierung weiterer Reparaturfaktoren? ... 118

6 LITERATURVERZEICHNIS ... 120

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ... 132

1 Zusammenfassung

Der MRX-Komplex in *S. cerevisiae* ist für viele zelluläre Mechanismen zur Aufrechterhaltung genomischer Integrität wichtig. Da die *xrs2*-Deletionsmutante nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien eine starke Reduktion des Zellüberlebens aufweist, wurden in dieser Arbeit die Funktionen des Komplexes und speziell von Xrs2 bezüglich der Apoptose, der DSB-Reparatur und der Basenexcisionsreparatur untersucht. Während bereits bekannt ist, dass der MRX-Komplex einige Funktionen in verschiedenen DSB-Reparaturwegen übernimmt, wurden für die Apoptose und die Basenexcisionsreparatur noch keine Beteiligungen des Komplexes beschrieben.

Für das Homolog von Xrs2 in Säugerzellen (Nbs1) konnte gezeigt werden, dass das Protein in der strahlen-induzierten Apoptose eine Rolle spielt. Daher wurde in dieser Arbeit das Apoptoseverhalten der *xrs2*-Deletionsmutante näher untersucht. Die Apoptoseinduktion nach H_2O_2 wurde mit zwei verschiedenen Methoden gemessen, die beide keinen Unterschied zwischen WT und der *xrs2*-Mutante ergaben. Xrs2 hat somit keine bedeutende Rolle für die Apoptose in Hefe. Da jedoch die Induktion von Apoptose in WT-Zellen sehr gering war, bleiben Zweifel, ob die detektierten Merkmale tatsächlich auf Apoptose zurückzuführen sind.

Es konnte gezeigt werden, dass der MRX-Komplex sowohl für eine effiziente Reparatur chromosomaler DSB, induziert durch γ-Strahlen sowie für die Reparatur von enzymatisch erzeugten Mikrodeletionen in Plasmid-DNA notwendig ist. Nähere Analysen ließen erkennen, dass der Komplex zwar keine Rolle für die Reparaturgenauigkeit spielt, aber Crossover-Ereignisse während der Homologen Rekombination begünstigt. Die Analyse von *sgs1xrs2*- und *srs2xrs2*-Doppelmutanten zeigte, dass die Phänotypen von *srs2* und *sgs1* bezüglich der Crossoverfrequenz durch die simultane Deletion von *XRS2* unterdrückt werden. Schließlich konnte durch Untersuchungen von Mutanten mit verkürzten *XRS2*-Allelen nachgewiesen werden, dass die Aufhebung der Interaktion von Xrs2 mit Mre11 für die Reparaturdefizienz und die reduzierte Crossoverfrequenz verantwortlich ist, während die Deletionen anderer funktioneller Domänen von Xrs2 keinen Einfluss auf die DSB-Reparatur haben. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der MRX-Komplex eine frühe Phase der Homologen Rekombination kontrolliert. Dabei ist der MRX-Komplex für HR-Mechanismen wie dem klassischen DSBR-Prozess, der Crossover fördert, wichtiger als für Reparaturwege, die ausschließlich Nichtcrossover produzieren.

Die in dieser Arbeit analysierte hohe Empfindlichkeit der *xrs2*-Mutante gegenüber H_2O_2 und MMS sowie die erhöhte spontane und MMS-induzierte Mutationsfrequenz deuten auf eine wichtige Rolle von Xrs2 bei der Reparatur von DNA-Basenschäden hin. Es konnte gezeigt werden, dass die MMS-Sensitivität im Gegensatz zur Empfindlichkeit einer *rad52*-Mutante, dem Schlüsselprotein der HR, unabhängig von der Wachstumsphase ist. Mit Hilfe von PFGE-Analysen zur Quantifizierung von hitze-labilen Stellen sowie einem *in vitro*-Versuch zur Messung der BER-Kapazität konnte eine direkte Beteiligung von Xrs2 in der Basenexcisionsreparatur bestätigt werden, zusätzlich zu seiner Funktion in der HR als Toleranzweg für die Überbrückung geschädigter Basen. Die reduzierte BER-Effizienz von MRX-defizienten Zellen ist unabhängig vom Schadenstyp (Uracil oder 8-oxoG) und wirkt sich auf den *short patch*- und den *long patch*-Weg der BER aus. Epistasisanalysen zu anderen BER-Genen zeigten, dass Xrs2 eine Funktion *downstream* der AP-Lyasen Ntg1 und Ntg2 besitzt. Wie in der DSB-Reparatur, ist auch in der BER der gesamte MRX-Komplex und speziell die Interaktion von Xrs2 mit Mre11 wichtig für eine effiziente BER-Ausführung. Spezifische Analysen des BER-Mechanismus zeigten eine reduzierte Polymerase-Aktivität in der *xrs2*-Mutante, während die Schadenserkennung und der *Incision*-Schritt nicht beeinflusst werden.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit neue Funktionen von Xrs2 bzw. dem MRX-Komplex im HR-Prozess sowie eine direkte Beteiligung an der BER nachgewiesen werden.

2 Einleitung

2.1 Bedeutung von DNA-Schäden

Die DNA ist der Träger der gesamten Erbinformation einer Zelle. Alle Informationen über benötigte Proteine und deren Regulation sind in diesen Molekülen gespeichert. Darum ist der Erhalt der strukturellen und funktionellen Integrität des Genoms lebenswichtig für jeden Organismus. Allerdings ist die DNA immerzu endogenen und exogenen Einflüssen, wie Sauerstoffradikalen, schädigenden Agenzien, UV-Licht, mutagenen Chemikalien und ionisierender Strahlung, ausgesetzt. Allein durch endogene Einflüsse kommt es pro Zelle täglich zu etwa 10.000 Schädigungen der DNA (Lindahl, 1993). Diese Anzahl wird durch zusätzliche exogene Einflüsse sehr stark erhöht.

Können diese Schäden nicht behoben werden, entstehen Mutationen und Rekombinationsereignisse, die genetische Instabilität zur Folge haben können, ein vorherrschendes Charakteristikum von Krebs-Zellen sowie vieler erblicher Krankheiten, die oft vorzeitige Alterung und Tumorentstehung mit sich bringen (Hoeijmakers, 2007; Thoms et al., 2007).

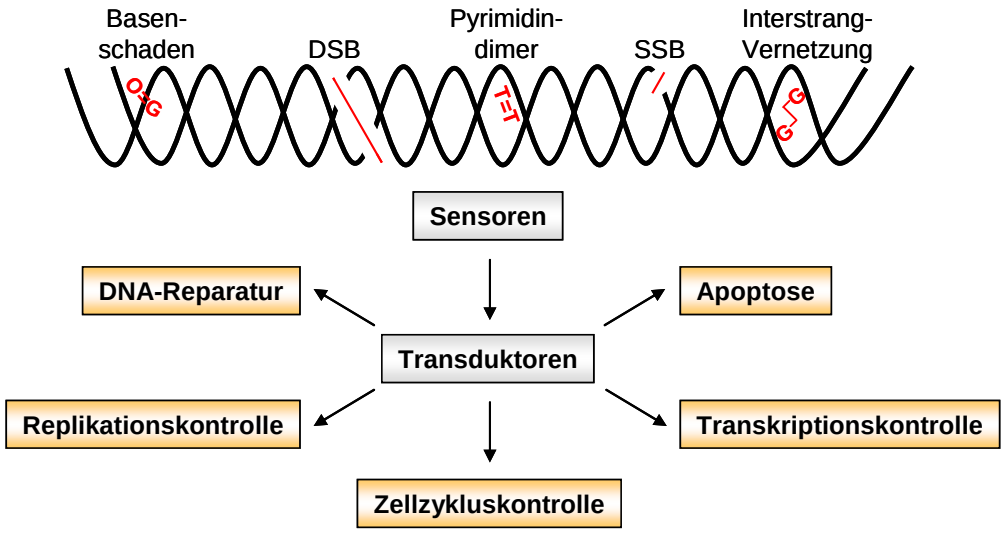

Abbildung 1: Zelluläre Antworten auf DNA-Schäden

DNA-Schäden wie DSB, Pyrimidindimere oder Interstrang-Vernetzungen werden zunächst von Sensoren erkannt. So genannte Transduktoren können das Signal im Folgenden an Effektoren weiterleiten. Dadurch wird eine Vielzahl an Reaktionen kontrolliert. Dieses Netzwerk umfasst DNA-Reparatur, Kontrolle der Replikation, des Zellzyklus und der Transkription sowie Apoptose.

Zur Aufrechterhaltung genomischer Integrität kann die Zelle eine Vielzahl an komplexen Reaktionen durchführen (Abbildung 1). Zu diesem Netzwerk zellulärer Antworten nach Schädigung der DNA (*DNA damage response network*) zählen Reparatur- und

Toleranzmechanismen, die Verhinderung der Replikation geschädigter DNA, die Kontrolle des Zellzyklus und der Transkription sowie eine Reihe von Zelltodprogrammen wie Apoptose (Rai et al., 2007). Dabei werden die Schäden von so genannten Sensoren, die an die DNA binden können, erkannt und das Signal wird über Transduktoren (oft eine Protein-Kinase-Kaskade) auf die jeweiligen Effektoren übertragen (Jackson, 2001; Schmitt et al., 2007). Neben der korrekten Abwicklung dieser Mechanismen ist auch das dynamische Gleichgewicht dieser Prozesse von großer Bedeutung. Dadurch wird z. B. sichergestellt, dass die Zelle vor der Replikation durch einen Zellzyklus-Arrest genügend Zeit gewinnt, um die geschädigten DNA-Bereiche zu reparieren oder bei irreparablen Schäden Apoptose einzuleiten (Burma et al., 2006). Ein besseres Verständnis dieser Abläufe ist für die Entwicklung neuer chemotherapeutischer Strategien, die Tumorzellen mit erhöhter Spezifität und Wirksamkeit töten können, von großem Nutzen (Helleday et al., 2007).

2.2 DNA-Reparaturprozesse

Der wichtigste Faktor zur Aufrechterhaltung genomischer Stabilität ist die korrekte Reparatur geschädigter DNA. Nicht oder falsch reparierte DNA-Schäden können einerseits zu chromosomalen Aberrationen wie Translokationen oder Deletionen führen, anderseits auch die genetische Aktivität von Genen verändern und damit das Risiko der Tumorentstehung erhöhen (Aylon und Kupiec, 2004; Dudasova et al., 2004). Die Reparaturwege einer eukaryotischen Zelle können in zwei große Kategorien eingeteilt werden: die DSB-Reparatur und die Excisionsreparatur (Ataian und Krebs, 2006). Zu den Excisionsreparaturwegen zählen die Nukleotidexcisionsreparatur (NER), die Basenexcisionsreparatur (BER) und die *Mismatch*-Reparatur (MMR). NER ist für die Entfernung konformations-störender Schäden wie UV-induzierte Pyrimidindimere verantwortlich. In der BER werden vor allem chemisch modifizierte Basen entfernt, in der MMR falsch gepaarte Basen oder kleine Insertionen und Deletionen. Werden Schäden vor der Replikation jedoch nicht rechtzeitig repariert, so besitzt die Zelle zusätzliche Toleranzmechanismen, um das Voranschreiten replikativer DNA-Polymerasen zu gewährleisten. In der so genannten postreplikativen Reparatur können solche Läsionen durch Rekombinations- oder Transläsionssynthese-bezogene Mechanismen toleriert, jedoch nicht entfernt werden (Minesinger und Jinks-Robertson, 2005).

2.2.1 Doppelstrangbruchreparatur

DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) stellen die schwerwiegendste Schädigung der DNA dar. Sie entstehen z. B. durch Nebenprodukte des zellulären Metabolismus (reaktive Sauerstoffspezies), durch physikalischen Stress der DNA während der Replikation oder auch als wichtige Zwischenprodukte während der Meiose und in der Hefe während des Paarungstypwechsels. Dadurch können die Variabilität eines Organismus und die Möglichkeit des Erwerbs neuer Fähigkeiten erhöht werden. Vor allem jedoch treten DSB nach Behandlung mit genotoxischen Agenzien wie ionisierende Strahlung (direkt und indirekt über Radikale) oder Chemikalien auf (Daley et al., 2005; Burma et al., 2006; Shrivastav et al., 2008).

Falls DSB nicht repariert oder falsch repariert werden, kann es zum Verlust oder zur Amplifikation genetischer Information kommen. Durch die erhöhte Rate an Chromosomen-Aberrationen können Tumorsuppressorgene inaktiviert oder Proto-Onkogene aktiviert werden (Obe et al., 2002; Burma et al., 2006). Durch die Deletion eines gesamtem Chromosomenarms kann ein einziger Doppelstrangbruch potenziell zum Verlust von mehr als 100 Millionen bp führen (Helleday et al., 2007).

Um Zellen vor diesen schädlichen Konsequenzen zu schützen, haben sich verschiedene Mechanismen zur Reparatur von DSB evolviert (Pfeiffer et al., 2004). DSB-Reparaturprozesse können formell in Homologe Rekombination (HR), die meist korrekt arbeitet, und Homologie-unabhängige Mechanismen, die potenziell fehlerhaft sind, unterteilt werden (Sonoda et al., 2006).

2.2.1.1 Erkennung des DSB

Der erste Schritt aller DSB-Reparaturprozesse ist die erfolgreiche Erkennung des DSB. Eine zentrale Komponente in Hefezellen stellt dabei der MRX-Komplex, bestehend aus den Proteinen Mre11, Rad50 und Xrs2, dar. Eines der ersten Ereignisse an der Schadensstelle ist die Phosphorylierung der Histone (Rogakou et al., 1998; Downs et al., 2000; Fillingham et al., 2006). In einer Studie von Shroff et al. konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von H2A zu γ-H2A vom MRX-Komplex abhängig ist (Shroff et al., 2004). Der Komplex sorgt für die Akkumulation von *Checkpoint*-Proteinen (Mec1, Tel1) an der Stelle des DSB, die im Folgenden H2A über einen Bereich von ca. 50 kb phosphorylieren (Bao und Shen, 2007). Dadurch wird der Zellzyklus verzögert und Zeit für die Reparatur des Schadens gewährleistet. Zusätzlich wird der MRX-Komplex für den

Umbau der Chromatinstruktur (*chromatin remodelling*) benötigt, wodurch weitere Reparaturproteine rekrutiert werden können (Tsukuda et al., 2005; van Attikum und Gasser, 2005). Über Interaktion mit Mre11 werden RSC und INO80 an den DSB gebracht. Diese Proteine sind vor allem für Chromatinveränderungen notwendig, die in der HR für den Zusammenhalt der geschädigten DNA mit dem Matrizenstrang sorgen (Bao und Shen, 2007). Nach der Erkennung des DSB hat der MRX-Komplex jedoch auch verschiedene Funktionen in den DSB-Reparaturprozessen selbst (D'Amours und Jackson, 2002).

2.2.1.2 Homologie-unabhängige Reparatur

Der bedeutendste Homologie-unabhängige Mechanismus ist die Nichthomologe Endenverknüpfung (*non-homologous end-joining* = NHEJ). Dieser Prozess verbindet die DNA-Enden ohne oder mit Mikrohomologien. Aufgrund häufiger Degradierung an den Bruchenden oder durch Verknüpfung „falscher" Enden weist dieser Reparaturweg ein hohes mutagenes Potential auf (Daley et al., 2005; Raji und Hartsuiker, 2006). In Abbildung 2 sind die wichtigsten Schritte des NHEJ schematisch dargestellt.

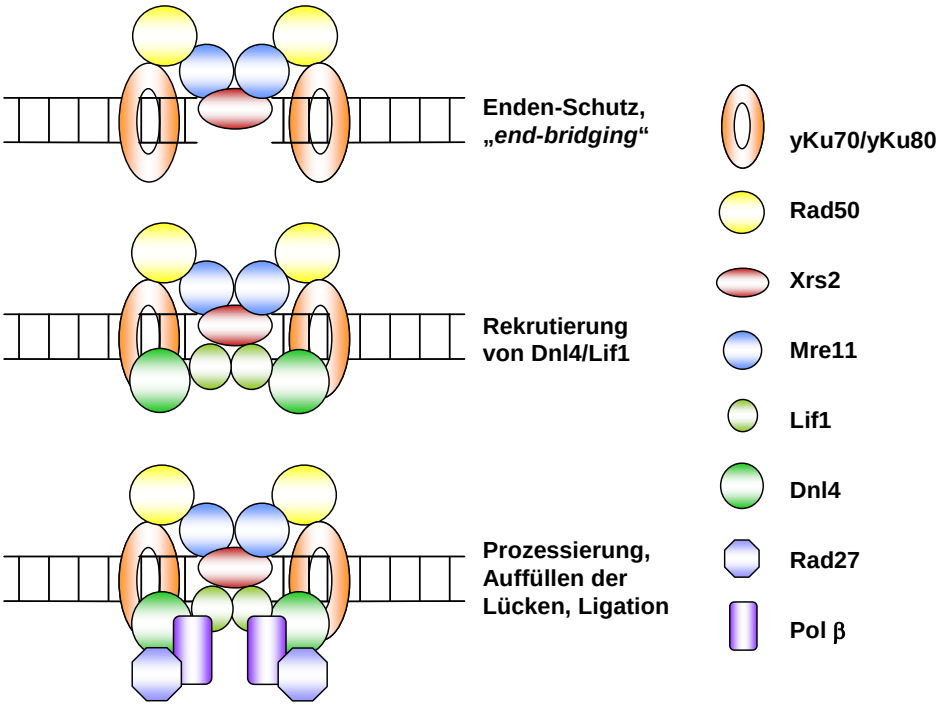

Abbildung 2: Modell für den NHEJ-Mechanismus in *S. cerevisiae*

Dargestellt ist ein vereinfachtes Modell nach Hefferin und Tomkinson (Hefferin und Tomkinson, 2005). Die beiden Komplexe yKu70/yKu80 und MRX binden als erste Faktoren an den DSB. Dies bietet Schutz vor nukleolytischem Abbau der Enden und sorgt für den Zusammenhalt der Stränge (*end-bridging*). Anschließend rekrutiert der MRX-Komplex Dnl4/Lif1 zur Verknüpfung der Enden. Bei nicht-ligierbaren Enden sind die beiden Faktoren Rad27 und Pol β für die Prozessierung der Termini und das Auffüllen der Lücken notwendig.

In *S. cerevisiae* werden die Bruchenden zunächst durch das Heterodimer yKu70/yKu80, das als ringähnliche Struktur sequenz-unspezifisch an die freien Enden bindet sowie durch den MRX-Komplex vor nukleolytischem Abbau geschützt. Dabei übernehmen sie auch eine so genannte „*end-bridging*"-Funktion, wodurch die beiden Enden des DSB in räumliche Nähe gebracht werden. Zusätzlich rekrutieren diese beiden Komplexe Dnl4/Lif1, die Homologe der Vertebraten-Proteine Xrcc4 und Ligase IV, an den DSB, die für die Verknüpfung der DNA-Stränge sorgen. Im Falle von nicht-ligierbaren DNA-Enden werden die Termini vor der Ligation von der Endonuklease Rad27 prozessiert und die Lücken durch die Polymerase β (Pol4) aufgefüllt (Dudasova et al., 2004; Hefferin und Tomkinson, 2005; Palmbos et al., 2005; Wu et al., 2008).

2.2.1.3 Homologe Rekombination

Für die Homologe Rekombination (HR) werden lange Sequenzhomologien in einem zweiten intakten DNA-Molekül (Schwesterchromatid oder homologen Chromosom) benötigt, wodurch meist eine fehlerfreie Reparatur des Schadens gewährleistet wird. Verantwortlich für diesen Reparaturweg in *S. cerevisiae* sind die Proteine der *RAD52*-Gruppe (Symington, 2002).

Für die HR stehen verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Die beiden wichtigsten Reparaturwege sind das DSBR-Modell (Doppelstrangbruch-Reparatur), das ursprünglich von Szostak und Mitarbeitern publiziert wurde (Szostak et al., 1983), und der SDSA-Prozess (*synthesis-dependent strand annealing*) (Hastings, 1988). Alternative Mechanismen sind SSA (*single-strand annealing)* und BIR (*break-induced replication*), die *RAD51*-unabhängig arbeiten (Symington, 2002). Der SSA-Prozess ist auf die Reparatur von DSB zwischen direkten Sequenzwiederholungen beschränkt. Einzelstrangüberhänge am DSB werden durch Nukleasen entfernt, Lücken durch DNA-Synthese aufgefüllt und schließlich durch Ligation verbunden. Durch das Zusammenfügen der komplementären Regionen ist dieser Mechanismus immer mutagen, da es zum Sequenzverlust ein oder mehrerer Wiederholungen sowie dem intermediären DNA-Stück kommt. Der BIR-Prozess wird vor allem für die Aufrechterhaltung der Telomerenden verwendet. Dabei tritt ein Einzelstrang-Überhang in den homologen Doppelstrang ein, der als Matrize für die eigene DNA-Synthese bis zum Ende des Donor-Chromosoms dient (Paques und Haber, 1999; Krogh und Symington, 2004).

Die beiden häufigsten Prozesse, DSBR und SDSA, die in Abbildung 3 vereinfacht dargestellt sind, beginnen mit einer ausgedehnten Degradierung der DSB-Enden in 5´→ 3´-Richtung. Die Initiierung dieser Endenresektion wird durch den MRX-Komplex und die Endonuklease Sae2 vermittelt, während für die weitere Degradierung die Helikase Sgs1 zusammen mit den Nukleasen Dna2 und Exo1 verantwortlich ist (Mimitou und Symington, 2008; Zhu et al., 2008). Dadurch entstehen invasive 3´-Überhänge, die umgehend von RPA (*replication protein A*) gebunden werden, um die Bildung von Sekundärstrukturen der ssDNA zu verhindern. Im folgenden Schritt rekrutiert das Mediatorprotein Rad52 das ssDNA-bindende Protein Rad51, das RPA verdrängt. Das resultierende Nukleoproteinfilament führt die Suche nach homologen Sequenzen durch und ist für die Stranginvasion verantwortlich, wodurch die so genannte „*D-Loop*"-Form durch Öffnen der homologen DNA-Helix entsteht. Der Komplex aus Rad55/Rad57 und Rad54 fungiert dabei als weiterer Mediator, der die Bindung von Rad51 unterstützt, die homologe Paarung der Stränge fördert und Zwischenprodukte stabilisiert. Beim SDSA-Prozess dient das 3´-Ende nach der Stranginvasion als *Primer* für die Verlängerung des eingedrungenen Stranges. Nach ausgiebiger DNA-Synthese wird der Strang von der homologen Donor-Sequenz wieder abgelöst und paart mit dem anderen Ende des DSB. Polymerase- und Ligations-Aktivitäten vervollständigen den gebrochenen Strang. Dadurch kommt es im SDSA-Mechanismus ausschließlich zur Bildung von Nichtcrossover-Produkten und im Gegensatz zum DSBR-Mechanismus zu kürzeren Stücken neu synthetisierter DNA (Blanton et al., 2005). Während des DSBR-Prozesses bindet das zweite DSB-Ende an den verdrängten Strang der Matrize in der „*D-Loop*"-Struktur, wodurch sich eine dHJ (*double Holliday junction*) bildet. Wiederum spielt Rad52 bei der Austauschreaktion eine wichtige Rolle. Die Auflösung der Holliday-Struktur sorgt für den reziproken Austausch von genetischem Material zwischen den beiden beteiligten DNA-Strängen (Genkonversion), assoziiert mit einem Crossover-Ereignis oder Nichtcrossover-Ereignis (Heyer, 2004). Die Mechanismen der HR sind in vielen *Reviews* detailliert erklärt (Paques und Haber, 1999; Aylon und Kupiec, 2004; Krogh und Symington, 2004; Raji und Hartsuiker, 2006; Barzel und Kupiec, 2008; San Filippo et al., 2008).

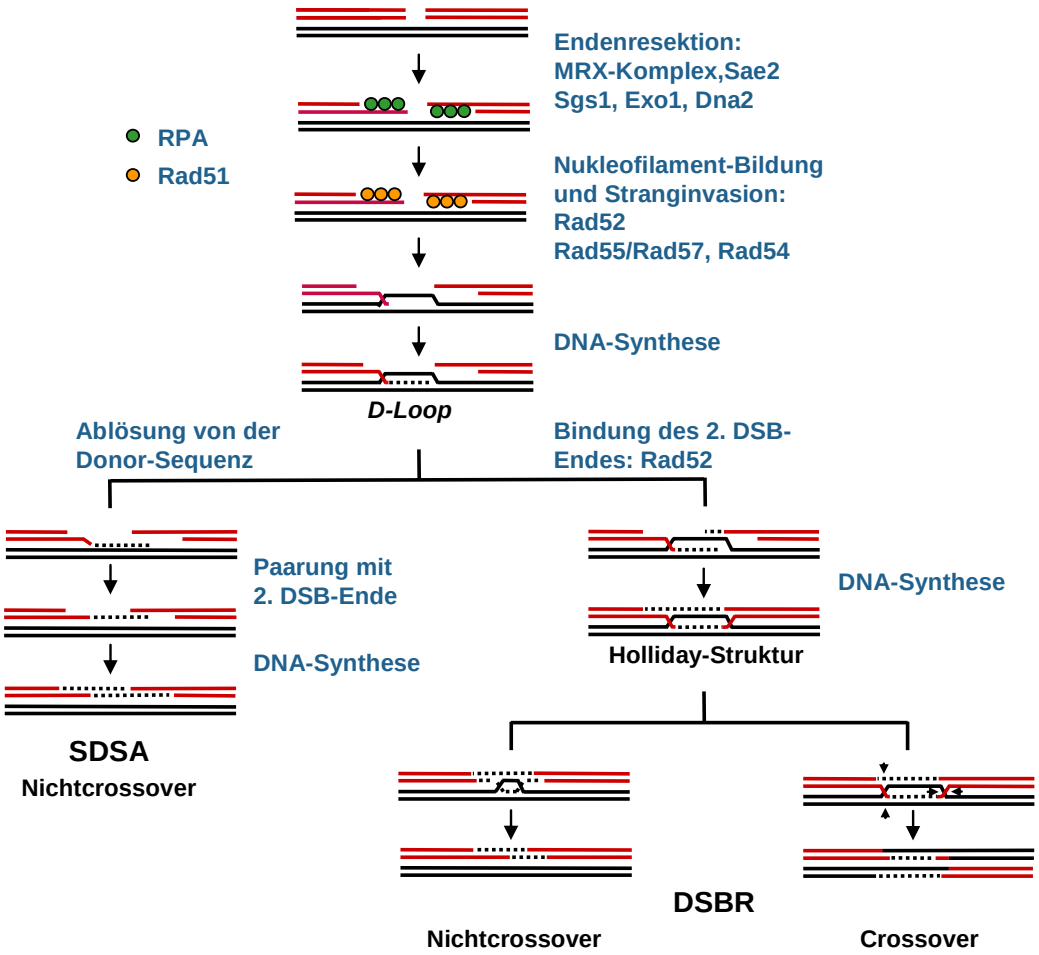

Abbildung 3: Homologe Rekombination: die Hauptwege DSBR und SDSA in *S. cerevisiae*

Nach der Erkennung eines DSB werden die Enden mit Hilfe des MRX-Komplexes prozessiert, so dass invasive 3´-Überhänge entstehen. Nach Bindung von Rad51 kann ein DSB-Ende in die homologe Sequenz eindringen, wodurch eine so genannte *D-Loop*-Struktur entsteht. Im Falle des SDSA-Prozesses löst sich das DSB-Ende nach Verlängerung durch DNA-Synthese von der Donor-Sequenz wieder ab und paart mit der zweiten Seite des DSB. Dadurch entstehen nur Nichtcrossover-Produkte. Im DSBR-Prozess hingegen fängt das zweite DSB-Ende den verdrängten Strang der *D-Loop*-Struktur ein und es bildet sich eine dHJ aus. Diese kann zu Nichtcrossover- und Crossover-Produkten aufgelöst werden.

2.2.1.4 Regulation von DSB-Reparaturmechanismen

Die Mechanismen der DSB-Reparaturwege, als auch darin involvierte Proteine sind von der Hefe bis zum Menschen hoch konserviert. Während die Prozesse an sich sehr gut charakterisiert sind, ist die Regulation der Unterwege nur wenig verstanden. Während bei Säugern der Mechanismus des NHEJ gegenüber HR bevorzugt wird, führen Hefen vor allem HR durch (Aylon und Kupiec, 2004; Shrivastav et al., 2008).

Nach heutigem Wissensstand ist die Gewichtung zwischen HR und NHEJ in Säugerzellen sehr vom Zellzyklus und von der Beschaffenheit des DSB abhängig (Ira et al., 2004; Saleh-Gohari und Helleday, 2004; Sonoda et al., 2006). Auch in Hefen konnte

eine zellzyklus-spezifische Regulation über die Kinase CDK1 gezeigt werden (Ira et al., 2004). Eine kürzlich veröffentlichte Studie lässt vermuten, dass effiziente Phosphorylierung der Endonuklease Sae2 durch CDK1 vor allem in der S- und G2-Phase stattfindet (Huertas et al., 2008). Phosphoryliertes Sae2 ist an der Endenresektion von DSB beteiligt, ein Prozess, der für HR, aber nicht für NHEJ notwendig ist (Zhu et al., 2008). Zusätzlich konnte für Hefezellen eine zelltyp-spezifische Regulation über die Ploidie beschrieben werden. Dabei unterstützt das Protein Nej1, dessen Gen in haploiden Zellen verstärkt exprimiert wird, durch seine Beteiligung am Transport von Lif1 in den Kern die NHEJ (Valencia et al., 2001). Außerdem konnte in einer neueren Arbeit gezeigt werden, dass die Proteine der *RAD6*-Gruppe eine wichtige Rolle in der Regulation von HR und NHEJ spielen. Diese modifizieren PCNA, einen Prozessivitätsfaktor für DNA-Polymerasen, durch Anfügen von Ubiquitin. Während mono-ubiquitiniertes PCNA NHEJ bevorzugt, fördert poly-ubiquitiniertes PCNA die HR und hat einen negativen Einfluss auf NHEJ (Mörtl et al., 2008).

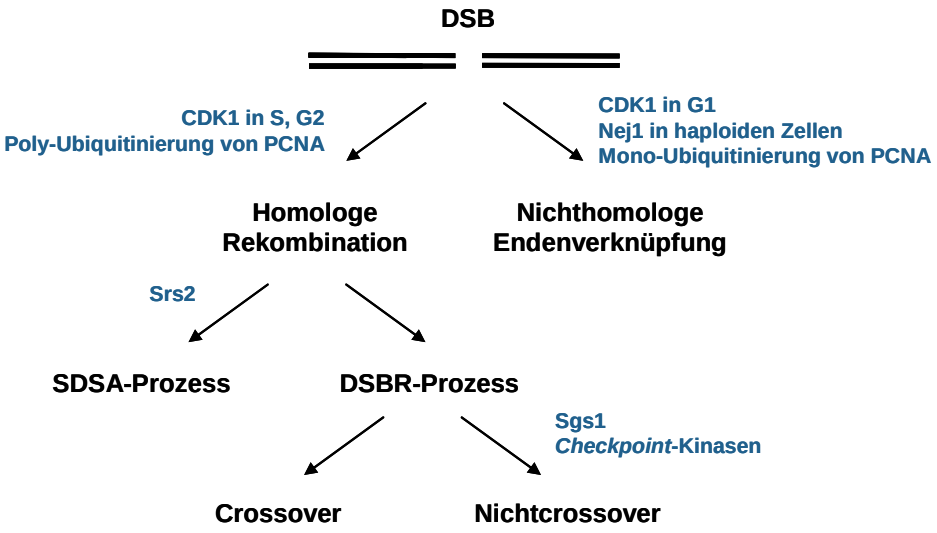

Abbildung 4: Bekannte Faktoren zur Regulation von DSB-Reparaturwegen

Die Kinase CDK1 reguliert das Gleichgewicht zwischen HR und NHEJ zellzyklus-spezifisch, während Nej1 ploidie-spezifisch NHEJ fördert. Auch der Ubiquitinierungsstatus von PCNA hat einen Einfluss auf die Verwendung von HR und NHEJ. Srs2, Sgs1 und einige *Checkpoint*-Kinasen unterdrücken Crossover-Ereignisse durch die Regulation von HR-Unterwegen.

Zur Regulation von Crossover-Ereignissen ist besonders die Balance verschiedener HR-Wege wie SDSA und DSBR kritisch. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Srs2 durch Ablösen von Rad51 von den 3´-ssDNA-Überhängen die Bildung der dHJ verhindert. Dadurch wird das Gleichgewicht zum SDSA-Prozess hin verschoben und Crossover-Ereignisse werden unterdrückt (Ira et al., 2003; Krejci et al., 2003; Veaute et al., 2003; Robert et al., 2006). Ein weitere Helikase, die eine Auswirkung auf die Entstehung von

Crossover-Produkten hat, ist das Sgs1-Protein. Zusammen mit seiner assoziierten Topoisomerase Top3 erniedrigt Sgs1 die Crossover-Frequenz durch die Auflösung der dHJ hin zu Nichtcrossover-Produkten (Ira et al., 2003; Ui et al., 2005). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass *Checkpoint*-Kinasen nach Erkennung eines DSB die Crossover-Frequenz in mitotischen Zellen herabsetzen (Haghnazari und Heyer, 2004).

2.2.2 Basenexcisionsreparatur

Bei der Schädigung der DNA durch endogene und exogene Agenzien sind neben dem Zucker-Phosphatrückgrat auch häufig die Purin- und Pyrimidin-Reste betroffen. Dadurch entstehen Läsionen, die viele zelluläre Prozesse behindern (Lindahl, 1993; Friedberg, 2003). Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die sowohl im aeroben Metabolismus der Zelle selbst, als auch durch UV-A- und γ-Bestrahlung oder Behandlung mit chemischen Agenzien wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entstehen, verursachen ein breites Spektrum an Basenschäden. Den häufigsten oxidativen Schaden durch H_2O_2-Behandlung stellt das 8-oxoG (8-oxo-7,8-Dihydroguanin) dar (Cadet et al., 1997; Boiteux et al., 2002). Weitere Agenzien wie Methylmethansulfonat (MMS) modifizieren die Basen durch Anhängen von Methylgruppen. Dadurch wird die N-glykosidische Bindung zwischen Base und Zucker-Phosphatrückgrat destabilisiert. Es entstehen depurinierte und depyrimidierte Stellen, die so genannten *AP-Sites* (*apurinic / apyrimidinic sites*) oder abasischen Stellen (Wyatt und Pittman, 2006). Zusätzlich zu ihrer Zytotoxität und Mutagenität blockieren diese AP-Stellen auch die Replikation und Transkription (Guillet und Boiteux, 2003).

Die Reparatur geschädigter Basen wird hauptsächlich von der Basenexcisionsreparatur (BER) durchgeführt (Abbildung 5). Dieser Reparaturweg wird durch verschiedene N-Glykosylasen mit unterschiedlicher Substratspezifität eingeleitet (Krokan et al., 1997). Das Hauptenzym zur Entfernung MMS-geschädigter Basen stellt dabei die Mag1-Glykosylase dar (Ma et al., 2008). Eine Analyse zur Interaktion von N-Glykosylasen mit DNA-Läsionen zeigte, dass die Bindung der Glykosylase eine Krümmung des DNA-Rückgrats zur Folge hat. Dadurch klappt die geschädigte Base aus der DNA ins aktive Zentrum des Enzyms und kann vom Zucker-Phosphatrückgrat gelöst werden (Bruner et al., 2000). Neben dem Basenschaden selbst hat aber auch die umgebende Nukleotidsequenz einen Einfluss auf die Aktivität der N-Glykosylasen (Lingaraju et al., 2008). Durch die Dissoziation der geschädigten Base vom Zucker-Phosphatrückgrat entsteht eine AP-Stelle. Der schadhafte Strang wird im weiteren Verlauf der BER 3´ der AP-Stelle durch eine AP-Lyase oder 5´ der AP-Stelle durch eine AP-Endonuklease

eingeschnitten. Da die AP-Lyase-Aktivität meistens mit der N-Glykosylase selbst assoziiert ist, werden die entstandenen Glykosylase-Produkte vom selben Enzym weiterbearbeitet. AP-Endonukleasen hingegen werden an AP-Stellen tätig, die spontan auftreten oder durch Glykosylasen ohne Lyase-Aktivität entstehen (Hanna et al., 2004).

In *S. cerevisiae* sind drei Enzyme mit kombinierter N-Glykosylase / AP-Lyase-Aktivität bekannt, die hauptsächlich die Eliminierung von oxidierten Basen katalysieren: Ogg1, Ntg1 und Ntg2 (Girard und Boiteux, 1997). Aber auch 7-Methylformamid-Pyrimidin, das nach MMS-Behandlung aus 7-Methylguanin entsteht, wird von Ntg1 und Ntg2 mit hoher Effizienz ausgeschnitten (Alseth et al., 1999). Nachfolgendes Eingreifen einer AP-Endonuklease entfernt das entstandene 3´-α,β-ungesättigte Aldehyd-Ende (3´-dRP-Ende) und verursacht eine Lücke von einem Nukleotid (Hanna et al., 2004). Die bekannten AP-Endonukleasen in Hefe, Apn1 und Apn2, weisen beide eine effiziente 3´-Phosphodiesterase-Akitivität auf (Boiteux und Guillet, 2004). Für das Auffüllen der Lücke wird die Polymerase ε diskutiert (Wang et al., 1993). Alternativ kann nach dem Einschnitt der AP-Lyase die Doppelhelix auch durch eine bisher noch unbekannte Helikase geöffnet werden. Der 3´-dRP-Rest wird in diesem Unterweg durch die Endonuklease Rad1-Rad10 entfernt, die entstandene Lücke durch Polymerase-Aktivität aufgefüllt und der Ausgangszustand durch die Ligase Cdc9 wieder hergestellt (Boiteux und Guillet, 2004). Der Hauptweg in *S. cerevisiae* nach dem Ausschneiden der geschädigten Base verläuft jedoch über einen Einschnitt des geschädigten Strangs 5´ der AP-Stelle mittels der AP-Endonukleasen Apn1 und Apn2, wodurch ein 5´-Deoxyribophosphat-Ende (5´-dRP-Ende) entsteht (Ramotar et al., 1991; Sander und Ramotar, 1997). Während 97 % der Substrate von Apn1 geschnitten werden, hat Apn2 nur eine schwache AP-Endonuklease-Aktivität (Boiteux und Guillet, 2004). Die Entfernung des blockierten 5´-Endes wird von Rad27, einer spezifischen 5´-*Flap*-Endonuklease, katalysiert. Dieses Homolg des FEN1 in Säugerzellen hinterlässt Lücken von bis zu 5 Nukleotiden (Wu und Wang, 1999; Kao et al., 2002). DNA-Synthese und Ligation durch Cdc9 vervollständigen den BER-Prozess (Boiteux und Guillet, 2004).

Da nach dem Einschnitt über eine AP-Endonuklease mehrere Nukleotide ausgetauscht werden, wird dieser Unterweg der BER *long patch*-Reparatur genannt (Boiteux und Guillet, 2004). Im Falle der Reparatur über AP-Lyasen entsteht zwar nur eine Lücke von einem Nukleotid, allerdings bleibt unklar, ob nur die geschädigte Base selbst oder mehrere Nukleotide neu synthetisiert werden. Möglicherweise kann *short patch*- als auch *long patch*-Reparatur stattfinden.

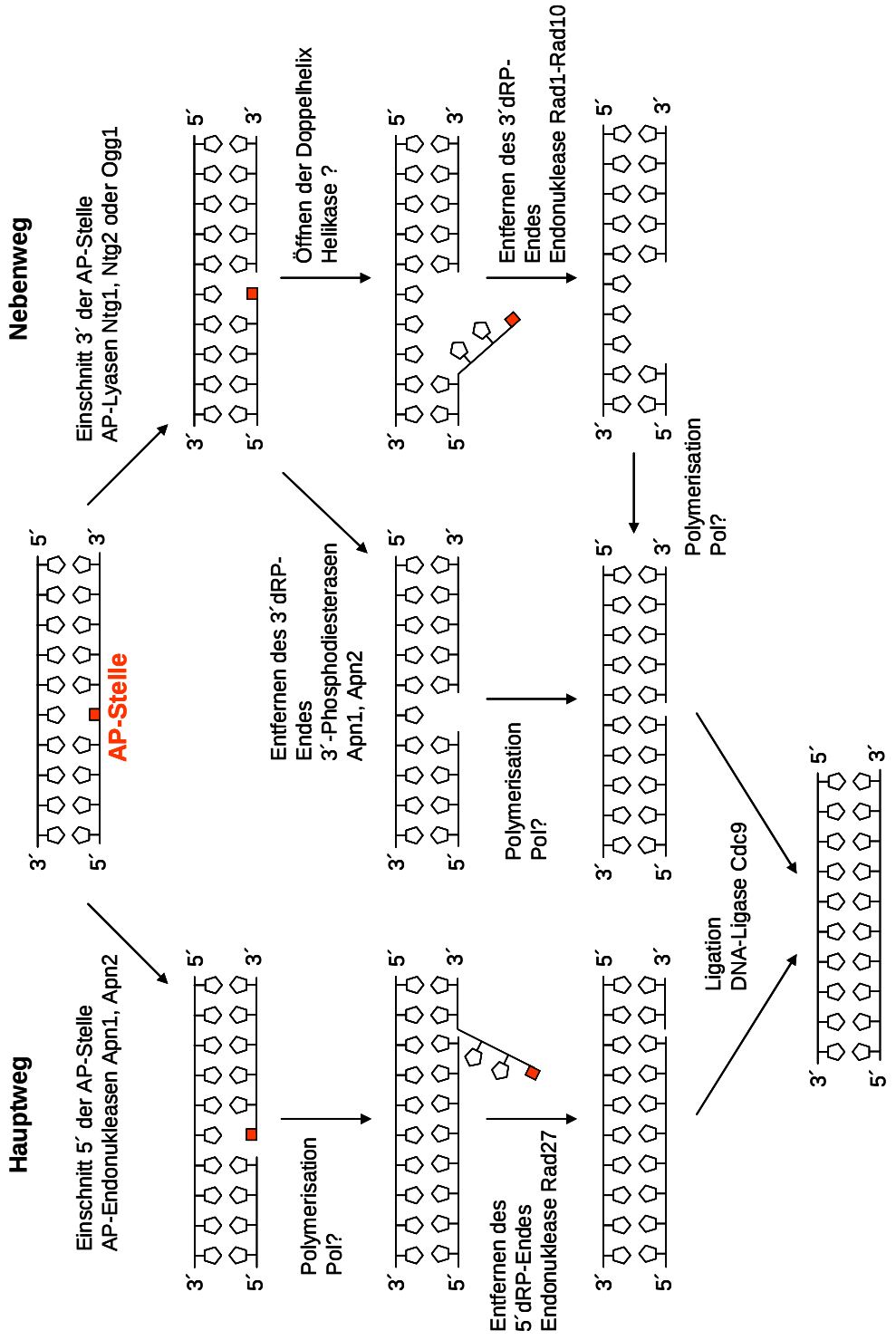

Abbildung 5: Basenexcisionsreparatur von AP-Stellen in *S. cerevisiae*

Dargestellt ist ein modifiziertes Modell nach Boiteux und Guillet (Boiteux und Guillet, 2004). Durch AP-Endonukleasen oder AP-Lyasen wird das Zucker-Phosphatrückgrat 5´ bzw. 3´ der AP-Stelle eingeschnitten. Durch die AP-Endonuklease-Aktivität entsteht ein blockiertes 5´-Ende, das nach der DNA-Neusynthese über die *Flap*-Endonuklease Rad27 entfernt wird. Bei diesem Unterweg der BER werden bis zu 5 Nukleotide ersetzt (*long patch*-BER). AP-Lyasen hingegen hinterlassen ein blockiertes 3´-Ende, das über Phophodiesterasen eliminiert werden kann. Polymerasen können in diesem Fall ein oder mehrere Nukleotide einsetzen (*short patch*- oder *long patch*-BER). Alternativ kann das blockierte 3´-Ende auch durch Öffnen der Doppelhelix und Schneiden der Endonuklease Rad1-Rad10 entfernt werden. Somit werden auch hier mehrere Nukleotide neu synthetisiert. In allen drei Fällen wird die Reparatur durch die Ligase Cdc9 beendet.

Welche Polymerasen an der BER in Hefe beteiligt sind, ist noch nicht vollständig geklärt. Wang et al. konnten zeigen, dass die DNA-Synthese während des Reparaturprozesses hauptsächlich von Polymerase ε katalysiert wird, dass aber auch die Polymerasen α und δ modulierende Einflüsse aufweisen (Wang et al., 1993). Kurz darauf wurde die Polymerase δ als Hauptenzym für die DNA-Synthese nach Methylschäden entdeckt (Blank et al., 1994). Eine neuere Studie hingegen zeigt die Wichtigkeit von Polymerase 4 (Pol β) für die Reparatur von MMS-induzierten Schäden (Sterling und Sweasy, 2006).

2.3 Apoptose

Neben DNA-Reparatur ist auch der Zelltod ein wichtiger Prozess für den Erhalt genomischer Stabilität (Rai et al., 2007). Dieser kann über unterschiedliche Mechanismen ablaufen, wodurch eine Einteilung in Apoptose, Nekrose, autophagischer Zelltod und mitotische Katastrophe möglich ist (Gourlay et al., 2006). Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein evolutionär hoch konservierter Prozess zur Eliminierung geschädigter Zellen, die eine Gefahr für den Gesamtorganismus darstellen. Aber auch während der Embryogenese von Säugern spielt die Apoptose eine wichtige Rolle für die Entwicklung vieler Organe (Vermeulen et al., 2005). Daher wurde früher angenommen, dass einzellige Organismen wie Hefen keine apoptotischen Mechanismen besitzen. 1997 konnten jedoch erstmal in einer temperatur-sensitiven *cdc48*-Hefemutante apoptotische Marker, wie die Externalisierung von Phosphatidylserin oder die Fragmentierung von DNA, nachgewiesen werden (Madeo et al., 1997).

Apoptose in Hefezellen kann durch eine Vielfalt an Stressfaktoren und Medikamenten ausgelöst werden. Niedrige Dosen an H_2O_2 oder Acetat sind jedoch die gängigsten Induktoren (Fröhlich et al., 2007). Zur Zeit sind zwei Hauptsignalwege für die Einleitung der Apoptose bekannt (Gourlay et al., 2006; Pereira et al., 2008), die in Abbildung 6 dargestellt sind. Ein Signalweg verläuft über die Aktivierung der Ras-Signalkette, welche die Lebensdauer von Hefezellen bestimmt. Nach rezeptor-vermittelter oder direkter Aktivierung von Ras kommt es zur Produktion des Botenstoffes (*second messenger*) cAMP. Dies führt zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die auf eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie die Regulation von Stressantwort, die metabolische Aktivität der Zellen, die Kohlenhydrat-Speicherung und auf mitochondriale Funktionen einen Einfluss hat. Eine konstitutive Aktivierung der Ras-Signalkette über die Anlagerung von Osmotin, einem Fungistatikum verschiedener Pflanzen, an Rezeptoren oder durch die Dysfunktion des Aktinskeletts nach umweltbedingtem Stress hat einen apopotischen

Phänotyp zur Folge. Erste Hinweise auf einen zweiten apoptotischen Signalweg wurden von Severin und Hyman entdeckt. Durch Zugabe hoher Konzentrationen an *Mating*-Pheromon in haploiden Zellkulturen kommt es zu Apoptose, wenn der passende Partner fehlt (Severin und Hyman, 2002). Diese Pheromonantwort verläuft rezeptor-vermittelt über den MAP-Kinase-Signalweg (Gourlay et al., 2006). Eine neuere Studie hingegen postuliert für den Zelltod nach hohen Dosen an *Mating*-Pheromon Nekrose, da keine DNA-Fragmentierung stattfindet (Zhang et al., 2006a).

In den beiden genannten Apoptose-Wegen, die durch äußere Faktoren induziert werden, kommt es zur intrazellulären Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Diese ROS stellen einen Promotor für die Apoptose in Hefe und somit einen Schlüsselregulator für den programmierten Zelltod dar (Fröhlich et al., 2007). Bisher ist der Mechanismus der ROS-Produktion allerdings unbekannt. Es gibt Hinweise, dass die erhöhte Konzentration an ROS durch eine apoptotische Dysfunktion der Mitochondrien entsteht (Gourlay et al., 2006). Der Zusammenhang von ROS-Produktion und Apoptose sowie die Mechanismen und Zielproteine, stellen offene Fragen dar (Perrone et al., 2008).

Eine weitere zentrale Komponente der Apoptose in Hefe ist die Metacaspase Yca1 (*yeast caspase*), ein Ortholog der Säugercaspasen (*cysteine-dependent aspartate specific protease*). In Säugerzellen sind Caspasen immer an der Apoptose beteiligt und leiten den Zelltod durch die Spaltung von Schlüsselproteinen ein. In der Hefe sind jedoch nicht alle Apoptosewege an die Aktivierung von Yca1 gebunden (Fröhlich et al., 2007) und auch die zu spaltenden Zielproteine sind bisher unbekannt (Mazzoni und Falcone, 2008). Neben der Beteiligung einer Caspase weist die Hefe-Apoptose auch die Freisetzung von Substanzen aus den Mitochondrien als weitere Gemeinsamkeit mit der Apoptose in Säugerzellen auf (Fröhlich et al., 2007; Pereira et al., 2008). Es kann in Hefen ebenfalls eine Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytoplasma beobachtet werden. Auch die beiden Endonukleasen Aif1 (*apoptosis-inducing factor*) und Nuc1 (Nuclease, Homolog von EndoG) translozieren von den Mitochondrien in den Nukleus, wo sie, wie ihre Säugerhomologe, die DNA fragmentieren und Histon H2B phosphorylieren (Büttner et al., 2007). Einen negativen Regulator der Apoptose stellt Bir1 dar, das wegen seiner BIR-Domäne zu den IAPs (*inhibitor-of-apoptosis proteins*) gezählt wird. Es wird vermutet, dass Bir1, wie seine Homologen in Säugern, die Caspasen inhibiert. Allerdings konnte bisher keine Bindung von Bir1 an Yca1 nachgewiesen werden (Owsianowski et al., 2008). Bir1 wird von der pro-apoptotischen Serinprotease Nma111 (*nuclear mediator of apoptosis*) gespalten und

dadurch inaktiviert. Im Gegensatz zu seinem Säugerhomolog Htra2/Omi befindet sich Nma111 in Hefezellen schon vor der Apoptose-Induktion im Kern (Fröhlich et al., 2007). Zusätzlich kommt es während des apoptotischen Prozesses zur Fragmentierung der Mitochondrien. Fis1, das eine ähnliche Funktion wie Bcl-2 in Säugerzellen ausübt, inhibiert diesen Schritt (Owsianowski et al., 2008). Ein weiteres Merkmal, das Hefezellen mit den Säugerzellen teilen, ist die Externalisierung des anionischen Phospholipids Phosphatidylserin (Fröhlich et al., 2007).

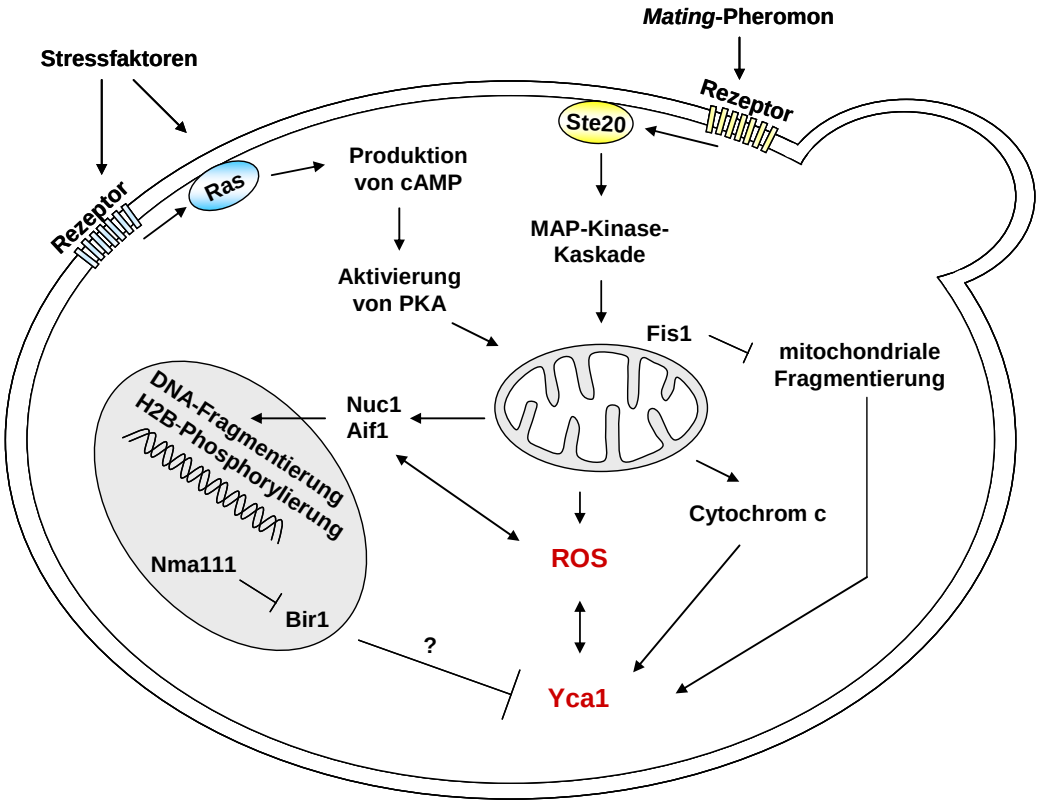

Abbildung 6: Mechanismen der Apoptose in Hefezellen

Dargestellt ist ein vereinfachtes und modifiziertes Modell nach Gourlay et al. (Gourlay et al., 2006) und Büttner et al. (Büttner et al., 2006). Hefe-Apoptose wird über Stressfaktoren und eine hohe Konzentration an *Mating*-Pheromon induziert. Über die Ras-Signalkette bzw. über eine MAP-Kinase-Kaskade wird das Signal in der Zelle weitergeleitet. In fast allen Apoptose-Szenarien kommt es zur Produktion von ROS sowie zur Aktivierung der Metacaspase Yca1. Translokation von Nuc1 und Aif1 in den Kern sorgt für die Fragmentierung der DNA und die Phosphorylierung von H2B. Wie in Säugerzellen wird Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt, die im weiteren Prozess fragmentiert werden. Bir1 stellt einen apoptose-inhibierenden Faktor dar, der sehr wahrscheinlich Yca1 hemmt und selbst auch einem inhibitorischen Effekt von Nma111 unterliegt.

Vorteile des programmierten Zelltods für den einzelligen Organismus Hefe wurden in der Literatur intensiv diskutiert. Heute wird vermutet, dass die Apoptose für die beiden bekannten Formen der Alterung in Hefe von großem Nutzen ist. Bei der replikativen Alterung tritt der programmierte Zelltod ein, um stark gealterte Mutterzellen aus der Population zu eliminieren. Auch für die so genannte chronologische Alterung in

langzeitigen Kulturen ist die Apoptose zur Entfernung gealterter Zellen notwendig (Büttner et al., 2006). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Zelltod bei der Entstehung von Hefekolonien eine Rolle spielt (Fröhlich et al., 2007). Deshalb wird angenommen, dass Hefezellen Apoptose durchführen, um die Zellpopulation je nach Umweltbedingen regulieren zu können. (Gourlay et al., 2006).

2.4 Das Xrs2-Protein und der MRX-Komplex

2.4.1 Aufbau des MRX-Komplexes

Der MRX-Komplex in *S. cerevisiae* besteht aus drei Proteinen: Mre11, Rad50 und Xrs2. Dabei wird eine Stöchiometrie von 2:2:1 angenommen (D'Amours und Jackson, 2002; Krogh und Symington, 2004). Abbildung 7 zeigt den Aufbau des MRX-Komplexes.

Rad50, die größte Komponente des Komplexes, gehört der Gruppe der SMC-Proteinfamilie (*structural maintenance of chromosome*) an, die in Chromosomen-Kondensation und Schwesterchromatid-Kohäsion involviert ist. Wie alle anderen SMC-Proteine besitzt auch Rad50 eine lange so genannte *Coiled-coil*-Region, die am aminoterminalen sowie am carboxyterminalen Ende des Proteins von nukleotid-bindenden Motiven flankiert wird. In der Mitte des *Coiled-coil*-Bereichs liegt ein Zinkfinger-Motiv vor. In diesem Bereich ist das Protein flexibel, so dass es sich zusammenfalten und mittels der *Coiled-coil*-Regionen intramolekular interagieren kann. Durch diese Konformationsänderung entsteht ein Haken, auch *Hook*-Domäne genannt, während auf der entgegengesetzten Seite die beiden nukleotid-bindenden Motive in räumliche Nähe kommen. Dadurch bilden sie eine ATP-Bindekassette (ABC-Domäne), die die Bindung an die DNA stimuliert (Hopfner et al., 2002; Symington, 2002) sowie ATPase- und Adenylatkinase-Aktivität besitzt (Bhaskara et al., 2007). Zusätzlich können Rad50-Moleküle über das Zinkfinger-Motiv intermolekulare Verbindungen eingehen, wodurch Schwesterchromatiden während der DSB-Reparatur zusammengehalten werden können. Dimerisierung von Rad50 innerhalb der ABC-Bereiche hingegen sorgt dafür, die Enden eines DSB in räumliche Nähe zu bringen (*end-bridging*) (Cahill und Carney, 2007; Williams et al., 2007). Der Basisbereich der *Coiled-coil*-Region interagiert mit Mre11 (Hopfner et al., 2002).

Mre11 besitzt Nuklease-Aktivität, die durch die Bindung von Xrs2 und Rad50 stimuliert wird. An einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA weist Mre11 3´-5´-Exonuklease-Aktivität auf. Die Endonuklease-Aktivität des Proteins hingegen konnte nur an

einzelsträngiger DNA sowie an Übergängen von einzelsträngiger zu doppelsträngiger DNA nachgewiesen werden. Zusätzlich kann Mre11 Haarnadel-Strukturen öffnen (Paull und Gellert, 1998; Trujillo und Sung, 2001; Krogh und Symington, 2004). Da Rad50 und Xrs2 ohne Mre11 nicht miteinander interagieren können, spielt Mre11 für die Komplexbildung eine zentrale Rolle (Symington, 2002).

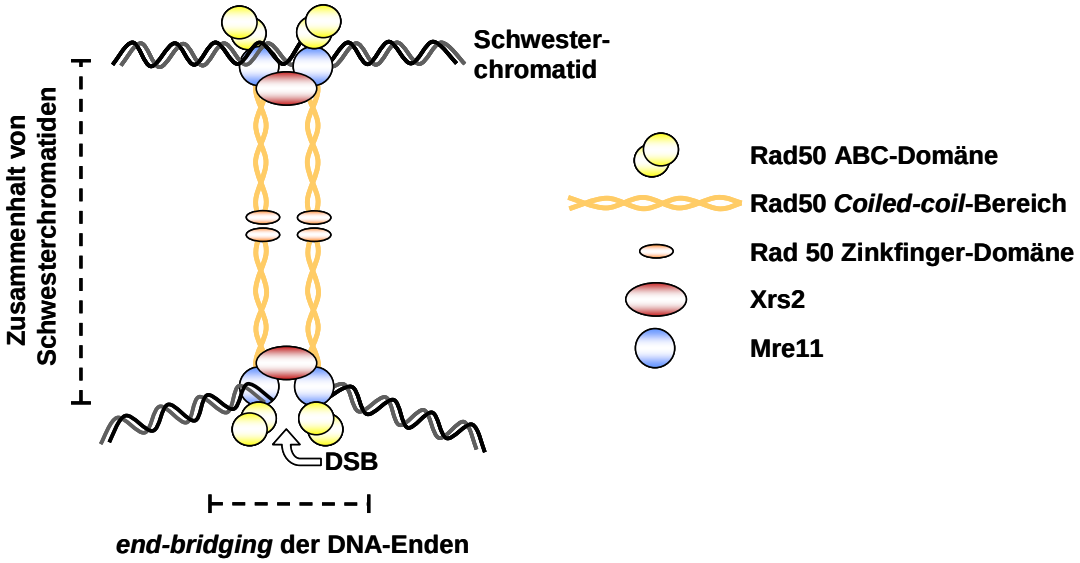

Abbildung 7: Architektur des MRX-Komplexes

Dargestellt ist ein modifiziertes Modell nach Williams et al. (Williams et al., 2007). Die größte Komponente des MRX-Komplexes, Rad50, kann in drei Bereiche unterteilt werden: Die ABC-Domäne am Kopfende, der *Coiled-coil*-Bereich in der Mitte und das Zinkfinger-Motiv in der *Hook*-Domäne. Über die Bindung von Zinkfinger-Domänen zweier Moleküle können Schwesterchromatiden für die HR zusammengehalten werden. Für das *end-bridging* hingegen ist wahrscheinlich eher die Bindung zweier ABC-Domänen notwendig. Neben Rad50 können auch Mre11, das Nuklease-Aktivität besitzt, und Xrs2 an die DNA direkt binden. Die Interaktion zwischen Rad50 und Xrs2 wird durch Mre11 gewährleistet.

Xrs2 ist bezüglich seiner biologischen Rolle das am wenigsten verstandene Mitglied des MRX-Komplexes. Als funktionelles Homolog von Xrs2 wird das Säugerprotein Nbs1 beschrieben. Durch Mutation im *NBS1*-Gen wird das *Nijmegen Breakage* Syndrom, eine seltene genetische Krankheit, verursacht, die durch Microcephalie, Wachstumsstörung, Immundefizienz und hohe Anfälligkeit für maligne Erkrankungen charakterisiert wird (D'Amours und Jackson, 2002). Im Vergleich zu Rad50 und Mre11 ist die strukturelle Homologie von Xrs2 zu Nbs1 nur sehr gering. Die deutlichste Sequenzhomologie mit 28 % Aminosäure-Identität weist die FHA-Domäne (*forkhead-associated domain*) am N-Terminus auf (Digweed et al., 1999), die Zielproteine phosphorylierungs-abhängig bindet (Durocher et al., 1999; Durocher und Jackson, 2002). In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass diese Domäne für Ligasefunktionen im NHEJ-Prozess verantwortlich ist (Matsuzaki et al., 2008; Palmbos et al., 2008). An die FHA-Domäne schließt eine vor

kurzem entdeckte doppelte BRCT-Domäne (*BRCA1 C-terminal domain*) an (Becker et al., 2006). Wie die FHA-Domänen sind auch BRCT-Domänen an Protein-Interaktionen beteiligt, die durch Phosphorylierung reguliert werden (Yu et al., 2003). Dadurch stellen FHA- und BRCT-Domänen die Schlüsselelemente von Proteinen dar, die an der Zellzyklus-Kontrolle, der *Checkpoint*-Aktivierung und der DNA-Reparatur beteiligt sind (Yu et al., 2003; Williams et al., 2005). Im Zentrum des Proteins befinden sich zwei Serinreste, die nach DNA-Schädigung von *Checkpoint*-Kinasen phosphoryliert werden können (Trujillo et al., 2003). Zwei weitere funktionelle Domänen wurden in der C-terminalen Region von Xrs2 gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren von Position 630 bis 661 für die Interaktion mit Mre11 notwendig sind (Shima et al., 2005; Tsukamoto et al., 2005), währen Tel1, eine *Checkpoint*-Kinase des Zellzyklus, mit den C-terminalen 162 Aminosäuren assoziiert (Nakada et al., 2003). Die Bindung von Xrs2 an Mre11 ist für die Translokation der Nuklease vom Cytoplasma in den Kern notwendig (Tsukamoto et al., 2005). Zusätzlich besitzt auch Xrs2 selbst Affinität zu DNA (Trujillo et al., 2003). Enzymatische Funktionen konnten für Xrs2 bisher nicht beschrieben werden. Das Xrs2-Protein mit seinen funktionellen Domänen ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt.

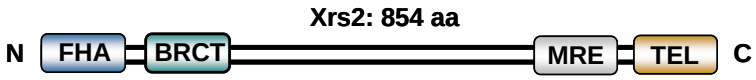

Abbildung 8: Das Protein Xrs2 mit seinen funktionellen Domänen

Xrs2 besteht aus insgesamt 854 Aminosäuren. Am N-Terminus sowie am C-Terminus befinden sich je zwei funktionelle Domänen.
FHA: 1-125, FHA-Domäne (*forkhead-associated domain*), Bindung von Lif1
BRCT: 119-327, doppelte BRCT-Domäne (*BRCA1 C-terminal domain*)
MRE: 630-664, Bindung von Mre11
TEL: 693-854, Bindung von Tel1

2.4.2 Funktionen des MRX-Komplexes

Der MRX-Komplex spielt für viele zelluläre Mechanismen eine wichtige Rolle. Die wohl wichtigsten Funktionen in *S. cerevisiae* übt der Komplex in der Endenprozessierung von DSB aus. Wie bereits unter Punkt 2.2.1.1 dargestellt, sind Mechanismen für die Schadenserkennung, wie die Phosphorylierung von H2A (Shroff et al., 2004) und das so genannte *Chromatin Remodelling* (Tsukuda et al., 2005; van Attikum und Gasser, 2005), MRX-abhängig. Zusätzlich wirken die Proteine des MRX-Komplexes in der Signalweiterleitung nach DNA-Schädigung (Haber, 1998; Grenon et al., 2001; Lisby et al., 2004) sowie in der Aktivierung von Zellzyklus-*Checkpoints* (Andrews und Clarke,

2005) mit. Wichtig hierfür ist wohl die Interaktion von Xrs2 mit Tel1, dem Hefe-Homolog des Säugerproteins ATM. Dadurch wird einerseits Tel1 an den DSB rekrutiert, anderseits bewirkt Tel1 die Phosphorylierung von Xrs2 und Mre11 (Nakada et al., 2003).

In der DSB-Reparatur ist die Fähigkeit von Xrs2, an die DNA zu binden, für die Rekrutierung der anderen beiden MRX-Komponenten wichtig (Trujillo et al., 2003). Die zentrale Rolle von Rad50 scheint das Zusammenhalten der losen DNA-Enden zu sein (D'Amours und Jackson, 2002; Williams et al., 2007). In der HR sorgt der MRX-Komplex zusätzlich für die Bindung des geschädigten Stranges an das Schwesterchromatid (Williams et al., 2007). Ivanov et al. konnten zeigen, dass die MRX-Proteine für die Endenresektion von großer Bedeutung sind (Ivanov et al., 1994). Eine neuere Studie lässt erkennen, dass der MRX-Komplex zusammen mit der Endonuklease Sae2 für die Initiierung dieser Endendegradierung verantwortlich ist (Zhu et al., 2008). Für den NHEJ-Mechanismus hingegen ist die Nuklease-Aktivität nicht notwendig (Zhang und Paull, 2005). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Lif1 durch Xrs2 (Trujillo et al., 2003; Palmbos et al., 2005) und die Bindung von yKu80 durch Mre11 (Palmbos et al., 2005) für die Rekrutierung der beiden NHEJ-Faktoren wichtig ist. Neuere Studien deckten auf, dass die FHA-Domäne von Xrs2 für die Bindung von Lif1 verantwortlich ist (Matsuzaki et al., 2008; Palmbos et al., 2008). Auch die Dissoziation von NHEJ-Faktoren ist ein aktiver Prozess, der von einem intakten MRX-Komplex und von der ATP-Bindung durch Rad50 abhängig ist (Wu et al., 2008).

Eine besonders wichtige Rolle spielt der MRX-Komplex außerdem während der Meiose, wobei die Nuklease-Aktivität von großer Bedeutung ist (Moreau et al., 1999). Der MRX-Komplex ist für die durch Spo11 katalysierte Bildung von DSB notwendig. Des Weiteren hat der Komplex eine spezielle Funktion bei der Entfernung des kovalent gebundenen Spo11 von den 5´-Enden, so dass weitere Endenresektion stattfinden kann. Schließlich spielt er auch in diesem Prozess eine Rolle für das *end-bridging* und die *Checkpoint*-Aktivierung (Borde, 2007).

Auch für die Aufrechterhaltung der Telomerenden ist der MRX-Komplex wichtig. Seine exakte Rolle hierbei ist jedoch noch unklar (Bianchi und Shore, 2008). Die Tel1-Bindestelle von Xrs2 spielt eine wichtige Rolle, da *xrs2*-Mutanten ohne die Tel1-Bindestelle Telomer-Verkürzungen aufweisen (Shima et al., 2005; Tsukamoto et al., 2005). Ebenso ist die *Hook*-Domäne von Rad50 für die Telomer-Funktionen essentiell (Wiltzius et al., 2005). Darüber hinaus zeigt eine neuere Studie, dass der MRX-Komplex an der postreplikativen Reparatur über den Rad5-Weg sowie an einem neu entdeckten Rad52-abhängigen Weg nach UV-Schäden beteiligt ist (Gangavarapu et al., 2007).

2.5 Zielsetzung

Mutationen im menschlichen *NBS1*-Gen verursachen das *Nijmegen Breakage* Syndrom, eine Krankheit, bei der die Zellen unter anderem chromosomale Instabilität aufweisen. Auch in Hefezellen hat das homologe Protein Xrs2 viele Funktionen für die Aufrechterhaltung genomischer Stabilität. In dieser Arbeit sollte die Rolle von Xrs2 in Prozessen, die diese Eigenschaft gewährleisten, näher untersucht werden.

Zunächst sollten mögliche Ursachen für die hohe Empfindlichkeit gegenüber γ-Strahlen nach Deletion von *XRS2* untersucht werden. γ-Strahlung verursacht vor allem DSB, die in Hefe hauptsächlich über HR repariert werden. Bisher konnten jedoch für Stämme mit Mutationen in den Genen des MRX-Komplexes keine deutlichen Defekte in der HR nachgewiesen werden. Daher sollten sowohl die chromosomale DSB-Reparatur als auch die Reparatur von Mikrodeletionen mit Hilfe eines *in vivo*-Plasmidsystems näher untersucht werden. Zusätzlich sollte auch überprüft werden, ob ein verändertes Apoptoseverhalten der *xrs2*-Zellen das Überleben beeinflussen könnte. Dies sollte indirekt über die Analyse der Akkumulation von ROS, aber auch direkt durch den Nachweis von Annexin V-positiven Zellen erfolgen.

Da Zellen nach Deletion von *XRS2* neben einer hohen Strahlenempfindlichkeit auch eine starke Sensitivität gegenüber basen-schädigenden Agenzien wie MMS und H_2O_2 aufweisen, sollte des Weiteren überprüft werden, ob Xrs2 eine Rolle in der BER spielt. Hierbei sollten zunächst Mutationsfrequenzen und Überlebensdaten in Abhängigkeit von der Wachstumsphase analysiert werden. Die BER-Effizienz selbst sollte mit Hilfe von PFGE-Analyse hitze-labiler Stellen *in vivo* als auch unter zu Hilfenahme von uracil- und 8-oxoG-haltigen Oligonukleotiden *in vitro* analysiert werden.

Für neu entdeckte Funktionen des Xrs2-Proteins sollte außerdem geklärt werden, ob es sich um Funktionen des Protein selbst oder des gesamten Komplexes handelt. Daher sollten neben der *xrs2*-Mutante auch Deletionen der Komplexpartner analysiert werden. Zusätzlich sollten Analysen von Mutanten, die verkürzte *XRS2*-Allele tragen, Aufschluss über die Notwendigkeit funktioneller Domänen des Proteins geben. Für die nähere Bestimmung der Rolle in den genannten Mechanismen sollten Epistasisanalysen zu anderen Genen dieser Prozesse dienen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Computerprogramme

3.1.1.1 Geräte

^{60}Co-γ-Zelle	Atomic Energy of Canada, Ltd., Ottawa, Canada
96-Loch-Platten	Falcon, USA
Blöckchenformen	Werkstatt GSF
CASY-*Counter*	Schaerfe GmbH, Reutlingen
Durchflußzytometer	BD LSRII, Becton Dickinson, USA
French Press	SLM-Aminco, Rochester, USA
Geldokumentation	GelDoc 2000, BioRad, München
Gelelektophorese-Apparaturen	horizontale Standardgelelektrophorese für Agarosegele, BioRad, München CHEF-Mapper für PFGE, BioRad, München vertikale Gelelektrophorese für PAA-Gele, Pharmacia Biotech, Wien und C.B.S. Scientific, Canada
Inkubationsschränke	Heraeus, Hanau Memmert, Schwabach Sanyo, Japan Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Küvetten	Brand, Wertheim
Mikroskop	Olympus LH50A, Olympus Optical Co., Hamburg
PCR-Gerät	Cyclone gradient, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Petrischalen	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
pH-Meter	InoLab pH Level 1, UK
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg
Scanner	Umax, PowerLook 1000, Willich
Schüttler	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Spannungsquellen	BioRad, München
Sterilbänke	Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau
Zählkammer	Brand, Wertheim
Zentrifugen	Biofuge pico, Heraeus, Hanau Eppendorf centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg Minifuge RF, Heraeus, Hanau Multifuge 3SR, Heraeus, Hanau Sigma 1K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz

3.1.1.2 Computerprogramme

Abbildungen	Adobe Photoshop CS, Adobe Inc. Adobe Illustrator CS, Adobe Inc. Microsoft® Power Point 2002
FACS Software	FACSDiva, Becton Dickinson, USA

Geldokumentation	*Quantity One*®, BioRad, München
Literaturrecherchen	http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed http://www.yeastgenome.org/
PFGE-Auswertung	*Geltool* (Gomez-Paramio, 2007; Steininger et al., 2008)
Plasmide – Schnittstellen, Zeichnen	http://rna.lundberg.gu.se/cutter2 *BioEdit* (Biological Sequence Alignment Editor)
Quantitative Auswertung von Filmen	*TotalLab TL100*, Amersham, UK
Sequenzrecherchen	http://www.yeastgenome.org/
Tabellenkalkulation und Diagramme	Microsoft® Excel 2002, Microsoft
Textverarbeitung	Microsoft® Word 2002, Microsoft

3.1.2 Chemikalien

[α-^{32}P]dCTP, [α-^{32}P]dGTP	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
[γ-^{32}P]ATP	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
5-FOA	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Acrylamid/BisAA	30 % / 0,8 % (Protogel™), National Diagnostics, Atlanta, USA 40 % / 19:1, Biozym, Hess, Oldendorf
Agarosen	Agarose Type I: Low EEO, SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen LMP-Agarose, GIBCO BRL Life Technologies, Eggenstein SeaKem LE, Biozym, Hess, Oldendorf
Aminosäuren	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen Merck, Darmstadt; Serva, Heidelberg
Ammoniumacetat	Merck KG aA, Darmstadt
Ammoniumchlorid	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Annexin V	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
APS	Merck KG aA, Darmstadt
ATP	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Bacto-Agar	Difco, Hamburg
Bacto-Pepton	Difco, Hamburg
Bacto-Trypton	Difco, Hamburg
Bacto-Yeast-Extract	Difco, Hamburg
Borsäure	Merck KG aA, Darmstadt
Bradford-Reagenz	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Bromphenolblau	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim
BSA	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Calciumchlorid	Merck KG aA, Darmstadt
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
ddTTP (wässrige Lösung, 10 mM)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DHE	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck KG aA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KG aA, Darmstadt
DTT	Serva, Heidelberg

EDTA	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethanol absolut	Merck KG aA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formamid	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
G418	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Glukose	Merck KG aA, Darmstadt
Glycerin	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Harnstoff	Merck KG aA, Darmstadt
HEPES	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Isopropanol	Merck KG aA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KG aA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KG aA, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck KG aA, Darmstadt
Lithiumacetat	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
LMP-Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Lytikase	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Magnesiumsulfat	Merck KG aA, Darmstadt
Methylmethansulfonat	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
NAD	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck KG aA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KG aA, Darmstadt
Natriumlauroylsarcosin	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Natronlauge	Merck KG aA, Darmstadt
PBS	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
PEG_{3350}	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Phenol/Chloroform/Isoamyl-alkohol (25:24:1)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Propidiumiodid	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Saccharose	Merck KG aA, Darmstadt
Salmon sperm DNA	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Salzsäure	Merck KG aA, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
Sorbitol	Serva, Heidelberg
TEMED	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Tri-Natrium-Citrat	Merck KG aA, Darmstadt
Tris	Merck KG aA, Darmstadt
Triton X-100	Merck KG aA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Merck KG aA, Darmstadt
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
YNB	DIFCO, Hamburg
β-Mercaptoethanol	Merck KG aA, Darmstadt

3.1.3 Verwendete Puffer und Lösungen

0,8 % bzw. 0,6 % Agarose für Gelelektrophorese

4 g bzw. 3 g Agarose SeaKem LE
mit 500 ml 1x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufkochen
flüssige Agarose bei 60 °C lagern

0,8 % Agarose für PFGE

0,8 g Agarose Type I
mit 100 ml 0,5 x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufkochen

10 N Ammoniumacetat

77,03 g Ammoniumacetat in 100 ml Wasser lösen, autoklavieren

Annexin-Puffer I

35 mM KH_2PO_4 / K_2HPO_4 (pH 6,8)
0,5 mM $MgCl_2$
1,2 M Sorbitol

Annexin-Puffer II

10 mM HEPES
140 mM NaCl
5 mM $CaCl_2$
0,6 M Sorbitol

5 x BER-Puffer

250 mM HEPES (pH 7,5)
2,5 mM EDTA
10 mM DTT
100 mM KCl
20 mM ATP
25 mM CPK (immer frisch zugeben)
2,5 mM NAD
0,5 mM ddTTP
Lagerung bei -20 °C möglich

Blöckchen-Puffer

pro Probe:
2 ml 0,5 M EDTA, pH 9
20 µl 10 mM Tris/HCl (pH 7,5)
30 µl Wasser

0,1 M $CaCl_2$ / 0,01 M Tris Lösung zur Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

14,7 g $CaCl_2$ x H_2O
1,2 g Tris
in 1 l Wasser lösen, pH 8,0 einstellen, autoklavieren

CASYton

0,9 % NaCl
0,1 mM EDTA

0,01 M Citrat-Phosphatpuffer für SEC-Puffer

0,01 M Tri-Natrium-Citrat
0,01 M Dinatriumhydrogenphosphat
pH 7,0 einstellen, autoklavieren

Dialysepuffer

10 mM Tris/HCl (pH 7,5)
10 mM β-Mercaptoethanol

6 x DNA-Auftragspuffer für Agarosegele

50 % (w/v) Saccharose
0,1 % (w/v) Bromphenolblau
mit TE-Puffer ansetzen

DNA-Auftragspuffer für Acrylamidgele

95 % Formamid
20 mM EDTA
0,02 % Bromphenolblau
0,02 % Xylencyanol

dNTP-Mix

dATP-, dCTP-, dGTP-, dTTP-Stammlösungen zu gleichen Teilen mischen, mit H_2O verdünnen
Konzentrationen der dNTPs im Mix:
[dATP] = [dCTP] = [dGTP] = [dTTP] = 10 mM

1 M EDTA

292,2 g EDTA
auf 1 l mit Wasser auffüllen
pH-Wert mit NaOH einstellen

Einfriermedium für Hefen

2 g Pepton
1 g Yeast-Extract
15 g Glycerin
in 100 ml Wasser lösen, autoklavieren

Extraktionspuffer

100 mM Tris/HCl (pH 8,0)
10 mM β-Mercaptoethanol

1 M HEPES

276,4 g HEPES
auf 1 l mit Wasser auffüllen,
pH-Wert mit NaOH, KOH einstellen

5 x *Incision*-Puffer

250 mM HEPES-KOH (pH 7,7)
2,5 mM EDTA
5 mM DTT
100 mM CPK
10 % Glycerin
500 µg/ml BSA

Kaliumphosphatpuffer

25 mM KH_2PO_4
25 mM K_2HPO_4
pH 7,0 mit KOH einstellen, autoklavieren

67 mM K_2HPO_4 für LHR-Puffer

5,83 g K_2HPO_4 in 500 ml Wasser lösen, autoklavieren

LHR-Puffer

18 g Glukose
9,1 g KH_2PO_4
in 1 l Wasser lösen, mit 67 mM K_2HPO_4 pH 5,0 einstellen, autoklavieren

1,6 % LMP-Agarose für Blöckchen

1,6 g LMP-Agarose
mit 100 ml 0,125 M EDTA (pH 8,0) in der Mikrowelle aufkochen, flüssige Agarose auf 50 °C temperieren

1 M Lithiumacetat

102 g LiOAc in 1 l Wasser lösen, steril filtrieren

Lysepuffer

2 % Triton X-100 (immer frisch zugeben)
1 % SDS (immer frisch zugeben)
100 mM NaCl
10 mM Tris/HCl (pH 8,0)
1 mM EDTA

Lytikase-Lösung für PFGE

pro Probe:
66 µl SEC-Puffer
4,7 µl Lytikase (Stock 20000 U/ml)
3,3 µl Mercaptoethanol

Lytikase-Lösung für Plasmid-Isolierung aus Hefe

1,2 M Sorbitol
0,1 M $NaPO_4$-Puffer (pH 7,4)
5000 U/ml Lytikase (Stock 20000 U/ml)

100 mM $MgCl_2$

0,95 g $MgCl_2$ in 100 ml Wasser lösen aliquotieren und bei -20 °C lagern

M9-Puffer

0,39 % $Na_2HPO_4*2H_2O$
0,3 % KH_2PO_4
0,1 % NH_4Cl
0,5 % NaCl
0,02 % $MgSO_4*7H_2O$

3 M Natriumacetat

24,6 g NaAc in Wasser lösen,
mit Essigsäure pH 5,8 einstellen,
mit H_2O auf 100 ml auffüllen

PBS

9,6 g PBS in 1 l Wasser lösen, autoklavieren

50 % PEG_{3350}

50 g PEG_{3350} in 100 ml Wasser lösen, autoklavieren

18 % bzw. 24 % Polyacrylamidgel

18 % Acrylamid/BisAA (30 %) bzw.
24 % Acrylamid/BisAA (40%)
8 M Harnstoff
89 mM Tris/HCl (pH 8,8)
89 mM Borsäure
2 mM EDTA
0,1 % APS
0,005 % TEMED

Proteinase K-Lösung

pro Probe:
1 ml 0,5 M EDTA (pH 9,0)
10 mg NLS
1 mg Proteinase K
zum Lösen kurz ins 50 °C-Wasserbad stellen

Ringsing-Puffer

1,21 g Tris
2,922 g EDTA
in 1 l Wasser lösen, pH 7,0 einstellen, autoklavieren

Reaktionspuffer für *Primer-extension-Assay*

25 mM KH_2PO_4 / K_2HPO_4 (pH 7,0)
5 mM $MgCl_2$
5 mM DTT
100 µg/ml BSA
10 % Glycerin
1 % dNTP-Mix (100 µM von jedem Nukleotid)

5 x Reaktionspuffer für *Gap-filling-Assay*

250 mM Tris (pH 7,5)
250 mM KCl
5 mM DTT
25 mM $MgCl_2$
25 % Glycerin
12,5 mM dCTP
12,5 mM dTTP

SEC-Puffer

1 M Sorbitol
0,1 M EDTA
in 0,01 M Citrat-Phosphatpuffer (pH 7,0) lösen
mit NaOH auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren

Stopplösung für *Incision-Assay*

250 mM HEPES-NaOH (pH 7,5)
500 µg/ml Proteinase K

10 x TAE-Laufpuffer für Gelelektrophorese

48,4 g Tris
11,4 ml Eisessig
20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
mit Wasser auf 1 l auffüllen

10 x TBE-Laufpuffer für Gelelektrophorese

1 M Tris
2 mM EDTA
mit Borsäure auf pH 8,3 einstellen, autoklavieren

10 x TE

50 ml 1 M Tris
10 ml 0,5 M EDTA
auf 500 ml mit Wasser auffüllen

TER

50 µg/ml RNaseA in TE lösen

1 M Tris

121,1 g Tris
auf 1 l mit Wasser auffüllen, pH-Wert mit HCl einstellen

3.1.4 Enzyme, Längenstandards und Kits

1 kb *Ladder* (DNA)	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
Creatinphosphokinase (CPK)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
G-25 Sephadex Säulen	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim
Glucuronidase / Arylsulfatase	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim
Katalase	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Protease-Inhibitor-Mix	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Proteinase K	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
PureYieldTM Plasmid Midiprep System	Promega Corporation, Madison, USA
QIAprep 8 Miniprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Quick Ligation Kit (T4-DNA-Ligase)	New England Biolabs, Frankfurt a. Main
Restriktionsendonukleasen und zugehörige Puffer	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen New England BioLabs, Frankfurt a. Main Roche Molecular Diagnostics, Mannheim

RNaseA	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
T4 Polynukleotidkinase	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega Corporation, Madison, USA

3.1.5 Medien und Stämme

3.1.5.1 Hefe

YEPD

2% Glukose
2% Pepton
1% Yeast-Extract

Das Standardmedium YEPD wurde als Vollmedium für Hefen verwendet. YEPD mit 80 mg Adeninsulfat pro Liter (YPAD) wurde für Hefetransformationen eingesetzt. Für Plattenmedium wurden 20 g Bacto-Agar zugefügt. Zur Herstellung von MMS-haltigen YEPD-Platten wurde die Chemikalie in Konzentrationen von 0,0025 % bis 0,02 % vor dem Gießen in das Plattenmedium gemischt.

SC-Medium

2 % Glukose
0,6 % YNB
1,5 g SC-Mix auf 1 l Medium

SC-Mix (komplett)

1 g Adenin, Arginin, Histidin, Methionin, Tryptophan, Uracil
2,5 g Phenylalanin
3 g Lysin, Tyrosin
4 g Isoleucin
5 g Aspartat, Glutamat
7,5 g Valin
10 g Threonin
20 g Leucin, Serin

Für Plattenmedium wurden 20 g Bacto-Agar zugefügt. SC-Medium, in dem ein Nährstoff fehlt, erlaubt die Selektion auf das entsprechende Wildtyp-Gen. 5-FOA-Platten wurden durch Lösen von nur 12 mg Uracil und 1 g 5-FOA pro Liter SC-Medium hergestellt. Für Can-Platten wurden 60 mg Canavanin pro Liter SC-Medium ohne Arginin verwendet. Für die Selektion auf den Austausch eines Gens durch eine *KanMX6*-Kassette wurden 250 µg/ml G418 zugegeben.

SMD-Medium

2 % Glukose
0,6 % YNB
10 % SMD-Mix

SMD-Mix

0,3 g Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Asparagin, Cystin, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin, Valin, Adenin
0,8 g Histidin, 2 g Leucin, 3,2 g Uracil
in 1 l Wasser lösen, autoklavieren

SMD-Medium wurde zur Anzucht von BY4741-Zellen für die Untersuchung des Apoptoseverhaltens verwendet.

Die haploiden *S. cerevisiae*-Stämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die meisten Stämme sind isogene Derivate von MKP0. Deletionsmutanten wurden durch Ersetzen des jeweiligen ORF durch Homologe Rekombination *in vivo* generiert (Knop et al., 1999). Dafür wurden PCR-Produkte verschiedener Marker-Kassetten (*HIS3MX6*, *KANMX6*, *LEU2*) verwendet (Wach et al., 1994; Wach et al., 1997), deren Enden zu anschließenden Regionen des jeweiligen auszuschaltenden Gens komplementär sind (Abbildung 9). Bei der Konstruktion der Deletionsmutante *rad50* bzw. *sgs1* wurde nur der vordere Teil des ORF gegen die Marker-Kassette ausgetauscht.
Für den Knockout von *NTG2* wurde das *RsaI*-*HincII*-Fragment aus dem Vektor pGEM-T *ntg2::TRP1* (Doktorarbeit Idoia Gomez-Paramio, 2007) an Stelle eines PCR-Produktes verwendet. Dadurch wird in der Mutante das *NTG2*-Gen von einer *TRP1*-Kassette unterbrochen.
Für die Herstellung von Mutanten mit verkürzten *XRS2*-Allelen wurden die YIplac128-basierten Plasmide YIpxrs2-84M, YIpxrs2-228M, YIpxrs2-630 und YIpxrs2-664 mit dem Restriktionsenzym *ClaI* verdaut und zur gezielten Integration in den *leu2-3-112*-Lokus in die *xrs2* Deletionsmutante eingebracht. Für die Konstruktion dieser integrativen Plasmide wurden die *XhoI*-*BamHI*-Fragmente der Plasmide pMS278 (*xrs2-84M*), pMS279 (*xrs2-228M*), pMS264 (*xrs2-630*) und pMS394 (*xrs2-664*), erhalten von M. Shinohara (Shima et al., 2005), in die *SalI*-*BamHI* Stelle von YIplac128 transferiert. Als Kontrolle wurde zusätzlich der gesamte *XRS2*-ORF in die *xrs2*-Deletionsmutante eingeführt. Für die Klonierung des Vektors YIp*XRS2* wurde ein *NheI*-*StuI* verdautes PCR-Amplifikat des *XRS2*-Gens gegen das verkürzte *XRS2*-Allel in YIpxrs2-664 ausgetauscht. Alle Mutationen wurden durch PCR-Analyse bestätigt.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	***Genotyp***	***Referenz***
MKP0	*Matα, can1-100, ade2-1, lys2-1, ura3-52, leu2-3-112, his3-Δ200, trp1-Δ901, RAD*	B.A. Kunz
MKP0 *xrs2*	Derivat von MKP0 mit *XRS2*::*KANMX6*	(Steininger, 2005)
MKP0 *rad50*	Derivat von MKP0 mit *RAD50*::*LEU2*	diese Arbeit
MKP0 *mre11*	Derivat von MKP0 mit *MRE11*::*HIS3MX*	diese Arbeit
MKP0 *XRS2*	Derivat von MKP0 *xrs2* mit *XRS2*	diese Arbeit
MKP0 *xrs2-84M*	Derivat von MKP0 *xrs2* mit *xrs2-84M*	diese Arbeit
MKP0 *xrs2-228M*	Derivat von MKP0 *xrs2* mit *xrs2-228M*	diese Arbeit
MKP0 *xrs2-630*	Derivat von MKP0 *xrs2* mit *xrs2-630*	diese Arbeit
MKP0 *xrs2-664*	Derivat von MKP0 *xrs2* mit *xrs2-664*	diese Arbeit
MKP0 *sgs1*	derivative of MKP0 mit *SGS1*::*HIS3MX6*	diese Arbeit
MKP0 *xrs2sgs1*	Derivat von MKP0 mit *XRS2*::*KANMX6*, *SGS1*::*HIS3MX6*	diese Arbeit
MKP0 *srs2*	Derivat von MKP0 mit *SRS2*::*LEU2*	S. Steinhübl
MKP0 *xrs2srs2*	Derivat von MKP0 mit *XRS2*::*KANMX6*, *SRS2*::*LEU2*	diese Arbeit
MKP0 *rad52*	Derivat von MKP0 mit *RAD52*::*KANMX6*	(Mörtl et al., 2008)
MKP0 *ku70*	Derivat von MKP0 mit *KU70*::*LEU2*	(Mörtl et al., 2008)
MKP0 *apn1*	derivative of MKP0 mit *APN1*::*LEU2*	S. Mörtl
MKP0 *apn1xrs2*	Derivat von MKP0 mit *APN1*::*LEU2*, *XRS2*::*KANMX6*	diese Arbeit
MKP0 *ntg1*	Derivat von MKP0 mit *NTG1*::*URA3*	S. Mörtl
MKP0 *ntg1ntg2*	Derivat von MKP0 mit *NTG1*::*URA3*, *NTG2*::*TRP1*	diese Arbeit
MKP0 *ntg1ntg2xrs2*	Derivat von MKP0 mit *NTG1*::*URA3*, *NTG2*::*TRP1*, *XRS2*::*HIS3MX6*	diese Arbeit
MKP0 *apn1ntg1ntg2*	Derivat von MKP0 mit *APN1*::*LEU2*, *NTG1*::*URA3*, *NTG2*::*TRP1*	S. Mörtl
MKP0 *apn1ntg1ntg2xrs2*	Derivat von MKP0 mit *APN1*::*LEU2*, *NTG1*::*URA3*, *NTG2*::*TRP1*, *XRS2*::*HIS3MX6*	diese Arbeit
MKP0 *ogg1*	Derivat von MKP0 mit *OGG1*::*HIS3MX6*	diese Arbeit
MKP0 *ogg1xrs2*	Derivat von MKP0 mit *OGG1*::*HIS3MX6*, *XRS2*::*KANMX*6	diese Arbeit
BY4741	MATa; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*	EUROSCARF
BY4741 *xrs2*	Derivat von BY4741 mit *XRS2*::*KANMX6*,	EUROSCARF

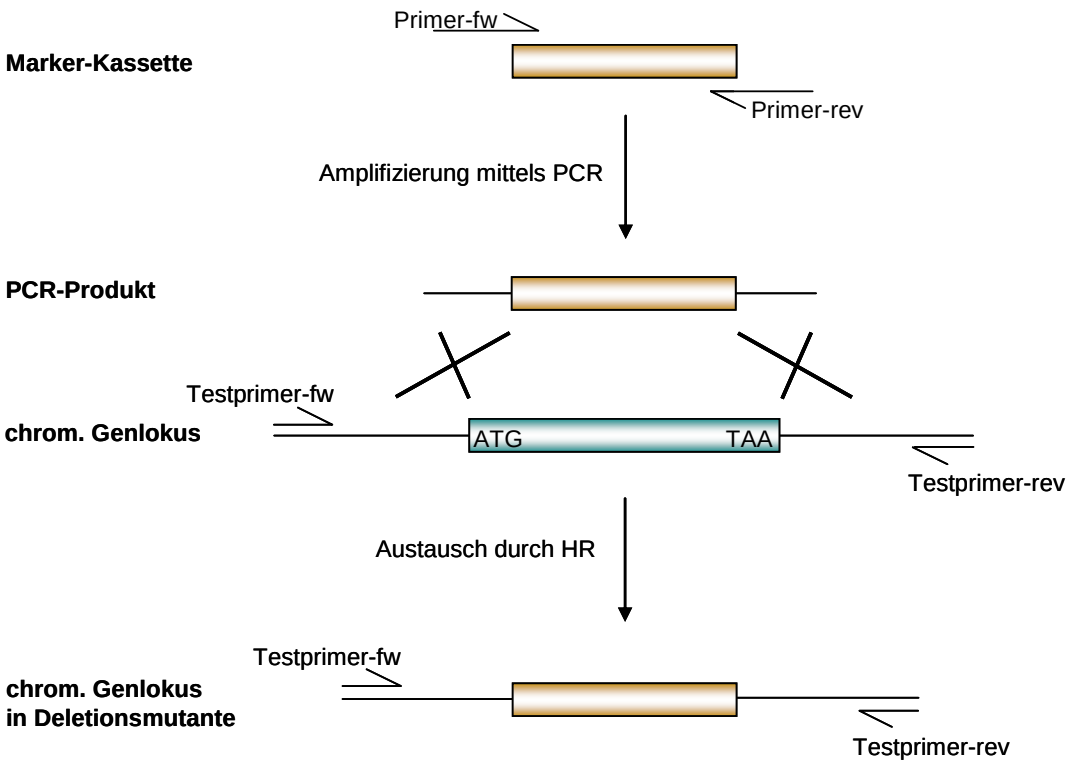

Abbildung 9: Konstruktion von Deletionsmutanten

Mit Hilfe von Primern, deren Enden zu benachbarten Regionen des auszuschaltenden Gens komplementär sind, wurde ein PCR-Produkt generiert, das in der Hefezelle über HR gegen das Gen ausgetauscht werden kann. Mit Hilfe von Testprimern kann anhand der Größe des entstehenden PCR-Produkts die Deletion bestätigt werden.

Zur Analyse der Mutationsfrequenz sowie für die Untersuchungen des Apoptoseverhaltens in Wildtyp-Zellen und in der *xrs2*-Deletionsmutante wurden Derivate von BY4741 verwendet.

3.1.5.2 Bakterien

LB-Medium

1 % Trypton
0,5 % Yeast-Extract
1 % NaCl
in Wasser lösen, pH 7,0 einstellen, auf 1 l auffüllen, autoklavieren

Als Standardmedium für die Anzucht von Bakterien wurde LB-Medium verwendet. Für Plattenmedium wurden 20 g Bacto-Agar zugefügt. Wenn für die Selektion auf ein Plasmid benötigt, wurden 100 mg/ml Ampicillin steril zugeben.

DH5α zur Amplifizierung von YIplac128-basierten Plasmiden:

F⁻ ϕ80δ*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-argF)U169 *deo*R *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17(r_K-,m_K+)*pho*A *sup*E44 λ⁻ *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1

ER2925 zur Amplifizierung von pJD4His:

Ara-14 *leu*B6 *fhu*A31 *lac*Y1 *tsx*78 *gln*V44 *gal*K2 *gal*T22 *mcr*A *dcm*-6 *his*G4 *rfb*D1 R*(zgb*210::Tn10*)*TetS *end*A1 *rps*L136 *dam*13::Tn9 *xyl*A-5 *mtl*-1 *thi*-1 *mcr*B1 *hsd*R2

3.1.6 Oligonukleotide

Berechnung der Anlagerungstemperatur T_A nach der Wallace-Regel:

T_A = [m x 2 °C + n x 4 °C] – 5 °C
m = Anzahl von A und T
n = Anzahl von C und G

Diese Anlagerungstemperatur wird für die Bindung der Oligonukleotide an die DNA in PCR-Reaktionen verwendet. Die Schmelztemperatur T_M liegt 5 °C über der berechneten Anlagerungstemperatur.

Sämtliche hier aufgelisteten Oligonukleotide wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, von Metabion GmbH, Martinsried bezogen. Die Lagerung erfolgte bei – 20 °C.

3.1.6.1 Oligonukleotide zur Generierung von Deletionsmutanten

Bezeichnung	**Sequenz**	**T_M**
Xrs2-KanMX-fw	5´- AAG CAG AAT TTT GTA ATA GAT GAG CAA CAA TAC TGA GAA GGT GAT AAC TAT AAA TTT GGG TCA CCC GGC CAG CG -3´	84,4 °C
Xrs2-KanMX-rev	5´- CGA ATG ATA ATG CAA AAT ATA ATT TAA TGA AAT TGG AAA TAC TCG GAA AAT TTA TCA GAT GGC GGC GTT AGT ATC G -3´	81,1 °C
Rad50-Leu2-fw	5´- TCT TTA ATT CTA AGA AGT GGT AGC AAC CAT TGA GAG GCA AAT CAC CGA AAC GCG CGA GAC GAA AG -3´	86,0 °C
Rad50-Leu2-rev	5´- ATT CAT CTT CCT TTG TTG GTC CCT TAA TTC ATC AAC AGT TAG GCC AAC TGT GGG AAT ACT CAG G -3´	85,0 °C
Mre11-His3MX-fw	5´- ACG CAA GTT GTA CCT GCT CAG ATC CGA TAA AAC TCG ACT AGC TTG CCT CGT CC -3´	87,0 °C
Mre11-His3MX-rev	5´- AAT GGC ATA CCT TGT TGT TCG CGA AGG CAA GCC CTT GGT TGG ATG GCG GCG TTA GTA TCG -3´	89,0 °C
Sgs1-His3MX-fw	5´- TAT ATA TTT AAA AAA TCA TAC ACG TAC ACA CAA GGC GGT AAG CTT GCC TCG TCC CCG CCG GGT CAC -3´	78,7 °C
Sgs1m-His3MX-rev	5´- TTG GGA GAC CAA GAT GGT GGT GGG TGT TCA TTG TCA CCT TGG ATG GCG GCG TTA GTA TCG -3´	80,3 °C

Ogg1-His3MX-fw	5´- AGC GTC CTG ATT CAT AAT TGC GAT TTT ATT TAT CAA CCA GAG CTT GCC TCG TCC -3´	84,0 °C
Ogg1-His3MX-rev	5´- ATC GCC TTT TCG GTC GCG TGC TTT TAT CGT GGT ATT TAC TTG GAT GGC GGC GTT AGT ATC G -3´	87,0 °C

Die unterstrichenen Bereiche sind komplementär zu Sequenzen der Plasmide pFA6a-kanMX6, pFA6a-HIS3MX6 und YIplac128, die als Matrize für die Amplifizierung von *KanMX6*, *HIS3MX6* und *LEU2* dienten. Die restlichen Sequenzen sind zu den Hefegenen homolog, die substituiert werden sollen.

3.1.6.2 Oligonukleotide zur Überprüfung von Gendeletionen

Bezeichnung	**Sequenz**	**T_M**
Xrs2-fw	5´- CAT CAC TAA ACT TAA GAC TAC TCC -3´	60,1 °C
Xrs2-rev	5´- CAG TTA ATG CCT CCA GCA ACC -3´	61,3 °C
Rad50-fw	5´- TGT CTT CAT CTG AGA TAA GGT TCC -3´	62,0 °C
Rad50-rev	5´- AAT GGT TTT CCT CAG TTC ACG -3´	57,0 °C
Mre11-fw	5´- TAC CCA ACC AAA CTG ACT TAA GG -3´	61,0 °C
Mre11-rev	5´- CGA ACA AAA GAG CAA AGG CTG GAA -3´	64,0 °C
Sgs1-fw	5´- GCA CAT ATA ACA AGA AAC TCG AGC -3´	59,3 °C
Sgs1-rev	5´- TCC AGA CTA TCT ATT CGT ATC G -3´	56,5 °C
Sgs1m-His3MX-rev	5´- TTG GGA GAC CAA GAT GGT GGT GGG TGT TCA TTG TCA CCT TGG ATG GCG GCG TTA GTA TCG -3´	80,3 °C
Ogg1-fw	5´- TTA AGA GAT GAG CTG AAC AG -3´	54,0 °C
Ogg1-rev	5´- TCA ATC ATT ACC TTT CAA GC -3´	52,0 °C

3.1.6.3 Oligonukleotide für die Konstruktion des Vektors YIpXRS2

Bezeichnung	**Sequenz**	**T_M**
Xrs2-start	5´- GAT AAC TAT AAA CAT ATG TGG GTA GTA C -3´	59,2 °C
Xrs2-stop	5´- GGA AAA TTT ATC GCT AGC CTT TTC TTC TTT TG -3´	63,1 °C

3.1.6.4 Oligonukleotide zur Überprüfung eines Crossover-Ereignisses

Bezeichnung	**Sequenz**	**T_M**
P1	5´- AAC CTG CAG GAA ACG AAG ATA AAT CAT GTC GAA AGC TAC GTA TAA GGA AC -3´	72,7 °C
P2	5´- GTG AAG TCA TTG ACA CAG TCT GTG -3´	63,5 °C

3.1.6.5 Oligonukleotide für *in vitro*-BER-Analysen

Bezeichnung	Sequenz	T_M
BER1	5´- GCC CTG CAG GTC GAU TCT AGA GGA TCC CCG GGT AC -3´	81,0 °C
BER2	5'- GTA CCC GGG GAT CCT CTA GAG TCG ACC TGC AGG GC -3'	82,0 °C
BER3*	5´- GCC CTG CAG GTC GAG$^{8\text{-oxo}}$ TCT AGA GGA TCC CCG GGT AC -3´	81,0 °C
BER4	5'- GTA CCC GGG GAT CCT CTA GAC TCG ACC TGC AGG GC -3'	82,0 °C
BER5	5´- GCC CTG CAG GTC GAC -3´	52,0 °C
BER6	5´- AGA GGA TCC CCG GGT AC -3´	56,0 °C
BER7	5´- GCC CTG CAG GTC GA -3´	48,0 °C

* von der Firma BioSpring GmbH, Frankfurt am Main

3.1.7 Vektoren

3.1.7.1 Vektoren zur Amplifizierung von Marker-Kassetten für Genaustausch

Der Vektor pFA6a-kanMX6 (Wach et al., 1994) enthält neben dem Ampicillin-Resistenzgen (*AmpR*) für die Selektion in *E. coli* und einem Replikationsursprung (ori) eine *KanMX6*-Kassette (Abbildung 10). Diese Kassette enthält den TEF-Promotor (P_{TEF}) und den TEF-Terminator (T_{TEF}) aus *A. gossypii*, die ein Kanamycin-Resistenzgen flankieren. Mit Hilfe von PCR wurde die *KanMX6*-Kassette amplifiziert und für die Konstruktion von Deletionsmutanten verwendet.

Für die Amplifizierung der Marker-Kassette *HIS3MX6* wurde der Vektor pFA6a-HIS3MX6 (Wach et al., 1997) verwendet. Statt des Kanamycin-Resistenzgens liegt hier zwischen P_{TEF} und T_{TEF} das Auxotrophiegen *HIS3* zur Synthese von Histidin aus *Sz. pombe*.

YIplac128 (Gietz und Sugino, 1988) (nähere Beschreibung unter 3.1.7.3) diente der Amplifizierung des Auxotrophiemarkers *LEU2* zur Synthese von Leucin. Das PCR-Produkt wurde ebenfalls für die Konstruktion von Deletionsmutanten verwendet.

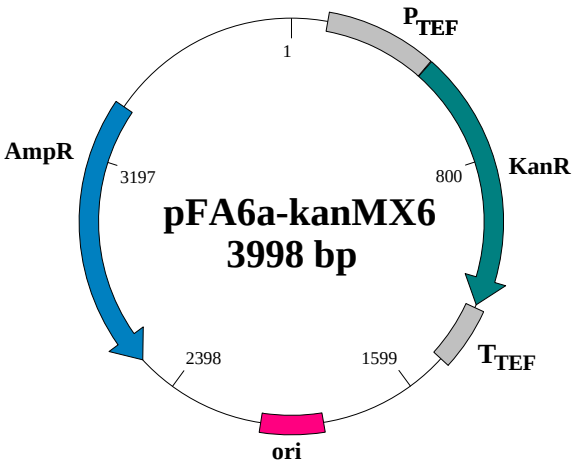

Abbildung 10: Vektor pFA6a-kanMX6

Schematische Darstellung des Vektors pFA6a-kanMX6 mit den wichtigsten funktionellen Elementen. Mit Hilfe von PCR wurde die *KanMX6*-Kassette (P_{TEF} + KanR + T_{TEF}) zur Konstruktion von Deletionsmutanten amplifiziert.

3.1.7.2 Vektor für die *NTG2*-Gendisruption

pGEM-T *ntg2*::*TRP1* (Abbildung 11) ist ein Derivat von pGEM-T *Easy Vector* (Promega). Mit Hilfe der überhängenden T-Enden wurde ein 1,9 kb großes Fragment des *NTG2*-Gens in das *LacZ*-Gen des Vektors eingebracht und durch eine *TRP1*-Marker-Kassette für die Synthese von Tryptophan unterbrochen (Gomez-Paramio, 2007). Für die *NTG2*-Gendisruption wurde das *RsaI-HincII*-Fragment aus dem Vektor isoliert und in *S. cerevisiae*-Zellen eingebracht. Durch Homologe Rekombination des Restriktionsfragmentes mit dem chromosomalen *NTG2*-Lokus wird das *TRP1*-Gen in das auszuschaltende Gen eingebaut.

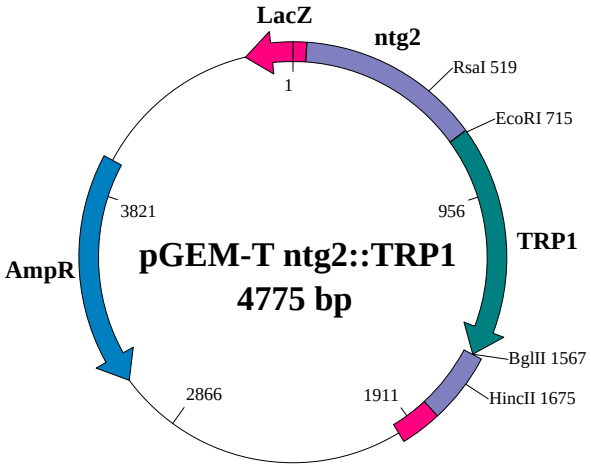

Abbildung 11: Vektor pGEM-T *ntg2*::*TRP1*

Schematische Darstellung des Vektors pGEM-T *ntg2*::*TRP1* mit den wichtigsten funktionellen Elementen. Das *RsaI-HincII*-Restriktionsfragment diente der Gendisruption von *NTG2*.

3.1.7.3 Vektoren für die Konstruktion von Mutanten mit verkürzten *XRS2*-Allelen

Für die Herstellung von Mutanten mit verkürzten *XRS2*-Allelen musste die *xrs2*-Deletionsmutante mit integrativen Plasmiden transformiert werden, die die benötigten Sequenzen inklusive Promotor- und Terminator-Region tragen. M. Shinohara stellte freundlicherweise die YIplac211-basierten Plasmide pMS278 (*xrs2-84M*), pMS279 (*xrs2-228M*), pMS264 (*xrs2-630*) und pMS394 (*xrs2-664*) zur Verfügung (Shima et al., 2005). Neben einem mutierten *xrs2*-Allel enthält jedes Plasmid sowohl die Promoter-Region von *XRS2* (Chromosom IV 1219010–1217570) als auch Sequenzen hinter dem *XRS2*-Gen (Chromosom IV 1215002–1214802). Da diese Vektoren jedoch in den *URA3*-Lokus integrieren und das *URA3*-Gen späteren Analysen der Reparatur von Mikrodeletionen dienen sollte, konnten die Plasmide nicht in dieser Form verwendet werden. Daher wurden die *XhoI-BamHI*-Fragmente der Vektoren in die *SalI-BamHI* Stelle von YIplac128 (Gietz und Sugino, 1988) transferiert. Durch diese Klonierung entstanden die Plasmide YIpxrs2-84M, YIpxrs2-228M, YIpxrs2-630 und YIpxrs2-664. Für die Herstellung des Vektors YIpXRS2 wurde das gesamte *XRS2*-Gen aus Wildtyp-Zellen mit Hilfe der Primer Xrs2-start und Xrs2-stop amplifiziert und das *NheI-StuI* verdaute PCR-Fragment gegen das verkürzte *XRS2*-Allel in YIpxrs2-664 ausgetauscht.
Der Vektor YIplac128 (Abbildung 12) enthält im *LEU2*-Gen eine singuläre Schnittstelle für das Restriktionsenzym *ClaI*. Dadurch kann der Vektor linearisiert werden und durch Transformation von Hefezellen in den *leu2-3-112*-Lokus integrieren. Die *SalI*- und *BamHI*-Schnittstellen liegen zwischen dem *LacZ*-Gen und dessen Promotor, so dass ein ORF, der mit Hilfe dieser Enzyme eingebracht wird, exprimiert werden kann.

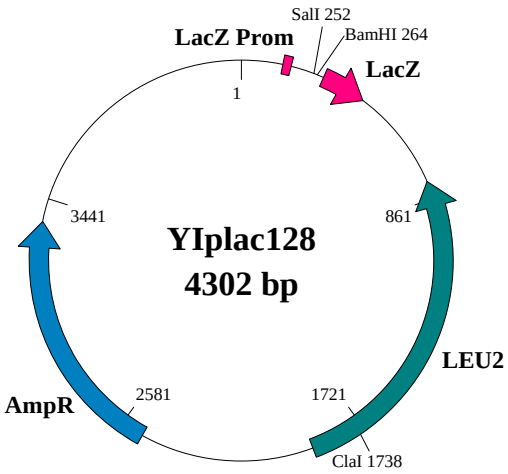

Abbildung 12: Vektor YIplac128

Schematische Darstellung des Vektors YIplac128 mit den wichtigsten funktionellen Elementen. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme *SalI* und *BamHI* wurden verkürzte *XRS2*-Allele hinter den *LacZ*-Promotor kloniert. Der durch *ClaI*-Verdau linearisierte Vektor kann in den chromosomalen *LEU2*-Lokus von Hefezellen integrieren.

3.1.7.4 Vektor zur Analyse der Reparatur von Mikrodeletionen in *S. cerevisiae*

Abbildung 13 zeigt den Vektor pJD4His (Steininger, 2005; Steininger et al., 2008), ein Derivat von YpJA18 (Jha et al., 1993; Mörtl et al., 2008). Der Vektor wurde für die Untersuchung der Reparatur von Mikrodeletionen in *S. cerevisiae* konstruiert. Neben Ampicillin zur Selektion in *E. coli* besitzt der Vektor die Selektionsgene *TRP1* (Gen für die Tryptophansynthese) und *URA3* (Gen für die Uracilsynthese). Mit Hilfe der Restriktionsenzyme *ApaI* und *NcoI* wurden 169 bp aus dem *URA3*-Gen durch eine *HIS3MX6*-Kassette (Gen für die Histidinsynthese) ausgetauscht. Die *ARS*-Sequenz dient der eigenständigen Replikation des Vektors in Hefezellen. Da die *CEN4*-Sequenz für die chromosomen-ähnliche Segregation deletiert wurde, kann der Vektor über Homologe Rekombination in das Genom integriert werden, als auch unter Selektionsdruck extrachromosomal in der Hefezelle vorliegen. Bei der Analyse der DNA-Reparatur können mit Hilfe dieses Vektors die Reparatureffizienz, die Reparaturgenauigkeit und die Crossoverfrequenz bestimmt werden.

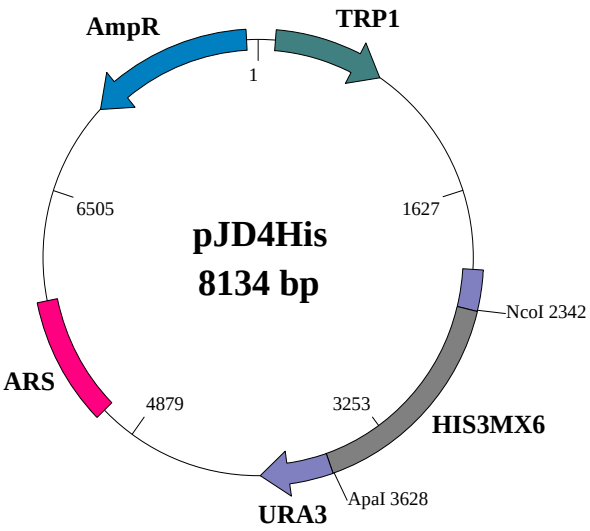

Abbildung 13: Vektor pJD4His

Schematische Darstellung des Vektors pJD4His mit den wichtigsten funktionellen Elementen. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme *ApaI* und *NcoI* kann die *HIS3MX6*-Kassette ausgeschnitten werden, was zu einer Mikrodeletion von 169 bp im *URA3*-Gen führt.

3.2 Methoden

3.2.1 Mikrobiologische Methoden

3.2.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen zur Transformation

Damit Plasmid-DNA von Bakterienzellen aufgenommen werden konnte, musste die Zellwand partiell durchlässig gemacht werden. Diese so genannten kompetenten Zellen wurden nach der Calciumchlorid-Methode nach Sambrook (Sambrook et al., 1989) hergestellt.

Von dem gewünschten Bakterienstamm wurde mit einer sterilen Impföse eine ÜN-Kultur in sterilem LB-Medium angelegt. Diese wurde dann in frischem LB-Medium 1:100 verdünnt, und solange bei 37 °C geschüttelt, bis eine optische Dichte von 0,3 bis 0,4 bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) erreicht wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4000 rpm, 4 °C, 15 min) geerntet, der Überstand verworfen und die Zellen sofort auf Eis gestellt. Das Sediment wurde anschließend in 245 ml eiskalter Calciumchlorid-Tris-Lösung gründlich resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (15 min, 4000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand wiederum verworfen, das Sediment in 5 ml Calciumchlorid-Tris-Lösung aufgenommen und 2 h auf Eis inkubiert. Schließlich wurde Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 15 % zugegeben und die Suspension in 200 µl Aliquots aufgeteilt. Wurde die Zellsuspension nicht sofort weiter verwendet, konnten Aliquots bei –80 °C gelagert werden.

3.2.1.2 Transformation von *E. coli*-Zellen mittels Hitzeschock

Kompetente Bakterien können dazu veranlasst werden, Plasmid-DNA aufzunehmen, indem sie einem Hitzeschock ausgesetzt werden (Lederberg und Cohen, 1974).

Die kompetenten Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut und mit 50 ng Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz gemischt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 2 min einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen nochmals kurz auf Eis gestellt und mit 900 µl LB-Medium versetzt. Es folgte eine Inkubation von 45 min bei 37 °C unter Schütteln. Von der Zellsuspension wurden 10 % und 90 % auf Agarplatten mit dem entsprechenden Resistenzantibiotikum ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert.

3.2.1.3 Flüssigkultur zur Anzucht und Plasmidpräparation von *E. coli*

Um Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen zu isolieren, wurden diese in Flüssigkultur angezüchtet.
Die Bakterien wurden hierzu mit einer sterilen Impföse von der Oberfläche einer Gefrierkultur abgenommen und in das benötigte Volumen LB-Medium überführt. Zusätzlich musste dem Medium das entsprechende Antibiotikum in geeigneter Konzentration zur Selektion zugefügt werden. Die Zellen wurden 12 – 16h bei 160 – 200 rpm und 37 °C geschüttelt.

3.2.1.4 Anlegen von Gefrierkulturen

Da Flüssigkulturen nur kurz und Agarplatten im Kühlschrank nur bis zu vier Wochen gelagert werden können, wurden zur längerfristigen Aufbewahrung Gefrierkulturen angelegt. Dazu wurden Zellen aus 2 ml einer ÜN-Flüssigkultur 10 min bei 5000 rpm pelletiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 800 µl LB-Medium aufgenommen. Die Kultur wurde mit 200 µl sterilem 87 %igem Glycerin versetzt, gemischt und bei –80 °C eingefroren.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Bei der photometrischen Bestimmung von Nukleinsäuren wird das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm ausgenutzt. Das Absorptions-Maximum von Proteinen hingegen liegt bei 280 nm. Bestimmt man das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm, lässt sich die Reinheit der Nukleinsäuren abschätzen. In einer reinen DNA-Lösung sollte der Quotient 260 nm / 280 nm zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Eine Absorption bei 260 nm von 1,0 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.
Zunächst wurde für die Konzentrationsbestimmung der Nullwert mit demjenigen Puffer bzw. Wasser eingestellt, in dem die zu bestimmende DNA gelöst war. Danach konnte ein Aliquot der DNA bzw. bei höher konzentrierten Lösungen ein Aliquot einer Verdünnung gemessen werden.

3.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch PCR können Nukleotidsequenzen in millionenfacher Kopie hergestellt werden. Dazu werden kurze Oligonukleotide (*Primer*) benötigt, die sequenz-spezifisch an die DNA-Matrize hybridisieren (*annealing*) und das zu amplifizierende Stück einschließen. Vom 3`- Ende der Oligonukleotide synthetisiert die hitze-stabile Taq-Polymerase den neuen Strang (Elongation). Durch Erhitzen wird der entstandene DNA-Doppelstrang getrennt (Denaturierung) und die Oligonukleotide können sich erneut an die DNA (Matrize oder Amplifikat) anlagern. Durch zyklisches Wiederholen dieses Prozesses kann die DNA somit exponentiell vermehrt werden.

Die Matrizen-DNA (0,1 – 5 µl) wurde mit 1/10 Endvolumen 10 x PCR-Puffer, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP-Mischung, je 0,5 mM des 3´- und 5´- Oligonukleotids und 1 U *Taq-Polymerase* / 100 µl PCR-Ansatz versetzt und mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt.

Die Reaktionen wurden nach folgendem Grundschema im *Thermocycler* durchgeführt:

3 min	95 °C	
45 sec	95 °C (Denaturierung)	35 Zyklen
45 sec	50 – 60 °C (Anlagerung) (Temperatur abhängig vom GC-Gehalt der Oligonukleotide)	
1 min / 1 kb erwarteter Produktlänge	72 °C (Elongation)	
5 min	72 °C	

3.2.2.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Endonukleasen werden verwendet, um gezielte Doppelstrangbrüche in der DNA zu erzeugen. Dies wurde zum spezifischen Einbringen von DNA-Fragmenten (Klonierung), zur Überprüfung der DNA-Sequenz sowie zur Vorbereitung des Vektors pJD4His für den Reparaturversuch genutzt. Jede Restriktionsendonuklease erkennt eine spezifische Sequenz, an der sie schneidet und dabei freie 3´-Hydroxylgruppen und 5´-Phosphatgruppen erzeugt. Einige Enzyme können nur schneiden, wenn die Erkennungssequenz methyliert bzw. nicht methyliert ist.

Die DNA-Menge (300 ng – 40 µg), die gespalten werden sollte, wurde mit 1/10 Endvolumen 10 x Puffer versetzt, in dem das entsprechende Enzym die optimale Aktivität besitzt. Wurden mehrere Enzyme gleichzeitig verwendet, musste ein Puffer gewählt werden, in dem alle Enzyme möglichst optimale Aktivität besitzen. War dies auf

Grund der Pufferzusammensetzungen oder der optimalen Reaktionstemperaturen nicht möglich, wurde die DNA zwischen dem Verdau mit dem ersten Enzym und dem Verdau mit dem zweiten Enzym gefällt. Pro µg DNA wurden 1 – 2 U Enzym zugegeben, der Ansatz mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt, gemischt und bei der für die Restriktionsendonuklease optimalen Temperatur inkubiert. Analytische Verdau-reaktionen wurden für 1,5 – 2 h inkubiert, präparative Reaktionen ÜN. Die Spaltung wurde auf einem Agarosegel überprüft.

3.2.2.4 Reinigung von PCR-Produkten bzw. Restriktionsansätzen

Die Reinigung von PCR-Produkten bzw. Restriktionsfragmenten mit einer Größe von 100 bp bis 10 kb erfolgte mittels des *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen). Die Mikrosäulen ermöglichen dabei die Abtrennung von DNA-Fragmenten von Desoxynukleotiden, Oligonukleotiden sowie Oligonukleotid-Dimeren. Zusätzlich werden störende Enzyme und Salze entfernt.
Die DNA-Lösung wurde zunächst mit 5 Vol Puffer PB versetzt, gemischt und auf eine *QIAquick* Säule pipettiert. Durch 30 – 60 sec Zentrifugation bei 13000 rpm wurde die DNA an die Säulenmatrix gebunden und mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen. Um Ethanolreste des Puffers vollständig zu entfernen, wurde ein weiterer Zentrifugationsschritt durchgeführt. Anschließend wurde die DNA mit 2 x 30µl Wasser eluiert. Dazu wurde das Wasser zunächst in das Zentrum der Säule pipettiert, 1 min inkubiert und wiederum 30 – 60 sec zentrifugiert.

3.2.2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Nukleinsäuren lassen sich mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach auftrennen. Als Gelmatrix finden Agarose- und Polyacrylamidgele Verwendung.
Für Fragmente zwischen 500 bp und 8000 bp eignen sich 0,8 %ige Agarosegele, während für die Auftrennung kleinerer Fragmente das Gel höherprozentig sein sollte. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und bis zur Verwendung in flüssiger Form bei 60 °C gelagert. Bei Gebrauch wurde die Agarose in einen Gelträger gegossen, für die Taschen wurde ein Kamm eingesetzt. Nach dem Erstarren wurde das Gel in eine Gelkammer überführt, wo es mit 1 x TBE als Laufpuffer überschichtet wurde. Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/5 Vol 6 x DNA-Auftragspuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Um die Längen abschätzen zu können, wurde zusätzlich eine Spur mit einem DNA-Längenstandard

beladen. Die Spannung zur Auftrennung betrug zwischen 90 V und 120 V. Anschließend wurde das Gel 15 – 20 min unter Schütteln in EB-Lösung gefärbt und mit Hilfe von Geldoc 2000 unter UV-Licht dokumentiert.
Wegen der kleineren Poren in Polyacrylamidgelen eignen sich diese zur Auftrennung besonders kleiner DNA-Moleküle, bis hin zur Unterscheidung einzelner Basenpaare. Für die Auftrennung der DNA-Fragmente bei der Analyse der Basenexcisionsreparatur wurden 18 %ige bzw. 24 %ige denaturierende Gele verwendet. Entsprechende Mengen Acrylamid/BisAA, Harnstoff, Tris, Borsäure und EDTA konnten bereits im Vorhinein gemischt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert werden. Durch Zugabe von 0,1 % APS und 0,005 % TEMED wurde die Polymerisation eingeleitet und das Polyacrylamidgel in die mit EtOH gesäuberte und zusammengebaute Gelapparatur von *Pharmacia Biotech* bzw. von *C.B.S. Scientific* gegossen. Zur kompletten Auspolymerisation wurde das Gel ÜN bei 4 °C gelagert. Anschließend wurde das Gel in die entsprechende Gelkammer eingespannt und diese mit 1 x TBE als Laufpuffer gefüllt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 1 Vol DNA-Auftragspuffer versetzt. 2 min Erhitzen auf 72 °C sowie das Formamid im Auftragspuffer denaturierten die Proben. Der Harnstoff im Gel sorgte dafür, dass die Moleküle auch während des Laufs denaturiert blieben. Um Harnstoffreste und in die Taschen diffundierte Salze zu entfernen, wurden die Probentaschen vor dem Auftragen der Proben mit Laufpuffer gespült. Für die Längenabschätzung wurde zusätzlich eine Spur mit einem selbst hergestellten DNA-Längenstandard (3.2.9.3) beladen. Um eine bessere Auftrennung zu gewährleisten, sollte das Gel vor dem Auftragen der Proben zunächst einen Vorlauf für 30 min bei 600 V, 25 mA, 100 W durchlaufen haben. Die Auftrennung der Proben erfolgte dann für ca. 1,5 h bzw. 5 h bei 600 V, 25 mA, 100 W.

3.2.2.6 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Wird ein bestimmtes Restriktionsfragment für weitere Untersuchungen in gereinigter Form benötigt, kann eine Gelreinigung durchgeführt werden.
Zu diesem Zweck wurde ein 0,6 – 0,8 %iges Agarosegel in 1 x TAE-Puffer mit großen Auftragstaschen gegossen. Die Auftrennung erfolgte bei 90 – 120 V. Nach der EB-Färbung wurde die benötigte Bande unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Gelextraktion selbst erfolgte mit Hilfe des *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systems* (Promega). Dazu wurde die Agarose bei 55 °C in 1 Vol *Membrane Binding Solution* gelöst. Die Minisäule des *Kits* wurde mittels Vakuum-Adapter auf die Vakuum-Station gesteckt. Anschließend konnte

die DNA-Mischung auf die Säule pipettiert werden und 1 min einwirken. Mit Hilfe des Vakuums wurde die Lösung durch die Säule gesaugt und die DNA gebunden. Es folgten zwei Waschschritte mit 700 µl bzw. 500 µl *Membrane Wash Solution*. Um Ethanolreste zu entfernen, wurde die Säule anschließend in ein Sammelgefäß überführt und für 5 min bei 16000 g zentrifugiert. Die Elution erfolgte mit 50 µl Wasser (1 min RT, dann 1 min / 16000 g).

3.2.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (Miniprep)

Die Isolierung kleinerer Mengen Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *QIAprep 8 Miniprep Kit* (Qiagen). Dazu wurden zunächst einzelne *E. coli*-Kolonien mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers von der Agarplatte aufgenommen und in je 4 ml LB-Medium, das mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurde, gegeben. Nach Inkubation im Schüttler bei 37 °C ÜN wurden die Zellen durch 10 min Zentrifugation bei 5000 rpm geerntet. Die Überstande wurde verworfen und die Pellets in 250 µl Puffer P1, der RNaseA enthält, aufgenommen. Durch Zugabe von 250 µl Puffer P2 wurden die Zellen mit NaOH / SDS alkalisch lysiert. Zugabe von 350 µl Puffer N3 (Kaliumacetat) neutralisierte die Lysate und bewirkte eine Präzipitation der SDS-Protein-Komplexe, an denen sich auch die genomische DNA befindet. Die kleinere Plasmid-DNA renaturierte und blieb dadurch in Lösung. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm wurden die Überstande auf *QIAprep*-8er-Streifen pipettiert und mittels Vakuum an die Säulenmatrix gebunden. Es folgte ein Waschschritt durch Zugabe von 1 ml Puffer PE, um Salzverunreinigungen zu entfernt. Zur Entfernung von Ethanolresten des Puffers wurden die Säulchenstreifen für 10 min bei 37 °C getrocknet. Schließlich wurde die DNA mit 100 µl Wasser und mit Hilfe von Vakuum eluiert.

3.2.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA in großem Maßstab (Midiprep)

Für die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden je nach Kopienzahl des Plasmids 100 bzw. 250 ml Medium einer ÜN-Flüssigkultur benötigt. Der Zellaufschluss und die Plasmid-Isolierung selbst erfolgten mit Hilfe des *PureYield™ Plasmid Midiprep Systems* (Promega).

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (20 min / 4000 rpm) geerntet, das Pellet in 3 bzw. 9 ml *Cell Resuspension Solution* aufgenommen und mit 3 bzw. 9 ml *Cell Lysis Solution* versetzt. Nach 3 min Inkubation bei RT wurden 5 bzw. 15 ml *Neutralization Solution* zugegeben und erneut gründlich gemischt sowie 3 min bei RT inkubiert. Die

Abtrennung der Plasmid-DNA von Zellresten und genomischer DNA erfolgte durch Zentrifugation (10 min / 15000 g). Auf die Vakuum-Station wurde zunächst eine weiße Säule zur Bindung der DNA gesteckt, darauf eine blaue Säule zur Reinigung des Überstandes. Danach wurde der Überstand durch beide Säulen gesaugt. Nach Abzug der blauen Säule folgten Waschschritte mit 5 ml *Endotoxin Removal Wash* und 20 ml *Column Wash Solution*. Um Ethanolreste zu entfernen, musste das Vakuum für weitere 30 – 60 sec angelegt bleiben sowie die Spitze der Säule auf ein Papiertuch getippt werden. Anschließend wurde die Säule in ein 50 ml Falcon-Gefäß gesteckt und die DNA durch zwei Elutionsschritte (600 µl und 400 µl Wasser, 5 min RT, dann 5 min / 3000 rpm) aus der Säule eluiert.

3.2.2.9 Präzipitation von DNA

Um DNA höher zu konzentrieren oder zu reinigen, kann sie mit Ethanol und Natriumacetat gefällt werden.
Dazu wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Vol 3 M NaAc (pH 5,0) und anschließend mit 2,5 Vol 100 %igem EtOH versetzt. Diese Lösung wurde 20 min oder ÜN bei –20 °C präzipitiert und danach 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 200 µl 70 %igem EtOH gewaschen und 10 min bei 13000 g zentrifugiert, an der Luft oder bei 30 °C für 10 min getrocknet und in 100 µl Wasser gelöst.

3.2.2.10 Klonierung

3.2.2.10.1 Ligation von Restriktionsfragmenten mit Vektoren

DNA-Ligasen verknüpfen 5´-Phosphatgruppen mit 3´-Hydroxylgruppen.
Um DNA-Fragmente in ein Plasmid einzufügen, wurde ein molares Verhältnis von Plasmid zu *Insert* von 1:3 eingesetzt. Dadurch wird eine Religation des Plasmids vermieden. Der Ansatz wurde mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt und mit 1 µl *Quick* T4-DNA-Ligase (*Quick Ligation Kit*, NEB) sowie 10 µl 2 x Ligase-Puffer versetzt. Zur Kontrolle wurde das Plasmid ohne Fragment mitgeführt. Der Ligationsansatz wurde 5 min bei 25 °C inkubiert und anschließend in *E. coli* transformiert (3.2.1.2).

3.2.2.10.2 Religation von Plasmid-DNA

Für den Plasmid-Reparaturversuch in Hefe musste die Vollständigkeit des Plasmid-Doppelverdaus überprüft werden. Dazu wurden 100 ng des verdauten Plasmids auf ein

Volumen von 10 µl gebracht und mit 10 µl 2 x Ligase-Puffer sowie 1 µl *Quick* T4-DNA-Ligase versetzt. Es folgte eine Inkubation von 10 min bei 25 °C. Anschließend wurden 50 ng des religierten Plasmids in *E. coli* transformiert (3.2.1.2).

3.2.3 Zellbiologische Methoden mit *S. cerevisiae*

3.2.3.1 Hefezellkultur

Hefezellen wurden je nach Verwendung in bzw. auf verschiedenen Plattenmedien bei 30 °C kultiviert. Flüssigkulturen wurden im Schüttler inkubiert. Alle Medien und Gegenstände für die Zellkultivierung wurden zuvor durch Autoklavieren (121 °C, 20 min) sterilisiert.

3.2.3.2 Zellzahlbestimmung bei Hefen

Eine Neubauerzählkammer und das passende Deckglas wurden mit 70 %igem EtOH gereinigt. Das Deckglas wurde so auf die Zählkammer gesetzt, dass sich an den Auflageflächen Newtonringe ausbildeten, die einen Abstand von exakt 0,1 mm zwischen Deckglas und Zählkammer anzeigen. Nun wurden 10 µl der Zellsuspension an den Spalt, den Glas und Kammer bilden, pipettiert und durch Kapillarkraft unter das Deckglas gezogen. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen von 25 Kleinquadraten ausgezählt und die Zelldichte der Suspension nach folgender Gleichung bestimmt:

Summe der Zellen aus 25 Kleinquadraten x 10^4 x Verdünnungsfaktor
= Zellzahl / ml Zellsuspension

Der Faktor 10^4 ergibt sich, da das Produkt der Fläche eines Großquadrates (= 25 Kleinquadrate) (1 mm^2) und der Tiefe der Zählkammer (0,1 mm) 0,1 µl ist. Um das Volumen eines Milliliters zu erhalten, muss man mit dem Faktor 10000 multiplizieren.
Eine weitere Möglichkeit zur Zellzahlbestimmung stellte die Verwendung eines Zählgerätes dar. Hierzu wurden 100 µl der Kultur in 10 ml CASYton gegeben und mit Hilfe des CASY-*Counters* die Zellen gezählt.

3.2.3.3 Herstellung einer Hefezellgefrierkultur

2 ml einer ÜN-Flüssigkultur in YEPD wurden 2 min bei 4000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Gelagert wurden die Kulturen bei –80 °C.

3.2.3.4 Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe

Für die Isolierung chromosomaler DNA aus Hefezellen wurden 6 – 8 ml YEPD mit einer Einzelkolonie angeimpft und 36 – 48 h bis zur stationären Wachstumsphase bei 30 °C im Schüttler inkubiert. Durch 2 min Zentrifugation bei 4000 rpm wurden die Zellen geerntet und in 0,2 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 0,3 g Glaskügelchen (Sigma G-8772) und 0,2 ml PCI wurden die Zellen für einen verbesserten Aufschluss 3 min gemischt. Nach 5 min Zentrifugation bei 4000 rpm / 4 °C konnte dann die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden und mit 0,15 ml 10 N Ammoniumacetat sowie 1 ml 100 %igem EtOH versetzt werden, um die DNA zu fällen. Nach erneuter Zentrifugation für 2 min bei 15000 rpm / 4 °C wurde das Pellet zum Abbau von RNA in 0,3 ml TER aufgenommen und 10 min bei 65 °C inkubiert. Um die Effizienz der RNaseA zu erhöhen wurden die Proben zwischenzeitlich kurz gemischt. Anschließend erfolgte eine zweite Fällung durch Zugabe von 0,1 ml 10 N Ammoniumacetat und 1 ml 100 %igem EtOH. Nach 2 min Zentrifugation bei 15000 rpm / 4 °C wurde das Pellet mit 70 %igem EtOH gewaschen, um Salze zu entfernen, erneut zentrifugiert und in 50 µl TE aufgenommen.

3.2.3.5 Transformation von Hefezellen

Hefetransformationen wurden nach dem Protokoll von Schiestl & Gietz (Schiestl und Gietz, 1989) durchgeführt. Für die Vorkultur wurden zunächst 30 ml YPAD-Medium mit Hilfe einer Impföse mit 3 – 5 Kolonien angeimpft und bei 30 °C unter Schütteln ÜN inkubiert. Mit Hilfe der Neubauerzählkammer wurde der Titer (Zellen / ml) bestimmt. 3 x 10^8 Zellen wurden aus der Vorkultur entnommen und in ein Endvolumen von 100 ml YPAD überführt. Danach wurden die Zellen ca. 4 h bei 30 °C bis zu einem Titer von mindestens 1 x 10^7 Zellen / ml inkubiert. Anschließend wurde erneut der Titer mit Hilfe der Neubauerzählkammer bestimmt. Die Zellen wurden für 2 min bei 4400 rpm abzentrifugiert, in 20 ml Wasser gewaschen und in 20 ml 0,1 M LiOAc resuspendiert. Es folgte eine Inkubation von 15 min unter Schütteln bei 30 °C. Wiederum wurden die Zellen 2 min bei 4400 rpm abzentrifugiert und mit 0,1 M LiOAc auf einen Titer von 1 x 10^9 Zellen / ml eingestellt.
Der Mastermix (1 x) für die Transformationsansätze wurde folgendermaßen hergestellt:

50 % PEG_{3350}:	240 µl
Salmon sperm DNA (3,2 mg/ml):	15 µl
1 M LiOAc:	31 µl

Die Träger-DNA aus Lachssperma wurde dabei zunächst 10 min bei 100 °C inkubiert, um die Stränge zu denaturieren, und bis zur Verwendung auf Eis gehalten.
Die Transformationsansätze setzten sich folgendermaßen zusammen:

Mastermix:	286 µl
DNA:	1 µg in einem Vol von 20 µl
Kompetente Zellen:	95 µl

Die Ansätze wurden für 30 min bei 30 °C inkubiert und anschließend 20 min einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Nach 5 min Zentrifugation bei 5000 rpm wurden die Zellen in 500 µl Kaliumphosphatpuffer resuspendiert und je 2 x 100 µl verschiedener Verdünnungen wurden mit Hilfe von Glaskugeln auf entsprechendem Medium ausplattiert.
Für die Herstellung von Mutanten mit Hilfe der *KanMX6*-Kassette wurde das Pellet in 1 ml YEPD aufgenommen, und weitere 4 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Schließlich wurde erneut abzentrifugiert und das Pellet in 0,4 ml YEPD resuspendiert. 4 x 100 µl wurden auf G418-haltiges Medium ausplattiert und nach 24 h Inkubation bei 30 °C auf neue Platten überstempelt.

3.2.4 Bestimmung des Zellüberlebens

3.2.4.1 Anzucht

Die Sensitivität verschiedener Hefestämme gegenüber DNA-schädigender Agenzien wurde in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Um Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu erhalten, wurden zunächst für die Vorkulturen 20 ml YEPD mit 2-3 Kolonien angeimpft (Impföse oder Zahnstocher) und ÜN bei 30 °C inkubiert. Mit Hilfe der Neubauerzählkammer wurde der Titer bestimmt und frisches YEPD „definiert“ angeimpft, so dass sich bis zum folgenden Tag eine gewünschte End-Zellzahl von 1×10^6 – 1×10^7 Zellen/ml einstellte. Dabei mussten die jeweiligen spezifischen Verdopplungszeiten der einzelnen Hefestämme beachtet werden. Eine weitere Möglichkeit war, die Vorkultur mit frischem Medium zu einem Titer von 3×10^6 Zellen/ml zu verdünnen und so lange bei 30 °C zu inkubieren (ca. 4 h), bis die Zellen einen Titer von 1×10^7 Zellen/ml erreichten. Zur Überprüfung der logarithmischen Wachstumsphase wurde der Anteil an Knospen bestimmt.
Die Sensitivität gegenüber MMS wurde zusätzlich in stationären Kulturen untersucht. Dazu wurde YEPD-Medium mit 2-3 Kolonien angeimpft und für mindestens 3 Tage bei

30 °C inkubiert. Auch hier wurde vor der Ernte die stationäre Wachstumsphase durch Mikroskopie bestätigt.

3.2.4.2 Behandlung mit verschiedenen DNA-schädigenden Agenzien

3.2.4.2.1 ^{60}Co-γ-Bestrahlung

Um die Zellen bestrahlen zu können, mussten sie zunächst durch 5 min Zentrifugation bei 4000 rpm geerntet werden. Das Pellet wurde in 20 ml KPO_4-Puffer resuspendiert und durch erneute Zentrifugation pelletiert. Dieser Waschschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt, bevor ein Titer von 2 x 10^8 Zellen/ml eingestellt wurde. Für die Bestrahlung mit γ-Strahlen wurde pro Dosis 1 ml Zellsuspension in einem Becherglas mit Eis in einer ^{60}Co-Quelle bestrahlt.

3.2.4.2.2 MMS-Behandlung

Für die Behandlung mit MMS wurden die Zellen, wenn nötig, geerntet (5 min / 4000 rpm) und in YEPD resuspendiert, so dass sich ein Titer von 1 x 10^7 Zellen/ml ergab. Im Folgenden wurden die Zellen für 0, 15, 30 und 45 min mit 0,2 % MMS versetzt und bei 30 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Behandlung wurden die Zellen erneut pelletiert und 1 x mit YEPD gewaschen.
Für eine grobe Abschätzung der MMS-Sensitivität wurden Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase seriell von 1 x 10^7 – 1 x 10^3 Zellen/ml verdünnt und Aliquots von 5 µl auf YEPD-Platten mit einem MMS-Gehalt von 0,0025 – 0,02 % aufgetropft.

3.2.4.2.3 H_2O_2-Behandlung

Zur Bestimmung des Überlebens nach H_2O_2-Behandlung wurden die Zellen geerntet (5 min / 4000 rpm) und 1 x mit 20 ml M9-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in M9-Puffer zu einem Titer von 1 x 10^7 Zellen/ml aufgenommen. Aliquots von 1 ml wurden wie bei Melo et al. beschrieben mit H_2O_2-Konzentrationen von 0 – 60 mM behandelt (Melo et al., 2004). Nach 20 min Inkubation bei 30 °C wurden die Reaktionen durch Zugabe von 500 U/ml Katalase und Inkubation für 2 min bei 30 °C abgestoppt.

3.2.4.3 Auswertung

Nach der Behandlung wurden die Zellen in allen Fällen in 1:10er Schritten bis zum gewünschten Titer verdünnt. Auf je 2 YEPD-Platten wurden jeweils 100 µl aus sinngemäßen Verdünnungen ausplattiert. Nach Inkubation der Platten bei 30 °C wurden die Kolonien ausgezählt und das Überleben durch das Verhältnis der Kolonien nach Behandlung und der Kolonien ohne Behandlung errechnet. Die Überlebensdaten wurden schließlich in einem Diagramm gegen die Dosis aufgetragen.

3.2.5 Analyse chromosomaler DSB und hitze-labiler Stellen

Die Effizienz von Hefezellen, chromosomale DSB und hitze-labile Stellen zu reparieren, wurde in haploiden Stämmen unter Nichtwuchs-Bedingungen gemessen. Hefechromosomen wurden nach Bestrahlung oder MMS-Behandlung isoliert und mittels PFGE aufgetrennt (elektrophoretisches Karyogramm). Während dieser Präparation werden durch MMS-induzierte hitze-labile Stellen bei erhöhten Temperaturen in DSB konvertiert. Durch die Verteilung von Bandenintensitäten zu degradierter DNA im EB-gefärbten Gel können DSB quantifiziert werden.

3.2.5.1 Anzucht, Behandlung und LHR-Inkubation

Um Zellen in der stationären Wachstumsphase zu erhalten wurde ein modifiziertes Protokoll von Pohlit und Heyder (Pohlit und Heyder, 1977) verwendet. Zunächst wurde eine Vorkultur von 50 ml YEPD mit ca. 3 Kolonien angeimpft und ÜN bei 30 °C inkubiert. Auf je 3 YEPD-Platten wurden am Tag darauf 1×10^5 Zellen mit Glaskugeln ausplattiert. Durch Inkubation von mindestens 6 Tagen bei 30 °C wurden die Zellen in die stationäre Wachstumsphase gebracht und mit Hilfe von je 5 ml KPO_4-Puffer abgewaschen. Um die stationäre Wachstumsphase der Zellen zu bestätigen, wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer der Anteil an Knospen bestimmt (stationäre Kultur $<$ 3 % Knospen). Bei 4000 rpm (5 min / 4 °C) wurden die Zellen geerntet und das Pellet 3 x mit mindestens 30 ml KPO_4-Puffer gewaschen. Anschließend wurde ein Titer von $7{,}5 \times 10^8$ Zellen / ml mit KPO_4-Puffer eingestellt. Je 2 ml dieser Zellsuspension wurden mit 0 Gy und 400 Gy bestrahlt bzw. für 0 - 60 min mit 0,1 % MMS versetzt. Nach der MMS-Behandlung wurden die Zellen 2 x mit KPO_4-Puffer gewaschen, um die Chemikalie zu entfernen. Nach der Behandlung wurden die Proben sofort in 200 ml LHR-Puffer (*Liquid Holding Recovery*) aufgenommen und gemischt. Dieser Puffer hält die Zellen in der stationären Wachstumsphase, während Reparaturprozesse stattfinden

können (Frankenberg-Schwager et al., 1980; Dardalhon et al., 1994; Friedl et al., 1995). Direkt nach der Behandlung sowie nach 23 h Inkubation in LHR wurden 100 ml abgenommen und zum Abstoppen der Reparatur mit 20 ml 0,5 M EDTA (pH 9,0) versetzt.

3.2.5.2 Präparation chromosomaler DNA in Agaroseblöckchen

Die Isolierung chromosomaler DNA nach Bestrahlung wurde nach Friedl et al. durchgeführt (Friedl et al., 1995). Um die Zellen der 0 h und 23 h LHR-Proben zu ernten, wurden diese für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 x 500µl 50 mM EDTA (pH 8,0) aufgenommen und erneut für 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen in 200 µl 50 mM EDTA resuspendiert und mit 74 µl Lytikase-Lösung sowie 267 µl 1,6 %iger LMP-Agarose gut gemischt. Diese Lösung wurde sofort in Blöckchenformen eingefüllt, die mit 70 %igem EtOH gereinigt und luftgetrocknet wurden, und für mindestens 30 min bei 4 °C ausgehärtet. Anschließend wurden die Blöckchen mit 2 ml Blöckchenpuffer versetzt. Durch Inkubation von 1 h bei 37 °C konnte die Zellwand durch die Aktivität der Lytikase verdaut werden. Nach dem Lytikaseverdau wurde der Blöckchen-Puffer vorsichtig abgegossen und 1 ml Proteinase K-Lösung zugesetzt. Eine Inkubation ÜN (ca. 18 h) bei 55 °C bzw. zur Kontrolle bei 32 °C sorgte für den Abbau der Proteine. Während diesem Schritt werden die MMS-induzierten hitze-labilen Stellen in DSB konvertiert. Als Kontrolle wurden die Zellen bei 32 °C inkubiert. Um Proteinase K wieder zu entfernen wurden die Blöckchen schließlich zuerst 2 x und dann im Abstand von mehreren Stunden noch 2 x mit 8 ml *Rinsing*-Puffer gewaschen und bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.5.3 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der Chromosomen in den Agaroseblöckchen wurde zunächst mit 0,5 x TBE-Puffer ein 0,8 %iges Gel hergestellt. Die Agarose wurde anschließend in einen mit 70 %igem EtOH gereinigten Gelträger gegossen, für die Taschen wurde ein Kamm eingesetzt. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit 0,5 x TBE-Puffer überschichtet. Mit Hilfe eines Millimeterpapiers und eines Deckglases konnten von den Agaroseblöckchen 5 x 10 mm große Stückchen abgetrennt und in die Taschen des Gels überführt werden. Das beladene Gel wurde dann in eine PFGE-Kammer mit auf 14 °C gekühlten 0,5 x TBE-Laufpuffer gelegt. Dort erfolgte die Auftrennung der Chromosomen nach folgendem Programm:

I. 6 V / cm, Pulszeit 60 sec, 9 h
II. 6 V / cm, Pulszeiten von 60 – 150 sec, 14 h

Zum Färben des Gels wurde dieses in 200 ml 0,5 x TBE-Puffer, versetzt mit 15 µl EB, mehrere Stunden oder ÜN geschüttelt. Mit Hilfe von Geldoc 2000 wurde das Gel unter UV-Licht dokumentiert.

3.2.5.4 Auswertung

Doppelstrangbrüche können durch die Intensität und Schärfe der Chromosomen-Banden im Verhältnis zur Hintergrundfärbung durch degradierte DNA quantifiziert werden.
Dazu wurden die Programme *Quantity One*® und *Geltool* (Gomez-Paramio, 2007) angewandt. Mit Hilfe von *Quantity One*® wurden zunächst die Spuren und Banden des Gels detektiert sowie Fluoreszenz-Intensitätsprofile der einzelnen Spuren erstellt. Diese konnten anschließend mit *Geltool* weiterbearbeitet werden.

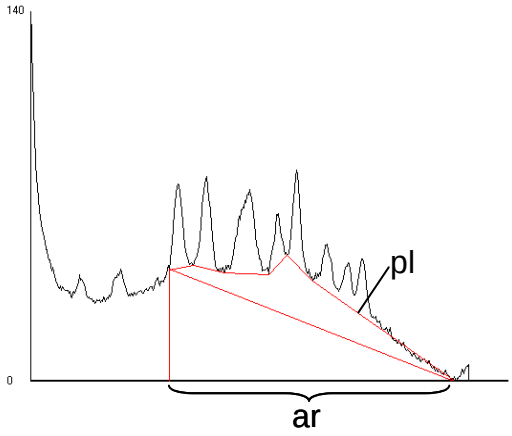

Abbildung 14: Fluoreszenz-Intensitätsprofil einer bestrahlten Probe

Mit Hilfe der Software *Geltool* werden Fluoreszenz-Intensitätsprofile der einzelnen PFGE-Spuren ermittelt. Die Längen der Linien pl (*profile line*) und ar (*analysed region*) werden für die Berechnung spezifischer Degradierungswertes pv (*profile value*) verwendet.

Dazu musste zunächst das auszuwertende Gebiet begrenzt werden, so dass ein Bereich von der Bande der Chromosomen 13/14 bis zum Gelende festgelegt wird. Die Banden der beiden größten Chromosomen wurden nicht in die Auswertung einbezogen, da diese beiden Chromosomen sich durch ihre Größe in den einzelnen Gelen unterschiedlich verhalten. Nach der Gebietsbegrenzung wurde das Minimum und Maximum der Intensitätskurve bestimmt und das Programm führte eine Subtraktion des Hintergrunds und zur besseren Vergleichbarkeit mit anderen Gelen eine Normalisierung des Gels durch. Im letzten Schritt mussten die Intensitätsminima

festgelegt werden. Durch Verbinden dieser Minima ergab sich ein Degradierungsprofil (pl = *profile line*). Die Länge der zu analysierenden Region auf der X-Achse wurde ar (*analysed region*) genannt (Abbildung 14). Mit Hilfe der Formel (pl – ar / ar) x 100 wurden Degradierungswerte (pv = *profile value*) berechnet.

Mit Hilfe dieser Degradierungswerte konnte die relative DSB-Reparatur nach Bestrahlung berechnet werden:

entstandener Schaden (a):
Spur 400 Gy / 0 h – Korrekturfaktor (Spur 0 Gy / 0 h)

stattgefundene Reparatur (b):
Spur 400 Gy / 0 h – Spur 400 Gy / 23 h
– Korrekturfaktor (Spur 0 Gy / 0 h – Spur 0 Gy / 23 h)

} relative Reparatur in % = b x 100 / a

Zur Auswertung der Reparatur von hitze-labilen Stellen wurde der Degradierungswert (pv) mit Hilfe von *Geltool* für die einzelnen Spuren je 6 x bestimmt und der Mittelwert gebildet. Der pv wurde als Restschaden direkt gegen die MMS-Konzentration aufgetragen.

3.2.6 Analyse der Reparatur von Mikrodeletionen

Für die Analyse der Reparatur von Mikrodeletionen wurde der Vektor pJD4His in dem *dcm*$^-$-Stamm *E. coli ER2925* amplifiziert (3.2.1.3), im großen Maßstab isoliert (3.2.2.8) und mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *ApaI* verdaut (3.2.2.3). Durch die Verwendung von *E. coli*-Zellen ohne endogene Cytosin-Methylase (*Dcm*) wurde die Restriktionseffizienz von *ApaI* deutlich erhöht. Um das Plasmid anschließend von der herausgeschnittenen *HIS3MX6*-Kassette innerhalb des *URA3*-Gens zu trennen, wurde eine Gelreinigung (3.2.2.6) durchgeführt.
Je 1 µg geschnittenes Plasmid (Reparatursubstrat) und ungeschnittenes Plasmid (Kontrolle für Transformationseffizienz) wurde in verschiedene Hefestämme eingebracht (3.2.3.5). Durch Selektion auf *TRP1*-Expression (Ausplattieren in entsprechenden Verdünnungen auf SC(-trp)-Medium) wurden Zellen detektiert, die das Plasmid durch Reparatur rezirkularisiert haben. Die Reparatureffizienz wurde durch das Verhältnis von Transformationsrate (geschnittenes Plasmid) zu Transformationsrate (ungeschnittenes Plasmid) bestimmt.
Nach dem Transformationsprozess sorgten weitere Selektionsschritte für die Analyse des Reparaturweges. Dazu wurden einzelne Kolonien mit Hilfe eines Zahnstochers aufgenommen, in 100 µl Wasser resuspendiert und auf SC(-trp), SC(-ura) und SC(-his)-

Platten aufgebracht. Die Selektion auf *HIS3MX6*-Expression diente der Identifizierung von Kolonien, die unvollständig geschnittenes Plasmid aufgenommen haben sowie dem Ausschluss von weiteren Analysen. *URA3*$^+$-Zellen entstanden durch korrekte Reparatur mittels HR mit dem chromosomalen *ura3-52*-Gen, während *ura3*$^-$ Zellen das Plasmid durch NHEJ oder fehlerhafte Reparatur rezirkularisiert haben. Das Verhältnis von *URA3*$^+$-Zellen zu *TRP1*$^+$-Zellen ergab einen Wert für die Reparaturgenauigkeit.

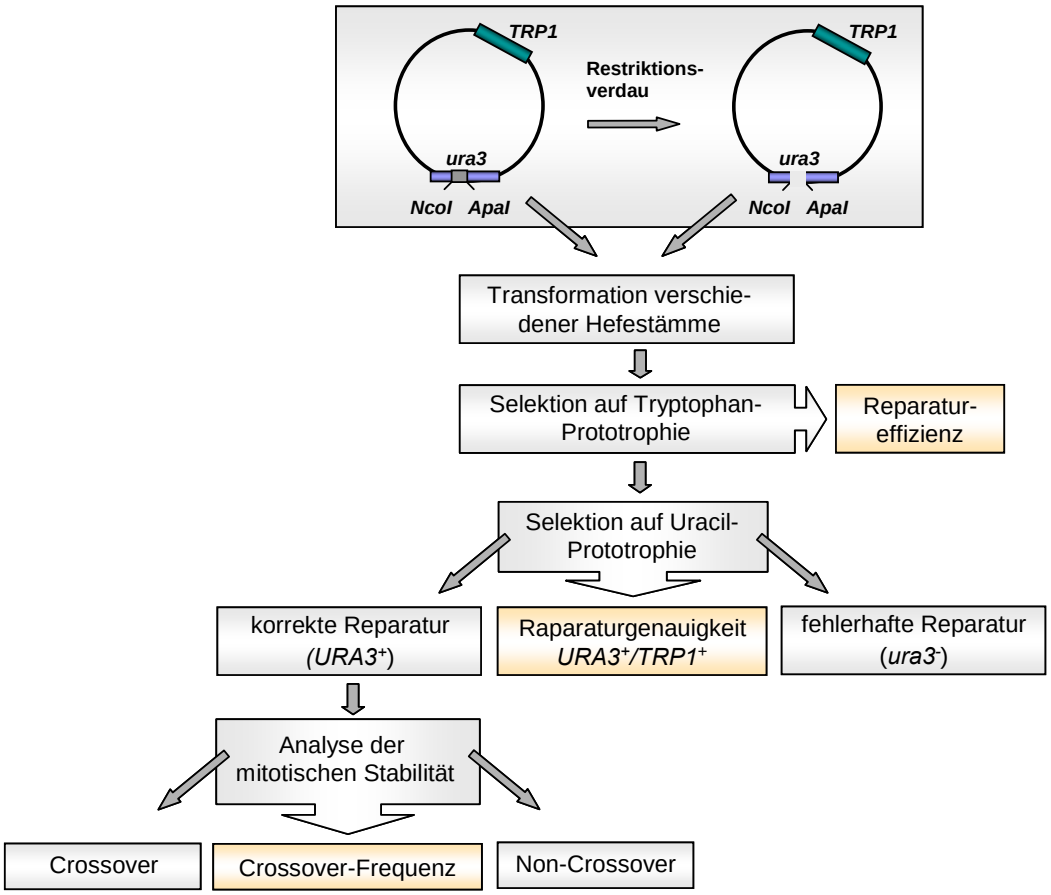

Abbildung 15: Ablaufschema des Plasmid-Reparaturversuches

Hefezellen werden sowohl mit geschnittenem, als auch ungeschnittenem Plasmid transformiert und auf Tryptophan-Prototrophie getestet. Dadurch kann die Reparatureffizienz berechnet werden. Selektion auf Uracil-Prototrophie erlaubt die Unterscheidung von korrekter und fehlerhafter Reparatur der Mikrodeletion und somit die Berechnung der Reparaturgenauigkeit. Durch die Analyse der mitotischen Stabilität kann die Crossoverfrequenz bestimmt werden.

Eine Integration des Plasmids ist die Folge eines Crossover-Ereignisses und führt zu stabilen Transformanten. Findet die Reparatur nicht durch einen Crossover-Mechanismus statt, resultiert dies in instabilen Transformanten. Um die mitotische Stabilität der reparierten Plasmide zu testen, wurden die Kolonien zusätzlich auf YEPD-Platten aufgebracht. Nach 2 Tagen Inkubation auf nicht-selektivem Medium bei 30 °C wurden die Zellen dann mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers erneut aufgenommen und auf YEPD-, SC(-trp)- und SC(+5-FOA)-Platten aufgetropft. Stabile Transformanten

weisen 5-FOA-Sensitivität auf, da das *URA3*-Genprodukt 5-FOA in eine toxische Substanz umwandelt. Zusätzlich zeigen die stabilen Transformanten konfluentes Wachstum ohne Tryptophan-Zugabe. Die Crossoverfrequenz wurde aus dem Verhältnis von Crossover-Ereignissen zu *URA3*$^+$-Zellen (korrekte Reparatur) ermittelt.
Zusätzlich konnte ein Crossover-Ereignis durch PCR-Analyse des chromosomalen *URA3*-Lokus nachgewiesen werden (Abbildung 16). Dazu wurde chromosomale DNA aus den Kolonien isoliert (3.2.3.4) und zur PCR-Reaktion (3.2.2.2) mit den Primern P1 und P2 verwendet. P1 bindet an den Start des *URA3*-Gens, während P2 erst hinter dem *URA3*-Gen auf dem Chromosom IV, nicht aber auf dem Plasmid, bindet. Durch die Ty-Insertion im chromosomalen *URA3*-Lokus, die eine Länge von etwa 6 kb aufweist, ist es nicht möglich mit einer Elongationsphase von nur 90 sec eine Amplifizierung zu erreichen. Erst durch Integration des Plasmids entsteht auf Chromosom IV ein zusätzliches *URA3*-Gen ohne Ty-Insertion, das durch ein PCR-Produkt mit einer Größe von ca. 1200 bp nachweisbar ist.

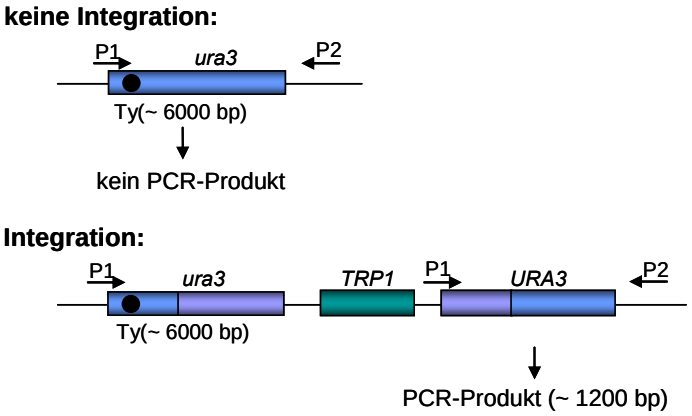

Abbildung 16: PCR-Analyse des chromosomalen *URA3*-Lokus

Erst durch die Integration des Plasmids in den chromosomalen *URA3*-Lokus ist es möglich, mit Hilfe der Primer P1 und P2 sowie einer Elongationsphase von 90 sec ein PCR-Produkt nachzuweisen.
blau: chromosomale *URA3*-Sequenz
lila: plasmidiale *URA3*-Sequenz

3.2.7 Analyse des Apoptoseverhaltens

3.2.7.1 Anzucht und H_2O_2-Behandlung

Für die Stimulation von Apoptose wurden Stämme mit BY4741-Hintergrund verwendet. Zunächst wurden für die Vorkultur 10 ml SMD-Medium mit 2 - 3 Kolonien im 100 ml-Kolben angeimpft (Impföse oder Zahnstocher). Um die Zellen nicht unter zusätzlichen Stress zu setzen, wurde die Vorkultur ÜN bei 28 °C inkubiert. Mit Hilfe des CASY-*Counters* wurde der Titer bestimmt und pro Stamm wurden für eine

Dreifachbestimmung 3 x 35 ml SMD-Medium im 250 ml-Kolben mit 5 x 10^7 Zellen/ml angeimpft. Diese Hauptkulturen wurden so lange bei 28 °C unter Schütteln (155 rpm) inkubiert (ca. 4 h), bis die Zellen einen Titer von ca. 2 x 10^6 Zellen/ml erreichten. Je 3 x 10 ml wurden auf 100 ml-Schikanekolben verteilt und für 4 h bei 30 °C mit 0, 0,4 und 0,6 mM H_2O_2 behandelt.
Zur Überprüfung des Überlebens wurde der Titer nach der Behandlung mit Hilfe des CASY-*Counters* bestimmt. Jeweils 500 Zellen wurden auf YEPD-Platten ausplattiert und für 3 Tage bei 28 °C inkubiert. Das Überleben wurde schließlich aus dem Verhältnis von Kolonien nach Behandlung zu Kolonien ohne Behandlung bestimmt.

3.2.7.2 Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Das Auftreten eines erhöhten ROS-Levels und der damit verbundene oxidative Stress von Zellen sind ein erstes Anzeichen für das Vorhandensein apoptotischer Zellen. Zur Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Zelle können lebende Zellen mit Stoffen angefärbt werden, die erst in der Zelle in ihre fluoreszierenden Produkte umgewandelt werden. Eine Möglichkeit hierbei bietet Dihydroethidiumbromid (DHE), welches durch Sauerstoffradikale in Hydroethidium und fluoreszierendes Ethidiumbromid gespalten wird. Die Fluoreszenz bei 550 – 720 nm kann durchflußzytometrisch bestimmt werden.
Hierzu wurden von jeder Probe 600 µl abgenommen und die Zellen durch Zentrifugation (10 min / 4000 rpm) geerntet. Das Pellet wurde anschließend in 500 µl einer 1:1000-Verdünnung von DHE (Stock 2,5 mg/ml) in PBS gelöst und zum Färben für 5 – 10 min im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden erneut geerntet, mit 500 µl PBS gewaschen und in 500 µl PBS aufgenommen. Mit Hilfe des Durchflußzytometers wurde die zu analysierende Population durch Größe und Granulatität der Zellen bestimmt. Anschließend konnte die Fluoreszenzintensität der Zellen gemessen werden.

3.2.7.3 Quantifizierung apoptotischer Zellen mittels Annexin V-Färbung

Durch Anfärbung von Phosphatidylserin können apoptotische Zellen quantifiziert werden (Vermes et al., 1995). Intakte Zellen weisen auf der Außenseite der Plasmamembran neutrale Phospholipide auf, während sich auf der Innenseite zusätzlich anionische Phospholipide wie Phosphatidylserin befinden. Geht eine Zelle in Apoptose, so werden diese externalisiert und Phospahtidylserin kann von Annexin V, gekoppelt an FITC, erkannt werden. Um apoptotische von nekrotischen Zellen zu

unterscheiden, wird zusätzlich eine Färbung mit Propidiumiodid durchgeführt. Geht eine Zelle in Nekrose, wird die Membran geschädigt, Annexin V kann in die Zelle eindringen und an Phosphatidylserin auf der Membraninnenseite binden. Durch die entstandenen Löcher in der Membran kann jedoch zusätzlich Propidiumiodid in die Zellen eindringen und in die DNA interkalieren.

Für die Färbung wurden 1×10^7 Zellen durch Zentrifugation (10 min / 4000 rpm) geerntet und mit 500 µl Annexin-Puffer I gewaschen. Nach Resuspension der Zellen in 330 µl Annexin-Puffer I wurden 2,5 µl Lyticase (1000 U/ml) und 15 µl Glucuronidase zugegeben, um die Zellwand aufzulösen. Die nach 1,5 h Inkubation bei 28 °C entstandenen Spheroblasten mussten im Folgenden sehr vorsichtig behandelt werden. Für den folgenden Waschschritt mit 500 µl Annexin-Puffer I wurden die Zellen deshalb für nur 10 sec bei max. 5000 rpm zentrifugiert und das Pellet durch leichtes Schwenken gelöst. In 30 µl Annexin-Puffer II, versetzt mit 3 µl Annexin und 3 µl PI (100 µg/ml), wurden die Zellen anschließend durch 20 min Inkubation im Dunkeln gefärbt. Nach Zugabe von 500 µl Annexin-Puffer II wurden die apoptotischen und nekrotischen Zellen am Durchflußzytometer quantifiziert.

3.2.8 Bestimmung der Mutationsfrequenz

Für die Analyse der Mutationsfrequenz wurden Hefezellen mit BY4741-Hintergrund verwendet. Dieser Stamm trägt das Wildtyp-Gen *CAN1*, eine Arginin-Permease. Dadurch wird nicht nur die essentielle Aminosäure Arginin in die Zellen aufgenommen, sondern auch das Arginin-Analog Canavanin, eine toxische, nicht-proteinogene Aminosäure, die mit Arginin um den Einbau in Aminosäureketten konkurriert. Mutationen in diesem Gen verleihen den Zellen somit Canavanin-Resistenz.

Zur Bestimmung der Mutationsfrequenz wurden die Zellen wie unter Punkt 3.2.4.1 beschrieben in die logarithmische Wachstumsphase gebracht und auf SC-Platten sowie auf Platten, die Canavanin beinhalten, aufgebracht. Der Quotient aus der Anzahl der Kolonien auf Can-Medium und der Anzahl der Kolonien auf SC-Medium ergab die Mutationsfrequenz. Für die chemisch-induzierte Mutagenese wurden Aliquots von 1×10^7 Zellen/ml für 0, 10, 20 und 30 min mit 0,1 % MMS behandelt, bei 30 °C inkubiert und 2 x mit KPO_4-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 1:10er Schritten bis zum gewünschten Titer verdünnt und je 100 µl auf 2 SC-Platten und 2 Can-Platten ausplattiert. Die induzierte Mutationsfrequenz wurde mittels des Quotienten aus der Anzahl der Kolonien auf Can-Medium abzüglich der spontanten Mutanten (= Can^R-$Kolonien_{0min}$ * Überleben) und der Anzahl der Kolonien auf SC-Medium berechnet.

3.2.9 Analyse der Basenexcisionsreparatur *in vitro*

Für die Analyse der Basenexcisionsreparatur *in vitro* wurden unterschiedliche DNA-Substrate mit Proteinextrakten verschiedener Hefestämme inkubiert. Dadurch konnte nicht nur die Effizienz der BER selbst, sondern auch die Effizienz einzelner mechanistischer Schritte der BER untersucht werden.

3.2.9.1 Aufbereitung von zellfreien Proteinextrakten

Zur Gewinnung zellfreier Proteinextrakte wurden 50 ml YEPD mit 2 – 3 Kolonien angeimpft und ÜN bei 30 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Vorkultur 1:10 mit frischem YEPD verdünnt und unter Schütteln bis zur frühen logarithmischen Wachstumsphase ($5 \times 10^6 – 1 \times 10^7$ Zellen/ml) inkubiert. Vor der Ernte (20 min / 4000 rpm / 4 °C) und 2 x Waschen mit KPO_4-Puffer wurden die Zellen für mindestens 20 min auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml eiskalten Extraktionspuffer aufgenommen, mit 1 ml Protease-Inhibitor-Mix pro 20 g Zellpellet versetzt und in der *Frensh-Press* unter Druck (20000 PSI) aufgeschlossen. Mit Hilfe von 0,1 M NaOH wurde der pH-Wert des unbearbeiteten Zellextrakts auf 8,0 eingestellt und Zellreste durch Zentrifugation (40 min / 20000 rpm / 4 °C) entfernt. Nach vorsichtigem Abnehmen des Überstandes wurden die Proteine durch schrittweise Zugabe von Ammoniumsulfat bis zur Konzentration von 0,35 g/ml und Inkubation von mindestens 20 min auf Eis präzipitiert. Das durch Zentrifugation (30 min / 20000 rpm / 4 °C) gewonnenen Pellet wurde anschließend in 3 ml Dialysepuffer gelöst und ÜN gegen denselben Puffer dialysiert. Der Extrakt wurde schließlich durch 10 min Zentrifugation von unlöslichen Partikeln getrennt. Bei –80 °C können Aliquots der Extrakte bis zu 6 Monate gelagert werden.

3.2.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Um die Proteinkonzentration der Extrakte zu bestimmen, wurde die Bradford-Methode verwendet. Der im Reagenz enthaltene Farbstoff Brilliant-Blau G bildet mit Proteinen einen Komplex. Dabei wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm verschoben.

Zunächst wurde mit Hilfe einer 1 µg/µl BSA-Lösung eine Kalibrierungskurve erstellt. Dazu wurden 4, 8, 12, 16 und 20 µg BSA mit H_2O auf 20 µl aufgefüllt und mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt. Nach 5 min Inkubation bei RT im Dunkeln konnten die Absorptionen im Photometer bei 595 nm bestimmt werden. Anschließend wurde 1 µl

der zu bestimmenden Probe auf die gleiche Weise gemessen. Über die Gleichung der Kalibrierungskurve konnte die tatsächliche Konzentration der Probe ermittelt werden.

3.2.9.3 Substratvorbereitungen für *in vitro*-Versuche

Für die *in vitro*-Versuche mussten Oligonukleotide mit einer Größe von 14 bis 35 nt, nach Abbildung 17 an komplmentäre Stränge angelagert werden. Einige Oligonukleotide mussten vor dem *Annealing* am 5´-Ende mit [γ-^{32}P]ATP radioaktiv markiert werden. An BER6 wurde ein nicht-radioaktiv markiertes Phosphat angefügt. Zusätzlich wurden die Oligonukleotide BER2 (35mer), BER5 (15mer) sowie ein 16mer radioaktiv markiert, um als Längenstandard für die gelelektrophoretische Auftrennung der Reparaturprodukte zu fungieren.

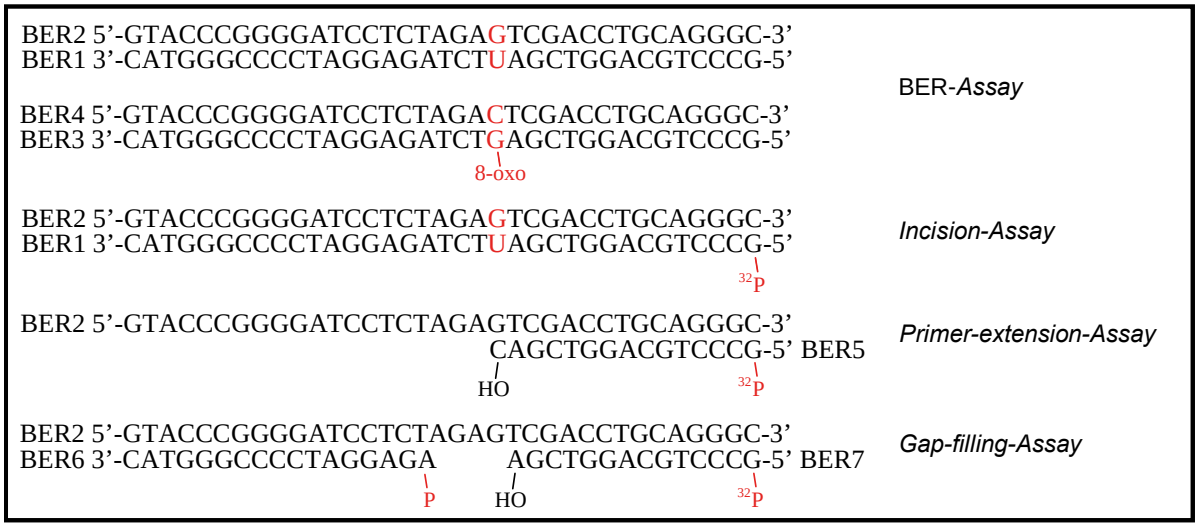

Abbildung 17: Substrate für die *in vitro*-BER-Analysen

Die einzelnen Oligonukleotide wurden, wenn nötig nach Markierung am 5´-Ende, an die entsprechenden komplementären Strängen angelagert. Die so entstandenen Substrate konnten für die Analyse verschiedener Schritte des BER-Mechanismus angewandt werden.

3.2.9.3.1 Radioaktive Markierung der 5´-Enden

Die radioaktive Markierung von 5´-Enden wurde mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase durchgeführt. In einem 20 µl-Ansatz wurden 0,1 nM Oligonukleotid mit 1/10 Vol Reaktionspuffer A, 2 nM ATP, 10 mCi/ml [γ-^{32}P]ATP und 10 U T4 PNK versetzt. Es folgte eine Inkubation von 20 min bei 37 °C. Erhitzen auf 75 °C für 10 min inaktivierte das Enzym. Das Anfügen eines nicht-radioaktiven Phosphats erfolgte auf dieselbe Weise. Um Pufferreste und nicht eingebautes [γ-^{32}P]ATP zu entfernen, wurden die Ansätze über G-25 Sephadex-Säulchen aufgereinigt. Die Säulchen mussten vor Verwendung zunächst getrocknet werden, da die Sephadex-Füllung in Puffer gelöst

vorliegt. Dazu wurden die Säulchen mit einem 1,5 ml Auffanggefäß in einem 15 ml Reaktionsgefäß platziert und 2 x für 2 min bei 1100 g zentrifugiert. Schließlich wurden die Proben, die mit H_2O auf ein Volumen von 50 µl gebracht wurden, in die Mitte der Säulchen pipettiert. Durch 4 min Zentrifugation bei 1100 g wurden die Proben eluiert.

3.2.9.3.2 Annealing der Oligonukleotide

Für die Anlagerung von Oligonukleotiden mussten gleiche Mengen der verwendeten Oligonukleotide gemischt und mit 1/10 Vol 10 x PCR-Puffer versetzt werden. Die Ansätze wurden für 10 min bei 95 °C inkubiert, gefolgt von langsamem Abkühlen.

3.2.9.4 *In vitro*-Versuche

3.2.9.4.1 Bestimmung der BER-Effizienz

Für die Bestimmung der BER-Effizienz wurde der BER-*Assay* nach Harrigan et al. (Harrigan et al., 2006) durchgeführt. Dabei wurde die Reparatur von einem dsDNA-Oligonukleotid untersucht, das an Position 15 wahlweise ein Uracil oder ein 8-oxoG enthält. Während des Reparaturprozesses werden diese geschädigten Basen erkannt, ausgeschnitten und ein markiertes [α-^{32}P]dCTP oder [α-^{32}P]dGTP wird gegenüber von G oder C eingebaut. Vor der Ligation weist das Intermediat eine Größe von 15 bp auf, nach der Ligation ist die Größe des eingesetzten 35 bp langen Oligonukleotids wieder hergestellt. Um zwischen *short patch*- und *long patch*-Reparatur zu unterscheiden, wird dem Ansatz ein ddTTP zugegeben, das die Elongation stoppt. Dadurch können *long patch*-Produkte als 16mer detektiert werden.
In einem 20 µl-Ansatz wurden 20 µg Proteinextrakt mit 1/5 Vol 5 x BER-Puffer, 250 nM dsDNA-Oligonukleotid, 10 mM $MgCl_2$ und 2,2 µM [α-^{32}P]dCTP bzw. [α-^{32}P]dGTP versetzt. Die Proben wurden für die angegeben Zeitwerte bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl 100 mM EDTA und Inkubation für 5 min bei 72 °C wurden die Reaktionen abgestoppt. Um uneingebaute radioaktive Nuklide zu entfernen, wurden die Ansätze über G25 Sephadex-Säulchen, wie unter Punkt 3.2.9.3.1 beschrieben, aufgereinigt und mit 1 Vol 2 x DNA-Auftragpuffer versetzt. Mit Hilfe eines 24 %igen PAA-Gels (3.2.2.5) wurden die Reparaturprodukte aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Die Filme wurden schließlich eingescannt und die Banden mit Hilfe der Software *TotalLab TL100* quantifiziert. Der Wert des am längsten inkubierten Ansatzes mit Wildtyp-Extrakt wurde auf 1 gesetzt.

3.2.9.4.2 Analyse des Incision-Schritt

Um die ersten beiden BER-Schritte, Erkennung der geschädigten Base und Einschneiden des Phosphatrückgrades durch Lyase- oder Endonuklease-Aktivität, zu analysieren, wurde der *Incision-Assay* nach Wang et al. (Wang et al., 1997) modifiziert. Dasselbe Uracil-Oligonukleotid, das für den BER-*Assay* genutzt wurde, musste hierzu radioaktiv markiert werden. Wird das Uracil erkannt, wird die DNA 5´ oder 3´ der fehlerhaften Base eingeschnitten und es entsteht ein 14mer bzw. 15mer als Produkt.
In einem 10 µl-Ansatz wurden 3 µg Proteinextrakt mit 1/5 Vol 5 x *Incision*-Puffer, 250 nM Substrat und 7,5 mM $MgCl_2$ versetzt. Es erfolgte für die angegebenen Zeitwerte eine Inkubation bei 23 °C. Durch Zugabe von 20 µl Stopplösung und Inkubation für 20 min bei 60 °C wurden die Reaktionen beendet. Die DNA wurde, wie unter Punkt 3.2.2.9 beschrieben, präzipitiert und in 20 µl Auftragspuffer aufgenommen. Durch Erhitzen für 8 min bei 72 °C unter Schütteln wurde die DNA gelöst. Die Reparaturprodukte wurden über ein 18 %iges PAA-Gel (3.2.2.5) aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert.

3.2.9.4.3 Untersuchung der Strang-Elongation

Zur Analyse der Strang-Elongation wurde ein *Primer-extension-Assay* durchgeführt. Dazu wurde ein Substrat verwendet, bei dem ein Oligonukleotid mit einer Länge von 15 nt an ein 35mer angelagert wurde. Durch die Verlängerung des *„Primers“* entstehen Produkte mit einer Größe von 16 – 35 bp.
Für diesen Versuch wurden in einem Volumen von 20 µl 2 µg Proteinextrakt mit 10 nM markiertem Substrat in 1 x Reaktionspuffer gelöst und für 0, 2 und 5 h bei 30 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 1 µl 100 mM EDTA gestoppt. Die Ansätze wurden mit 10 µl Auftragspuffer versetzt und die Reaktionsprodukte über ein 24 %iges PAA-Gel (3.2.2.5) aufgetrennt. Wiederum diente Autoradiographie dem Sichtbarmachen der Banden.
Zusätzlich wurde zur Untersuchung der Strang-Elongation ein *Gap-filling-Assay* durchgeführt. Dabei weist das Substrat eine Lücke von 4 Nukleotiden auf.
40 µg Proteinextrakt wurden in einem 20 µl-Ansatz mit 10 nM markiertem Substrat und 1/5 Vol Reaktionspuffer gemischt. Die Ansätze wurden für die angegebenen Zeitwerte bei RT inkubiert und durch Zugabe von 10 µl Auftragspuffer und Erhitzen für 5 min bei 72 °C wurden die Reaktionen abgestoppt. Die Ansätze wurden wie im *Primer-extension-Assay* auf ein 24 %iges Gel aufgetragen.

4 Ergebnisse

4.1 Empfindlichkeit der *xrs2*-Mutante gegenüber DNA-schädigenden Agenzien

Zur Charakterisierung der *xrs2*-Deletionsmutante wurde diese zunächst in der logarithmischen Wachstumsphase auf ihre Empfindlichkeit gegenüber DNA-schädigenden Agenzien untersucht. γ-Strahlung induziert Basenschäden und Strangbrüche, wobei DSB die schwerwiegendsten Schäden darstellen (Helleday et al., 2007). Die Chemikalien MMS und H_2O_2 hingegen induzieren hauptsächlich Basenschäden. Der häufigste Schaden nach H_2O_2-Behandlung ist das hoch mutagene 8-oxoG (Cadet et al., 1997; Boiteux et al., 2002), während MMS Basen durch Anfügen von Methylgruppen modifiziert. In 82 % der Fälle entsteht 7-Methylguanin, das die N-glykosidische Bindung destabilisiert. Dadurch entstehen hauptsächlich abasische (AP) Stellen (Guillet und Boiteux, 2003).

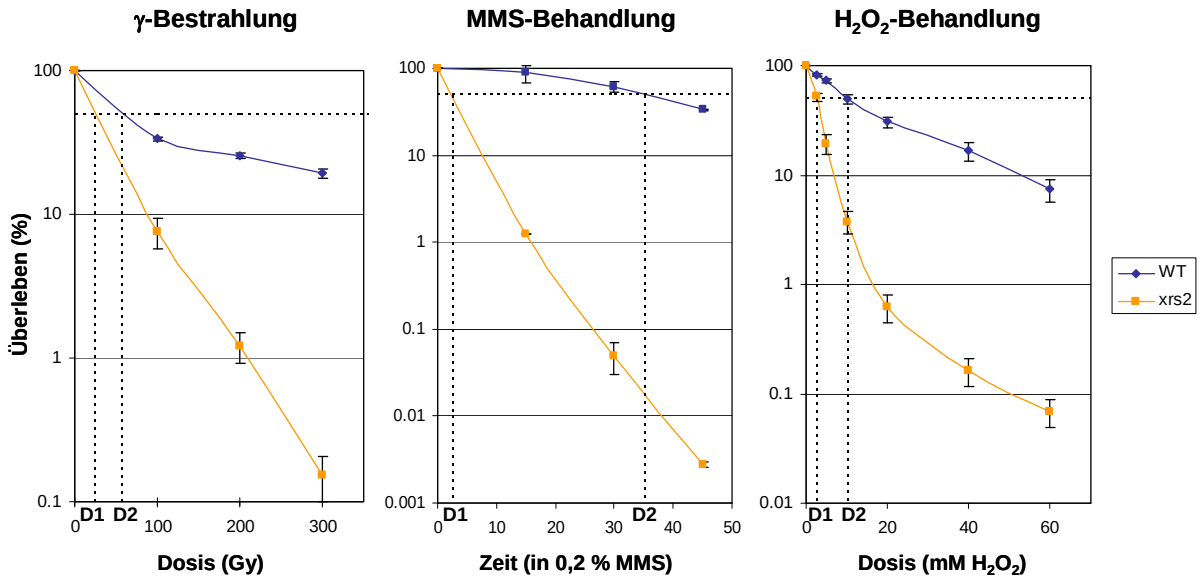

Abbildung 18: Überleben der *xrs2*-Deletionsmutante im Vergleich zum WT

Dargestellt ist die Sensitivität der Zellen gegenüber γ-Bestrahlung (links), MMS- (Mitte) und H_2O_2-Behandlung (rechts). Das Überleben wurde aus dem Verhältnis von Kolonienanzahl nach der Behandlung zu Kolonienanzahl ohne Behandlung bestimmt. In allen drei Fällen ist die *xrs2*-Mutante wesentlich empfindlicher als der WT. Die DRF für 50 % Überleben betragen 2, 14 und 4. Sie berechnen sich aus dem Quotienten von D2 zu D1. Die Mittelwerte wurden aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten ermittelt (+/-Standardfehler).

Abbildung 18 zeigt, dass die *xrs2*-Mutante im Vergleich zum WT eine hohe Sensitivität gegenüber allen drei Agenzien aufweist. Bei Bestrahlung mit 300 Gy überleben 20 % der WT-Zellen, jedoch nur noch 0,15 % der *xrs2*-Zellen. Durch 45-minütige Inkubation in

0,2 % MMS können im WT 33 % der Zellen überleben, während in der *xrs2*-Mutante nur noch 0,003 % der Zellen Kolonien bilden können. Nach Behandlung mit 60 mM H_2O_2 ist das Überleben von 7,5 % im WT auf 0,07 % in der *xrs2*-Mutante reduziert.

Die hohe Empfindlichkeit der *xrs2*-Mutante kann mit Hilfe von Dosis-Reduktions-Faktoren (DRF) ausgedrückt werden. Dabei gibt der DRF an, um wie viele Dosiseinheiten die Mutante bei einem Überleben von 50 % empfindlicher gegenüber dem jeweiligen Agenz im Vergleich zum WT ist. Er berechnet sich aus der Dosis, die notwenig ist, dass im WT 50 % der Zellen überleben (D2), geteilt durch die Dosis, die notwendig ist, dass in der Mutante 50 % der Zellen überleben (D1). In diesem Fall betragen die DRF für die γ-Bestrahlung 2, für die MMS-Behandlung 14 und für die H_2O_2-Behandlung 4.

4.2 Einfluss von Xrs2 auf die Apoptose

Bisher konnte nach Deletion von *XRS2* kein schwerer Defekt in der HR, dem Hauptweg zur Reparatur von DSB in Hefe, nachgewiesen werden. Alternativ könnte auch ein weiterer Faktor der Strahlenantwort, die Induktion von Apoptose, die hohe Empfindlichkeit nach DNA-Schädigung erklären. In lymphoblastoiden Zelllinien von NBS-Patienten konnte bereits eine gesteigerte Rate an strahlen-induzierter Apoptose nachgewiesen werden (Sagan et al., 2007). Auch in Hefe stellt die Apoptose einen Mechanismus zur Entfernung geschädigter Zellen dar. Daher sollte das Apoptoseverhalten der *xrs2*-Mutante im Vergleich zum WT in den folgenden Experimenten untersucht werden. Die Versuche hierzu wurden während eines Gastaufenthaltes in Graz im Labor von Frank Madeo (Institut für Molekulare Biowissenschaften, Karl-Franzens-Universität) durchgeführt. Die Analyse von Apoptose in Hefe erfolgte im BY4741-Hintergrund, da in diesem Stamm die Mechanismen der Apoptose in Hefe intensiv untersucht wurden (Büttner et al., 2007). Zur Stimulation von Apoptose wurden die Zellen mit niedrigen H_2O_2-Dosen behandelt, einem gebräuchlichen Induktor.

4.2.1 Quantifizierung des oxidativen Stress

Die intrazelluläre Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ist ein etablierter und leicht zu testender Marker für Apoptose in Hefe (Fröhlich et al., 2007). Zur Bestimmung des ROS-Gehaltes wurden die BY4741-Zellen mit 0,4 und 0,6 mM H_2O_2 stimuliert. Bei diesen Dosen weist die *xrs2*-Mutante im MKP0-Hintergrund bereits eine

hohe Empfindlichkeit auf (Abbildung 18). Zur Quantifizierung des oxidativen Stress wurde 4 h nach Behandlung eine Färbung der ROS mit Dihydroethidiumbromid (DHE) durchgeführt. Dieses wird durch die in der Zelle akkumulierten Sauerstoffradikale in Hydroethidium und fluoreszierendes Ethidiumbromid gespalten, welches durchflußzytometrisch quantifiziert wurde.

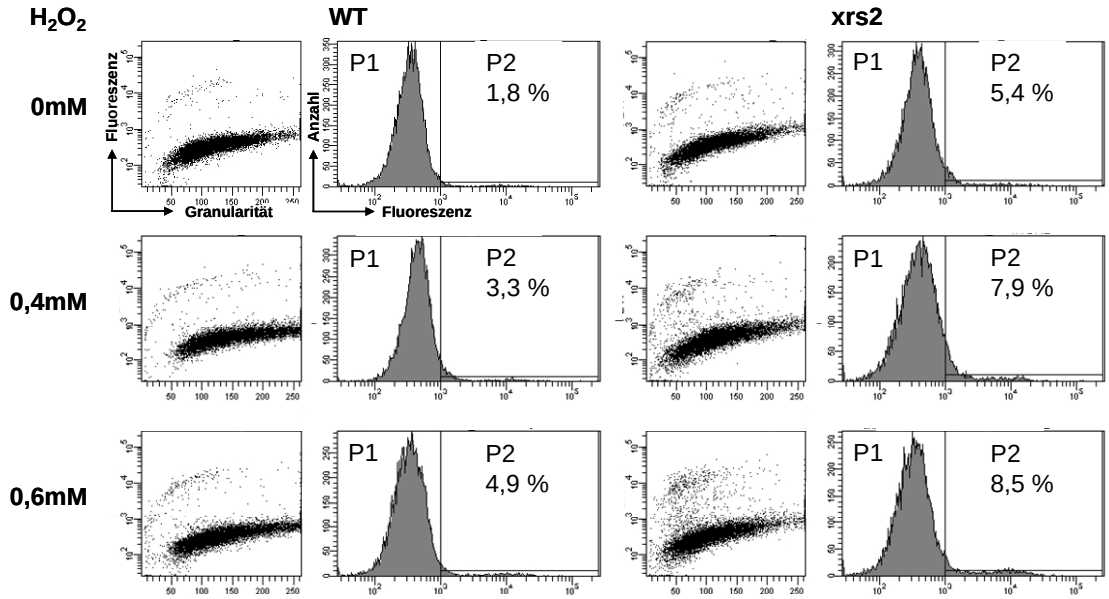

Abbildung 19: FACS-Analyse zur Bestimmung der Zellen mit erhöhter Menge an ROS

DHE-gefärbte Zellen wurden durchflußzytometrisch auf ihren ROS-Gehalt hin untersucht. Zur Analyse der Fluoreszenz kann diese gegen die Granularität der Zellen aufgetragen werden (jeweils linke Spalten). Zusätzlich wurde die Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl an gezählten Zellen dargestellt (jeweils rechte Spalten). Population P1 weist einen normalen ROS-Gehalt auf, während die Fluoreszenz in P2 erhöht ist. Im WT (links) steigt die Zahl der Zellen mit oxidativem Stress von 1,8 % um das 2,7-fache auf 4,9 % an. Die *xrs2*-Mutante (rechts) zeigt im unstimulierten Zustand bereits eine leicht erhöhte Konzentration an ROS. Die Population wird durch H_2O_2-Behandlung jedoch nur um das 1,6-fache auf 8,5 % erhöht.

Abbildung 19 zeigt, dass im WT die Population mit einer erhöhten Konzentration an ROS von 1,8 % ohne Behandlung auf 3,3 % nach Stimulation mit 0,4 mM H_2O_2 ansteigt. Durch Zugabe von 0,6 mM des Induktors weisen 4,9 % der Zellen eine Akkumulation von ROS auf. In der *xrs2*-Mutante liegt bereits ohne Induktion ein leicht erhöhter ROS-Level von 5,4 % vor. Durch H_2O_2-Behandlung wächst die Population auf 7,9 % bzw. 8,5 % an.

Zur Überprüfung des Überlebens nach Behandlung mit H_2O_2 wurde die Methode der Koloniebildung verwendet. In beiden Fällen weist die *xrs2*-Mutante eine stark erniedrigte Überlebensrate auf (Abbildung 20). Während im WT 70 % bzw. 40 % der Zellen Kolonien bilden können, überleben in der Mutante nur noch 30 % bzw. 10 % die Behandlung.

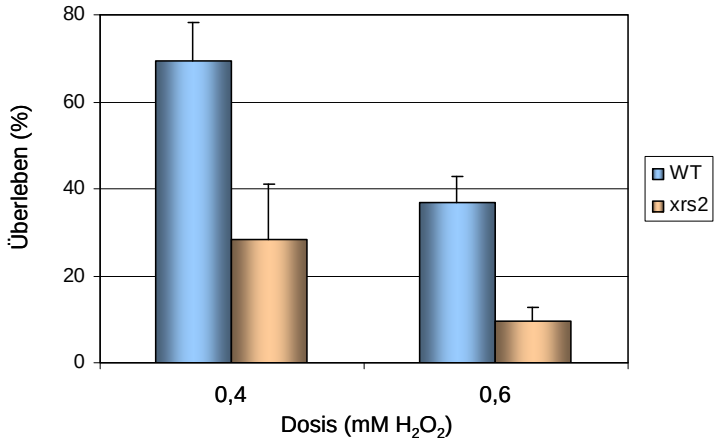

Abbildung 20: Überleben nach H_2O_2-Behandlung bei der Bestimmung des oxidativen Stress

Zur Bestimmung des Überlebens wurden die Zellen mit H_2O_2 versetzt und nach 4 h auf YEPD ausplattiert. Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil an überlebenden Zellen nach 0,4 und 0,6 mM H_2O_2 bezogen auf die Kontrolle ohne Behandlung. Die *xrs2*-Mutante weist bei beiden Dosen eine stärkere Empfindlichkeit gegenüber dem WT auf. Dargestellt ist der Mittelwert einer Dreifachbestimmung mit Standardabweichung.

4.2.2 Analyse apoptotischer Zellen mittels Annexin V-Färbung

Für den direkten Nachweis apoptotischer Zellen wurde eine Annexin V-Färbung durchgeführt. Dazu wurden WT- und *xrs2*-Zellen zunächst für 4 h mit 0,6 mM H_2O_2 behandelt und mit Hilfe von Lyticase / Glucuronidase spheroblastiert. Annexin V, das an FITC gekoppelt ist, bindet an Phosphatidylserin. Dieses wird zusammen mit weiteren anionischen Phospholipiden während des programmierten Zelltods externalisiert. Da nekrotische Zellen eine durchlässige Membran aufweisen, kann auch in diesem Fall Annexin V an Phophatidylserin auf der Innenseite der Plasmamembran binden. Daher wurde zur Detektion von nekrotischen Zellen zusätzlich eine Färbung mit Propidiumiodid durchgeführt.

Abbildung 21 A zeigt exemplarisch die FACS-Daten eines Versuchs. Zellen in P1 sind Annexin V-positive Zellen und somit apoptotisch, während die nekrotischen Zellen in P2 sowohl durch Annexin V als auch durch PI angefärbt wurden. Die Ergebnisse einer Dreifachbestimmung sind in einem Diagramm zusammengefasst (Abbildung 21 B). Für den WT zeigt sich nach Stimulation eine 4-fache Erhöhung des Anteils an Zellen mit apoptotischen Markern von 1,2 % auf 5,2 %. Auch der nekrotische Anteil steigt von 1,5 % auf 3,6 % an. Die Mutante weist bereits ohne H_2O_2-Behandlung doppelt so viele apoptotische (2,2 %) und 3 x so viele nekrotische Zellen (4,8 %) wie der WT auf. Durch Stimulation mit 0,6 mM H_2O_2 verdoppelt sich der Anteil an apoptotischen Zellen in der *xrs2*-Mutante. Somit wird in der Mutante durch die Stimulation weniger Apoptose

induziert als im WT. Die nekrotische Population hingegen wächst wie im WT um den Faktor 3 auf 12,6 % an.

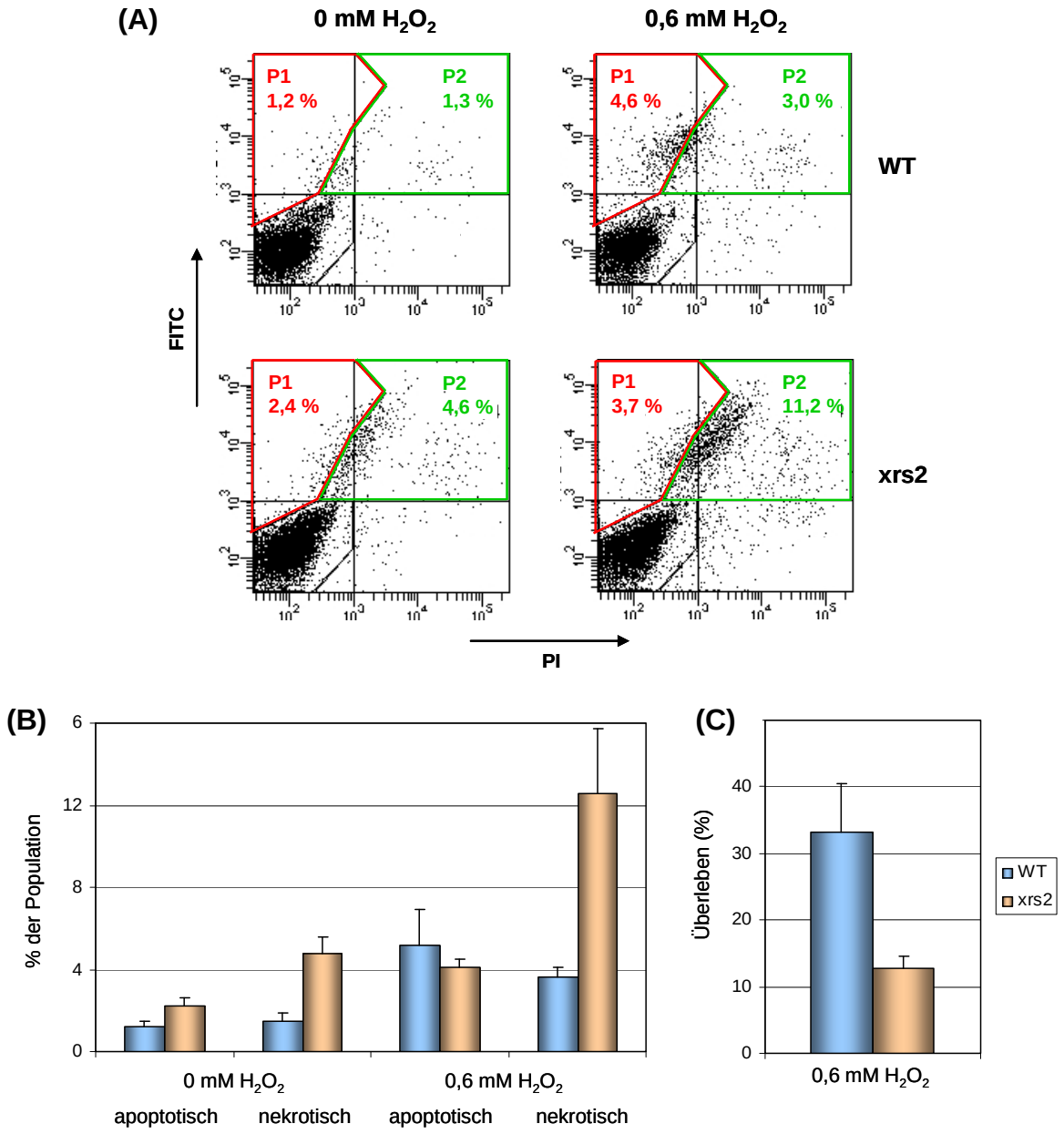

Abbildung 21: Durchflußzytometrische Quantifizierung apoptotischer und nekrotischer Zellen sowie Überleben nach H_2O_2-Behandlung

Die Zellen wurden für 4 h mit 0,6 mM H_2O_2 versetzt. **(A)** Durch Färbung von Phosphatidylserin mit FITC-gekoppeltem Annexin V und der Färbung von DNA mit Propidiumiodid lassen sich apoptotische und nekrotische Zellen im FACS bestimmen. Annexin V-positive Zellen (P1) weisen apoptotische Merkmale auf, während Annexin V- und PI-positive Zellen (P2) nekrotisch sind. In Bezug auf Apoptose unterscheiden sich WT- (oben) und *xrs2*-Zellen (unten) kaum. Die Mutante weist jedoch im Vergleich zum WT im unstimulierten Zustand (links) sowie nach Behandlung mit 0,6 mM H_2O_2 (rechts) einen erhöhten Anteil an nekrotischen Zellen auf. Exemplarisch sind die FACS-Daten einer Bestimmung dargestellt. **(B)** Im Diagramm sind die prozentualen Anteile an apoptotischen und nekrotischen Zellen einer Dreifachbestimmung mit Standardabweichung zu sehen. **(C)** Zusätzlich wurde der Anteil an überlebenden Zellen nach der Stimulation mit 0,6 mM H_2O_2 überprüft. Die *xrs2*-Mutante weist dabei eine stärkere Empfindlichkeit als der WT auf. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit Standardabweichung.

Zusätzlich wurde auch hier das Überleben durch Koloniebildungsvermögen der Zellen überprüft (Abbildung 21 C). Obwohl im WT sowie in der *xrs2*-Mutante nur wenige Zellen nach Stimulation mit 0,6 mM H_2O_2 Annexin V-positiv sind, überleben nur ca. 30 % der WT-Zellen, während in der *xrs2*-Mutante nur noch 10 % der Zellen die Fähigkeit, Kolonien zu bilden, aufweisen.

Die ROS-Bestimmung, als auch die Färbung mit Annexin V zeigten in den unbehandelten *xrs2*-Proben eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen. Die Induktion durch Stimulation mit H_2O_2 hingegen fiel gering aus.

4.3 Einfluss von Xrs2 auf die DSB-Reparatur

Die niedrige Überlebensrate der *xrs2*-Mutante nach γ-Bestrahlung aus Abbildung 18 wurde bereits in Mutanten mit anderen Stammhintergründen sowie in Mutanten mit Punktmutationen oder unvollständigen Deletionen gezeigt (Paques und Haber, 1999; Jackson, 2002; Aylon und Kupiec, 2004). Durch die hohe Sensitivität der Mutanten mit Defekten in den Genen der MRX-Komponenten, wurden diese in die *RAD52*-Epistasisgruppe eingegliedert. Zusätzlich zeigten Plasmidversuche und Untersuchungen der Reparatur enzymatisch-indzuierter DSB (Milne et al., 1996; Tsukamoto et al., 1997; Boulton und Jackson, 1998; Moreau et al., 1999), dass der Komplex eine wichtige Rolle in der DSB-Reparatur spielt. Bisher wurden jedoch hauptsächlich wichtige Funktionen für NHEJ (Dudasova et al., 2004) und BIR (Krishna et al., 2007) beschrieben, während für die HR nur geringe Defekte in den Mutanten nachgewiesen werden konnten (Jackson, 2002; Palmbos et al., 2005). Deshalb sollte die Funktion des Komplexes in der DSB-Reparatur besser charakterisiert werden. Für eine gute Vergleichbarkeit der Daten wurden nur Mutanten mit Komplettdeletionen der Gene im gleichen Stammhintergrund (MKP0) verwendet.

4.3.1 Analyse der chromosomalen DSB-Reparatur

Zunächst wurde die Reparatur chromosomaler DSB, induziert durch γ-Bestrahlung, näher analysiert. Diese wurde bisher hauptsächlich in diploiden Zellen untersucht, da vermutet wurde, HR fände nur zwischen homologen Chromsomen statt (Geigl und Eckardt-Schupp, 1991; Friedl et al., 1993; Dardalhon et al., 1994; Friedl et al., 1995; Moore et al., 2000). In dieser Arbeit hingegen wurde die chromosomale DSB-Reparatur in haploiden Zellen bestimmt.

4.3.1.1 Strahlenempfindlichkeit von MRX-Mutanten

Um zu testen, ob alle Komponenten des MRX-Komplexes für die Reparatur von DSB notwendig sind, wurde eine vergleichende Analyse des Zellüberlebens nach γ-Bestrahlung von *xrs2*-, *mre11*- und *rad50*-Mutanten in der logarithmischen Wachstumsphase durchgeführt. Zusätzlich sollte das Überleben nach Deletion der MRX-Gene im Vergleich zu HR- und NHEJ-defizienten Mutanten analysiert werden.

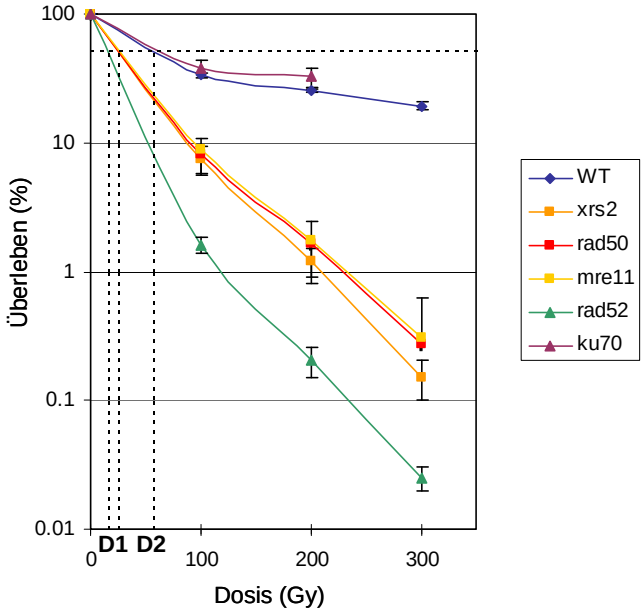

Abbildung 22: Strahlenempfindlichkeit der MRX-Mutanten im Vergleich zu Zellen mit Mutationen in wichtigen DSB-Reparaturgenen

Dargestellt ist das Überleben der MRX-Deletionsmutanten nach γ-Bestrahlung im Vergleich zu den Mutanten *ku70* und *rad52*, die Schlüsselgene des NHEJ bzw. der HR. Zellen mit Mutationen in den Genen des MRX-Komplexes weisen eine hohe Strahlenempfindlichkeit auf (DRF = 2). Die Deletion von *RAD52* verstärkt die Strahlenempfindlichkeit (DRF = 3), während die Deletion von *KU70* keine Auswirkung auf das Überleben zeigt. Die Mittelwerte (+/-Standardfehler) wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt.

Abbildung 22 zeigt, dass die beiden Mutanten *rad50* und *mre11* die gleiche Sensitivität aufweisen wie die *xrs2*-Mutante. Alle drei Mutanten weisen einen DRF bei 50 % Überleben von 2 auf. In den HR-defizienten *rad52*-Zellen ist das Überleben noch stärker herabgesetzt (DRF = 3), da Hefezellen hauptsächlich diesen DSB-Reparaturweg verwenden, wenn homologe Sequenzen, z. B. durch Schwesterchromatiden in replizierenden Zellen, vorliegen. Die Deletion von *KU70* hingegen, dem Schlüsselgen des in Hefe untergeordneten DSB-Reparaturweges NHEJ, beeinträchtigt das Überleben nicht.

4.3.1.2 Quantifizierung der DSB-Reparatur mittels PFGE

Da die Überlebensdaten auf eine bedeutende Rolle des MRX-Komplexes in der Reparatur strahlen-induzierter Schäden hinweisen, wurde die chromosomale DSB-Reparatur von Zellen in der stationären Wachstumsphase mittels PFGE analysiert. Hierzu wurden die Reparatureffizienzen durch Quantifizierung der DSB direkt nach der γ-Bestrahlung sowie nach 23 h Reparaturzeit bestimmt. Um die Reparatur zu erleichtern, wurden die Zellen nach Schadensinduktion unter Nichtwuchs-Bedingungen inkubiert. Der verwendete LHR-Puffer lässt dabei Reparaturprozesse zu, während die DNA-Replikation und das Zellwachstum unterdrückt werden (Frankenberg-Schwager et al., 1980; Dardalhon et al., 1994; Friedl et al., 1995). 0 h und 23 h nach Bestrahlung mit 0 Gy und 400 Gy wurden die Zellen in Agarose gebettet und die chromosomale DNA mit Hilfe von PFGE aufgetrennt (Friedl et al., 1995).

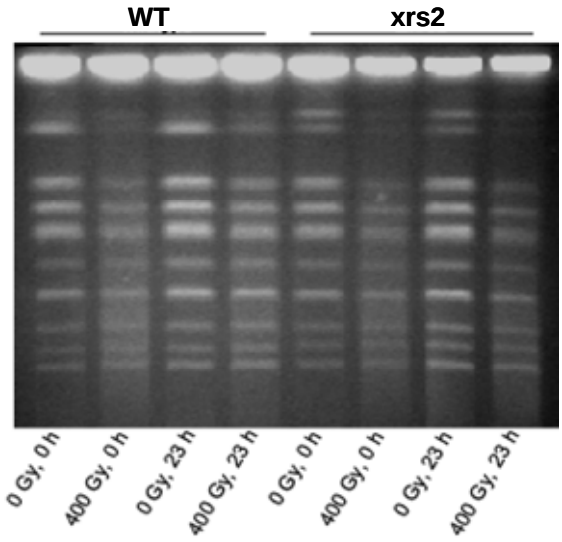

Abbildung 23: Chromosomale DNA von WT und *xrs2*-Mutante nach der Auftrennung mittels PFGE

Zellen in der stationären Wachstumsphase wurden mit 0 Gy und 400 Gy bestrahlt. Direkt nach der Bestrahlung sowie nach 23 h Inkubation in LHR-Puffer wurden die Zellen in Agarose eingebettet und die chromosomale DNA mittels PFGE aufgetrennt.

Nach Färbung der Gele mit EB (Abbildung 23) sind in den Proben ohne Bestrahlung die Chromosomen als klare Banden zu sehen. Nach der Bestrahlung sinkt jedoch die Intensität der Banden, was auf einen Verlust intakter Chromosomen zurückzuführen ist. Zusätzlich werden die Banden von einem Schmier überlagert. Dieser entsteht durch das Auftreten von DNA-Fragmenten willkürlicher Größe, verursacht durch zufällig induzierte DSB in den Chromosomen. Nach Inkubation in LHR-Puffer wird die Reparatur durch eine Zunahme der Bandenintensität sowie einer Abnahme der degradierten DNA sichtbar.

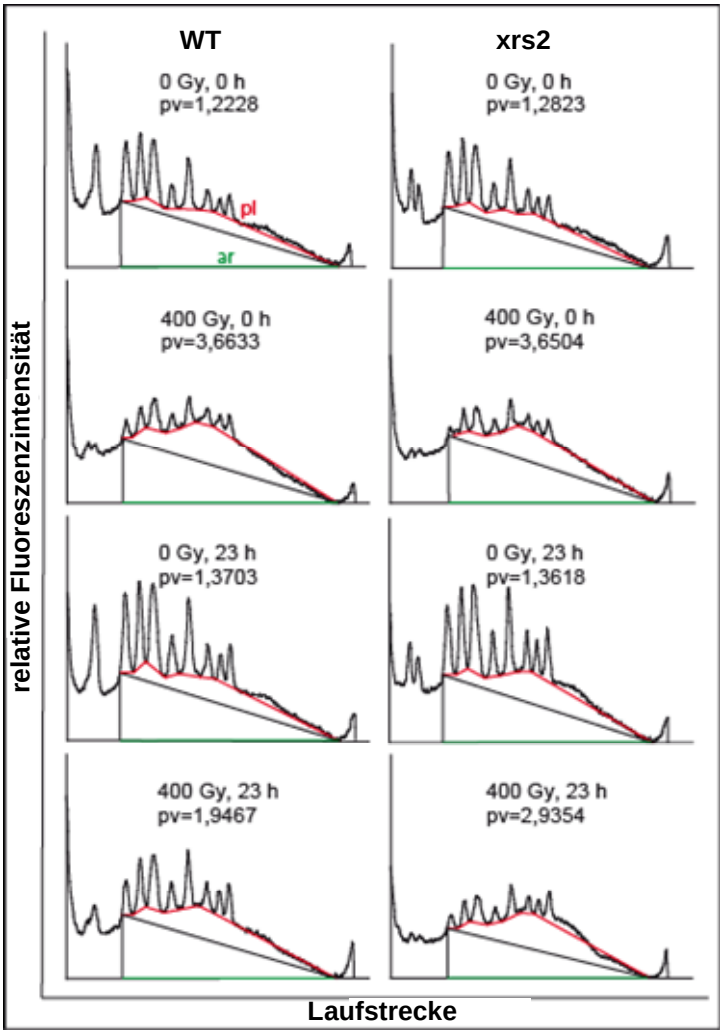

Abbildung 24: Auswertung der Fluoreszenz-Intensitätsprofile mit Hilfe der Software *Geltool*

Die mit dem Programm *Quantity One*® erstellten Fluoreszenzprofile der einzelnen Spuren aus der PFGE-Analyse wurden mit Hilfe der Software *Geltool* ausgewertet. *Geltool* quantifiziert die Degradierung durch die Ermittlung von Degradierungswerten (pv), die der Berechnung der Reparatureffizienz dienen. Im WT sowie in der *xrs2*-Mutante steigt der Degradierungswert durch die Bestrahlung mit 400 Gy von 1,2 auf 3,6 an. Nach 23 h Reparaturzeit weist die *xrs2*-Mutante im Gegensatz zum WT einen erhöhten pv auf.

Um die DSB zu quantifizieren, wurden mit Hilfe des Programms *Quantity One*® Fluoreszenz-Intensitätsprofile der einzelnen Spuren generiert, die im weiteren Verlauf mit der neuen Software *Geltool* (Gomez-Paramio, 2007) ausgewertet wurden (3.2.5.4 / Abbildung 14). Dabei wird zunächst das auszuwertende Gebiet von den Chromosomen 13/14 bis zum Gelende begrenzt. Auf Grund des unterschiedlichen Migrationsverhaltens der beiden größten Chromosomen, werden diese Banden nicht in die Auswertung mit einbezogen. Nach der Gebietsbegrenzung führt die Software eine Subtraktion des Hintergrunds sowie eine Normalisierung des Gels durch. Verbinden der Intensitätsminima legt ein Degradierungsprofil (pl = *profile line*) fest, die Länge der zu analysierenden Region auf der X-Achse wird ar (*analysed region*) genannt. Mit Hilfe der

Längen dieser beiden Linien werden Degradierungswerte (pv = *profile value*) ermittelt, die der Berechnung der DSB-Reparatureffizienz dienen (3.2.5.4) (Steininger et al., 2008). Abbildung 24 zeigt die *Geltool*-Auswertung des exemplarischen Pulsfeldgels aus Abbildung 23.

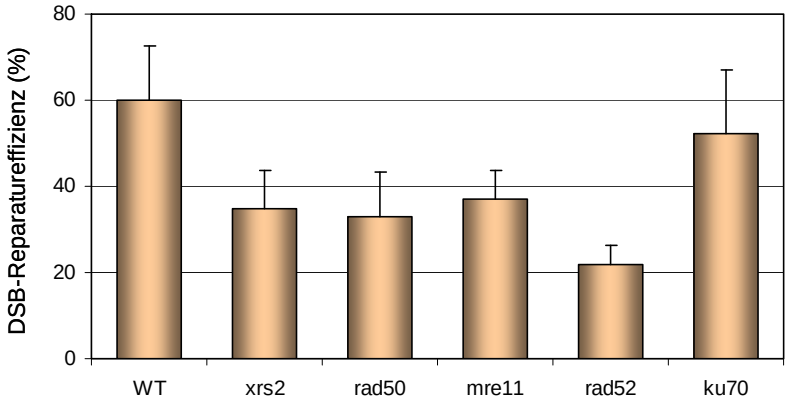

Abbildung 25: DSB-Reparatureffizienzen von Stämmen mit Mutationen in verschiedenen DSB-Reparaturgenen

Die Reparatureffizienz in den MRX-Mutanten ist im Vergleich zum WT um die Hälfte erniedrigt. In der *rad52*-Mutante ist die Reparatureffizienz noch weiter herabgesetzt, während die Deletion von *KU70* kaum einen Effekt auf die DSB-Reparatur hat. Die gezeigten Ergebnisse sind Mittelwerte (mit Standardabweichung) aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen.

Abbildung 25 zeigt die berechneten DSB-Reparatureffizienzen der MRX-Mutanten im Vergleich zum WT und den HR- und NHEJ-defizienten Stämmen *rad52* und *ku70*. Für den WT wurde eine Reparatureffizienz von 60 % berechnet. In den Stämmen *xrs2*, *rad50* und *mre11* ist die Effizienz signifikant ($p < 0,05$) auf 35 % reduziert. Die *rad52*-Mutante weist einen noch stärkeren DSB-Reparaturdefekt auf. Innerhalb der 23 h konnte dieser Stamm nur 22 % der entstandenen DSB reparieren. Die *ku70*-Mutante repariert mit einer Effizienz von 52 % DSB annähernd so gut wie der WT.

Diese Resultate zeigen, dass auch haploide Zellen in der stationären Wachstumsphase effiziente Reparaturmechanismen besitzen, die zum größten Teil über HR ablaufen. Zusätzlich zeigen die Daten einen signifikanten Reparaturdefekt von Mutanten, die in den MRX-Komponenten deletiert sind.

4.3.2 Analyse der Reparatur von Mikrodeletionen

Die Analyse der chromosomalen DSB-Reparatur ließ eine wichtige Rolle des MRX-Komplexes für die Reparatureffizienz erkennen. Allerdings gibt diese Technik keine Information über die Reparaturgenauigkeit oder den verwendeten Reparaturweg. Daher

wurde das neu etablierte Plasmidsystem pJD4His (Steininger, 2005; Steininger et al., 2008) verwendet, welches eine Untersuchung der Reparatureffizienz, -genauigkeit und der Crossoverfrequenz bei der Reparatur von Mikrodeletionen erlaubt. Im Gegensatz zu seinem Vorläufersystem YpJA18 (Jha et al., 1993; Mörtl et al., 2008) ist in pJD4His die *CEN*-Region deletiert und im *URA3*-Gen wurde eine *HIS3MX6* Marker-Kassette einkloniert (Abbildung 13).

4.3.2.1 Bestimmung der Reparatureffizienz und -genauigkeit

Zur Untersuchung der Reparatur von Mikrodeletionen wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen *ApaI* und *NcoI* verdaut. Dadurch wurde die *HIS3MX6* Marker-Kassette eliminiert sowie eine Mikrodeletion von 169 bp im *URA3*-Gen eingeführt. Nach der Transformation von Hefezellen mit linearisiertem Vektor wurden mit Hilfe einer ersten Selektion *TRP1*-prototrophe Kolonien identifiziert, die das Plasmid rezirkularisiert haben. Durch zusätzliche Transformation der Zellen mit intaktem pJD4His kann die Reparatureffizienz durch die Formel (Anzahl der Kolonien nach Transformation mit geschnittenem Plasmid) / (Anzahl der Kolonien nach Transformation mit ungeschnittenem Plasmid) bestimmt werden. Selektion auf *HIS3MX6*-Expression nach Transformation mit geschnittenem Plasmid diente der Identifizierung von Klonen, die unvollständig verdautes Plasmid aufgenommen haben. Dadurch konnten diese von den weiteren Analysen ausgeschlossen werden. Im nächsten Schritt wurde durch die Analyse der Funktionalität des *URA3*-Gens die Reparaturgenauigkeit untersucht. *URA3*$^{+}$-Transformanten entstehen durch korrekte Reparatur der enzymatisch-induzierten Mikrodeletion mittels HR unter Verwendung des chromosomalen *ura3-52*-Lokus als Matrize. Uracil-defiziente Zellen hingegen weisen auf NHEJ oder fehlerhafte HR hin. Unter 3.2.6 ist das Ablaufschema des Plasmid-Reparaturversuches näher beschrieben (Abbildung 15).

Im Folgenden wurde dieses Plasmidsystem verwendet, um die Reparatureffizienz und -genauigkeit der MRX-Mutanten im Vergleich zum WT und zu Mutanten mit Defekten in den Reparaturwegen HR und NHEJ zu bestimmen (Abbildung 26).

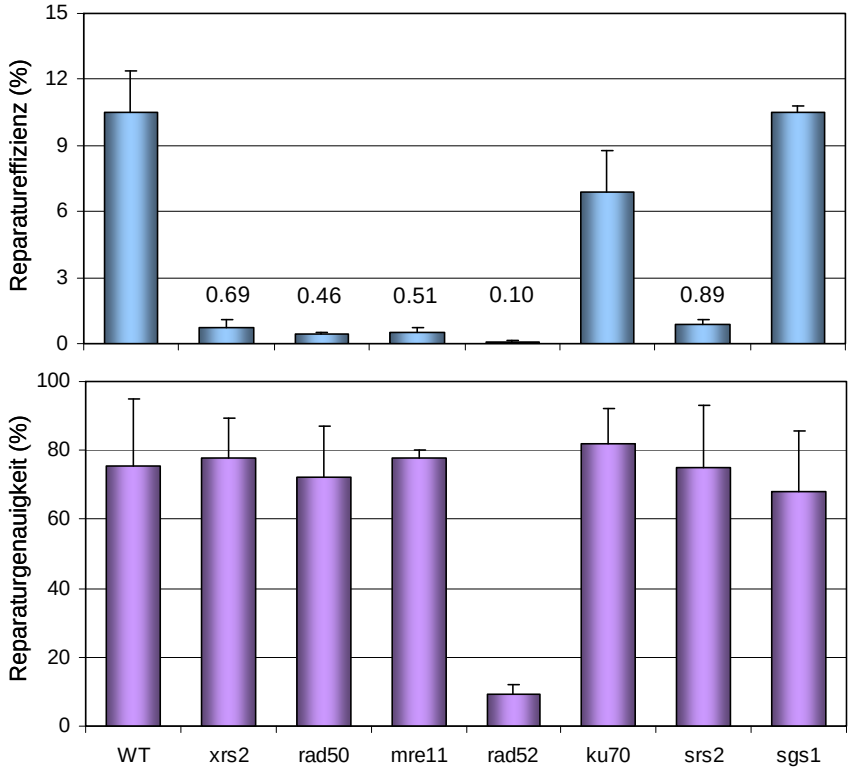

Abbildung 26: Effizienzen und Genauigkeiten der Reparatur von Mikrodeletionen in Zellen mit Mutationen in verschiedenen DSB-Reparaturgenen

Die Analyse der Reparatur von Mikrodeletionen erfolgte mit Hilfe des Vektors pJD4His. Die beiden Selektionsmarker *TRP1* und *URA3* dienten der Bestimmung von Reparatureffizienz und -genauigkeit. Die Effizienz (oben) in den MRX-Mutanten ist im Vergleich zum WT 20-fach erniedrigt. In der *rad52*-Mutante ist die Reparatureffizienz noch stärker herabgesetzt, während die Deletion von *KU70* kaum einen Effekt zeigt. Die beiden zusätzlichen Kontrollstämme, *srs2* und *sgs1* weisen einen hohen bzw. keinen Reparaturdefekt auf. Die Reparaturgenauigkeit (unten) ist nur nach Deletion von *RAD52* erniedrigt. Dargestellt sind die Mittelwerte (mit Standardabweichung) von mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Für die Bestimmung der Reparaturgenauigkeit wurden pro Versuch 150 Klone analysiert.

In WT-Zellen wurde eine Reparatureffizienz von 11 % gemessen, während die MRX-Deletionsmutanten eine starke Reduktion auf 5 % des WT-Wertes (0,5 % Reparatureffizienz) aufweisen. Somit weisen diese Mutanten einen starken Defekt in der Reparatureffizienz von enzymatisch-indzuierten Mikrodeletionen auf. Auch bei der DSB-Reparatur auf chromosomaler Ebene konnten die Mutanten nur 50 % des WT-Wertes erreichen. Für die *rad52*-Mutante konnte, wie für die chromosomale DSB-Reparatur, eine noch deutlichere Verminderung der Reparatureffizienz festgestellt werden, was die wichtige Rolle von Rad52 für die Rekombination in Hefe widerspiegelt. Während auf chromosomaler Ebene nur 30 % des WT-Wertes erreicht wurden, ist die Reparatureffizienz für enzymatisch-induzierte Mikrodeletionen sogar auf 1 % des WT-Wertes (0,1 % Reparatureffizienz) reduziert. Im Gegensatz dazu beeinträchtigt die Deletion von *KU70*, dem wichtigsten NHEJ-Faktor, die Reparatur kaum, so dass 60 % des WT-Wertes erreicht werden (7 % Reparatureffizienz). Zur Validierung des

Plasmidsystems wurden zusätzlich die Auswirkungen der Deletionen von *SRS2* and *SGS1* analysiert. Dies sind Gene, deren Produkte die Crossoverfrequenz in der DSB-Reparatur beeinflussen. Während die Deletion von *SGS1* keinen Einfluss auf die Reparatureffizienz hat, ist die Effizienz in der *srs2*-Mutante auf ca. 10 % des WT-Wertes reduziert (1 % Reparatureffizienz). Aylon et al. (Aylon et al., 2003) und Ira et al. (Ira et al., 2003) konnten mit interchromosomalen Rekombinations-systemen ebenfalls eine reduzierte Reparatureffizienz nach Deletion von *SRS2* nachweisen.

Neben der Reparatureffizienz wurde die Reparaturgenauigkeit analysiert. *Saccharomyces cerevisiae* WT-Zellen reparieren chromosomale DSB in mitotischen Zellen hauptsächlich über fehlerfreie HR (Paques und Haber, 1999; Jackson, 2002). Auch in dem hier verwendeten Plasmidsystem wurde das *URA3*-Gen in 80 % der Reparatur-Ereignisse unter Verwendung der chromosomalen Kopie auf Chromosom IV wieder hergestellt (*URA3*$^{+}$-Klone). Die Plasmid-Mikrodeletionen wurden in den Stämmen *xrs2*, *rad50*, *mre11*, *ku70*, *srs2* und *sgs1*, wie im WT, mit hoher Genauigkeit durch HR repariert. Nur die *rad52*-Mutante, die kaum HR durchführen kann, zeigt eine stark reduzierte Reparaturgenauigkeit.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Reparatureffizienz nach Deletion der MRX-Gene zwar stark reduziert ist, aber korrekte HR, wie im WT, der Hauptweg für die Reparatur der Mikrodeletion bleibt. Das Gleichgewicht zwischen HR und NHEJ ist in den Mutanten somit unverändert.

4.3.2.2 Quantifizierung von Crossover-Ereignissen

Mit Hilfe der Reparaturgenauigkeit lassen sich fehlerfreie und fehlerhafte Reparatur voneinander differenzieren, jedoch ist keine Aussage über den verwendeten HR-Mechanismus möglich. Da sich die beiden Hauptwege der Homologen Rekombination, DSBR und SDSA, in ihrem Einfluss auf die Entstehung von Crossover-Ereignissen unterscheiden, kann die Bestimmung der Crossoverfrequenz Hinweise auf den verwendeten HR-Weg geben. Da pJD4His zwar eine *ARS*-Sequenz, aber keine Centromer-Sequenz mehr besitzt, kann der Vektor entweder in das Genom integriert werden oder nach der Reparatur extrachromosomal vorliegen. Eine Integration des Plasmids ist die Folge eines Crossover-Ereignisses und führt zu stabilen Transformanten. Findet die Reparatur nicht durch einen Crossover-Mechanismus statt, resultiert dies in instabilen Transformanten, die leicht durch die mitotische Instabilität der beiden Markergene *TRP1* and *URA3* identifiziert werden können. Zusätzlich kann die

Integration von Plasmid-DNA durch PCR-Analyse des chromosomalen *URA3*-Lokus nachgewiesen werden (3.2.6 / Abbildung 16).

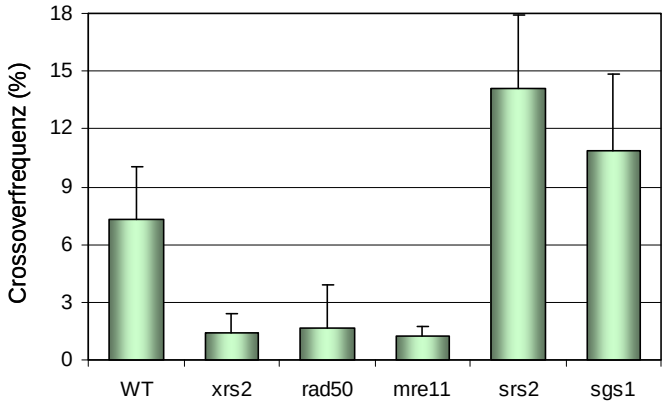

Abbildung 27: Crossoverfrequenz bei der Reparatur von Mikrodeletionen in Zellen mit Mutationen in verschiedenen DSB-Reparaturgenen

Zur Bestimmung der Crossoverfrequenz wurde die mitotische Stabilität der Selektionsmarker *TRP1* und *URA3* nach korrekter Reparatur der Mikrodeletion untersucht. Erst nach Einbau des Vektors in das Genom der Hefezelle durch ein Crossover-Ereignis kann die plasmidiale DNA stabil an die Nachkommen weitergegeben werden. Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil an Crossover-Ereignissen unter den korrekten Reparatur-Ereignissen. In den MRX-Mutanten ist die Crossoverfrequenz im Vergleich zum WT signifikant erniedrigt. Die beiden Kontrollstämme, *srs2* und *sgs1*, weisen erhöhte Crossoverfrequenzen auf. Dargestellt sind die Mittelwerte (mit Standardabweichung) von mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Pro Versuch wurden 150 Klone analysiert.

Abbildung 27 zeigt die Crossoverfrequenz unter den *URA3*$^+$-Konvertanten in den MRX-Mutanten im Vergleich zum WT sowie zu den Deletionsmutanten *srs2* und *sgs1*. Da nicht nur durch den NHEJ-Prozess Uracil-Auxotrophie entstehen kann, sondern auch durch die gleichzeitige Übertragung der Ty-Mutation im HR-Mechanismus (Kokonversion), wurden auch die *ura3*$^-$-Klone auf Crossover-Ereignisse hin untersucht. Allerdings zeigte hierbei kein einziger Klon mitotische Stabilität der Markergene. In den *URA3*$^+$-Klonen der WT-Zellen wurde eine Crossoverfrequenz von 7 % ermittelt. Diese niedrige Rate an Crossover-Ereignissen stimmt gut mit früheren Studien in der Bäckerhefe, wie auch in der Spalthefe überein (Virgin und Bailey, 1998; Ira et al., 2003; Robert et al., 2006). In den Mutanten *xrs2*, *rad50* und *mre11* finden Crossover-Ereignisse zu einem Prozentsatz von nur 1,5 % statt. In den Deletionsmutanten *srs2* und *sgs1* hingegen waren 14 % bzw. 11 % der Reparatur-Ereignisse mit dem Auftreten eines Crossover-Ereignisses assoziiert. Diese erhöhten Frequenzen an Crossover-Ereignissen konnten auch mit einem interchromosomalen System gefunden werden (Ira et al., 2003), wodurch bestätigt wird, dass das Plasmidsystems pJD4His als Modell für chromosomale Reparatur- und Rekombinationsereignisse verwendet werden kann.

Somit hat der MRX-Komplex zwar keine Funktion für die Regulation der Balance zwischen HR und NHEJ, er spielt jedoch eine Rolle bei der Begünstigung von mitotischen Crossover-Ereignissen innerhalb der HR.

4.3.3 Einfluss funktioneller Domänen des Xrs2-Proteins auf die DSB-Reparatur

Um den Einfluss von Xrs2 auf die DSB-Reparatur näher zu analysieren, sollten funktionelle Domänen identifiziert werden, die für die verschiedenen beobachteten Funktionen des Proteins verantwortlich sind. Dazu wurden Mutanten konstruiert, die verkürzte Versionen des Xrs2-Proteins exprimieren. Für die Herstellung dieser Mutanten wurden YIplac128-basierte Plasmide verwendet, die nach Linearisierung gezielt in den *leu2-3-112*-Lokus der *xrs2*-Deletionsmutante integrieren. Diese Plasmide enthalten neben der Promoter-Region von *XRS2* (Chromosom IV 1219010–1217570) und der Terminatorsequenz (Chromosom IV 1215002–1214802) je ein mutiertes *xrs2*-Allel bzw. den kompletten *XRS2*-ORF zur Konstruktion eines Kontrollstammes. Während in der *xrs2-84M*-Mutante die FHA-Domäne am N-Terminus fehlt, ist in der *xrs2-228M*-Mutante der gesamte N-Terminus inklusive BRCT-Domäne deletiert. In der *xrs2-664*-Mutante endet das Protein vor der Tel1-Bindedomäne. Die *xrs2-630*-Mutante weist eine Deletion beider Bindedomänen in der C-terminalen Region, der Tel1-Bindedomäne sowie der Mre11-Bindedomäne auf.

4.3.3.1 Analyse der chromosomalen DSB-Reparatur

Zur Analyse der chromosomalen DSB-Reparatur wurden die Mutanten mit verkürzten *XRS2*-Allelen auf ihre Strahlensensitivität und Reparaturkapazität mittels PFGE hin untersucht (Abbildung 28). Nur die *xrs2-630*-Mutante, der die Mre11-Bindestelle des Xrs2-Proteins fehlt, weist eine hohe Empfindlichkeit, vergleichbar der *xrs2*-Deletionsmutante, gegenüber γ-Strahlung auf (A). Zwar hat der DRF für die *xrs2-228M*-Mutante, wie für die *xrs2*-Deletionsmutante und die *xrs2-630*-Mutante, einen Wert von 2, jedoch geht das Überleben bei Bestrahlungsdosen über 100 Gy in ein Plateau über, während die beiden Mutanten *xrs2* und *xrs2-630* einen exponentiellen Kurvenverlauf zeigen. Ebenso konnte nur für die *xrs2-630*-Mutante eine signifikante Erniedrigung der chromosomalen DSB-Reparatureffizienz, die der *xrs2*-Deletionsmutante entspricht, nachgewiesen werden (B).

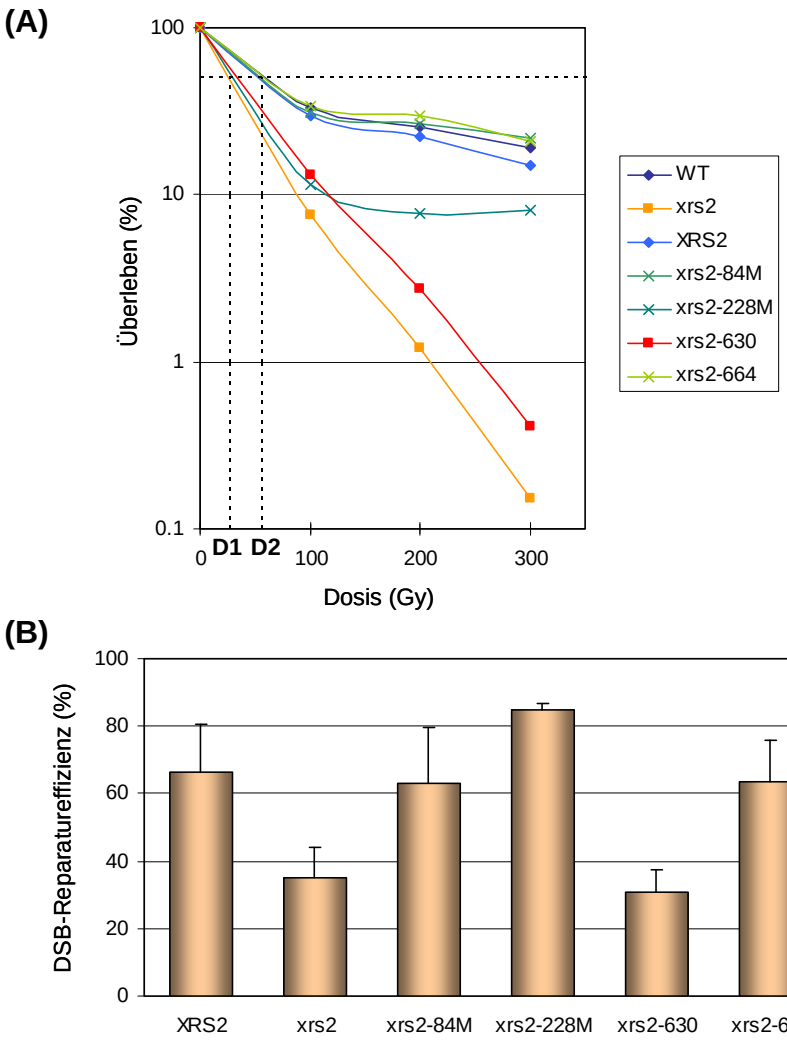

Abbildung 28: Strahlenempfindlichkeit DSB-Reparatureffizienzen der Mutanten mit verkürzten *XRS2*-Allelen

(A) Im Diagramm ist das Überleben von haploiden Hefezellen in der logarithmischen Wachstumsphase nach γ-Bestrahlung dargestellt. Die Mutanten tragen sowohl N-terminale, als auch C-terminale Verkürzungen. Als Kontrolle wurde der komplette *XRS2*-ORF in den *LEU2*-Lokus der Deletionsmutante integriert. Nur die *xrs2-630*-Mutante, deren Xrs2-Protein keine Mre11-Bindestelle mehr besitzt, weist die hohe Sensitivität der *xrs2*-Deletionsmutante auf. Die *xrs2-228M*-Mutante besitzt zwar denselben DRF-Wert (DRF = 2) wie die Deletionsmutante, zeigt bei höheren Bestrahlungsdosen jedoch ein besseres Überleben.
(B) Für die Analyse der chromosomalen DSB-Reparatur wurden Zellen in der stationären Wachstumsphase mit 0 Gy und 400 Gy bestrahlt. Direkt nach Bestrahlung sowie nach 23 h Inkubation in LHR-Puffer wurden die Zellen in Agarose eingebettet und die chromosomale DNA mittels PFGE aufgetrennt. Mit Hilfe der Software *Geltool* wurden Degradierungswerte (pv) bestimmt, die der Berechnung der DSB-Reparatureffizienz dienten. Nur die *xrs2-630*-Mutante, bei der Mre11 nicht mehr an Xrs2 binden kann, zeigt wie die *xrs2*-Deletionsmutante eine signifikante Erniedrigung der Reparatureffizienz im Vergleich zum Kontrollstamm *XRS2*. Die gezeigten Ergebnisse sind Mittelwerte (mit Standardabweichung) von mindestens zwei unabhängigen Versuchen.

Weder die Deletion der N-terminalen Domänen FHA und BRCT, noch die Eliminierung der Tel1-Bindedomäne beeinträchtigen die chromosomale DSB-Reparatur oder das Überleben nach γ-Bestrahlung.

4.3.3.2 Analyse der Reparatur von Mikrodeletionen

Wie für die *xrs2*-Deletionsmutane wurde das Plasmidsystem zur Analyse der Reparatur enzymatisch-induzierter Mikrodeletionen in den Mutanten mit partieller *xrs2*-Deletion verwendet (Abbildung 29).

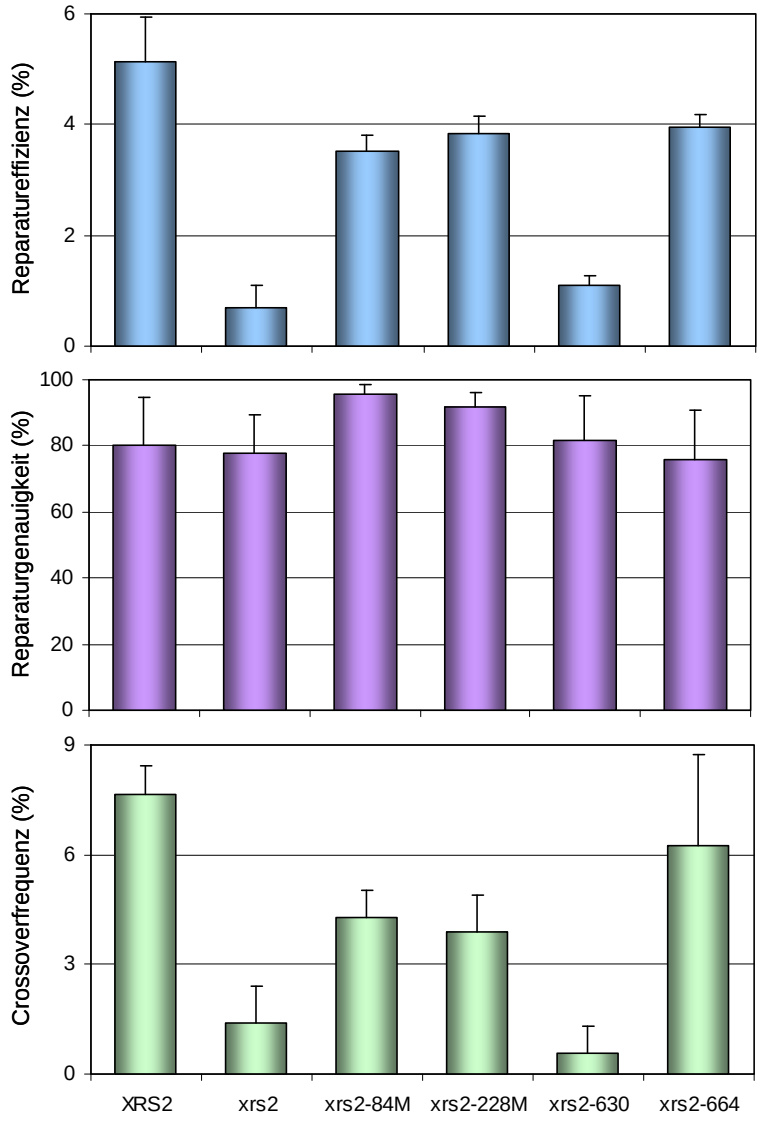

Abbildung 29: Effizienzen, Genauigkeiten und Crossoverfrequenzen der Reparatur von Mikrodeletionen in Mutanten mit verkürzten *XRS2*-Allelen

Die Analyse der Reparatur von Mikrodeletionen erfolgte mit Hilfe des Vektors pJD4His. Die beiden Selektionsmarker *TRP1* und *URA3* dienten der Bestimmung von Reparatureffizienz und -genauigkeit. Die Crossoverfrequenz wurde mittels der mitotischen Stabilität der Selektionsmarker bestimmt. Die Effizienz (oben) und die Crossoverfrequenz (unten) sind im Vergleich zum Kontrollstamm *XRS2* nur in der *xrs2-630*-Mutante ohne Mre11-Bindestelle so stark reduziert wie in der *xrs2*-Mutante. Dargestellt sind die Mittelwerte (mit Standardabweichung) von mindestens zwei unabhängigen Versuchen.

Die Reparatureffizienz wird nur durch die Deletion der Mre11-Bindestelle in der *xrs2-630*-Mutante so stark beeinträchtigt wie in der *xrs2*-Deletionsmutante. Die Deletion der

anderen Domänen hat nur einen geringen Einfluss auf die Reparatureffizienz. Hingegen ist die Reparaturgenauigkeit in keiner der analysierten Mutanten erniedrigt. Die Analyse der Crossoverfrequenz ließ eine leicht erniedrigte Crossoverfrequenz von 7 % im Kontrollstamm *XRS2* auf ungefähr 4 % in den Mutanten *xrs2-84M* und *xrs2-228M* erkennen, während die Crossoverfrequenz in der *xrs2-630*-Mutante eindeutig auf 0,5 % reduziert ist. Die Deletion der Tel1-Bindedomäne hat keinen Einfluss auf die Crossoverfrequenz.

Die Resultate der Analyse der Mutanten mit verkürzten *XRS2*-Allellen zeigen, dass nur die Deletion der Mre11-Bindestelle und somit die Bindung zwischen Mre11 und Xrs2 für die Funktion von Xrs2 in der Reparatur von DSB und Mikrodeletionen kritisch ist.

4.3.4 Epistasisanalysen von *XRS2* mit *SRS2* und *SGS1*

Aus den bisher gewonnenen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Proteine des MRX-Komplexes wichtig für die Ermöglichung von Crossover-Ereignissen sind. Die Crossoverfrequenz kann einerseits durch die Verschiebung des Gleichgewichts der verschiedenen HR-Wege, SDSA und DSBR, beeinflusst werden. Anderseits kann das Verhältnis von Crossover- zu Nichtcrossover-Ereignissen auch durch die Beeinflussung der dHJ-Auflösung im DSBR-Prozess verändert werden. In der Literatur wurden für diese beiden Prozesse bereits Proteine beschrieben. Die beiden DNA-Helikasen, Srs2 und Sgs1, sind zur Unterdrückung von Crossover-Ereignissen von großer Bedeutung (Ira et al., 2003; Lo et al., 2006) und bilden zusätzlich nach schadens-induzierter Aktivierung Proteinkomplexe mit Mre11 (Chiolo et al., 2005). Um den Mechanismus der durch Xrs2 vermittelten Crossover-Entstehung näher zu untersuchen, wurden Epistasisanalysen von *XRS2* zu *SRS2* und *SGS1* durchgeführt. Dazu wurden die Doppelmutanten *xrs2sgs1* und *xrs2srs2* konstruiert und deren Phänotypen mit denen der Einfachmutanten verglichen.

4.3.4.1 Analyse der Strahlenempfindlichkeit

Überlebensexperimente der Doppelmutanten (Abbildung 30) zeigten, dass die Deletion von *SGS1* und *SRS2* keine Strahlenempfindlichkeit verursacht. Der DRF bei 50 % Überleben in der *srs2*-Mutante liegt bei nur 1,2. Auch die zusätzliche Deletion dieser Gene im *xrs2*-Hintergrund erhöht die Sensitivität der *xrs2*-Deletionsmutante nicht. Beide Doppelmutanten weisen, wie die *xrs2*-Mutante, einen DRF von 2 auf.

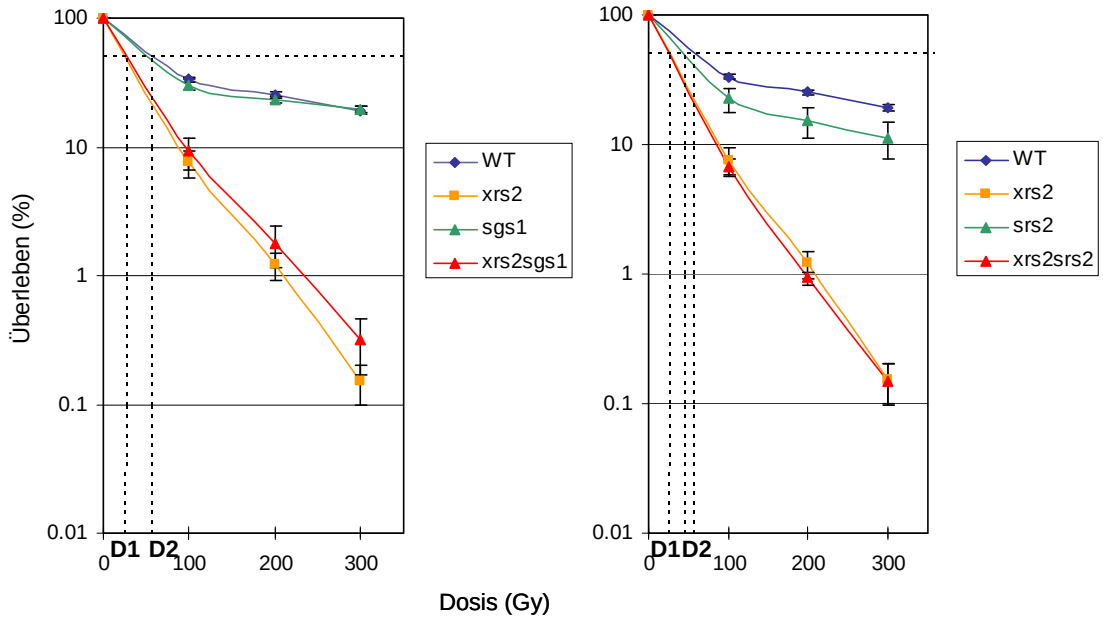

Abbildung 30: Strahlenempfindlichkeit der Mutanten für die Epistasisanalysen

Dargestellt ist das Überleben der Stämme *sgs1* und *xrs2sgs1* (links) sowie *srs2* und *xrs2srs2* (rechts) nach γ-Bestrahlung. In beiden Fällen ist die Sensitivität der *xrs2*-Mutante durch zusätzliche Deletion von *SGS1* bzw. *SRS2* nicht erhöht (DRF = 2). Die Mittelwerte (+/-Standardfehler) wurden aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten berechnet.

4.3.4.2 Analyse der Reparatur von Mikrodeletionen

Zur Bestimmung der Reparatureffizienz und des verwendeten Reparaturweges diente das Plasmid pJD4His.

Abbildung 31 fasst die Ergebnisse der Plasmidversuche zusammen. Während die Deletion von *SGS1* keinen Einfluss auf die Reparatureffizienz hat, ist die Effizienz in der *srs2*-Mutante reduziert (siehe auch 4.3.2.1 / Abbildung 26). Die niedrige Reparatureffizienz der *xrs2*-Mutante ist in den Doppelmutanten nicht weiter erniedrigt. Des Weiteren wird die Reparaturgenauigkeit weder von Xrs2, noch Srs2 und Sgs1 verändert. Die Analyse der mitotischen Stabilität korrekt reparierter Plasmide zeigt für die beiden Mutanten *sgs1* und *srs2*, wie erwartet, eine erhöhte Crossoverfrequenz. Die *sgs1*-Mutante weist eine Crossoverfrequenz von 11 %, die *srs2*-Mutante von 14 % auf, während im WT nur 7 % der HR-Ereignisse mit einem Crossover-Ereignis assoziiert sind. Diese 2-fache Erhöhung der Crossoverfrequenz in der *srs2*-Mutante konnte auch mit Hilfe eines chromosomalen Reparatursystems gemessen werden (Ira et al., 2003). In der *xrs2sgs1*-Doppelmutante wurde jedoch eine starke Reduzierung der Crossoverfrequenz auf 0,5 % beobachtet. Dieser Wert unterscheidet sich nicht signifikant von den 1,5 % Crossover-Ereignissen in der *xrs2*-Mutante ($p > 0,2$). Auch in der *xrs2srs2*-Mutante ist der Prozentsatz an Crossover-Ereignissen im Vergleich zur

srs2-Einfachmutante 4-fach reduziert. In nur 3,5 % der Fälle ist die korrekte Reparatur mit einem Crossover-Ereignis assoziiert.

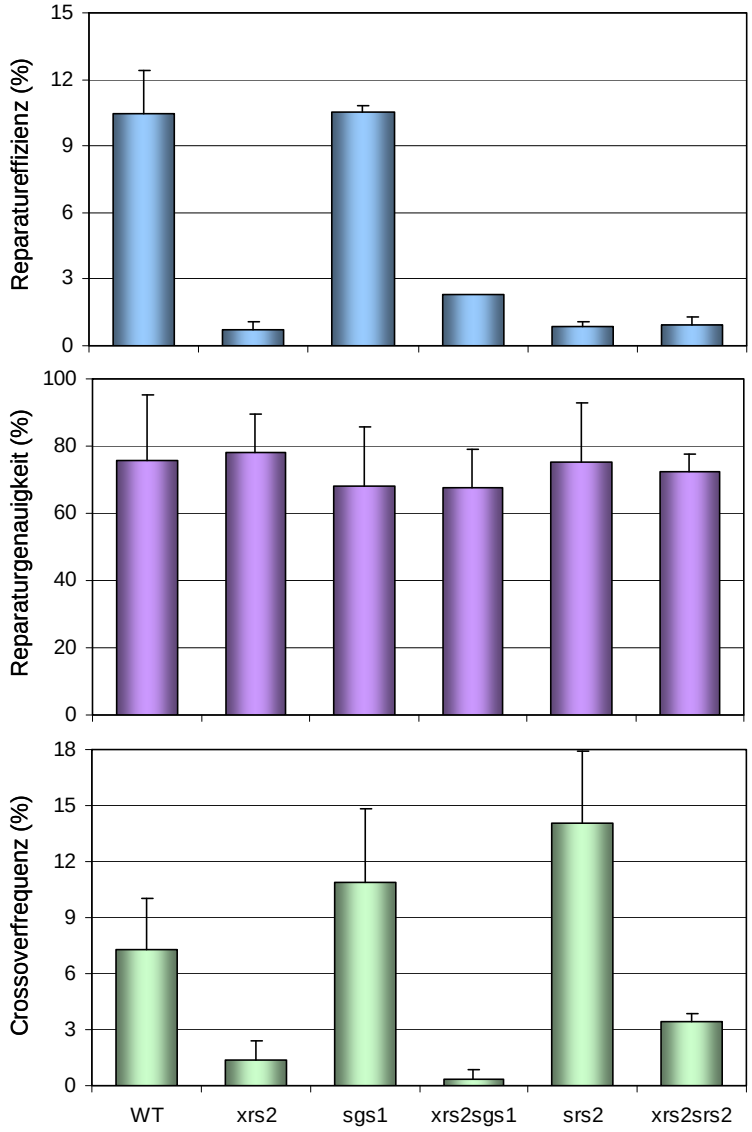

Abbildung 31: Analyse der Reparatur von Mikrodeletionen in den Mutanten für die Epistasisanalysen

Die Analyse der Reparatur von Mikrodeletionen erfolgte mit Hilfe des Vektors pJD4His. Die beiden Selektionsmarker *TRP1* und *URA3* dienten der Bestimmung von Reparatureffizienz und -genauigkeit. Die Crossoverfrequenz wurde mittels der mitotischen Stabilität der Selektionsmarker bestimmt. Die niedrige Reparatureffizienz (oben) der *xrs2*-Deletionsmutante ist in den Doppelmutanten nicht stärker erniedrigt. Die hohe Crossoverfrequenz (unten) der beiden Stämme *sgs1* und *srs2* ist nach Deletion von *XRS2* gesenkt. Die Mittelwerte (mit Standardabweichung) stammen aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen.

Diese Resultate zeigen, dass die regulatorische Rolle von Srs2 und Sgs1 auf die Crossoverfrequenz durch die Deletion von *XRS2* unterdrückt wird. Somit beeinflusst Xrs2 die Wahl des Reparaturweges *upstream* der beiden anderen Proteine.

4.4 Einfluss von Xrs2 auf die Basenexcisionsreparatur

Zusätzlich zu ihrer hohen Strahlenempfindlichkeit, weist die *xrs2*-Mutante auch eine sehr hohe Sensitivität gegenüber den Chemikalien MMS und H_2O_2 auf, die hauptsächlich Basenschäden induzieren (siehe Abbildung 18, oder auch (Chang et al., 2002; Mallory et al., 2003; Tucker und Fields, 2004; Letavayova et al., 2006)). Bisher wurde dieses geringe Überleben auf die Tatsache zurückgeführt, dass unreparierte Basenschäden oder BER-Intermediate während der Replikation in DSB umgewandelt werden. Zusätzlich können auch lokal gehäufte DNA-Läsionen und AP-Stellen zu DSB führen (Hendricks et al., 2002; Lundin et al., 2005; Letavayova et al., 2006). Somit wurde die Empfindlichkeit gegen MMS und H_2O_2 mit dem DSB-Reparaturdefekt der *xrs2*-Mutante erklärt. Im folgenden Teil sollte untersucht werden, ob die starke Empfindlichkeit der *xrs2*-Mutante gegenüber Agenzien, die Basenschäden induzieren, nicht auch mit einer Funktion des Proteins in der BER selbst in Zusammenhang gebracht werden könnte.

4.4.1 Bestimmung der Mutationsfrequenz und der MMS-Empfindlichkeit

Defekte in der BER führen zu einer erhöhten Mutationsfrequenz. Daher wurden zunächst die spontane sowie die MMS-induzierte Mutationsfrequenz der *xrs2*-Mutante im Vergleich zum Mutationsverhalten des WT untersucht. Für diese Untersuchungen wurden Hefezellen mit BY4741-Hintergrund verwendet, die das Wildtyp-Gen *CAN1* für die Expression einer Arginin-Permease tragen. Dadurch wird auch das Arginin-Analog Canavanin, eine toxische, nicht-proteinogene Aminosäure, in die Zelle aufgenommen. Durch Mutationen im *CAN1*-Gen erhalten die Zellen Resistenz gegen Canavanin.

In Abbildung 32 ist die spontane Mutationsfrequenz als Can^R-Mutanten pro 10^7 Zellen dargestellt. Für die MMS-induzierte Mutationsfrequenz wurden die spontanen Mutanten abgezogen und die induzierten Can^R-Mutanten pro 10^7 Überlebende angegeben (siehe 3.2.8). Die *xrs2*-Mutante weist spontan eine 10-fach erhöhte Mutationsfrequenz auf. Während im WT eine Mutationsfrequenz von 17 Mutanten pro 10^7 Zellen gemessen wurde, kommt es in der *xrs2*-Mutante in 170 pro 10^7 Zellen zu einer Mutation im *CAN1*-Gen. Des Weiteren besitzt die *xrs2*-Mutante eine erhöhte Mutationsfrequenz nach MMS-Behandlung. Durch Inkubation für 30 min in 0,1 % MMS konnten 450 Can^R-Mutanten pro 10^7 Überlebende gemessen werden, während in WT-Zellen durch die gleiche Behandlung nur 170 Canavanin-resistente Mutanten induziert wurden.

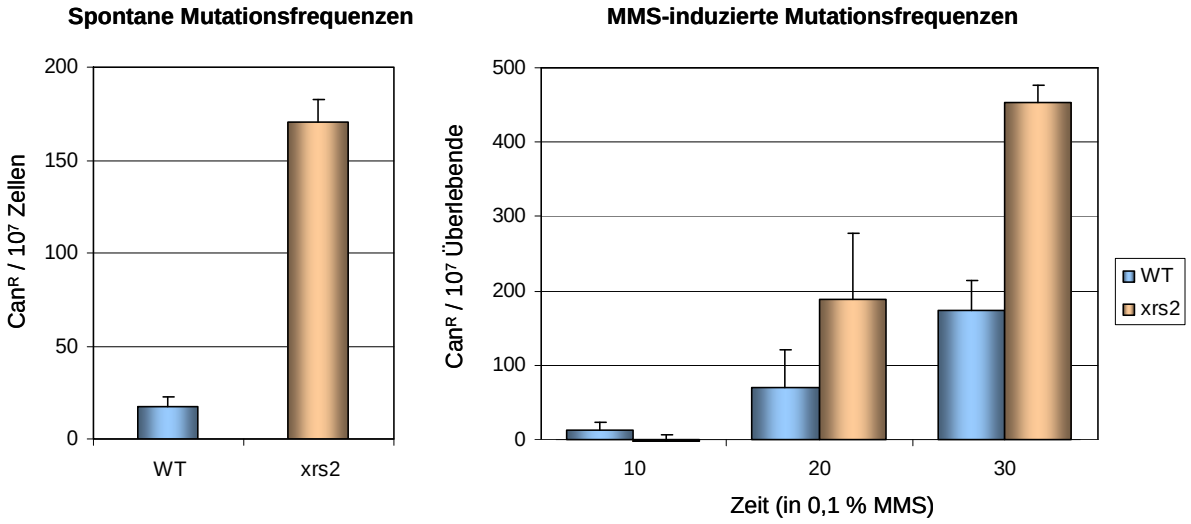

Abbildung 32: Spontane und MMS-induzierte Mutationsfrequenzen im WT und in der *xrs2*-Mutante

Zur Bestimmung der spontanen Mutationsfrequenz (links) wurden BY4741-Zellen auf Canavanin-haltigem SC-Medium ausplattiert. Im Diagramm sind die erhaltenen Can^R-Kolonien pro 10^7 Zellen angegeben. Für die chemisch-induzierte Mutagenese (rechts) wurden die Zellen für 0, 10, 20 und 30 min mit 0,1 % MMS behandelt. Die induzierte Mutationsfrequenz ist als Can^R-Mutanten pro 10^7 Überlebende angegeben, wobei die spontanen Mutanten abgezogen wurden. Die Mittelwerte (mit Standardabweichung) wurden aus drei (spontan) bzw. zwei (induziert) unabhängigen Versuchen ermittelt.

Xrs2 spielt somit eine wesentliche Rolle in der Vermeidung von Mutationen. Es lässt sich jedoch zunächst keine Aussage über den dafür verantwortlichen Reparaturweg machen. Auch nach Deletion von *RAD52*, dem Schlüsselfaktor der HR, weisen Hefezellen eine erhöhte spontane Mutationsfrequenz auf (Alseth et al., 1999; Huang et al., 2003). Daher wurden im Folgenden die Sensitivitäten der MKP0-Mutanten *xrs2* und *rad52* gegenüber MMS näher untersucht. Um den Einfluss der HR, die als *Backup*-Weg für die BER gilt, zu verringern, wurden die Empfindlichkeiten der Zellen nicht nur in der logarithmischen Wachstumsphase, sondern auch in der stationären Wachstumsphase analysiert (Abbildung 33). In dieser Phase, in der keine Replikation stattfinden kann, sollten unreparierte Basenschäden und Intermediate der BER nicht mehr in DSB umgewandelt werden.

In der logarithmischen Wachstumsphase weisen die *xrs2*-Mutante sowie die HR-defiziente *rad52*-Mutante eine hohe Sensitivität gegenüber MMS auf. Für beide Stämme konnte ein DRF von 14 bestimmt werden. Nach einer Inkubation für 45 min in 0,2 % MMS können nur 0,002 % der Zellen überleben, während WT-Zellen eine Überlebensrate von 35 % aufweisen. In der stationären Wachstumsphase sollte der Einfluss der HR vermindert sein. Erst nach der Behandlung und dem Ausplattieren gehen die Zellen wieder in die Replikation. Da dadurch ein essentieller Reparaturweg

abgeschwächt wird, sinkt das Überleben des WT, so dass nach 45 min Behandlung mit 0,02 % MMS nur noch 7 % der Zellen Kolonien bilden können. In der *rad52*-Mutante, die keine HR durchführen kann, steigt das Überleben in der stationären Wachstumsphase im Vergleich zur logarithmischen Wachstumsphase an (0,01 %, DRF = 4). Da jedoch beim Ausplattieren der Zellen noch nicht alle Basenschäden über die BER repariert wurden, liegt das Überleben noch unter dem des WT. Die Empfindlichkeit der *xrs2*-Mutante jedoch bleibt unverändert (DRF = 6,5) und ist somit unabhängig von der Wachstumsphase. Dies lässt neben der Rolle von Xrs2 in der HR eine zusätzliche direkte Funktion in einem Mechanismus zur Reparatur von Basenschäden vermuten.

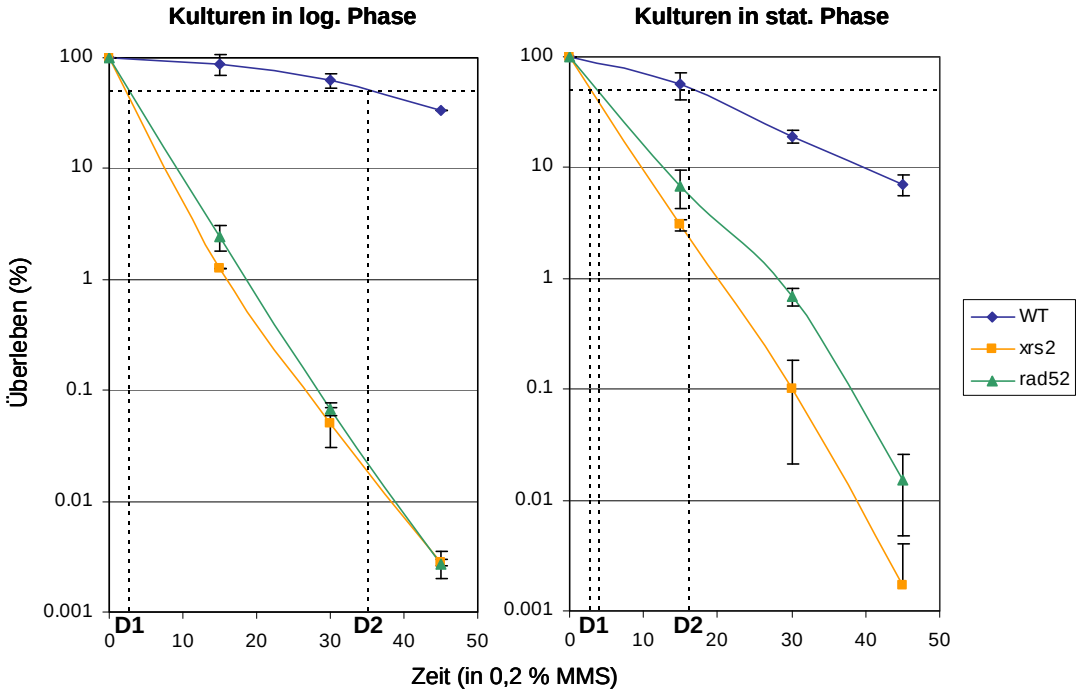

Abbildung 33: Empfindlichkeit von Zellen in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase gegenüber MMS

Dargestellt ist die Sensitivität der *xrs2*-Mutanten gegenüber MMS-Behandlung im Vergleich zur *rad52*-Mutante in der logarithmischen (links) sowie in der stationären (rechts) Wachstumsphase. Das Überleben wurde aus dem Verhältnis der Zahl der Kolonien nach der Behandlung zu der Zahl der Kolonien ohne Behandlung bestimmt. Während die *rad52*-Mutante in der logarithmischen Wachstumsphase eine höhere Empfindlichkeit aufweist als in der stationären Phase, ist die Sensitivität der *xrs2*-Mutante unabhängig von der Wachstumsphase. Für die Überlebenskurven ist der Mittelwert (+/-Standardfehler) aus drei (logarithmische Wachstumsphase) bzw. zwei (stationäre Wachstumsphase) unabhängigen Experimenten dargestellt.

4.4.2 Analyse der Reparatur von hitze-labilen Stellen

MMS wurde lange Zeit als radiomimetisches Agenz verwendet, das DSB induziert (Wyatt und Pittman, 2006). Neuere Studien konnten zeigen, dass in stationären Kulturen die meisten MMS geschädigten Stellen erst durch die Behandlung der Proben bei erhöhten

Temperaturen, die für den Aufschluss von Hefezellen z. B. für die gelelektrophoretische Auftrennung der Chromosomen nötig ist, in DSB umgewandelt werden (Lundin et al., 2005; Ma et al., 2008). MMS induziert somit hitze-labile Stellen, die vermutlich lokal gehäufte Basenschäden darstellen. Um dies zu überprüfen, wurden WT-Zellen mit MKP0-Hintergrund in der stationären Wachstumsphase für 0, 15 und 30 min mit 0,1 % MMS behandelt. Während der anschließenden Präparation der Proben wurde die genomische DNA durch Inkubation mit Proteinase K bei 32 °C sowie bei 55 °C freigesetzt. Mit Hilfe von PFGE wurde die chromosomale DNA aufgetrennt.

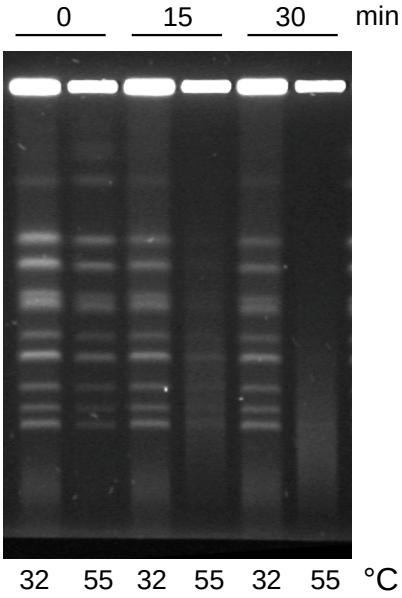

Abbildung 34: Detektion hitze-labiler Stellen nach MMS-Behandlung als sekundäre DSB

WT-Zellen in der stationären Wachstumsphase wurden für 0, 15 und 30 min mit 0,1 % MMS behandelt und anschließend in Agarose eingebettet. Zur Freisetzung chromosomaler DNA wurden die Zellen für 18 h bei 32 °C bzw. 55 °C mit Proteinase K versetzt. Mittels PFGE wurden die Chromosomen aufgetrennt. Nach Inkubation bei 32 °C ist keine Degradierung detektierbar. Durch die Inkubation bei 55 °C hingegen werden MMS-induzierte hitze-labile Stellen in DSB konvertiert. Diese zeigen sich im Gel durch eine Verringerung der Bandenintensität und das Auftreten kleinerer DNA-Fragmente („Schmier“).

Aus Abbildung 34 wird ersichtlich, dass die chromosomale DNA aus den unbehandelten Zellen keine Unterschiede aufweist. Die bei 32 °C und bei 55 °C inkubierten Proben zeigen das gleiche Verhältnis von Bandenintensität und Hintergrund. Nach MMS-Behandlung können bei den 55 °C-Proben intensive Degradierungen beobachtet werden. Nach 15 min Inkubation mit 0,1 % MMS sind neben einem Schmier nur noch leichte Chromosomenbanden erkennbar, nach 30-minütiger Inkubation mit der Chemikalie können nur noch kleine DNA-Fragmente detektiert werden. MMS produziert somit hitze-labile Stellen, die bei der DNA-Präparation durch Inkubation bei 55 °C in

sekundäre DSB umgewandelt werden. Auf diese Weise kann der Gehalt an hitze-labilen Stellen durch die Quantifizierung der DNA-Fragmentierung bestimmt werden.

Mit dieser Methode wurde die Reparatur von hitze-labilen Stellen in WT- und *xrs2*-Zellen im Folgenden analysiert. Die Zellen wurden für 0, 10, 20, 40 und 60 min mit 0,1 % MMS behandelt. Wie für die Analyse der Reparatur chromosomaler DSB nach γ-Bestrahlung (4.3.1.2) wurden die Zellen anschließend für 23 h bei 30 °C unter Nichtwuchs-Bedingungen inkubiert, die Reparaturprozesse wurden durch Zugabe von EDTA gestoppt, die Zellen in Agarose eingebettet und durch Inkubation bei 55 °C mit Proteinase K aufgeschlossen. Die Chromosomen wurden mit Hilfe von PFGE aufgetrennt.

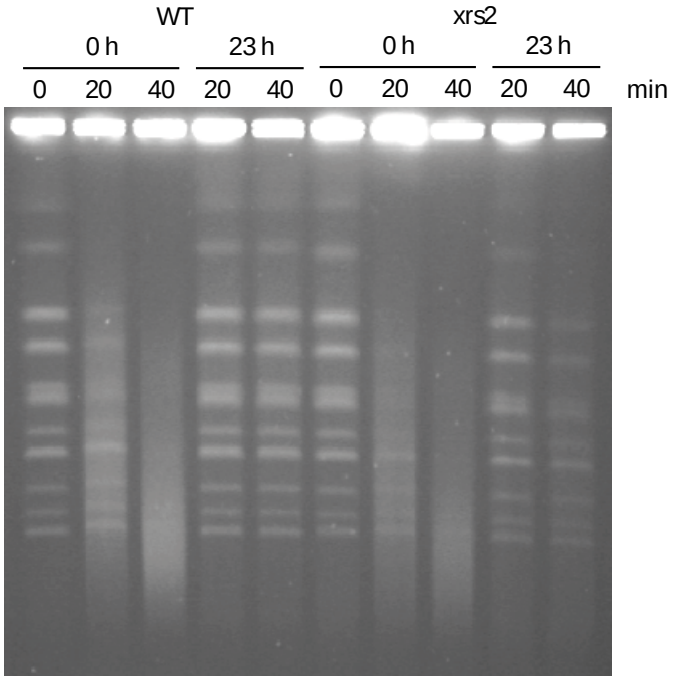

Abbildung 35: Chromosomale DNA der Stämme WT und *xrs2* nach Behandlung mit 0,1 % MMS und DNA-Präparation bei 55 °C

WT- und *xrs2*-Zellen in der stationären Wachstumsphase wurden für 0, 20 und 40 min mit 0,1 % MMS behandelt, für 0 h bzw. 23 h in LHR-Puffer inkubiert und anschließend in Agarose eingebettet. Zur Freisetzung chromosomaler DNA wurden die Zellen für 18 h bei 55 °C mit Proteinase K versetzt, wodurch hitze-labile Stellen der DNA in DSB konvertiert werden. Diese können mittels PFGE-Analyse der chromosomalen DNA detektiert werden. Dargestellt ist ein exemplarisches Gelphoto. Nach einer Reparaturzeit von 23 h weist die *xrs2*-Mutante im Vergleich zum WT einen höheren Gehalt an Restschäden auf.

Abbildung 35 zeigt ein exemplarisches Gel für die Auftrennung der genomischen DNA aus WT- und *xrs2*-Proben. Direkt nach der Behandlung steigt die DNA-Fragmentierung mit der Länge der MMS-Behandlung in beiden Stämmen an. Nach 23 h Reparaturzeit in LHR-Puffer weisen die Proben des WT wieder klare Chromosomenbanden auf. Dies zeigt, dass hitze-labile Stellen unter LHR-Bedingungen in WT-Zellen effizient repariert

werden können. Die *xrs2*-Mutante hingegen weist nach der Inkubation in LHR-Puffer einen höheren Restschaden auf als der WT. Die chromosomale Degradierung der 23 h-Proben wurde mit Hilfe der Software *Geltool* ausgewertet (Steininger et al., 2008) und die Degradierungswerte (pv, siehe 3.2.5.4) gegen die MMS-Konzentration aufgetragen (Abbildung 36).

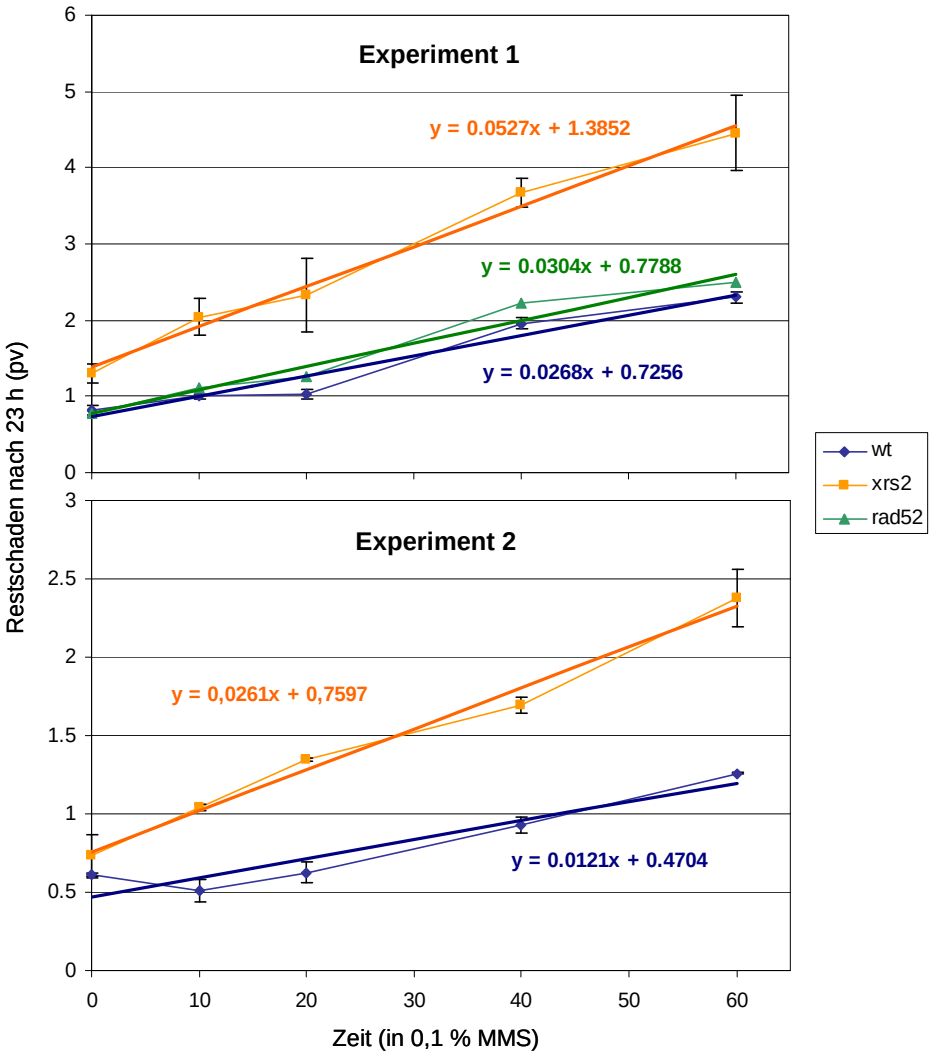

Abbildung 36: Konzentrationsabhängiger Restschaden nach 23 h Inkubation in LHR-Puffer

Mit Hilfe der Programme *Quantity One*® und *Geltool* wurden die chromosomalen Degradierungen der 23 h-Proben bestimmt. Dargestellt ist der Restschaden als *profile value* (pv) aufgetragen gegen die MMS-Konzentration. Für die Trendlinien sind die Gleichungen angegeben. In beiden durchgeführten Versuchen weist die *xrs2*-Mutante nicht nur nach MMS-Behandlung, sondern auch in den unbehandelten Proben mehr Degradierung auf als der WT. Die *rad52*-Mutante hingegen repariert hitze-labile Stellen annähernd so gut wie der WT. Die Mittelwerte (+/- Standardabweichung) wurden aus einer 6-fachen *Geltool*-Auswertung ermittelt.

Die Analyse des Restschadens nach Induktion hitze-labiler Schäden zeigt, dass die *xrs2*-Mutante im Gegensatz zum WT ohne Behandlung bereits eine leichte Degradierung der DNA aufweist. Diese spontan erhöhte Zahl an hitze-labilen Stellen steht in Einklang mit

der erhöhten spontanen Mutationsfrequenz der *xrs2*-Mutante. Durch Behandlung mit MMS steigt im WT der Restschaden konzentrationsabhängig nur leicht an (Steigung der Trendlinie = 0,0268), während in der *xrs2*-Deletionsmutante mehr Schäden unrepariert bleiben (Steigung der Trendlinie = 0,0527). Auch im Wiederholungsexperiment ist die Steigung der Trendlinie für die *xrs2*-Mutante (0,0261) doppelt so hoch wie für den WT (0,0121). Die HR-defiziente *rad52*-Mutante, die zur Kontrolle mitgeführt wurde, zeigt eine annähernd so gute Reparatur der hitze-labilen Stellen wie der WT, was bereits publizierten Daten entspricht, die ebenfalls zeigen, dass *rad52*-Mutanten nach Behandlung mit MMS keine sekundären DSB akkumulieren (Lundin et al., 2005).

4.4.3 Analyse der Basenexcisionsreparatur *in vitro*

Da hitze-labile Stellen in der stationären Wachstumsphase hauptsächlich über BER repariert werden (Lundin et al., 2005; Ma et al., 2008), sollte dieser Reparaturweg im WT und in der *xrs2*-Mutante näher untersucht werden. Dazu wurde ein für Säugerzellen publizierter *in vitro-Assay* (Harrigan et al., 2006) auf Hefezellen adaptiert (Abbildung 37).

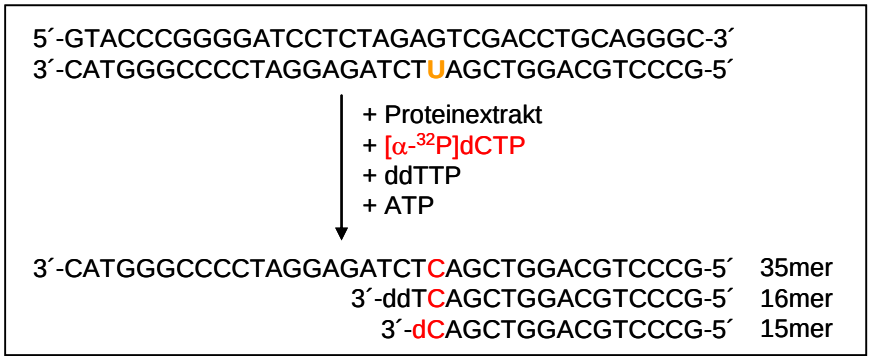

Abbildung 37: Reaktionsschema des *in vitro*-BER-*Assays*

Durch Zugabe von Proteinextrakt, [α-^{32}P]dCTP, ddTTP und ATP aus dem 5 x BER-Puffer zu dem Uracil-haltigen Substrat entstehen drei Reparaturprodukte:
35mer = *short patch*-Produkt
16mer = *long patch*-Produkt
15mer = Intermediat
Dargestellt ist nur das Reaktionsschema für die Reparatur des Uracil-haltigen Substrats. Für die Reparatur des 8-oxoG-haltigen Substrats wird radioaktiv markiertes [α-^{32}P]dGTP verwendet.

Proteinextrakte aus den einzelnen Stämmen wurden mit dsDNA-Oligonukleotiden einer Länge von 35 bp, die an Position 15 ein Uracil bzw. ein 8-oxoG aufweisen, versetzt. BER-Proteine im Zellextrakt können die geschädigte Base erkennen, ausschneiden und durch ein radioaktiv markiertes Nukleotid ([α-^{32}P]dCTP bzw. [α-^{32}P]dGTP) ersetzten. Dadurch entsteht ein 15 nt langes Intermediat. Durch die Ligation der ausgetauschten Base mit dem Zucker-Phosphatrückgrat wird im *short patch*-Weg der BER ein Produkt

mit einer Länge von 35 nt erzeugt. Im *long patch*-Weg werden mehrere Nukleotide im Matrizenstrang ausgetauscht. Durch die Zugabe von ddTTP wird die Verlängerung des reparierten Einzelstranges gestoppt, wodurch ein Produkt mit einer Länge von 16 nt entsteht.

Die Inkubation der Oligonukleotide mit Proteinextrakten erfolgte für 0, 2, 5, 10, 15 und 20 min. Über ein 24 %iges denaturierendes PAA-Gel wurden die Produkte anschließend aufgetrennt und durch Exposition eines Röntgenfilms sichtbar gemacht. Wenn anstelle des Uracil- bzw. 8-oxoG-haltigen Substrats ein fehlerfreies Oligonukleotid eingesetzt wird, kann kein Einbau von markierten Nukleotiden beobachtet werden (persönliche Mitteilung S. Mörtl).

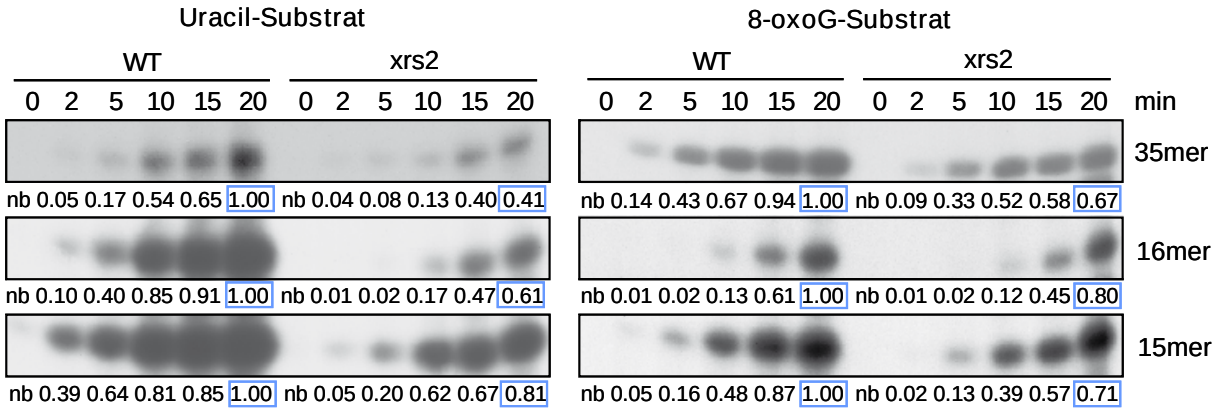

Abbildung 38: *In vitro*-Analyse der Basenexcisionsreparatur von Oligonukleotiden mit Uracil und 8-oxoG

35 bp lange dsDNA Oligonukleotide, die an Position 15 ein Uracil (links) bzw. 8-oxoG (rechts) beinhalten, wurden mit WT- und *xrs2*-Exrakten für die angegebenen Zeitwerte inkubiert. Während des BER-Prozesses wird die geschädigte Base erkannt, ausgeschnitten und durch ein radioaktives [α-^{32}P]dCTP bzw. [α-^{32}P]dGTP ersetzt. Durch die Zugabe von ddTTP können die unterschiedlichen Wege der BER im PAA-Gel unterschieden werden (35mer = *short patch*-Produkt, 16mer = *long patch*-Produkt, 15mer = Intermediat). Nach Autoradiographie wurden die Intensitäten der Banden mit Hilfe der Software *TotalLab TL100* quantifiziert. Die Menge an jeweiligem Produkt nach 20 min Inkubation mit WT-Extrakt wurde auf 1 normiert. Die *xrs2*-Mutante zeigt sowohl im *short patch*- als auch im *long patch*-Weg eine erniedrigte Reparatureffizienz. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment (nb = nicht bestimmt).

Abbildung 38 zeigt je ein repräsentatives Experiment für die Reparatur des Uracil- bzw. 8-oxoG-haltigen Oligonukleotids. Da in Hefezellen vor allem *long patch*-Reparatur verwendet wird (Boiteux und Guillet, 2004), mussten die Filme zur Detektion des *short patch*-Produktes länger belichtet werden. Mit Hilfe der Software *TotalLab TL100* wurden die Produkte quantifiziert. Die jeweilige Produktmenge, die durch Inkubation für 20 min mit WT-Extrakt entsteht, wurde auf 1 gesetzt. Unabhängig vom Schaden (Uracil oder 8-oxoG) weist die *xrs2*-Mutante eine erniedrigte BER-Effizienz auf. Dieser Defekt zeigt sich bereits bei der Produktion des Intermediats. Des Weiteren sind beide Wege

der BER, *short patch*-Reparatur und *long patch*-Reparatur, betroffen. Für alle drei Produkte liegt der Prozentsatz nach Inkubation für 20 min im *xrs2*-Extrakt zwischen 40 % und 80 % im Vergleich zum WT (vergleiche die blau markierten 20 min-Werte).

Für die Reparatur des Uracil-haltigen Substrates wurden drei verschiedene WT- und *xrs2*-Extrakte in unabhängigen Versuchen getestet. In Abbildung 39 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Die *xrs2*-Mutante bildet nach 20 min im Vergleich zum WT durchschnittlich 64 % *short patch*- und *long patch*-Produkt und 77 % Intermediat.

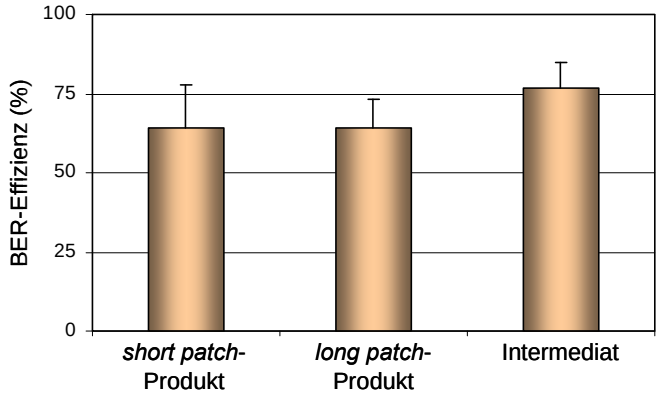

Abbildung 39: BER-Effizienz der *xrs2*-Mutante im Vergleich zum WT

Die BER-Effizienz des Uracil-haltigen Oligonukleotids der *xrs2*-Mutante ist nach 20 min Reparaturzeit relativ zum WT angegeben. Die BER-Effizienz für *short patch*- und *long patch*-Produkt liegt bei 64 %. Die Intermediatmenge erreichte 77 %. Die Mittelwerte (mit Standardabweichung) wurden aus drei unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Proteinextrakten ermittelt.

Zur weiteren Abgrenzung der Funktionen des Xrs2-Proteins zu denen von Rad52 wurden die BER-Kapazitäten von WT, *xrs2*- und *rad52*-Mutante verglichen. Dabei wurden die Reparatureffizienzen mit Hilfe des Uracil-haltigen Oligonukleotids nach 5, 10, 15 und 20 min analysiert. Aus Abbildung 40 wird ersichtlich, dass Rad52 im Gegensatz zu Xrs2, wenn überhaupt, nur einen marginalen Einfluss auf die BER hat (vergleiche die blau markierten 20 min-Werte).

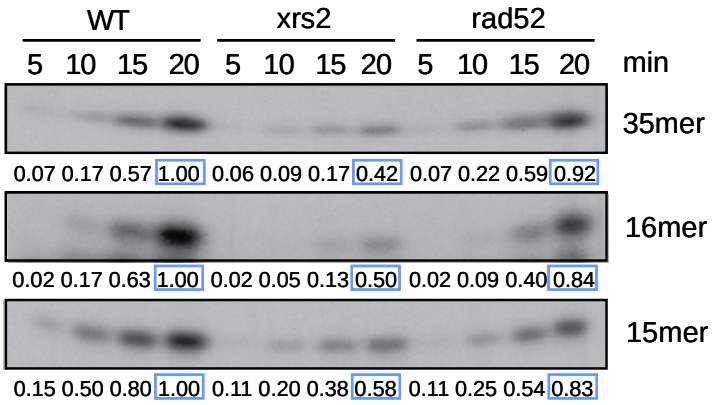

Abbildung 40: Vergleich der BER-Kapazitäten nach Deletion von *XRS2* und *RAD52*

Zum Vergleich der *in vitro*-BER-Effizienz von *xrs2*- und *rad52*-Mutanten wurden die Proteinextrakte dieser Stämme sowie des WT für 5, 10, 15 und 20 min mit dem Uracil-haltigen Oligonukleotid versetzt. Die Produkte wurden mittels 24 %iger PAA-Gele aufgetrennt. Die Menge an jeweiligem Produkt nach 20 min Inkubation mit WT-Extrakt wurde auf 1 normiert. Die *rad52*-Mutante zeigt im Gegensatz zur *xrs2*-Mutante keine starke Beeinträchtigung der BER.

4.4.4 Untersuchungen zur Rolle des MRX-Komplexes in der Basen-excisionsreparatur

Bei den bisher in dieser Arbeit beschriebenen Funktionen von Xrs2 in der DSB-Reparatur konnte gezeigt werden, dass der gesamte MRX-Komplex für deren Ausübung notwendig ist. Analysen der Mutanten mit verkürzten *XRS2*-Allelen identifizierten die Mre11-Bindestelle von Xrs2 als die essentielle Domäne für die neuen DSB-Reparaturfunktionen. Deshalb sollte auch für die neu entdeckte Rolle von Xrs2 in der BER überprüft werden, ob es sich wiederum um eine Funktion des Komplexes handelt oder ob Xrs2 ohne Mre11 und Rad50 aktiv ist. Mit Hilfe der beiden Mutanten *xrs2-228M* und *xrs2-630* sollte untersucht werden, ob die N-terminale oder C-terminale Domäne von Xrs2 eine Rolle für die BER spielt.

4.4.4.1 Bestimmung der MMS-Empfindlichkeit

Um zunächst zu testen, welche Faktoren einen Einfluss auf das Überleben nach Induktion von Basenschäden besitzt, wurden die Mutanten *rad50*, *mre11*, *xrs2-228M* und *xrs2-630* im Vergleich zur *xrs2*-Deletionsmutante und dem WT als Kontrolle auf ihre MMS-Sensitivität hin untersucht. Dazu wurden Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase seriell verdünnt und auf MMS-haltige Platten aufgetropft.

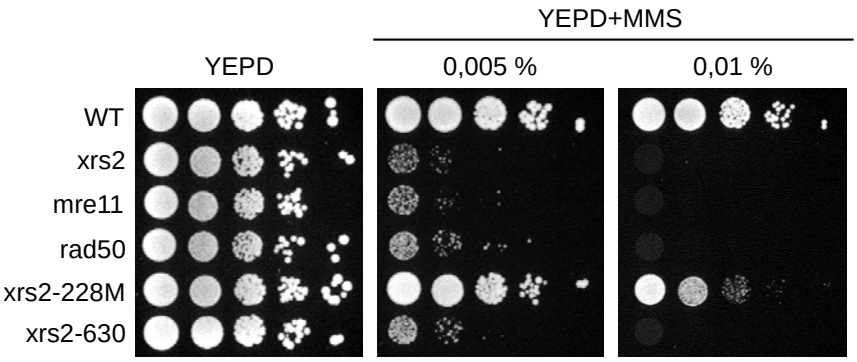

Abbildung 41: Empfindlichkeit der MRX-Mutanten gegen MMS

Zum Vergleich der MMS-Sensitivität verschiedener Stämme wurden Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase seriell von 1 x 10^7 bis 1 x 10^3 Zellen/ml verdünnt und auf YEPD-Platten, versetzt mit 0,001 % und 0,005 % MMS, aufgetropft. Die Stämme *mre11*, *rad50* und *xrs2-630* weisen die hohe Sensitivität der *xrs2*-Mutante auf und können bei 0,005 % MMS nur noch in den Verdünnungen 10^7 und 10^6 Kolonien bilden. Die *xrs2-228M*-Mutante ist nur ein wenig empfindlicher als der WT.

Abbildung 41 zeigt für alle Mutanten mit Ausnahme der *xrs2-228*-Mutante mit der N-terminalen Verkürzung die gleiche Empfindlichkeit gegenüber MMS auf. Bei einer Konzentration von 0,005 % MMS können in der Verdünnung mit 1 x 10^5 Zellen/ml nur noch sehr wenige Kolonien wachsen, während bei 0,01 % MMS kein Wachstum mehr nachgewiesen werden konnte. Die *xrs2-228M*-Mutante weist nur eine leichte Sensitivität bei 0,01 % MMS auf. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen anderer Gruppen überein, die zeigen konnten, dass der Verlust der Mre11-Bindestelle für die hohe MMS-Empfindlichkeit der *xrs2*-Mutante verantwortlich ist und dass N-terminale Domänen keinen Einfluss auf die MMS-Sensitivität haben (Tsukamoto et al., 2005).

4.4.4.2 Analyse der Basenexcisionsreparatur *in vitro*

Neben der MMS-Empfindlichkeit sollte des Weiteren die *in vitro*-BER-Kapazität der MRX-Deletionsmutanten und der *xrs2-630*-Mutante mit Hilfe des Uracil-haltigen Oligonukleotids untersucht werden. Dazu wurden Proteinextrakte der Mutanten *xrs2*, *mre11*, *rad50*, *xrs2-228M* und *xrs2-630* sowie der Kontrollstämme WT und *XRS2*, die den kompletten *XRS2*-ORF im *leu2-3-112*-Lokus der *xrs2*-Deletionsmutante trägt (3.1.5.1), für jeweils 5, 10 und 15 min mit Oligonukleotid versetzt. Die Produkte wurden über ein PAA-Gel aufgetrennt und über Autoradiographie sichtbar gemacht. Die durch Inkubation des WT-Extrakts für 15 min entstandene Produktmenge wurde auf 1 gesetzt.

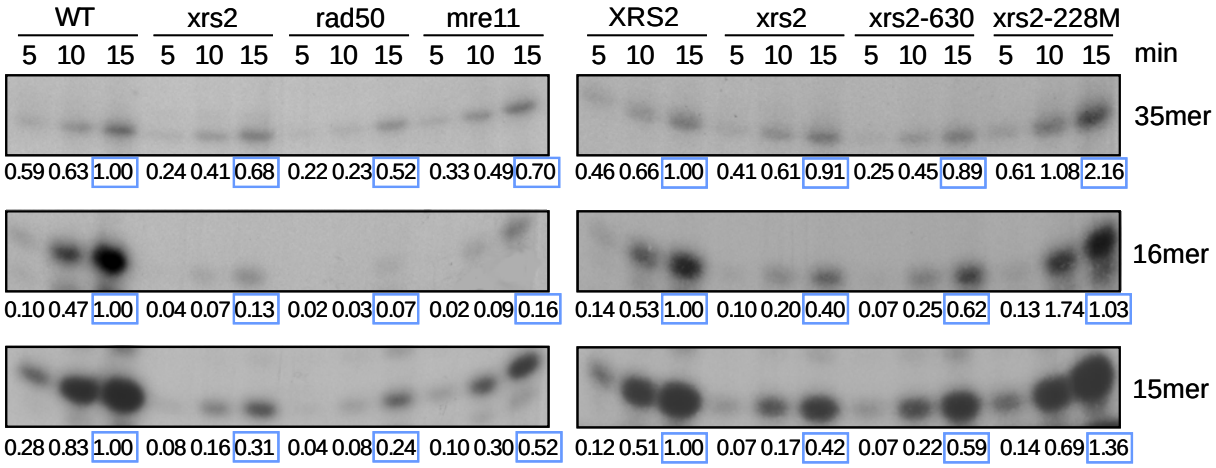

Abbildung 42: *In vitro*-BER-Analysen der MRX-Mutanten

Zur näheren Analyse der Rolle des MRX-Komplexes in der BER wurde die *in vitro*-Reparatur des Uracil-haltigen Oligonukleotids in den Stämmen *rad50* und *mre11* (links), *xrs2-228M* und *xrs2-630* (rechts) im Vergleich zu *xrs2* und WT bzw. *XRS2* untersucht. Die Produkte wurden durch 24 %ige PAA-Gele aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Menge an jeweiligem Produkt wurde auf die Menge normiert, die der WT-Extrakt in 15 min Reparaturzeit produziert. Alle Mutanten außer der *xrs2-228M*-Mutante zeigen wie die *xrs2*-Deletionsmutante im Vergleich zum WT bzw. zu *XRS2*-Zellen eine erniedrigte Reparatureffizienz.

Aus Abbildung 42 wird ersichtlich, dass die Stämme *rad50* und *mre11* sowie *xrs2-630* die niedrige BER-Effizienz der *xrs2*-Mutante aufweisen (vergleiche die blau markierten 15 min-Werte). Wiederum sind beide Wege, der *short patch*- und der *long patch*-Weg, betroffen. Nur die *xrs2-228M*-Mutante kann wie die *XRS2*-Kontrolle ein ausreichendes Maß an Produkten erzeugen. Daraus kann geschlossen werden, dass der gesamte MRX-Komplex an der BER beteiligt ist und dass speziell die Mre11-Bindestelle des Xrs2-Proteins notwendig ist, um die anderen Komponenten des Komplexes zu rekrutieren. Die N-terminalen Domänen FHA und BRCT spielen keine Rolle für die BER.

4.4.5 Epistasisanalysen von *XRS2* mit unterschiedlichen BER-Genen

Um die Funktion des MRX-Komplexes dem AP-Endonuklease- oder AP-Lyase-Weg zuordnen zu können, wurden Epistasisanalysen von *XRS2* zu anderen BER-Genen durchgeführt. Einerseits wurde *XRS2* im *apn1*-Hintergrund deletiert. Dadurch wird der Hauptweg der BER in Hefe über die AP-Endonuklease gestört. Der AP-Lyase-Weg bleibt unbeeinflusst, da hier Apn2 als effiziente 3´-Phosphodiesterase arbeiten kann (Boiteux und Guillet, 2004). Andererseits wurde *XRS2* in der AP-Lyase-defizienten Mutante *ntg1ntg2* deletiert. Zusätzlich sollte auch der Einfluss einer *XRS2*-Deletion im *apn1ntg1ntg2*-Hintergrund untersucht werden.

4.4.5.1 Bestimmung der MMS-Empfindlichkeit

Zunächst wurde die MMS-Sensitivität dieser Mutanten im Vergleich zum WT und zur *xrs2*-Mutante getestet. Zusätzlich wurden die neuen Mutanten mit einer *apn1*-Einfachmutante, einer *ntg1ntg2*-Doppelmutante sowie einer *apn1ntg1ntg2*-Dreifachmutante verglichen (Abbildung 43).

Die AP-Endonuklease-defiziente Mutante *apn1* weist nur eine leichte MMS-Empfindlichkeit auf, so dass nur bei der höchsten MMS-Konzentration von 0,02 % ein verringertes Überleben zu erkennen ist. Durch die Deletion der Gene *NTG1* und *NTG2* wird das Überleben kaum beeinträchtigt. Die *apn1ntg1ntg2*-Dreifachmutante weist eine höhere Sensitivität als die *apn1*-Mutante auf, da neben dem Hauptweg über die AP-Endonukleasen auch der Reparaturweg über die AP-Lyasen gestört ist. In der *xrs2*-Mutante können bereits bei der niedrigsten Konzentration von 0,001 % MMS nicht mehr alle Zellen Kolonien bilden, da neben der BER auch der *Backup*-Weg über HR gestört ist. Durch zusätzlich Deletion von *APN1* im *xrs2*-Hintergrund wird die MMS-Sensitivität nochmals erhöht, so dass bei 0,0025 % MMS kaum Zellen überleben können. Nach Deletion von *XRS2* in den Stämmen *ntg1ntg2* und *apn1ntg1ntg2* ist jedoch die MMS-Empfindlichkeit der *xrs2*-Mutante aufgehoben (supprimiert).

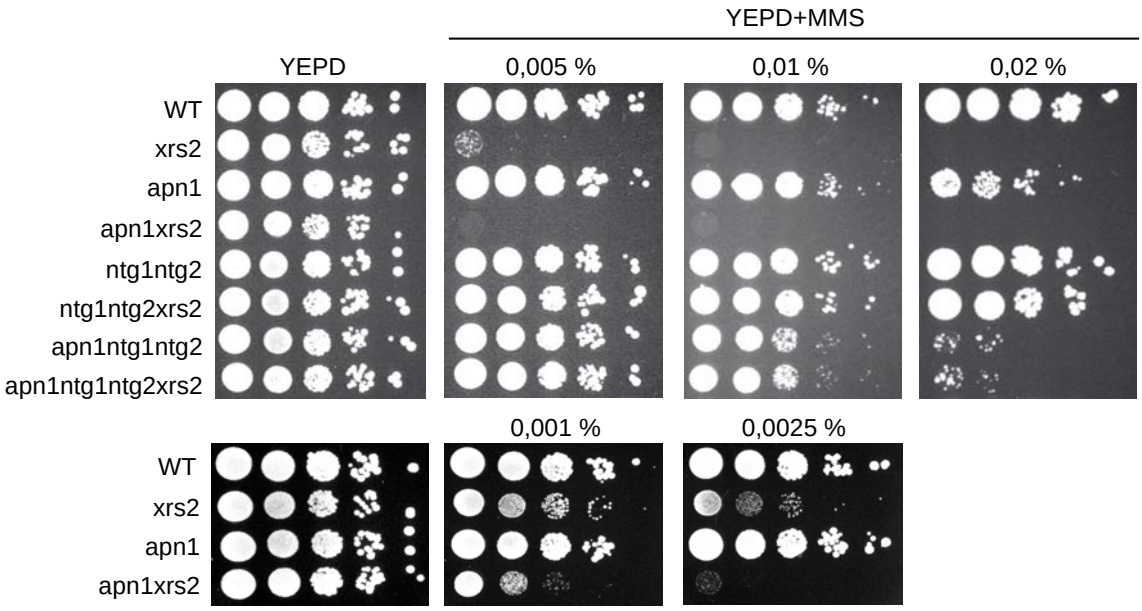

Abbildung 43: Empfindlichkeit der Mutanten für die Epistasisanalysen gegen MMS

Zum Vergleich der MMS-Sensitivität verschiedener Stämme wurden Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase seriell von 1 x 10^7 bis 1 x 10^3 Zellen/ml verdünnt und auf YEPD-Platten, versetzt mit unterschiedlichen Konzentrationen an MMS, aufgetropft. Während *XRS2* und *APN1* einen additiven Einfluss auf die MMS-Sensitivität aufweisen (unten), wird die Empfindlichkeit der Mutanten *ntg1ntg2* und *apn1ntg1ntg2* durch zusätzliche Deletion von *XRS2* nicht verändert (oben).

4.4.5.2 Analyse der Basenexcisionsreparatur *in vitro*

Im Folgenden wurde die BER-Effizienz mit Hilfe des *in vitro*-BER-*Assays* analysiert. Während der WT-Extrakt nur für 5 und 15 min mit dem Uracil-Oligonukleotid versetzt wurde, wurden für die Mutanten-Extrakte zusätzliche Zeitwerte von 30 und 60 min eingeführt, da die Reparatureffizienz deutlich geringer ist als im WT. Wiederum diente der längste Zeitwert des WT (15 min) der Normalisierung der Produktmenge.

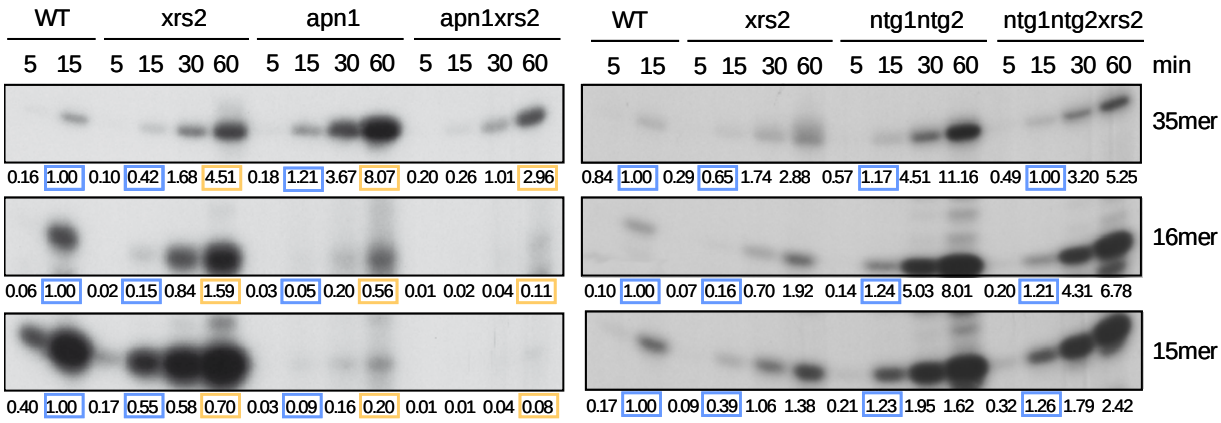

Abbildung 44: *In vitro*-BER-Untersuchungen der Mutanten für die Epistasisanalysen

Zur näheren Analyse der Rolle von Xrs2 in der BER wurde die *in vitro*-Reparatur des Uracil-haltigen Oligonukleotids in BER-defizienten Stämmen im Vergleich zu Mutanten mit zusätzlicher *XRS2*-Deletion untersucht. Die Produkte wurden durch 24 %ige PAA-Gele aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Menge an jeweiligem Produkt wurde auf die Menge normiert, die der WT-Extrakt in 15 min Reparaturzeit produziert. In der *apn1xrs2*-Doppelmutante (links) ist die BER-Effizienz im Vergleich zu den entsprechenden Einzelmutanten weiter reduziert. Die Deletion von *XRS2* in dem Stamm *ntg1ntg2* (rechts) setzt die BER-Effizienz nicht mehr weiter herab. Dargestellt ist jeweils einer von zwei durchgeführten Versuchen mit unterschiedliche Zellextrakten und nahezu identischen Ergebnissen.

Während die *apn1*-Mutante im Vergleich zur *xrs2*-Mutante weniger Intermediat und *long patch*-Produkt generiert, ist die *short patch*-Kapazität nicht beeinflusst (Abbildung 44 links, vergleiche die blau markierten 15 min-Werte). Für die Herstellung von *long patch*-Produkt und Intermediat weisen die beiden Gene, wie für die MMS-Sensitivität, einen additiven Effekt auf, so dass in der Doppelmutante fast keine Produkte mehr detektiert werden konnten. Für die *short patch*-Reparatur zeigt sich nahezu der *xrs2*-Phänotyp (vergleiche die orange markierten 60 min-Werte).

Verglichen mit dem WT zeigt die *ntg1ntg2*-Mutante keinen BER-Defekt (Abbildung 44 rechts). Durch zusätzlich Deletion von *XRS2* wird die Reparatureffizienz der *ntg1ntg2xrs2*-Dreifachmutante kaum beeinflusst (vergleiche die blau markierten 15 min-Werte). Im Vergleich zur *ntg1ntg2*-Mutante zeigt sich kein reproduzierbarer Unterschied. Für alle drei Produkte wird der *xrs2*-Phänotyp deutlich supprimiert. Zur weiteren

Epistasisanalyse wurde auch eine *apn1ntg1ntg2*-Dreifachmutante untersucht. Hierbei konnten kaum Reparaturprodukte detektiert werden (nicht gezeigt). Daher kann keine Aussage über den Einfluss einer zusätzlichen Deletion von *XRS2* gemacht werden.

Der additive Effekt von *APN1* und *XRS2* sowie die Suppression des *xrs2*-Phänotyps im AP-Lyase-defizienten Hintergrund deutet auf eine Funktion von Xrs2 *downstream* von Ntg1 und Ntg2 hin.

4.4.6 Analyse der Rolle von Xrs2 im BER-Mechanismus

Bisherige Analysen haben nachgewiesen, dass Xrs2 an der BER beteiligt ist. Biochemische Analysen zu einzelnen BER-Schritten sollten einen Aufschluss über die spezielle Funktion von Xrs2 im BER-Mechanismus liefern. Mit Hilfe eines *Incision-Assays* und verschiedener Untersuchungen zur Strang-Elongation wurden Zellextrakte der *xrs2*-Mutante und des WT miteinander verglichen.

4.4.6.1 Untersuchung des *Incision*-Schrittes

Der erste Schritt in der BER stellt die Erkennung des Basenschadens dar. Nachfolgend wird das Zucker-Phosphatrückgrat mit Hilfe von AP-Endonukleasen oder AP-Lyasen eingeschnitten. Um diese beiden ersten Schritte zu analysieren, wurde ein *Incision-Assay* durchgeführt, bei dem durch Inkubation des Uracil-haltigen, doppelsträngigen Oligonukleotids mit Proteinextrakten Produkte mit einer Größe von 14 nt und 15 nt Länge entstehen. Abbildung 45 zeigt ein Reaktionsschema für diesen Versuch.

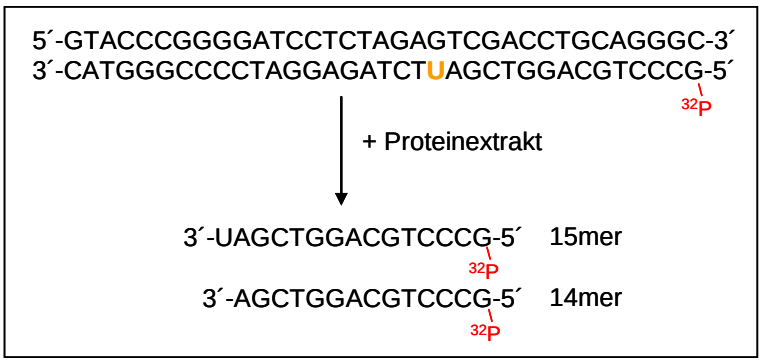

Abbildung 45: Reaktionsschema des *in vitro-Incision-Assays*

Durch Zugabe von Proteinextrakt zu dem Uracil-haltigen Substrat wird der Schaden von Reparaturproteinen erkannt und ausgeschnitten. Durch die Aktivität von AP-Lyasen oder AP-Endonukleasen entstehen Produkte von 15 nt und 14 nt Länge.

Die Spezifität dieser Reaktion wurde mit Hilfe von Kontrollen bestätigt. Ohne Zugabe von Extrakten findet keine Spaltung des Substrats statt. Durch Zugabe von rekombinanter Uracil-DNA-Glykosylase aus *E. coli* unter alkalischen Bedingungen wird das Uracil vom Enzym ausgeschnitten und das Zucker-Phosphatrückgrat an der entstandenen AP-Stelle durch NaOH hydrolysiert (persönliche Mitteilung S. Mörtl). Da Apn1 die wichtigste Endonuklease in Hefezellen darstellt, diente ein *apn1*-Extrakt als Kontrolle.

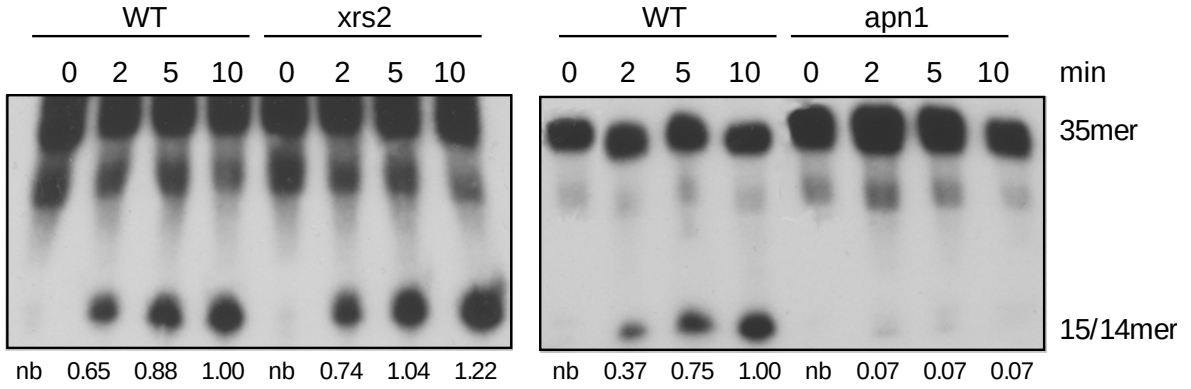

Abbildung 46: *In vitro*-Analyse der Basenerkennung und des *Incision*-Schrittes

Um die ersten beiden Schritte der BER, die Basenerkennung und den Einschnitt des Zucker-Phosphatrückgrates (*Incision*), zu untersuchen, wurde markiertes Uracil-Oligonukleotid für die angegebenen Zeitwerte mit Proteinextrakten versetzt. Durch den *Incision*-Schritt entsteht ein Produkt von 14/15 nt Länge. Substrat und Produkt wurden mittels PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit der Software *TotalLab TL100* quantifiziert. Die Produktmenge nach Inkubation für 10 min mit WT-Extrakt wurde auf 1 normiert (nb = nicht bestimmt). Die *xrs2*-Mutante weist im Vergleich zum WT keinen Defekt des *Incision*-Schrittes auf (links). Nach Deletion von *APN1*, dessen Genprodukt die wichtigste Endonuklease darstellt, ist jedoch kaum mehr Produkt messbar (rechts).

Abbildung 46 zeigt, dass die Effizienz für die Basenerkennung und den Einschnitt des Zucker-Phosphatrückgrats in der *xrs2*-Mutante im Vergleich zum WT nicht beeinträchtigt ist. In beiden Fällen erfolgen diese Schritte mit hoher Effizienz. In der *apn1*-Mutante hingegen ist die *Incision*-Effizienz stark herabgesetzt. Es entsteht, wie erwartet, nur eine kleine Menge an Produkt, da das Gen für die Hauptendonuklease deletiert wurde.

4.4.6.2 Untersuchung der Strang-Elongation

Nach dem Entfernen der schadhaften bzw. falschen Base muss die prozessierte AP-Stelle durch eine Polymerase aufgefüllt werden. Zur Untersuchung der Strang-Elongation wurden zwei verschiedene Experimente durchgeführt (Abbildung 47). Um zunächst in WT- und *xrs2*-Extrakten die Polymerase-Aktivität an sich zu vergleichen, wurde im *Primer-extension-Assay* ein partiell doppelsträngiges Substrat verwendet, bei dem ein 15 nt langes radioaktiv markiertes Oligonukleotid an ein 35mer angelagert wurde. Durch die Polymerase-Kapazität in den Extrakten kann das Substrat zu einem

vollständig doppelsträngigen Oligonukleotid aufgefüllt werden. In einem zweiten Experiment wurden die Extrakte mit einem doppelsträngigen, 35 bp langem Substrat versetzt, das in einem Strang eine Lücke von 4 Nukleotiden aufweist. Dadurch wird die *long patch*-Reparatur simuliert, da das Substrat BER-Intermediaten nach der Entfernung des blockierten 5´-Endes durch die 5´-*Flap*-Endonuklease Rad27 entspricht. Da kein ATP für Ligase-Aktivitäten zugegeben wird, können nach Inkubation mit den Proteinextrakten Produkte von 15-18 nt Länge detektiert werden.

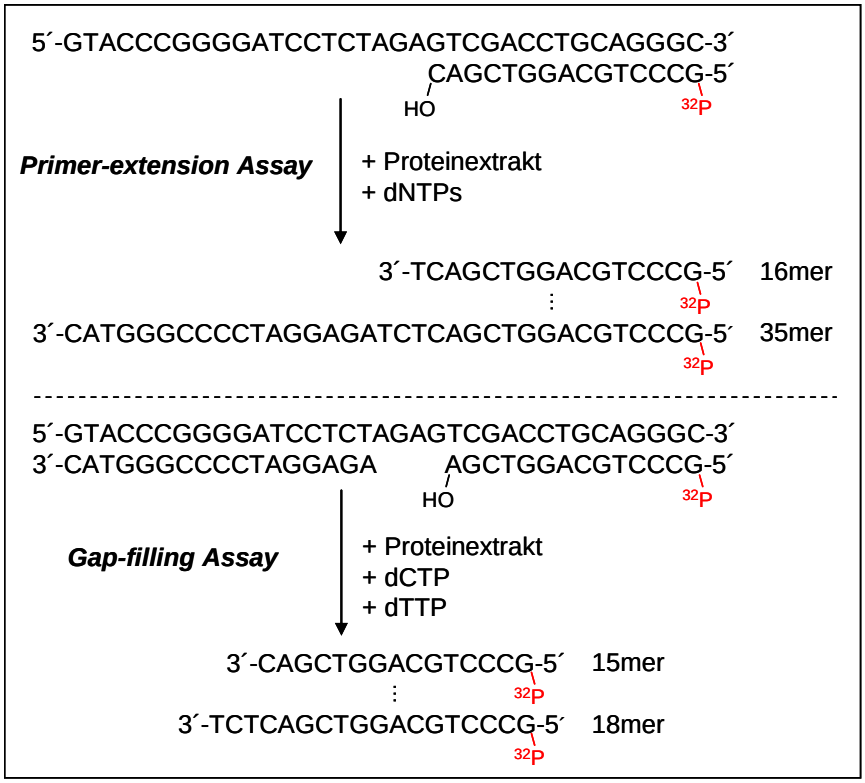

Abbildung 47: Reaktionsschemata der *in vitro*-Versuche zur Untersuchung der Strang-Elongation

Durch Zugabe von Proteinextrakt und dNTPs zum Substrat des *Primer-extension-Assays* entstehen Produkte mit einer Länge von 16 nt bis 35 nt Länge. Das Substrat des *Gap-filling-Assays* weist eine Lücke von 4 Nukleotiden auf. Durch Zugabe von Proteinextrakt und den beiden Nukleotiden dCTP und dTTP entstehen Produkte von 15 nt - 18 nt Länge.

Aus Abbildung 48 wird ersichtlich, dass die *xrs2*-Mutante eine erniedrigte Aktivität der Strang-Elongation aufweist. Während WT-Extrakte das Substrat im *Primer-extension-Assay* bereits nach 2 h teilweise komplett auffüllen, ist in der *xrs2*-Mutante erst nach 5 h sehr wenig Produkt mit einer Größe von 35 bp erkennbar. Auch im *Gap-filling-Assay* zeigt sich eine reduzierte Aktivität in den *xrs2*-Extrakten. Der WT weist bereits nach 15 min ein Produkt von 18 nt Länge auf. Die *xrs2*-Mutante hingegen zeigt erst nach 60 min geringe Strang-Elongation. Mit Hilfe der verminderten Strang-Elongation lässt

sich auch erklären, warum die *xrs2*-Mutante bereits bei der Produktion des Intermediats einen Defekt aufweist, obwohl der *Incision*-Schritt nicht beeinträchtigt ist.

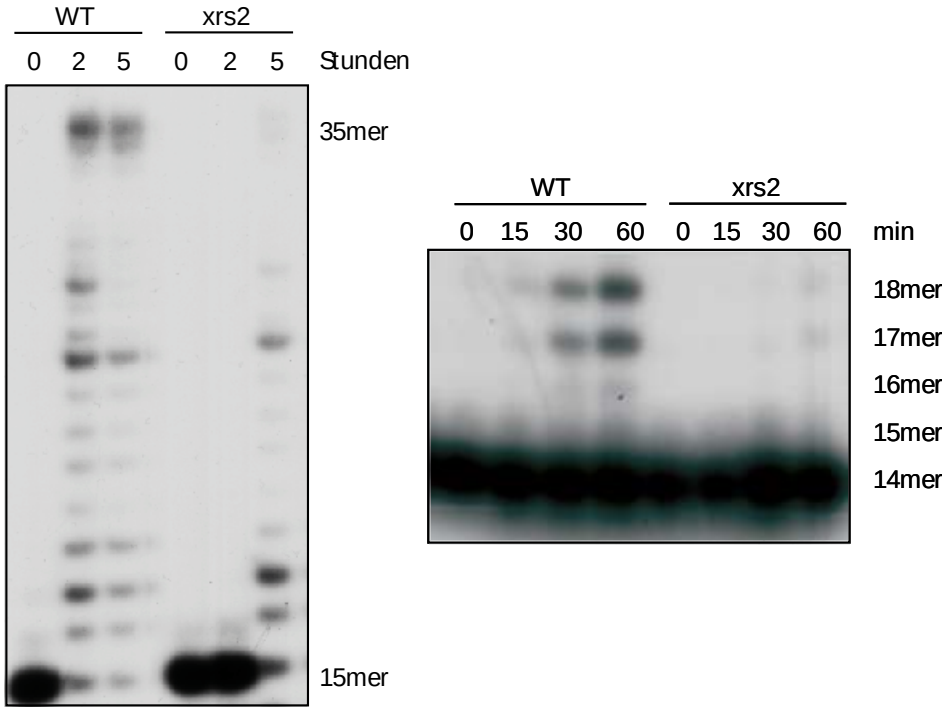

Abbildung 48: Analyse der Strang-Elongation mittels *Primer-extension-Assay* und *Gap-filling-Assay*

Für die Analyse der Strang-Elongation wurden zwei verschiedene, markierte Substrate mit Proteinextrakten von WT- und *xrs2*-Zellen versetzt. Im *Primer-extension-Assay* wurde ein partiell doppelsträngiges Oligonukleotid verwendet. Das dsDNA Oligonukleotid für den *Gap-filling-Assay* weist in einem Strang eine Lücke von 4 Nukleotiden auf. In beiden Fällen wurden die entsprechenden Nukleotide zum Auffüllen der Substrate angeboten. Die Produkte wurden durch PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt und über Autoradiographie sichtbar gemacht. Im *Primer-extension-Assay* (links) zeigt der WT bereits nach 2 h Produkte mit einer maximalen Größe von 35 nt, während die *xrs2*-Mutante erst nach 5 h eine kleine Menge an komplett aufgefülltem Produkt aufweist. Auch im *Gap-filling-Assay* (rechts) zeigt die *xrs2*-Mutante eine niedrigere Effizienz für das Auffüllen der vier fehlenden Nukleotide. Dargestellt ist jeweils einer von zwei durchgeführten Versuchen mit verschiedenen Extrakten.

Die Resultate der Analyse des BER-Mechanismus zeigen, dass das Xrs2-Protein für die Strang-Elongation notwendig ist. Für die Basenerkennung und den *Incision*-Schritt des BER-Prozesses spielt Xrs2 hingegen keine Rolle.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das Protein Xrs2, das mit Mre11 und Rad50 in *S. cerevisiae* den MRX-Komplex bildet, auf neue Funktionen zum Erhalt genomischer Stabilität hin untersucht. Auf Grund der hohen Sensitivität von *xrs2*-Mutanten gegenüber DNA-schädigenden Agenzien, wurde in der Apoptose, der DSB-Reparatur und in der Basenexcisionsreparatur nach neuen Funktionen von Xrs2 gesucht.

Bisher konnte gezeigt werden, dass der MRX-Komplex an vielen zellulären Mechanismen beteiligt ist (Haber, 1998). Neben der DSB-Reparatur spielt der MRX-Komplex auch in der Aufrechterhaltung der Telomerenden und in der Meiose eine Rolle. Die beiden Komponenten Mre11 und Rad50 sind von der Hefe bis zum Menschen hoch konserviert. Xrs2 hingegen weist zum Säugerhomolog Nbs1 nur eine geringe Sequenzhomologie von 28 % im FHA-Bereich auf (Digweed et al., 1999) (Abbildung 49). Mutationen im *NBS1*-Gen verursachen das *Nijmegen Breakage* Syndrom, eine seltene genetische Krankheit mit chromosomaler Instabilität. Charakterisiert ist das Syndrom durch Microcephalie, Wachstumsstörungen, Immundefizienz, einer hohen Anfälligkeit für maligne Erkrankungen und erhöhter Strahlenempfindlichkeit (Carney, 1999). Trotz der starken Sequenzunterschiede zwischen Nbs1 und Xrs2 lassen die Domänenstruktur und die Bindung zu Mre11 und Rad50 auf ähnliche Funktionen schließen, von denen bereits viele beschrieben wurden.

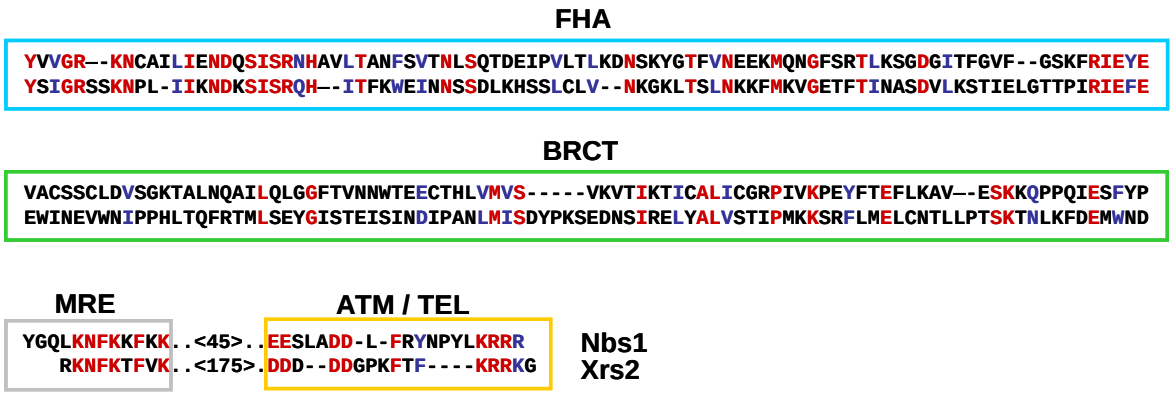

Abbildung 49: Vergleich der Aminosäure-Sequenz von Nbs1 und Xrs2

Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen innerhalb der funktionellen Domänen. Nur die FHA-Domäne am N-Terminus der beiden Proteine weist größere strukturelle Homologien auf. (rot = identische Aminosäure; blau = ähnliche Aminosäure, zur Verfügung gestellt von Simone Mörtl)

Das *XRS2*-Gen wurde ursprünglich in einem genetischen *Screen* zur Identifikation von Mutanten mit hoher Strahlenempfindlichkeit entdeckt (Ivanov et al., 1992). Auch nach Herunterregulierung von Nbs1 in Säugerzellen weisen diese, wie die Zellen von NBS-

Patienten, eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung auf (Sagan et al., 2007; Hematulin et al., 2008). Sowohl Nbs1 als auch Xrs2 sind an der DSB-Erkennung beteiligt (Bao und Shen, 2007; Lavin, 2007). Als erster Sensor rekrutieren und aktivieren sie ATM bzw. Tel1/Mec1. Dies führt im Folgenden zur Phosphorylierung des Histons H2A in Hefezellen bzw. H2AX in Säugerzellen. Ein *Feedback-Loop* sorgt in beiden Fällen für die anschließende Phosphorylierung von Nbs1 und Xrs2 durch die Kinasen ATM und Tel1. Des Weiteren konnte für beide Proteine gezeigt werden, dass sie für die Kernlokalisation von Mre11 verantwortlich sind (Carney et al., 1998; Tsukamoto et al., 2005). Nach der Erkennung von DSB wird der Zellzyklus an bestimmten Kontrollpunkten angehalten, um die Reparatur zu ermöglichen. Nbs1 ist für den G_1-Arrest verantwortlich, damit geschädigte Zellen nicht in die S-Phase eintreten und ihre DNA replizieren können (Zhang et al., 2006b). Xrs2 aktiviert über Mec1 und Tel1 ebenfalls einen G1-Arrest sowie einen Intra-S-Phase *Checkpoint* (Andrews und Clarke, 2005; Grenon et al., 2006). Durch seine mannigfaltigen Funktionen spielt das Xrs2-Protein eine Rolle in der Unterdrückung großer chromosomaler *Rearrangements* (Smith et al., 2005). Auch beim *Nijmegen Breakage* Syndrom kommt es zu chromosomaler Instabilität, weshalb die Krankheit auch zu den *Chromosome Fragility* Syndromen gerechnet wird (Carney, 1999). Neben den Funktionen von Nbs1 und Xrs2 in der DSB-Reparatur sind beide Proteine auch für die Aufrechterhaltung der Telomerenden verantwortlich (Zhang et al., 2006b; Bianchi und Shore, 2008). Sowohl *xrs2*-Mutanten als auch Zellen von NBS-Patienten weisen Telomerverkürzungen auf. Da Nbs1 und Xrs2 ähnliche Funktionen haben, stellt eine funktionelle Analyse von Xrs2 in Hefezellen somit auch eine Grundlage für Untersuchungen in menschlichen Zellen dar. Die Analyse komplexer Schadensantworten nach DNA-Schädigung in Hefezellen im Rahmen dieser Arbeit kann auch neue Erkenntnisse für diese Prozesse in Säugerzellen liefern.

5.1 Rolle von Xrs2 in der Apoptose

5.1.1 Geringe Apoptose-Induktion in WT-Zellen

Niedrige H_2O_2-Dosen sollten einen guten Induktor für Apoptose in Hefezellen darstellen (Fröhlich et al., 2007). Als Richtwert wird die Dosis verwendet, bei der ca. 50 % der WT-Zellen überleben können (persönliche Mitteilung C. Ruckenstuhl, Graz). Da in dieser Arbeit das Überleben im WT durch die Behandlung mit 0,4 mM und 0,6 mM H_2O_2 auf 70 % bzw. 30 % reduziert wird (4.2.1 / Abbildung 20), sollten auch die hier verwendeten

Dosen an H_2O_2 ausreichen, um den programmierten Zelltod in ausreichendem Maße einzuleiten.

Eine erhöhte Menge an ROS ist charakteristisch für apoptotische Zellen (Perrone et al., 2008). Mit Hilfe des Durchflußzytometers kann der Anteil an Zellen mit einer Akkumulation von ROS durch Anfärbung mit Dihydroethidiumbromid quantifiziert werden. In einer anderen Studie konnte die ROS-Quantifizierung nach H_2O_2-Stimulation zur Identifizierung von Apoptose bereits erfolgreich eingesetzt werden. Büttner et al. konnten bei einer Induktion von BY4741 mit 0,4 mM H_2O_2 nach 4 h in WT-Zellen wie in dieser Arbeit ein Überleben von 75 % feststellen. Ca. 10 % der Zellen weisen hierbei eine erhöhte Konzentration an ROS auf (Büttner et al., 2007). In dieser Arbeit hingegen konnten bei Stimulation mit 0,4 mM bzw. 0,6 mM H_2O_2 nach 4 h in nur 3,3 % bzw. 4,9 % der Zellen eine Akkumulation von ROS nachgewiesen werden (4.2.1 / Abbildung 19). Da die Werte sehr niedrig sind, bleibt unklar, ob Apoptose wirklich induziert werden konnte. In einer Publikation über das Apoptoseverhalten von *cdc13*-Mutanten wird die Verlässlichkeit der Quantifizierung von ROS mit Hilfe von Fluorochromen angezweifelt. Zusätzlich zur Anfärbung mit Dihydrorhodamin wurde in der Studie eine PI-Färbung durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass PI-positive Zellen und somit nekrotische Zellen Fluorochrome unspezifisch akkumulieren. Diese Akkumulation ist unabhängig von ROS und Apoptose, da die Zellen auch nach Zugabe von Antioxidantien mit Dihydrorhodamin angefärbt werden konnten (Wysocki und Kron, 2004).

Ein zweiter *Assay* für den direkten Nachweis apoptotischer Zellen, der ebenfalls von Büttner et al. erfolgreich durchgeführt werden konnte, ist der Annexin V-*Assay* (4.2.2 / Abbildung 21). Während Büttner et al. bereits bei 0,4 mM H_2O_2 ca. 10 % Annexin V-positive Zellen detektieren konnten (Büttner et al., 2007), wurden in dieser Arbeit nach Behandlung mit 0,6 mM H_2O_2 nur halb so viele Annexin V-positive Zellen nachgewiesen. Somit zeigt derselbe BY4741-WT wie bei Büttner et al. mit beiden Methoden nur eine schwache Apoptose-Induktion, obwohl die Versuchsbedingungen identisch gewählt wurden.

5.1.2 Xrs2 hat keinen Einfluss auf die Apoptose

Die Deletion von *XRS2* sorgt auch im BY4741-Hintergrund, wie im MKP0-Stamm, für eine erhöhte H_2O_2-Sensitivität im Vergleich zum WT (4.2.1 / Abbildung 20, 4.1 / Abbildung 18). Allerdings ist in der *xrs2*-Mutante der Anteil an Zellen mit erhöhter Konzentration an ROS bereits ohne Stimulation im Vergleich zum WT 3-fach erhöht

(5,4 %) und steigt durch Behandlung mit 0,6 mM H_2O_2 wie im WT nur um 3,1 % an (4.2.1 / Abbildung 19).

Mit Hilfe der Annexin V- und PI-Färbung lassen sich nekrotische und apoptotische Zellen unterscheiden (4.2.2 / Abbildung 21). Hier zeigt sich, dass die Zellen, die bereits ohne Stimulation eine erhöhte Menge an ROS aufweisen, nekrotische Merkmale besitzen. Nach Behandlung mit 0,6 mM H_2O_2 steigt die Population nekrotischer Zellen stark auf 12,6 % an. Das Apoptoseverhalten der *xrs2*-Mutante hingegen ist mit dem Apoptoseverhalten der WT-Zellen vergleichbar und liegt nach Stimmulation mit 0,6 mM H_2O_2 bei 30 % des nekrotischen Werts (4,1 % nekrotische Zellen).

Es wird über einen apoptotischen Phänotyp in einzelligen Organismen wie der Hefe in der Literatur intensiv diskutiert (Wysocki und Kron, 2004). Auf Grund der niedrigen Induktionsraten in dieser Arbeit bleibt unklar, ob die detektierten Merkmale tatsächlich auf Apoptose zurückzuführen sind. Unter der Annahme, dass Apoptose eingeleitet wurde, sorgt die Deletion von *XRS2* nicht für eine Erhöhung der Apoptoserate. Das geringe Überleben der *xrs2*-Mutante nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien kann in diesem Fall nicht auf eine Rolle von Xrs2 für die Unterdrückung von Apoptose zurückgeführt werden. Dies steht im Gegensatz zu den Resultaten einer Studie mit lymphoblastoiden Zelllinien von NBS-Patienten, die eine Beteiligung von Nbs1 an der Regulation von Apoptose vermuten lassen. Im Vergleich zu Kontrollzellen weisen die Patientenzellen nach γ-Bestrahlung eine deutlich erhöhte Apoptoserate auf (Sagan et al., 2007).

5.2 Rolle von Xrs2 in der DSB-Reparatur

Der MRX-Komplex hat viele Funktionen bei der Erkennung von DSB und der Signalweiterleitung für die *Checkpoint*-Aktivierung (Ivanov et al., 1994; Haber, 1998; Grenon et al., 2001; D'Amours und Jackson, 2002; Lisby et al., 2004). Zusätzlich wird seine Rolle in der DSB-Reparatur selbst stark diskutiert. Bisherige Studien konnten eine klare Beteiligung des MRX-Komplexes im NHEJ zeigen, während seine Rolle in der HR als weniger wichtig angesehen wurde (Malkova et al., 1996; Matsuzaki et al., 2008; Palmbos et al., 2008). Ein klarer Defekt von Stämmen mit Mutationen in den Genen des MRX-Komplexes konnte nur für die durch γ-Strahlung induzierte Rekombination zwischen Schwesterchromatiden nachgewiesen werden (Bressan et al., 1999). Deshalb sollte die Rolle von Xrs2 in der DSB-Reparatur mittels HR näher analysiert werden.

5.2.1 Deletion von *XRS2* reduziert die DSB-Reparatureffizienz

Unter Verwendung verschiedener experimenteller Ansätze wurde der Einfluss von Xrs2 sowie seiner Komplexpartner Mre11 und Rad50 auf die DSB-Reparatureffizienz untersucht.

Mit Hilfe von PFGE-Analysen von WT-Zellen konnte gezeigt werden, dass auch in haploiden Zellen, die sich in der stationären Wachstumsphase befinden, unter LHR-Bedingungen Reparatur von strahlen-induzierten, chromosomalen DSB stattfinden kann. In den Mutanten *xrs2*, *rad50* und *mre11* ist die Reparatureffizienz im Gegensatz zum WT mit 60 % Reparatureffizienz auf fast die Hälfte (35 %) reduziert (4.3.1.2 / Abbildung 25). Die DSB-Reparatur in stationären Zellen sollte zum größten Teil über den NHEJ-Mechanismus vollzogen werden. Tatsächlich konnte eine vermehrte Verwendung von NHEJ für Hefezellen in der stationären Wachstumsphase gezeigt werden (Herrmann et al., 1998; Valencia et al., 2001; Karathanasis und Wilson, 2002; Ira et al., 2004). Aus grundsätzlichen Überlegungen war es nicht zu erwarten, dass haploide Hefezellen in der stationären Wachstumsphase HR zeigen, da ohne Schwesterchromatiden keine homologen Sequenzen zur Verfügung stehen. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Reparatur chromosomaler DSB auch in haploiden *rad52*-Zellen in der stationären Phase stark beeinträchtigt ist (4.3.1.2 / Abbildung 25). Sie weist mit 22 % die niedrigste Reparatureffizienz auf. Dieses Ergebnis ist nur zu erklären, wenn so genannte ektopische HR (Kupiec und Steinlauf, 1997) erfolgen kann, bei der auf homologe Sequenzen irgendwo im Genom (z. B. *Repeats*, Pseudogene, Genduplikate) zurückgegriffen wird. Die Deletion des NHEJ-Faktors *KU70* hat nur einen geringen Einfluss auf die DSB-Reparatur, was ebenfalls verwunderlich ist, da die Rolle von NHEJ für haploide Hefen bereits nachgewiesen wurde (Dudasova et al., 2004). Die ermittelten Reparatureffizienzen spiegeln die Verhältnisse der Überlebensraten von Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase nach γ-Bestrahlung wieder (4.3.1.1 / Abbildung 22). In beiden Wachstumsphasen wird demnach ein großer Anteil der DSB über HR repariert.

Auch bei der Analyse der Reparatur von Mikrodeletionen in Plasmid-DNA zeigte sich ein starker Reparaturdefekt für logarithmisch wachsende, MRX-defiziente Zellen. Die Effizienz der Rezirkularisation des Vektors ist in den Mutanten *xrs2*, *rad50* und *mre11* im Vergleich zum WT 20-fach reduziert. Wiederum zeigt sich eine noch stärkere Reduktion für die Deletion von *RAD52*, während die *ku70*-Mutante nur eine schwach erniedrigte Reparatureffizienz aufweist (4.3.2.1 / Abbildung 26). Diese Ergebnisse passen zu der untergeordneten Rolle von NHEJ in Hefezellen. Fernerhin konnten Ma et al. zeigen, dass

NHEJ-Ereignisse bei nicht-kompatiblen Enden, wie sie in dem hier verwendeten Plasmidsystem vorliegen, nicht vom Ku70/Ku80-Komplex, sondern vom MRX-Komplex abhängig sind (Ma et al., 2003).

Ergebnisse von Versuchen mit Mutanten, die verkürzte *XRS2*-Allele tragen, kennzeichnen die Mre11-Bindestelle von Xrs2 als die einzig essentielle Domäne für Strahlenresistenz sowie für die Reparatur von chromosomalen DSB und enzymatisch-induzierten Mikrodeletionen in Plasmid-DNA (4.3.3.1 / Abbildung 28, 4.3.3.2 / Abbildung 29). Die leicht beeinträchtigte Reparatur von Mikrodeletionen in den restlichen Mutanten mit Deletionen anderer Domänen kann auf eine niedrigere Expression der verkürzten Gene zurückgeführt werden (Shima et al., 2005).

Somit zeigen die neuen Ergebnisse, dass der MRX-Komplex und speziell die Interaktion zwischen Xrs2 und Mre11 eine wichtige Rolle für effiziente DSB-Reparatur spielt. Übereinstimmend lassen auch Ergebnisse neuerer Studien einen DSB-Reparaturdefekt für Fibroblasten-Zelllinien mit mutiertem *NBS1* vermuten (Riballo et al., 2004; Pluth et al., 2008), während frühere Arbeiten keinen starken Defekt solcher Zelllininen aufzeigen konnten (Kraakman-van der Zwet et al., 1999).

5.2.2 WT und MRX-defiziente Zellen bevorzugen HR

Die Analyse der Reparaturgenauigkeit zeigte, dass die Reparatur von Mikrodeletionen in Plasmid-DNA in WT-Zellen hauptsächlich über fehlerfreie HR (*URA3*$^{+}$-Klone) erfolgt (4.3.2.1 / Abbildung 26), wie bereits mit anderen Versuchssystemen publiziert ist (Paques und Haber, 1999; Jackson, 2002). In den restlichen 20 % der Klone, die Uracil-Defizienz aufweisen, kann fehlerhafte HR oder NHEJ stattgefunden haben. Zusätzlich kann auch bei längeren Austauschlängen die Übertragung der chromosomalen Ty-Insertion während eines HR-Ereignisses (Kokonversion) die Wiederherstellung eines funktionellen *URA3*-Gens verhindern (Bärtsch et al., 2000; Symington et al., 2000; Haghnazari und Heyer, 2004). Sequenzanalysen des Vorläufer-Plasmids YpJA18 aus *ura3*$^{-}$-Klonen im Rahmen einer vorangegangenen Studie zeigten, dass diese durch fehlerhafte HR entstanden. NHEJ-Ereignisse und Kokonversionen konnten nicht detektiert werden (Mörtl et al., 2008). Auch in den MRX-Deletionsmutanten wurde die Mikrodeletion zu 80 % über fehlerfreie HR repariert, allerdings mit wesentlich reduzierter Effizienz. Diese reduzierte Reparatureffizienz kann somit hauptsächlich auf eine Erniedrigung der HR zurückgeführt werden kann. Welche Mechanismen zur Reparatur der Mikrodeletion in den 20 % Uracil-defizienten Zellen Verwendung fand, wurde in

dieser Arbeit nicht näher untersucht. Sequenzanalysen könnten Aufschluss über die Nutzung von fehlerhafter HR, NHEJ oder Kokonversion geben.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Palmbos et al. (Palmbos et al., 2005), weist auch die Analyse der Mutanten mit einer N-terminalen Verkürzung des *XRS2*-Allels auf eine Beteiligung von Xrs2 im NHEJ-Prozess hin. Mutanten ohne FHA-Domäne zeigten ein leicht verändertes Gleichgewicht von fehlerfreier HR und fehlerhafter Reparatur. Im Vergleich zum Kontrollstamm *XRS2* ist die Reparaturgenauigkeit in den beiden Stämmen *xrs2-84M* und *xrs2-228M* von 80 % auf 90 % leicht erhöht (4.3.3.2 / Abbildung 29). Chen et al. konnten zeigen, dass Xrs2 mit Lif1 interagiert und dadurch die NHEJ-Komponente Lig4/Lif1 an die DSB-Enden rekrutiert (Chen et al., 2001). In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass Lif1 an die FHA-Domäne von Xrs2 bindet (Shima et al., 2005; Palmbos et al., 2008). Deletion der FHA-Domäne in den beiden Mutanten *xrs2-84M* und *xrs2-228M* könnte somit NHEJ blockieren, wodurch vermehrt HR verwendet würde.

5.2.3 Xrs2 fördert die Crossover-Bildung in einer frühen Phase der HR

Während der HR kann das verwendete Plasmid pJD4His, dessen Centromer deletiert wurde, entweder durch ein Crossover-Ereignis in das Chromosom IV, das die homologe Sequenz bietet, integrieren oder extrachromosomal in der Zelle verbleiben. Die Analyse dieser Möglichkeiten zeigte, dass WT-Zellen eine Crossoverfrequenz von 7 % aufweisen (4.3.2.2 / Abbildung 27). Diese niedrige Rate stimmt mit Resultaten aus einem interchromosomalen Rekombinationssystem gut überein, bei dem 5 % der Genkonversionen mit einem Crossover-Ereignis assoziiert waren (Ira et al., 2003). Zudem konnte auch für die Spalthefe eine Crossoverfrequenz von 4 % ermittelt werden (Raji und Hartsuiker, 2006).

In den MRX-defizienten Stämmen zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der Crossoverfrequenz von 7 % auf 1,5 % (4.3.2.2 / Abbildung 27). Wiederum zeigt nur die Deletion der Mre11-Bindestelle im Xrs2-Protein einen vergleichbaren Phänotyp zur *xrs2*-Deletionsmutante (4.3.3.2 / Abbildung 29). In den Mutanten *xrs2-84M* und *xrs2-228M* war die Crossoverfrequenz im Gegensatz zum WT leicht erniedrigt. Auch hier ist wohl die schwächere Expression der beiden verkürzten Allele, die bereits gezeigt werden konnte (Shima et al., 2005), ein Grund für dieses Ergebnis.

Eine reduzierte Crossoverfrequenz kann aus einer Verschiebung des Gleichgewichts von HR hin zu NHEJ resultieren. Wie bereits diskutiert, erniedrigt sich die

Reparaturgenauigkeit nach Deletion der MRX-Komponenten jedoch nicht. Des Weiteren kann die Crossoverfrequenz durch eine Verschiebung innerhalb der HR hin zu Unterwegen, die Crossover favoriesieren, erhöht werden. Können diese Unterwege in den MRX-Mutanten nicht mehr optimal erfolgen, wird die Crossvoerfrequenz reduziert. Verschiedene Mechanismen sind für die Bildung von Crossover- und Nichtcrossover-Ereignissen während der HR in mitotischen Zellen verantwortlich (Symington, 2002; Heyer et al., 2003). In *S. cerevisiae* stellt der DSBR-Prozess den Hauptweg für die Bildung von Crossover dar (Fu und Xiao, 2003; Ira et al., 2003), während für den SDSA-Mechanismus keine Crossover-Ereignisse erwartet werden. Demzufolge kann die erniedrigte Crossoverfrequenz entweder aus einem veränderten Gleichgewicht von SDSA und DSBR in den MRX-Mutanten im Vergleich zum WT oder aus einer bevorzugten Auflösung der dHJ zu Nichtcrossover innerhalb des DSBR-Prozesses hervorgehen. Um diese beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden Epistasisanalysen von *XRS2* mit *SRS2* und *SGS1* durchgeführt, da von den beiden Helikasen Srs2 und Sgs2 bekannt ist, dass sie die das Gleichgewicht verschiedener HR-Prozesse bzw. die Auflösung der dHJ regulieren. Hierbei unterdrücken Srs2 und Sgs2 Crossover-Ereignisse (Ira et al., 2003), während Xrs2 diese fördert (4.3.2.2 / Abbildung 27).

In den Mutanten *sgs1* und *srs2* ist die Crossoverfrequenz im Vergleich zum WT um das 1,6 – 2-fache erhöht (4.3.4.2 / Abbildung 31). Im *xrs2*-Hintergrund werden diese Phänotypen jedoch unterdrückt und die Crossoverfrequenz in den Doppelmutanten ist niedriger als im WT. Die Unterdrückung des *sgs1*-Phänotpys kann durch eine bevorzugte Auflösung der dHJ zu Nichtcrossover-Ereignissen erklärt werden. Die Unterdrückung des *srs2*-Phänotyps lässt jedoch darauf schließen, dass die gesteigerte Nutzung des DSBR-Weges, die für diese Mutante gezeigt wurde (Ira et al., 2003; Krejci et al., 2003; Veaute et al., 2003; Robert et al., 2006), durch die Deletion von *XRS2* gestört wird. Folglich spielt Xrs2 eine Rolle in einer frühen Phase der HR *upstream* von Srs2 und Sgs2 (Abbildung 50).

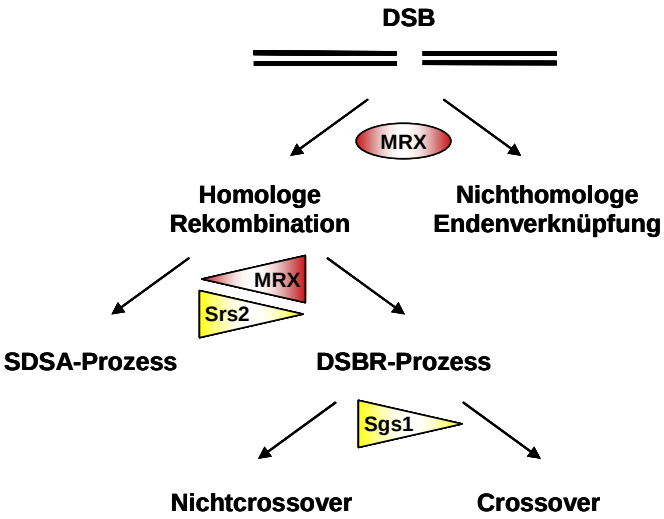

Abbildung 50: Einfluss des MRX-Komplexes auf die DSB-Reparaturwege

Bei der Wahl der DSB-Reparaturwege beeinflusst der MRX-Komplex die HR als auch das NHEJ. Der Einfluss des MRX-Komplexes auf die Crossoverfrequenz findet *upstream* von Srs2 und Sgs1 statt. Während Srs2 das Gleichgewicht zum SDSA-Prozess verschiebt und Crossover-Ereignisse unterdrückt, fördert der MRX-Komplex den DSBR-Prozess vermutlich stärker als den SDSA-Mechanismus. Sgs1 hingegen unterdrückt Crossover-Ereignisse in einer späten Phase der HR. Zusammen mit Top3 sorgt Sgs1 für die Auflösung der dHJ im DSBR-Prozess hin zu Nichtcrossover-Produkten.

Die Resultate lassen vermuten, dass Xrs2 die Wahl des HR-Weges beeinflusst, indem es für den DSBR-Prozess, der Crossover begünstigt, von größerer Bedeutung ist als für den SDSA-Mechanismus. Die funktionelle Analyse der Mutanten mit verkürzten Allelen zeigte, dass der bisher dargestellte Phänotyp von *xrs2* sich nur in der *xrs2-630*-Mutante ohne Mre11-Bindestelle widerspiegelt. Wie auch für sein Säugerhomolog Nbs1 (Carney et al., 1998) ist die Bindung von Mre11 für die Translokation der Nuklease in den Kern notwendig (Tsukamoto et al., 2005). Da Xrs2 beides bindet, DNA und Mre11, wird postuliert, dass Xrs2 die beiden anderen Mitglieder des Komplexes an die DNA-Enden rekrutiert (Trujillo et al., 2003). Somit ist der gesamte MRX-Komplex für die Förderung des DSBR-Prozesses notwendig. Einige frühe Funktionen des MRX-Komplexes in der Erkennung von DSB und der Endenprozessierung, die die reduzierte DSB-Reparatureffizienz und Crossoverfrequenz in den Mutanten erklären könnten, sind bereits bekannt und werden im Folgenden diskutiert.

5.2.4 Beeinflusst der MRX-Komplex die Crossover-Bildung über die *Checkpoint*-Aktivierung?

Als Antwort auf einen DSB ist es für die Zelle wichtig, Signalwege zu aktivieren, die nicht nur die DNA-Reparatur sondern auch den Zellzyklus-Arrest fördern. Die wichtigste *Checkpoint*-Kinase nach DNA-Schädigung ist Rad53 (Longhese et al., 1998).

Zusammen mit einer anderen Kinase, Chk1, wird Rad53 durch Mec1 und Tel1 phosphoryliert und damit aktiviert (Sanchez et al., 1996). Während in Säugerzellen ATM die wichtigere Kinase darstellt, ist in *S. cerevisiae* das ATR-Homolog Mec1 von größerer Bedeutung (Grenon et al., 2006). Das ATM-Homolog Tel1 hingegen scheint weniger relevant zu sein. Erste Publikationen, die einen Zusammenhang zwischen dem MRX-Komplex und *Checkpoint*-Kinasen gefunden haben, konnten die Notwendigkeit von Mre11, Rad50 und Xrs2 für die Aktivierung der beiden Effektor-Kinasen Rad53 und Chk1 nachweisen (Grenon et al., 2001; Usui et al., 2001). Spätere Studien zeigten, dass der MRX-Komplex einen Einfluss auf die Sensor-Kinasen Mec1 und Tel1 hat. Beide Proteine müssen an die freien DNA-Enden des DSB lokalisieren, um aktiviert werden zu können. Usui et al. zeigten, dass der MRX-Komplex den weniger wichtigen Tel1-Signalweg kontrolliert (Usui et al., 2001). In der Tat konnte später gezeigt werden, dass Tel1 durch die Assoziation mit Xrs2 an die DSB-Enden rekrutiert wird (Nakada et al., 2004). Schließlich konnte auch eine für den MRX-Komplex auch eine Rolle im Mec1-Signalweg detektiert werden (Nakada et al., 2004; Grenon et al., 2006).

Auch für *Checkpoint*-Kinasen konnte ein Einfluss auf die Crossoverfrequenz demonstriert werden (Haghnazari und Heyer, 2004), wie es in dieser Arbeit für den MRX-Komplex bewiesen wurde. Daher besteht theoretisch die Möglichkeit, dass der MRX-Komplex die Crossover-Bildung durch die Aktivierung der *Checkpoint*-Kinasen fördern könnte. Allerdings weisen *mec1*-, *rad53*-, und *chk1*-Mutanten einen Anstieg der Crossoverfrequenz auf (Haghnazari und Heyer, 2004), was es unwahrscheinlich macht, dass die *Checkpoint*-Funktion des MRX-Komplexes für die in dieser Arbeit beschriebene Begünstigung von Crossover-Ereignissen verantwortlich ist. Auch die Tatsache, dass die Phosphorylierung von Srs2 durch Cdk1 und Mec1 zur Bildung von Sgs1-Mre11 und Srs2-Mre11 Unterkomplexen führt (Chiolo et al., 2005), kann den beobachteten Phänotyp nach Deletion nicht erklären, da auch die beiden Helikasen das Gleichgewicht zwischen Crossover und Nichtcrossover in die andere Richtung als der MRX-Komplex verschieben. Die postulierten Zusammenhänge des MRX-Komplexes mit den *Checkpoint*-Kinasen sowie deren Einwirkung auf die Crossoverfrequenz ist in Abbildung 51 zusammenfassend dargestellt.

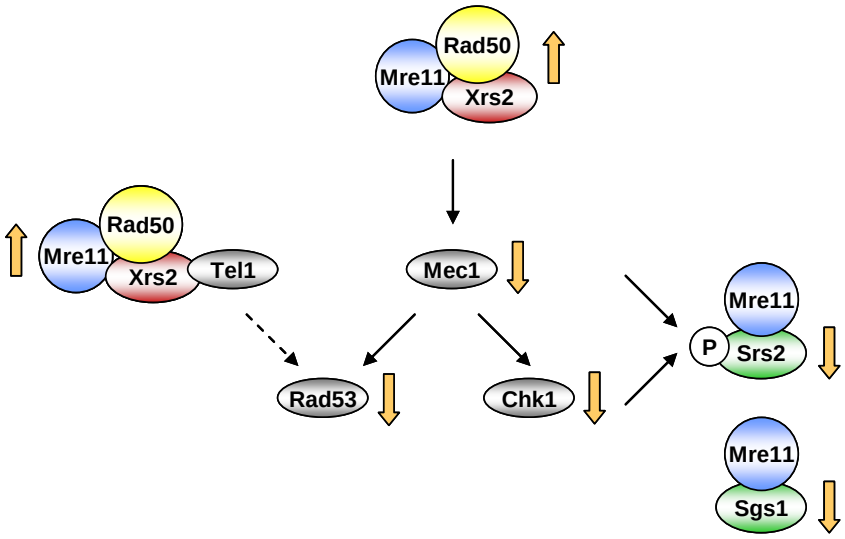

Abbildung 51: *Checkpoint*-Aktivierung durch den MRX-Komplex und die Einflüsse der einzelnen Proteine auf die Crossover-Bildung

Der Einfluss der Proteine bzw. Komplexe auf die Crossover-Bildung ist durch Pfeile symbolisiert (⇧ = fördert die Crossover-Bildung, ⇩ = unterdrückt die Crossover-Bildung). Der MRX-Komplex aktiviert durch die Rekrutierung der beiden Sensor-Kinasen Tel1 und Mec1 an die DSB-Enden die Signalketten zur *Checkpoint*-Aktivierung. Während der MRX-Komplex die Crossoverfrequenz erhöht, unterdrücken die Checkpoint-Kinasen Mec1, Rad53, Chk1 und Dun1 jedoch die Bildung von Crossover. Zusätzlich konnte ein Zusammenhang von MRX-Komplex und Srs2 bzw. Sgs1 gezeigt werden. Durch Phosphorylierung von Srs2 durch Mec1 und Chk1 bilden sich Mre11-Srs2- und Mre11-Sgs1-Unterkomplexe. Da die beiden Helikasen jedoch ebenfalls die Crossoverfrequenz niedrig halten, kann auch diese Funktion des MRX-Komplexes nicht den beobachteten Phänotyp der MRX-defizienten Mutanten erklären.

5.2.5 Beeinflusst der MRX-Komplex die Crossover-Bildung über die Endenprozessierung?

Neben der *Checkpoint*-Aktivierung stellen auch die Endenprozessierung und das *end-bridging* frühe Funktionen des MRX-Komplexes in der HR dar. Für beide Funktionen gibt es gute Hinweise, dass eine effiziente Ausführung die Crossover-Bildung begünstigen kann.

Wichtig für die Endenprozessierung ist die MRX-abhängige Degradierung der Enden in 5´→ 3´-Richtung (Ivanov et al., 1994; Lee et al., 1998; Tsubouchi und Ogawa, 1998; Moreau et al., 1999) zur Entstehung einzelsträngiger 3´-Überhänge. Da die experimentell nachgewiesene 3´-5´-Exonuklease-Aktivität von Mre11 jedoch die benötigte 5´-3´-Degradierung nicht bedingen kann, wird, wie für Säugerzellen, vermutet, dass der Komplex zusätzlich Helikase-Aktivität besitzt (Paull und Gellert, 1999). Dadurch können die Enden auch ein Substrat für die Endonuklease-Aktivität von Mre11 darstellen. Da Nuklease-defiziente *mre11*-Zellen allerdings keinen Defekt in der DSB-Reparatur und vor allem keine signifikante Erniedrigung der Crossover-Ereignisse aufweisen (Symington et

al., 2000), wird vermutet, dass nach dem Aufwinden auch redundante Exonukleasen, wie Exo1 und Pso2 (Lam et al., 2008), die DNA schneiden können. Ein weiterer Schritt der Endenprozessierung, der vom MRX-Komplex beeinflusst wird, ist das *Chromatin remodelling*. Infolge der Phosphorylierung von H2A kommt es zum Verlust von Histonen, wodurch Reparaturfaktoren an die DSB-Enden binden können (Tsukuda et al., 2005). Die Bildung von 3´-Überhängen sowie der Verlust von Histonen sind wichtige Vorraussetzungen für die Bildung des Rad51-Nukleoproteinfilaments (Tsukuda et al., 2005). Die Menge an Nukleoproteinfilament kann eine Rolle in der Wahl von SDSA oder DSBR spielen. Je mehr Nukleoproteinfilament entsteht, desto wahrscheinlicher wird die Invasion von nicht nur einem Strangende, sondern die Bildung einer dHJ für den DSBR-Prozess (Symington et al., 2000). Zusätzlich zu dem MRX-Komplex spielt auch Sae2 eine wichtige Rolle für die Enden-Degradierung (Zhu et al., 2008). In einer neuen Studie konnte gezeigt werden, dass die Deletion von Sae2 auf Grund der defizienten Endenresektion einen Einfluss auf die Wahl von Reparaturwegen hat, und zwar verschiebt sich das Gleichgewicht von HR hin zu NHEJ (Huertas et al., 2008). Da ohne Sequenzanalyse mit dem in dieser Arbeit verwendeten experimentellen System keine Aussage über die Verwendung von NHEJ in den MRX-defizienten Zellen gamacht werden kann, bleibt die Frage, ob der MRX-Komplex über die Endenprozessierung einen ähnlichen Einfluss auf die Verwendung von NHEJ und HR hat, offen. Darüber hinaus bleibt zu klären, wie Sgs1 und MRX, die beide an der Endenresektion beteiligt sind, einen gegensätzlichen Einfluss auf die Crossoverfrequenz haben können (Mimitou und Symington, 2008; Zhu et al., 2008).

Des Weiteren ist der MRX-Komplex für den Zusammenhalt der homologen Sequenzen sowie für das *end-bridging* der DNA am DSB verantwortlich (Hopfner et al., 2002; Williams et al., 2007). Auch reduziertes *end-bridging* in den MRX-Mutanten könnte die reduzierte HR und speziell die reduzierte Crossoverfrequenz erklären. Möglicherweise kann durch ein beeinträchtigtes *end-bridging* keine dHJ mehr gebildet werden, da das zweite DNA-Ende sich nicht in der Nähe der *D-Loop*-Struktur befindet, um den verdrängten Einzelstrang der homologen Sequenz einzufangen. Dieses Szenario würde den DSBR-Prozess verhindern, während SDSA weiterhin ermöglicht wird. Verantwortlich für das *end-bridging* sind die *Hook*-Domäne und die Adenylatkinase-Aktivität des Rad50-Proteins (Bhaskara et al., 2007). Daher wären weitere Untersuchungen interessant, die den Effekt einer *rad50 hook*-Mutante bzw. einer Inhibition der Adenylatkinase-Aktivität auf die Plasmid-Reparatur analysieren, insbesondere da bekannt ist, dass die *Hook*-

Domäne von Rad50 in Hefezellen für die MRX-abhängige DSB-Reparatur gebraucht wird (Wiltzius et al., 2005).

Werden alle Resultate der DSB-Analyse aus dieser Arbeit und den genannten Publikationen betrachtet, wird folgendes Modell vorgeschlagen (Abbildung 52), bei dem beide Prozesse, die reduzierte Endenprozessierung und das beeinträchtigte *end-bridging*, zu dem beobachteten Phänotyp der MRX-defizienten Zellen beitragen. Die Endenprozessierung beinhaltet sowohl die Enden-Degradierung als auch den Histonverlust in der Nähe des DSB.

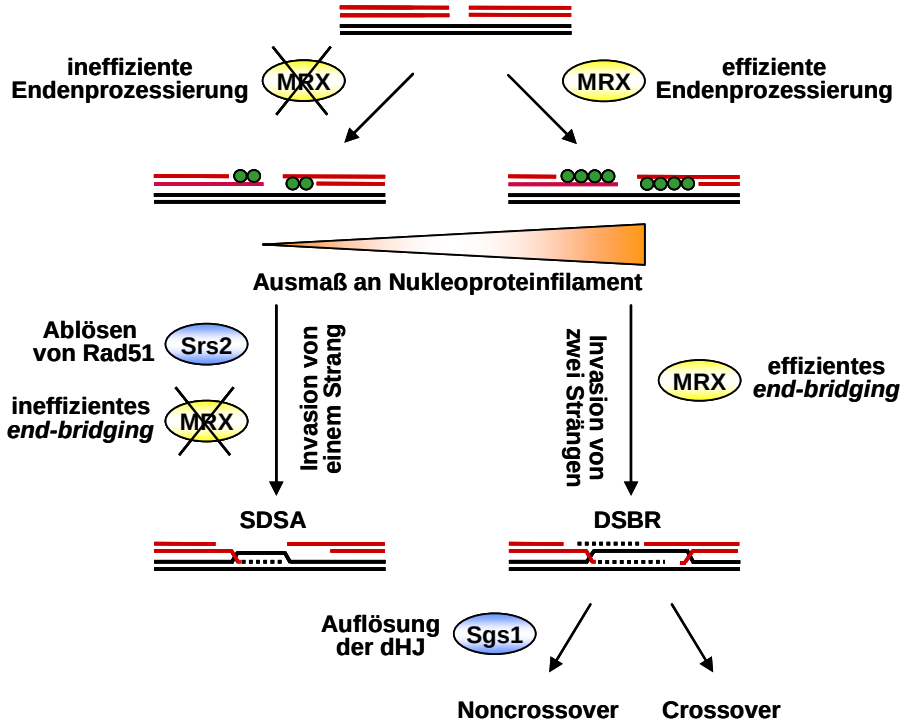

Abbildung 52: Modell für die Regulation von HR-Wegen

Nach der DSB-Erkennung ist der MRX-Komplex für eine effiziente Endenprozessierung verantwortlich. Dazu zählen neben der Enden-Degradierung auch das Aufwinden der DNA-Enden und der Histonverlust. Diese Schritte beeinflussen die Menge an Rad51-Nukleoproteinfilament. Auch Srs2 beeinflusst das Nukleoproteinfilament durch Ablösen von Rad51. Das Ausmaß an Nukleoproteinfilament könnte bei der Wahl des HR-Reparaturweges eine Rolle spielen. Zusätzlich sorgt der MRX-Komplex für den Zusammenhalt der DNA am DSB. Fehlendes *end-bridging* führt zu ineffizienter dHJ-Bildung, da das zweite Ende sich nicht in der Nähe der *D-Loop*-Struktur befindet. Dies erschwert den DSBR-Prozess, während SDSA weiterhin möglich ist.

5.3 Rolle von Xrs2 in der Basenexcisionsreparatur

Die Basenexcisionsreparatur stellt einen wichtigen Mechanismus zum Erhalt genomischer Stabilität dar (Maclean et al., 2003; Baute und Depicker, 2008; Degtyareva et al., 2008). Obwohl Xrs2 in viele verschiedene Prozesse involviert ist, die die Integrität des Genoms aufrechterhalten, wurde bisher keine Beteiligung des Proteins in der BER

gezeigt. Der einzige Hinweis in der Literatur auf eine Beteiligung des MRN-Komplexes in Säugerzellen an der Basenexcisionsreparatur besteht darin, dass rekombinant exprimiertes Mre11 *in vitro* Lyase-Aktivität besitzt (Larson et al., 2005). Es ist bekannt, dass Hefestämme mit Mutationen in den verschiedenen Genen der *RAD52*-Gruppe sensitiv gegenüber basen-schädigenden Agenzien, wie MMS und H_2O_2, sind (Chang et al., 2002; Mallory et al., 2003; Letavayova et al., 2006) und dass sie eine hohe Mutationsfrequenz aufweisen (Alseth et al., 1999; Huang et al., 2003). In dieser Arbeit konnte die bereits publizierte erhöhte MMS-Empfindlichkeit nach Deletion von *XRS2* und *RAD52* (Chang et al., 2002) bestätigt werden (4.1 / Abbildung 18, 4.4.1 / Abbildung 33). Überdies konnte bekräftigt werden, dass die *xrs2*-Mutante im Vergleich zum WT eine erhöhte spontane Mutationsfrequenz aufweist (4.4.1 / Abbildung 32, (Huang et al., 2003)). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die *xrs2*-Mutante auch eine erhöhte MMS-induzierte Mutationsfrequenz besitzt.

Bisher wurde angenommen, dass diese Phänotypen durch die Rolle von Xrs2 und Rad52 in der *RAD52*-Gruppe für die DSB-Reparatur erklärt werden können (Vazquez et al., 2008). Die HR kann als *Backup*-Mechanismus zur Reparatur von Basenschäden eingesetzt werden, da auch durch Basenschäden DSB induziert werden können, wenn die Replikationsgabel auf unreparierte Schäden oder Intermediate der BER trifft. Aber auch eine Anhäufung an Basenschäden (*clustered DNA damage*) kann zu DSB führen. Durch die Prozessierung gegenüberliegender Basenschäden kommt es zu Einschnitten an beiden Strängen und folglich zu DSB (Hendricks et al., 2002; Lundin et al., 2005; Letavayova et al., 2006).

Bei der Analyse des Zellüberlebens nach MMS-Behandlung konnten in dieser Arbeit Unterschiede zwischen der *xrs2*- und der *rad52*-Deletionsmutante gezeigt werden (4.4.1 / Abbildung 33). Während das Überleben nach Deletion von *RAD52* von der Wachstumsphase abhängig ist, weist die *xrs2*-Mutante in der stationären Phase die gleiche Sensitivität wie in der logarithmischen Wachstumsphase auf. Da die HR hauptsächlich in der logarithmischen Wachstumsphase, in der unreparierte Basenschäden in DSB umgewandelt werde, Verwendung findet, deutet die wachstumsphasen-unabhängige Sensitivität der *xrs2*-Mutante auf eine andere oder weitere von der HR unabhängige Rolle von Xrs2 in der Reparatur von Basenschäden hin.

5.3.1 Xrs2 ist direkt in die BER involviert

MMS modifiziert Basen durch Anfügen von Methylgruppen und induziert dabei vor allem 7-Methylguanin und 3-Methyladenin (Wyatt und Pittman, 2006), die durch die BER entfernt werden können. Die unreparierten, modifizierten Basen stellen hitze-labile Stellen dar (Lundin et al., 2005), die *in vitro* in DSB umgewandelt und durch PFGE-Analyse der chromosomalen DNA quantifiziert werden können (Ma et al., 2008). Somit kann mit PFGE die Reparatur von MMS-induzierten, hitze-labilen Stellen *in vivo* untersucht werden.

PFGE-Analysen der chromosomalen DNA nach MMS-Behandlung zeigten, dass die *xrs2*-Mutante bei der Reparatur von hitze-labilen Stellen im Vergleich zum WT eine erhöhte Menge an Restschäden aufweist. Die Deletion von *RAD52* hat jedoch keinen Einfluss auf die Reparatur hitze-labiler Stellen (4.4.2 / Abbildung 36). Auch Ma et al. konnten mit dieser Methode zeigen, dass sich Rad52 nicht an der Reparatur von hitze-labilen Stellen beteiligt (Ma et al., 2008). Xrs2 besitzt somit eine Funktion bei der Reparatur von MMS-induzierten Schäden *in vivo*, die vermutlich mittels BER erfolgt.

Um eine Beteiligung des Xrs2-Proteins in der BER zu bestätigen und Einzelschritte der BER zu untersuchen, wurde ein *in vitro*-BER-Assay, modifiziert nach Harrigan et al. (Harrigan et al., 2006), durchgeführt (4.4.3 / Abbildung 38 und Abbildung 39). Dabei wurde in Proteinextrakten des WT, der *xrs2*- sowie der *rad52*-Mutante die Reparatur eines 35 bp langen dsDNA-Oligonukleotids, das an Position 15 ein Uracil aufweist, untersucht. Mit diesem Versuchsansatz können *short patch*- und *long patch*-Reparatur voneinander unterschieden werden. Dabei bestätigte sich, dass der Hauptweg der BER in Hefe die *long patch*-Reparatur ist (Boiteux und Guillet, 2004), da zur Detektion der *short patch*-Produkte längere Belichtungszeiten notwendig waren. Zum ersten Mal konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Xrs2 direkt an der BER beteiligt ist. Nach 20 min Reparaturzeit zeigt die *xrs2*-Mutante im Gegensatz zum WT nur ca. 65 % Reparaturkapazität. Passend zu den *in vivo*-Ergebnissen weist die *rad52*-Mutante hingegen kaum eine Beeinträchtigung der BER auf (4.4.3 / Abbildung 40). Somit konnte, wie vor kurzem für das Säugerhomolog Nbs1 publiziert (Sagan et al., 2009), auch für Xrs2 eine direkte Beteiligung an der BER *in vitro* gezeigt werden, während Rad52 keine Rolle in diesem Reparaturweg spielt.

5.3.2 Xrs2 aktiviert die BER *downstream* von Ntg1 und Ntg2

Mit Hilfe des *in vitro*-BER-*Assays* konnte gezeigt werden, dass beide Unterwege der BER, der *short patch*- und der *long patch*-Weg, durch die Deletion von *XRS2* gleichermaßen betroffen sind. Daher sollte Xrs2 entweder vor der Auftrennung der Unterwege eine Rolle spielen oder eine Funktion übernehmen, die für beide Wege notwendig ist. Da sich der Einfluss von Xrs2 jedoch unabhängig vom Schadenstyp (Uracil und 8-oxoG, 4.4.3 / Abbildung 38) zeigt, sollte die Schadenserkennung in der Mutante nicht gestört sein.

Um näher eingrenzen zu können, welche Funktion Xrs2 in der BER ausübt, wurde der *in vitro-Assay* modifiziert, so dass einzelne Schritte der BER, wie der Einschnitt des Zucker-Phosphatrückgrats (*Incisio*n) und die Strang-Elongation, näher analysiert werden konnten. Der *Incision-Assay* zeigte, dass der Einschnitt des Zucker-Phosphatrückgrats in der *xrs2*-Mutante so effizient wie im WT ablaufen kann. Somit ist weder die Erkennung des Uracils als Basenschaden, noch die Endonuklease-Aktivität bzw. Lyase-Aktivität in der Mutante gestört. Als Kontrolle ließ die Deletion von *APN1*, dem Gen für die wichtigste AP-Endonuklease in Hefezellen, eine starke Einschränkung des *Incision*-Schrittes erkennen (4.4.6.1, Abbildung 46). Auch in einer neuen Studie über Nbs1 in Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass das Protein keinen Einfluss auf den *Incision*-Schritt der BER hat (Sagan et al., 2008). Um die Strang-Elongation zu untersuchen, wurde ein *Primer-extension-Assay* durchgeführt. Hierbei zeigt die *xrs2*-Mutante eine reduzierte Fähigkeit, das Substrat aufzufüllen. Allerdings ist unklar, ob für das Auffüllen des gegebenen Substrats die gleichen Polymerasen genutzt werden wie für die BER. Um die BER zu simulieren, wurde deshalb zusätzlich ein *Gap-filling-Assay* durchgeführt, bei dem das Substrat einem BER-Intermediat des *long patch*-Weges gleicht (4.4.6.2 / Abbildung 48). Auch in diesem Versuch zeigt die *xrs2*-Mutante einen Defekt für das Anfügen von Nukleotiden. Die Mutante weist somit eine eingeschränkte Aktivität der DNA-Synthese auf. Die verringerte DNA-Synthese könnte auch für die reduzierte Intermediatmenge des *in vitro*-BER-*Assays* (4.4.3 / Abbildung 39) verantwortlich sein. Xrs2 besitzt zwar selbst keine Polymerase-Aktivität, könnte aber diese stimulieren oder an der Rekrutierung von Polymerasen an die Reparaturstelle beteiligt sein.

Um Xrs2 dem AP-Endonuklease- oder AP-Lyaseweg zuordnen zu können, wurden Epistasisanalysen der *xrs2*-Deletionsmutante zu anderen BER-defizienten Mutanten mit Hilfe des *in vitro*-BER-Versuches durchgeführt (4.4.5). Die Eliminierung einer geschädigten Base durch N-Glykosylasen oder durch spontane Dissoziation führt zur

Bildung einer AP-Stelle. Das Zucker-Phosphatrückgrat kann anschließend durch Apn1, der wichtigsten Endonuklease in Hefezellen, 5´ der AP-Stelle eingeschnitten werden (Hanna et al., 2004). Da das dabei entstehende 5´-dRP-Ende kein Substrat für Ligasen darstellt, wird über die Schadensstelle hinwegsynthetisiert und der verdrängte Überhang mit Hilfe der Rad27 *Flap*-Endonuklease entfernt (Boiteux und Guillet, 2004). Somit werden in dem so genannten *long patch*-Reparaturweg mehrere Nukleotide im geschädigten Strang ersetzt. Die AP-Lyasen Ntg1 und Ntg2 hingegen schneiden das Zucker-Phosphatrückgrat 3´ der AP-Stelle ein. Das blockierte 3´-dRP-Ende wird anschließend entfernt. In der Literatur wird davon ausgegangen, dass hierbei nur die geschädigte Base ausgetauscht wird (*short patch*-Reparatur) (Boiteux und Guillet, 2004). Allerdings könnte hier auch die Möglichkeit bestehen, dass mehrere Nukleotide neu synthetisiert werden (*long patch*-Reparatur). Nach dem Einschnitt über AP-Lyasen existiert ein weiterer, bisher wenig verstandener Reparaturweg über die Öffnung der Doppelhelix mittels Helikase-Aktivität (Boiteux und Guillet, 2004), der mit dem verwendeten *Assay* nicht untersucht werden kann. Um den Einfluss von Xrs2 auf diese beiden Unterwege näher zu analysieren, wurde die Deletion von *XRS2* einerseits mit einer *APN1*-Deletion, anderseits mit der Deletion der beiden Gene *NTG1* und *NTG2* kombiniert. Zusätzlich wurde der Einfluss von Xrs2 in einer *apn1ntg1ntg2*-Dreifachmutante untersucht.

Nach dem derzeitigen Verständnis der BER in Hefe (Boiteux und Guillet, 2004) sollte die Deletion von *APN1* für einen Defekt in der *long patch*-Reparatur sorgen, während der *short patch*-Weg unbeeinflusst bleibt, da hier Apn2 als effiziente 3´-Phosphodiesterase arbeiten kann. Diese Erwartung konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (4.4.5.2 / Abbildung 44 / Abbildung 53). Zusätzlich zeigt die *apn1*-Mutante eine auffällig geringe Menge an Intermediat. Dies kann dadurch erklärt werden, dass der geschwindigkeits-limitierende Schritt in der Mutante der Einschnitt des Zucker-Phosphatrückgrats vor der Produktion des Intermediats ist. Das Intermediat kann sofort nach seiner Herstellung in *short patch*-Produkt umgewandelt werden. In der *xrs2*-Mutante hingegen kann eine relativ hohe Menge an Intermediat produziert werden. Der geschwindigkeits-limitierende Schritt sollte für die Erzeugung aller drei Produkte eine Rolle spielen. Wird davon ausgegangen, dass nach dem Einschnitt des Zucker-Phosphatrückgrats über AP-Lyasen *short patch*- und *long patch*-Reparatur möglich ist, sollte die Deletion von *NTG1* und *NTG2*, deren Genprodukte den Nebenweg der BER einleiten, beide Wege leicht beeinflussen. Die *ntg1ntg2*-Mutante zeigt jedoch im Gegensatz zum erwarteten Ergebnis keinen Reparaturdefekt (4.4.5.2 / Abbildung 44 /

Abbildung 53). Vermutlich kann die Reparatur über redundante AP-Lyasen (z.B. Ogg1) noch durchgeführt werden. In der BER-defizienten Mutante *apn1ntg1ntg2* konnten kaum Reparaturprodukte detektiert werden, da sowohl der Hauptweg als auch der Nebenweg der BER unterbrochen ist.

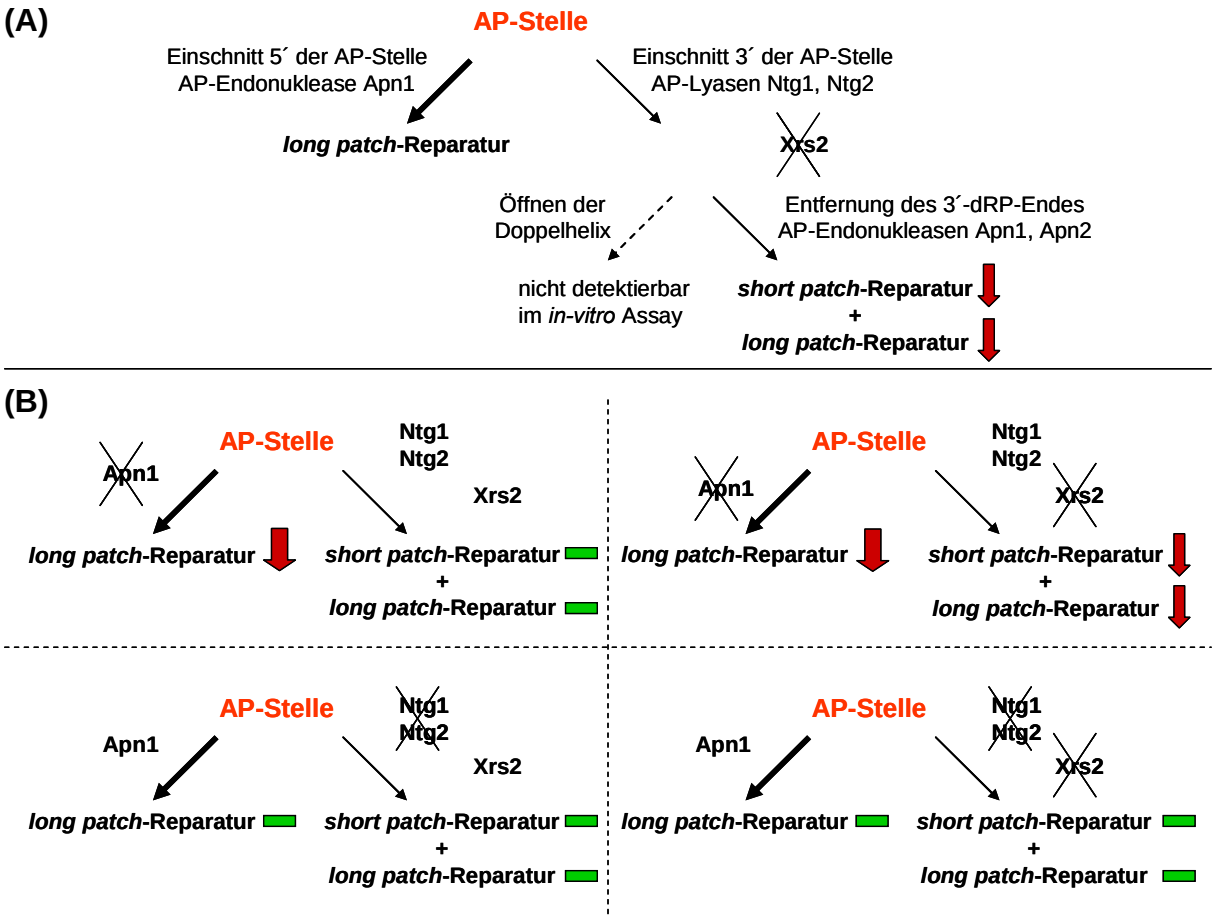

Abbildung 53: Einfluss von Xrs2 und weiterer BER-Proteine auf den *long patch*- und den *short patch*-Weg der BER

Die Abbildung zeigt das in dieser Arbeit angenommene Modell. Dabei kann nach dem Einschnitt über AP-Lyasen sowohl *short patch*- als auch *long patch*-Reparatur stattfinden. Xrs2 arbeitet nach dieser Vorstellung *downstream* von Ntg1 und Ntg2.
(A) Xrs2 beeinflusst die *long patch*- und *short patch*-Reparatur gleichermaßen. Der alternative Reparaturweg nach dem Einschnitt über AP-Lyasen ist wenig verstanden und mit dem hier verwendeten *in vitro-Assay* nicht detektierbar.
(B) Deletion von *APN1* führt zu einer Reduktion der *long patch*-Reparatur. Durch zusätzliche Deletion von *XRS2* im *apn1*-Hintergrund tritt in der *short patch*-Reparatur der *xrs2*-Phänotyp in Erscheinung, während die beiden Proteine einen additiven Effekt in der *long patch*-Reparatur zeigen. Die Deletion von *NTG1* und *NTG2* hat keinen Einfluss auf die Reparatureffizienz. Im *xrs2*-Hintergrund wird durch die Deletion der beiden AP-Lyasen der *xrs2*-Phänotyp supprimiert.
Rote Pfeile geben an, wie stark die Reparaturkapazität des *long patch*- bzw. des *short patch*-Weges in den einzelnen Mutanten im Vergleich zum WT herabgesetzt ist. Grüne Balken stehen für eine unveränderte Effizienz des jeweiligen BER-Unterweges.

Mit dem hier präsentierten Modell, dass durch AP-Lyasen *short patch*- und *long patch*-Reparatur stattfinden kann, während nach AP-Endonuklease-Aktivität nur *long patch*-Reparatur durchgeführt wird, lassen sich auch die Ergebnisse der *in vitro*-Versuche gut mit einer Funktion von Xrs2 *downstream* von Ntg1 und Ntg2 erklären. In diesem Modell wären somit durch die Deletion von *XRS2* beide Reparaturwege, *short patch*- und *long patch*-Reparatur betroffen (Abbildung 53 A), wie in dieser Arbeit auch gezeigt werden konnte (4.4.3 / Abbildung 39). Eine gemeinsame Deletion von *XRS2* und *APN1* zeigt im *short patch*-Weg den *xrs2*-Phänotyp. Für den *long patch*-Weg weist die Doppelmutante einen additiven Effekt auf. Die Deletion von *NTG1* und *NTG2* im *xrs2*-Hintergrund beeinflusst *long patch*- und *short patch*-Reparatur nicht (4.4.5.2 / Abbildung 44 / Abbildung 53 B). Diese Unterdrückung des *xrs2*-Phänotpys ist nur mit einer Funktion von Xrs2 *downstream* von Ntg1 und Ntg2 zu erklären. Sind die beiden AP-Lyasen nicht aktiv, so hat die Deletion von *XRS2* keinen Effekt mehr auf die BER. Möglicherweise wird hier ein weiterer Reparaturweg, z. B. über Ogg1, eingesetzt, der Xrs2-unabhängig arbeiten kann.

Auch die Analyse der MMS-Sensitivität (4.4.5.1 / Abbildung 43) zeigt für die Gene *APN1* und *XRS2* einen additiven Effekt, während die Deletion der beiden Gene *NTG1* und *NTG2* den *xrs2*-Phänotyp unterdrückt. Diese Analyse zeigte zusätzlich, dass die *xrs2*-Mutante eine höhere MMS-Empfindlichkeit aufweist als die BER-defizienten Mutanten, da neben der BER selbst auch die HR als *Backup*-Weg beeinträchtigt ist. Allerdings bleibt zu klären, weshalb der *xrs2*-Phänotyp durch die Deletion von *NTG1* und *NTG2* fast komplett supprimiert werden kann, wenn Xrs2 eine weitere Funktion neben der BER besitzt.

5.3.3 Xrs2 arbeitet in der BER zusammen mit seinen Komplexpartnern

Eine Analyse der BER-Kapazität von *mre11*- und *rad50*-Mutanten zeigte, dass es sich nicht um eine individuelle Funktion des Xrs2-Proteins handelt, sondern dass der gesamte MRX-Komplex an der BER beteiligt ist. Die MMS-Sensitivität sowie die *in vitro*-Reparatureffizienz sind in allen drei Mutanten gleichermaßen betroffen (4.4.4.2 / Abbildung 42). Zusätzlich wurden *xrs2*-Mutanten untersucht, bei denen einerseits die Mre11-Bindestelle am C-Terminus deletiert wurde, anderseits der gesamte N-Terminus inklusive FHA- und BRCT-Domäne fehlt. Diese Experimente zeigten, dass wiederum, wie für die Funktion in der DSB-Reparatur, nur die Mre11-Bindestelle von Xrs2 für die Rolle in der BER essentiell ist.

5.3.4 Fördert der MRX-Komplex die BER über die Rekrutierung weiterer Reparaturfaktoren?

Mehrere potentielle Funktionen des MRX-Komplexes in der BER sind denkbar. Ein positiver Einfluss des Komplexes auf die Expression verschiedener BER-Gene könnte die Reparatur begünstigen. Bisher sind in *S. cerevisiae* jedoch keine MRX-abhängigen Expressionsänderungen bekannt. Wie für die DSB-Reparatur könnte der Komplex auch in der BER eine Rolle im Umbau der Chromatinstruktur (*Chromatin Remodelling*) spielen und somit den Zugang weiterer Proteine an die geschädigte Stelle gewährleisten. Da der MRX-Komplex auf Grund der Ergebnisse der Epistasisanalysen *downstream* der AP-Lyasen zu arbeiten scheint, könnte er auch eine Funktion an der Prozessierung des von Ntg1 und Ntg2 produzierten Intermediats besitzen. Die 3´-5´-Exonukleaseaktivität des Komplexes könnte möglicherweise an der Entfernung des blockierten 3´dRP-Endes beteiligt sein, wodurch auch die Synthese neuer Nukleotide gestört wird. Dies würde die verminderte Polymerase-Aktivität der *xrs2*-Mutante erklären. Dagegen spricht jedoch, dass die im *Primer-extension-Assay* sowie im *Gap-filling-Assay* angebotenen Substrate keine blockierten Enden aufwiesen.

Wie für die HR könnte der MRX-Komplex auch in der BER mittels Kerntransport und / oder Bindung für die Rekrutierung weiterer BER-Faktoren, vor allem DNA-Polymerasen, verantwortlich sein. In Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass das WRN-Protein, ein Mitglied der RecQ-Helikase-Familie, die BER durch Interaktionen mit Schlüsselenzymen dieses Reparaturweges aktiviert (Opresko et al., 2003). Mutationen im WRN-Protein verursachen das Werner Syndrom (WS), das, wie das *Nijmegen Breakage* Syndrom, chromosomale Instabilität aufweist. Durch Assoziation von WRN mit dem Rad27-Homolog Fen1 und der Glykosylase Neil1 werden deren Aktivitäten stimuliert (Brosh et al., 2001; Das et al., 2007). Des Weiteren kooperiert WRN mit der Polymerase β, die in Säugerzellen Lyase-Aktivität besitzt und im *short patch*- und im *long patch*-Weg das erste Nukleotid einfügt (Fortini und Dogliotti, 2007). Während die Helikase-Aktivität von WRN Polβ stimuliert (Harrigan et al., 2003), übernimmt die Exonuklease-Aktivität die fehlende *Proofreading*-Aktivität der Polymerase (Harrigan et al., 2006). Zusätzlich ist der MRN-Komplex in Säugerzellen mit den RecQ-Helikasen BLM und WRN in großen Komplexen, so genannten Superkomplexen, assoziiert (Wang et al., 2000; Cheng et al., 2004). Es stellte sich heraus, dass die Verbindung zwischen dem MRN-Komplex und WRN durch Nbs1 vermittelt wird (Cheng et al., 2004). Passend zu diesen Befunden konnte kürzlich auch für Nbs1 eine Beteiligung an der BER gezeigt werden (Sagan et al., 2009). Die Autoren vermuten wie für WRN auch für Nbs1 eine

Rolle im Rekrutierungsschritt weiterer Reparaturfaktoren, unter anderem DNA-Polymerasen für die Reparatursynthese.

In Hefezellen bildet der MRX-Komplex nach *Checkpoint*-Aktivierung durch MMS-Behandlung ebenfalls einen Komplex mit der RecQ-Helikase Sgs1 (Chiolo et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass in Hefezellen, wie in Säugerzellen, nach Basenschädigung ein großer Komplex, bestehend aus dem MRX-Komplex, Sgs1 und weiteren BER-Faktoren, wichtig für die Aktivierung der Reparatur ist (Abbildung 54). Speziell die Rekrutierung essentieller Polymerasen könnte von großer Bedeutung sein. Bisher ist für Hefen im Gegensatz zu Säugern noch nicht komplett geklärt, welche Polymerasen in der BER arbeiten. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Pol4, die die höchste Sequenzhomologie zu Polβ in Säugerzellen aufweist, an der Reparatur von MMS-induzierten Schäden beteiligt ist (Sterling und Sweasy, 2006).

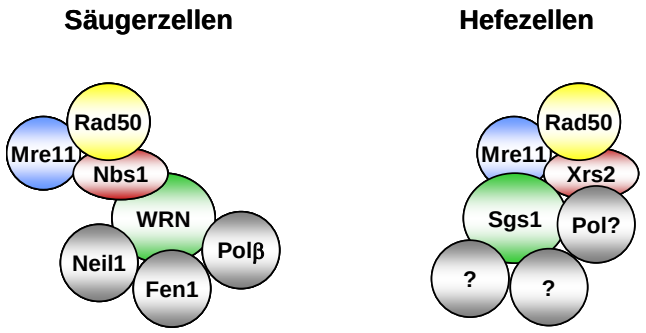

Abbildung 54: Modell zur Bildung von BER-Superkomplexen

In Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass die RecQ-Helikase WRN über Interaktionen mit Schlüsselenzymen des BER-Prozesses die Reparatur von Basenschäden stimuliert. Zusätzlich konnte eine neue Studie eine Beteiligung von Nbs1 an der BER nachweisen. Dieses vermittelt die Assoziation des MRN-Komplexes mit dem WRN-Protein. Daher wird vermutet, dass ein Superkomplex aus all diesen Proteinen eine Rolle in der BER hat. Auch in Hefezellen könnte ein solcher Komplex die BER aktivieren. Nach Behandlung mit MMS konnte bereits die Bildung von Sgs1-Mre11 Subkomplexen nachgewiesen werden. Wie für Säugerzellen, liegt auch hier die Vermutung nahe, dass der MRX-Komplex für die Rekrutierung wichtiger Polymerasen für die BER verantwortlich ist.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal eine direkte Beteiligung des MRX-Komplexes an der BER gezeigt werden. Dabei beeinflusst der Komplex sowohl die *short patch*- als auch die *long patch*-Reparatur *downstream* der AP-Lyasen Ntg1 und Ntg2. Möglicherweise rekrutieren die MRX-Proteine weitere BER-Proteine, die vor allem für die Polymerase-Aktivität notwendig sind.

6 Literaturverzeichnis

Alseth, I., Eide, L., Pirovano, M., Rognes, T., Seeberg, E. und Bjoras, M. (1999). The Saccharomyces cerevisiae homologues of endonuclease III from Escherichia coli, Ntg1 and Ntg2, are both required for efficient repair of spontaneous and induced oxidative DNA damage in yeast. *Mol Cell Biol* **19,** 3779-87.

Andrews, C. A. und Clarke, D. J. (2005). MRX (Mre11/Rad50/Xrs2) mutants reveal dual intra-S-phase checkpoint systems in budding yeast. *Cell Cycle* **4,** 1073-7.

Ataian, Y. und Krebs, J. E. (2006). Five repair pathways in one context: chromatin modification during DNA repair. *Biochem Cell Biol* **84,** 490-504.

Aylon, Y. und Kupiec, M. (2004). DSB repair: the yeast paradigm. *DNA Repair (Amst.)* **3,** 797-815.

Aylon, Y., Liefshitz, B., Bitan-Banin, G. und Kupiec, M. (2003). Molecular dissection of mitotic recombination in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.* **23,** 1403-17.

Bao, Y. und Shen, X. (2007). Chromatin remodeling in DNA double-strand break repair. *Curr Opin Genet Dev* **17,** 126-31.

Bärtsch, S., Kang, L. E. und Symington, L. S. (2000). RAD51 is required for the repair of plasmid double-stranded DNA gaps from either plasmid or chromosomal templates. *Mol. Cell. Biol.* **20,** 1194-205.

Barzel, A. und Kupiec, M. (2008). Finding a match: how do homologous sequences get together for recombination? *Nat Rev Genet* **9,** 27-37.

Baute, J. und Depicker, A. (2008). Base excision repair and its role in maintaining genome stability. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **43,** 239-76.

Becker, E., Meyer, V., Madaoui, H. und Guerois, R. (2006). Detection of a tandem BRCT in Nbs1 and Xrs2 with functional implications in the DNA damage response. *Bioinformatics* **22,** 1289-92.

Bhaskara, V., Dupre, A., Lengsfeld, B., Hopkins, B. B., Chan, A., Lee, J. H., Zhang, X., Gautier, J., Zakian, V. und Paull, T. T. (2007). Rad50 adenylate kinase activity regulates DNA tethering by Mre11/Rad50 complexes. *Mol Cell* **25,** 647-61.

Bianchi, A. und Shore, D. (2008). How telomerase reaches its end: mechanism of telomerase regulation by the telomeric complex. *Mol Cell* **31,** 153-65.

Blank, A., Kim, B. und Loeb, L. A. (1994). DNA polymerase delta is required for base excision repair of DNA methylation damage in Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91,** 9047-51.

Blanton, H. L., Radford, S. J., McMahan, S., Kearney, H. M., Ibrahim, J. G. und Sekelsky, J. (2005). REC, Drosophila MCM8, drives formation of meiotic crossovers. *PLoS Genet.* **1,** e40.

Boiteux, S., Gellon, L. und Guibourt, N. (2002). Repair of 8-oxoguanine in Saccharomyces cerevisiae: interplay of DNA repair and replication mechanisms. *Free Radic Biol Med* **32,** 1244-53.

Boiteux, S. und Guillet, M. (2004). Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in Saccharomyces cerevisiae. *DNA Repair (Amst)* **3,** 1-12.

Borde, V. (2007). The multiple roles of the Mre11 complex for meiotic recombination. *Chromosome Res* **15,** 551-63.

Boulton, S. J. und Jackson, S. P. (1998). Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *EMBO J.* **17,** 1819-28.

Bressan, D. A., Baxter, B. K. und Petrini, J. H. (1999). The Mre11-Rad50-Xrs2 protein complex facilitates homologous recombination-based double-strand break repair in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.* **19,** 7681-7.

Brosh, R. M., Jr., von Kobbe, C., Sommers, J. A., Karmakar, P., Opresko, P. L., Piotrowski, J., Dianova, I., Dianov, G. L. und Bohr, V. A. (2001). Werner syndrome protein interacts with human flap endonuclease 1 and stimulates its cleavage activity. *EMBO J* **20,** 5791-801.

Bruner, S. D., Norman, D. P. und Verdine, G. L. (2000). Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature* **403,** 859-66.

Burma, S., Chen, B. P. und Chen, D. J. (2006). Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)* **5,** 1042-8.

Büttner, S., Eisenberg, T., Carmona-Gutierrez, D., Ruli, D., Knauer, H., Ruckenstuhl, C., Sigrist, C., Wissing, S., Kollroser, M., Fröhlich, K. U., Sigrist, S. und Madeo, F. (2007). Endonuclease G regulates budding yeast life and death. *Mol Cell* **25,** 233-46.

Büttner, S., Eisenberg, T., Herker, E., Carmona-Gutierrez, D., Kroemer, G. und Madeo, F. (2006). Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love, and war. *J Cell Biol* **175,** 521-5.

Cadet, J., Berger, M., Douki, T. und Ravanat, J. L. (1997). Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **131,** 1-87.

Cahill, D. und Carney, J. P. (2007). Dimerization of the Rad50 protein is independent of the conserved hook domain. *Mutagenesis* **22,** 269-74.

Carney, J. P. (1999). Chromosomal breakage syndromes. *Curr Opin Immunol* **11,** 443-7.

Carney, J. P., Maser, R. S., Olivares, H., Davis, E. M., Le Beau, M., Yates, J. R., 3rd, Hays, L., Morgan, W. F. und Petrini, J. H. (1998). The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* **93,** 477-86.

Chang, M., Bellaoui, M., Boone, C. und Brown, G. W. (2002). A genome-wide screen for methyl methanesulfonate-sensitive mutants reveals genes required for S phase progression in the presence of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99,** 16934-9.

Chen, L., Trujillo, K., Ramos, W., Sung, P. und Tomkinson, A. E. (2001). Promotion of Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes. *Mol. Cell* **8,** 1105-15.

Cheng, W. H., von Kobbe, C., Opresko, P. L., Arthur, L. M., Komatsu, K., Seidman, M. M., Carney, J. P. und Bohr, V. A. (2004). Linkage between Werner syndrome protein and the Mre11 complex via Nbs1. *J Biol Chem* **279,** 21169-76.

Chiolo, I., Carotenuto, W., Maffioletti, G., Petrini, J. H., Foiani, M. und Liberi, G. (2005). Srs2 and Sgs1 DNA helicases associate with Mre11 in different subcomplexes following checkpoint activation and CDK1-mediated Srs2 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **25,** 5738-51.

D'Amours, D. und Jackson, S. P. (2002). The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3,** 317-27.

Daley, J. M., Palmbos, P. L., Wu, D. und Wilson, T. E. (2005). Nonhomologous end joining in yeast. *Annu. Rev. Genet.* **39,** 431-51.

Dardalhon, M., Nohturfft, A., Meniel, V. und Averbeck, D. (1994). Repair of DNA double-strand breaks induced in Saccharomyces cerevisiae using different gamma-ray dose-rates: a pulsed-field gel electrophoresis analysis. *Int J Radiat Biol* **65,** 307-14.

Das, A., Boldogh, I., Lee, J. W., Harrigan, J. A., Hegde, M. L., Piotrowski, J., de Souza Pinto, N., Ramos, W., Greenberg, M. M., Hazra, T. K., Mitra, S. und Bohr, V. A. (2007). The human Werner syndrome protein stimulates repair of oxidative DNA base damage by the DNA glycosylase NEIL1. *J Biol Chem* **282,** 26591-602.

Degtyareva, N. P., Chen, L., Mieczkowski, P., Petes, T. D. und Doetsch, P. W. (2008). Chronic oxidative DNA damage due to DNA repair defects causes chromosomal instability in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* **28,** 5432-45.

Digweed, M., Reis, A. und Sperling, K. (1999). Nijmegen breakage syndrome: consequences of defective DNA double strand break repair. *Bioessays* **21,** 649-56.

Downs, J. A., Lowndes, N. F. und Jackson, S. P. (2000). A role for Saccharomyces cerevisiae histone H2A in DNA repair. *Nature* **408,** 1001-4.

Dudasova, Z., Dudas, A. und Chovanec, M. (2004). Non-homologous end-joining factors of Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Microbiol. Rev.* **28,** 581-601.

Durocher, D., Henckel, J., Fersht, A. R. und Jackson, S. P. (1999). The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. *Mol. Cell* **4,** 387-94.

Durocher, D. und Jackson, S. P. (2002). The FHA domain. *FEBS Lett.* **513,** 58-66.

Fillingham, J., Keogh, M. C. und Krogan, N. J. (2006). GammaH2AX and its role in DNA double-strand break repair. *Biochem Cell Biol* **84,** 568-77.

Fortini, P. und Dogliotti, E. (2007). Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst)* **6,** 398-409.

Frankenberg-Schwager, M., Frankenberg, D., Blocher, D. und Adamczyk, C. (1980). Repair of DNA double-strand breaks in irradiated yeast cells under nongrowth conditions. *Radiat Res* **82,** 498-510.

Friedberg, E. C. (2003). DNA damage and repair. *Nature* **421,** 436-40.

Friedl, A. A., Beisker, W., Hahn, K., Eckardt-Schupp, F. und Kellerer, A. M. (1993). Application of pulsed field gel electrophoresis to determine gamma-ray-induced double-strand breaks in yeast chromosomal molecules. *Int J Radiat Biol* **63,** 173-81.

Friedl, A. A., Kraxenberger, A. und Eckardt-Schupp, F. (1995). Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Studies of DNA Double-Strand Break Repair in the Yeast Saccharomyces cerevisiae. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* **7,** 205-218.

Fröhlich, K. U., Fussi, H. und Ruckenstuhl, C. (2007). Yeast apoptosis--from genes to pathways. *Semin Cancer Biol* **17,** 112-21.

Fu, Y. und Xiao, W. (2003). Functional domains required for the Saccharomyces cerevisiae Mus81-Mms4 endonuclease complex formation and nuclear localization. *DNA Repair (Amst.)* **2,** 1435-47.

Gangavarapu, V., Prakash, S. und Prakash, L. (2007). Requirement of RAD52 group genes for postreplication repair of UV-damaged DNA in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* **27,** 7758-64.

Geigl, E. M. und Eckardt-Schupp, F. (1991). The repair of double-strand breaks and S1 nuclease-sensitive sites can be monitored chromosome-specifically in Saccharomyces cerevisiae using pulse-field gel electrophoresis. *Mol Microbiol* **5,** 1615-20.

Gietz, R. D. und Sugino, A. (1988). New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74,** 527-34.

Girard, P. M. und Boiteux, S. (1997). Repair of oxidized DNA bases in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Biochimie* **79,** 559-66.

Gomez-Paramio, I. (2007). Doktorarbeit, Analysis of the role of Rad5 for the regulation of repair of DSB, small deletions and oxidative damage, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Gourlay, C. W., Du, W. und Ayscough, K. R. (2006). Apoptosis in yeast--mechanisms and benefits to a unicellular organism. *Mol Microbiol* **62,** 1515-21.

Grenon, M., Gilbert, C. und Lowndes, N. F. (2001). Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Nat. Cell Biol.* **3,** 844-7.

Grenon, M., Magill, C. P., Lowndes, N. F. und Jackson, S. P. (2006). Double-strand breaks trigger MRX- and Mec1-dependent, but Tel1-independent, checkpoint activation. *FEMS Yeast Res.* **6,** 836-47.

Guillet, M. und Boiteux, S. (2003). Origin of endogenous DNA abasic sites in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* **23,** 8386-94.

Haber, J. E. (1998). The many interfaces of Mre11. *Cell* **95,** 583-6.

Haghnazari, E. und Heyer, W. D. (2004). The DNA damage checkpoint pathways exert multiple controls on the efficiency and outcome of the repair of a double-stranded DNA gap. *Nucleic Acids Res.* **32,** 4257-68.

Hanna, M., Chow, B. L., Morey, N. J., Jinks-Robertson, S., Doetsch, P. W. und Xiao, W. (2004). Involvement of two endonuclease III homologs in the base excision repair pathway for the processing of DNA alkylation damage in Saccharomyces cerevisiae. *DNA Repair (Amst)* **3,** 51-9.

Harrigan, J. A., Opresko, P. L., von Kobbe, C., Kedar, P. S., Prasad, R., Wilson, S. H. und Bohr, V. A. (2003). The Werner syndrome protein stimulates DNA polymerase beta strand displacement synthesis via its helicase activity. *J Biol Chem* **278,** 22686-95.

Harrigan, J. A., Wilson, D. M., 3rd, Prasad, R., Opresko, P. L., Beck, G., May, A., Wilson, S. H. und Bohr, V. A. (2006). The Werner syndrome protein operates in base excision repair and cooperates with DNA polymerase beta. *Nucleic Acids Res* **34,** 745-54.

Hastings, P. J. (1988). Recombination in the eukaryotic nucleus. *Bioessays* **9,** 61-4.

Hefferin, M. L. und Tomkinson, A. E. (2005). Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst.)* **4,** 639-48.

Helleday, T., Lo, J., van Gent, D. C. und Engelward, B. P. (2007). DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)* **6,** 923-35.

Hematulin, A., Sagan, D., Eckardt-Schupp, F. und Mörtl, S. (2008). NBS1 is required for IGF-1 induced cellular proliferation through the Ras/Raf/MEK/ERK cascade. *Cell Signal* **20,** 2276-85.

Hendricks, C. A., Razlog, M., Matsuguchi, T., Goyal, A., Brock, A. L. und Engelward, B. P. (2002). The S. cerevisiae Mag1 3-methyladenine DNA glycosylase modulates susceptibility to homologous recombination. *DNA Repair (Amst)* **1,** 645-59.

Herrmann, G., Lindahl, T. und Schar, P. (1998). Saccharomyces cerevisiae LIF1: a function involved in DNA double-strand break repair related to mammalian XRCC4. *EMBO J* **17,** 4188-98.

Heyer, W. D. (2004). Recombination: Holliday junction resolution and crossover formation. *Curr. Biol.* **14,** R56-8.

Heyer, W. D., Ehmsen, K. T. und Solinger, J. A. (2003). Holliday junctions in the eukaryotic nucleus: resolution in sight? *Trends Biochem. Sci.* **28,** 548-57.

Hoeijmakers, J. H. (2007). Genome maintenance mechanisms are critical for preventing cancer as well as other aging-associated diseases. *Mech Ageing Dev* **128,** 460-2.

Hopfner, K. P., Craig, L., Moncalian, G., Zinkel, R. A., Usui, T., Owen, B. A., Karcher, A., Henderson, B., Bodmer, J. L., McMurray, C. T., Carney, J. P., Petrini, J. H. und Tainer, J. A. (2002). The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* **418,** 562-6.

Huang, M. E., Rio, A. G., Nicolas, A. und Kolodner, R. D. (2003). A genomewide screen in Saccharomyces cerevisiae for genes that suppress the accumulation of mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100,** 11529-34.

Huertas, P., Cortes-Ledesma, F., Sartori, A. A., Aguilera, A. und Jackson, S. P. (2008). CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature* **455,** 689-92.

Ira, G., Malkova, A., Liberi, G., Foiani, M. und Haber, J. E. (2003). Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast. *Cell* **115,** 401-11.

Ira, G., Pellicioli, A., Balijja, A., Wang, X., Fiorani, S., Carotenuto, W., Liberi, G., Bressan, D., Wan, L., Hollingsworth, N. M., Haber, J. E. und Foiani, M. (2004). DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* **431,** 1011-7.

Ivanov, E. L., Korolev, V. G. und Fabre, F. (1992). XRS2, a DNA repair gene of Saccharomyces cerevisiae, is needed for meiotic recombination. *Genetics* **132,** 651-64.

Ivanov, E. L., Sugawara, N., White, C. I., Fabre, F. und Haber, J. E. (1994). Mutations in XRS2 and RAD50 delay but do not prevent mating-type switching in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.* **14,** 3414-25.

Jackson, S. P. (2001). Detecting, signalling and repairing DNA double-strand breaks. *Biochem Soc Trans* **29,** 655-61.

Jackson, S. P. (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* **23,** 687-96.

Jha, B., Ahne, F. und Eckardt-Schupp, F. (1993). The use of a double-marker shuttle vector to study DNA double-strand break repair in wild-type and radiation-sensitive mutants of the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Curr. Genet.* **23,** 402-7.

Kao, H. I., Henricksen, L. A., Liu, Y. und Bambara, R. A. (2002). Cleavage specificity of Saccharomyces cerevisiae flap endonuclease 1 suggests a double-flap structure as the cellular substrate. *J Biol Chem* **277,** 14379-89.

Karathanasis, E. und Wilson, T. E. (2002). Enhancement of Saccharomyces cerevisiae end-joining efficiency by cell growth stage but not by impairment of recombination. *Genetics* **161,** 1015-27.

Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. und Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15,** 963-72.

Kraakman-van der Zwet, M., Overkamp, W. J., Friedl, A. A., Klein, B., Verhaegh, G. W., Jaspers, N. G., Midro, A. T., Eckardt-Schupp, F., Lohman, P. H. und Zdzienicka, M. Z. (1999). Immortalization and characterization of Nijmegen Breakage syndrome fibroblasts. *Mutat. Res.* **434,** 17-27.

Krejci, L., Van Komen, S., Li, Y., Villemain, J., Reddy, M. S., Klein, H., Ellenberger, T. und Sung, P. (2003). DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament. *Nature* **423,** 305-9.

Krishna, S., Wagener, B. M., Liu, H. P., Lo, Y. C., Sterk, R., Petrini, J. H. und Nickoloff, J. A. (2007). Mre11 and Ku regulation of double-strand break repair by gene conversion and break-induced replication. *DNA Repair (Amst.)* **6,** 797-808.

Krogh, B. O. und Symington, L. S. (2004). Recombination proteins in yeast. *Annu. Rev. Genet.* **38,** 233-71.

Krokan, H. E., Standal, R. und Slupphaug, G. (1997). DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J* **325 (Pt 1),** 1-16.

Kupiec, M. und Steinlauf, R. (1997). Damage-induced ectopic recombination in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Mutat Res* **384,** 33-44.

Lam, A. F., Krogh, B. O. und Symington, L. S. (2008). Unique and overlapping functions of the Exo1, Mre11 and Pso2 nucleases in DNA repair. *DNA Repair (Amst)* **7,** 655-62.

Larson, E. D., Cummings, W. J., Bednarski, D. W. und Maizels, N. (2005). MRE11/RAD50 cleaves DNA in the AID/UNG-dependent pathway of immunoglobulin gene diversification. *Mol Cell* **20,** 367-75.

Lavin, M. F. (2007). ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene* **26,** 7749-58.

Lederberg, E. M. und Cohen, S. N. (1974). Transformation of Salmonella typhimurium by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* **119,** 1072-4.

Lee, S. E., Moore, J. K., Holmes, A., Umezu, K., Kolodner, R. D. und Haber, J. E. (1998). Saccharomyces Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell* **94,** 399-409.

Letavayova, L., Markova, E., Hermanska, K., Vlckova, V., Vlasakova, D., Chovanec, M. und Brozmanova, J. (2006). Relative contribution of homologous recombination and non-homologous end-joining to DNA double-strand break repair after oxidative stress in Saccharomyces cerevisiae. *DNA Repair (Amst)* **5,** 602-10.

Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362,** 709-15.

Lingaraju, G. M., Kartalou, M., Meira, L. B. und Samson, L. D. (2008). Substrate specificity and sequence-dependent activity of the Saccharomyces cerevisiae 3-methyladenine DNA glycosylase (Mag). *DNA Repair (Amst)* **7,** 970-82.

Lisby, M., Barlow, J. H., Burgess, R. C. und Rothstein, R. (2004). Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* **118,** 699-713.

Lo, Y. C., Paffett, K. S., Amit, O., Clikeman, J. A., Sterk, R., Brenneman, M. A. und Nickoloff, J. A. (2006). Sgs1 regulates gene conversion tract lengths and crossovers independently of its helicase activity. *Mol. Cell. Biol.* **26,** 4086-94.

Longhese, M. P., Foiani, M., Muzi-Falconi, M., Lucchini, G. und Plevani, P. (1998). DNA damage checkpoint in budding yeast. *EMBO J.* **17,** 5525-8.

Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A. S. und Helleday, T. (2005). Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* **33,** 3799-811.

Ma, J. L., Kim, E. M., Haber, J. E. und Lee, S. E. (2003). Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences. *Mol Cell Biol* **23,** 8820-8.

Ma, W., Resnick, M. A. und Gordenin, D. A. (2008). Apn1 and Apn2 endonucleases prevent accumulation of repair-associated DNA breaks in budding yeast as revealed by direct chromosomal analysis. *Nucleic Acids Res* **36,** 1836-46.

Maclean, M. J., Aamodt, R., Harris, N., Alseth, I., Seeberg, E., Bjoras, M. und Piper, P. W. (2003). Base excision repair activities required for yeast to attain a full chronological life span. *Aging Cell* **2,** 93-104.

Madeo, F., Fröhlich, E. und Fröhlich, K. U. (1997). A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J Cell Biol* **139,** 729-34.

Malkova, A., Ivanov, E. L. und Haber, J. E. (1996). Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93,** 7131-6.

Mallory, J. C., Bashkirov, V. I., Trujillo, K. M., Solinger, J. A., Dominska, M., Sung, P., Heyer, W. D. und Petes, T. D. (2003). Amino acid changes in Xrs2p, Dun1p, and Rfa2p that remove the preferred targets of the ATM family of protein kinases do not affect DNA repair or telomere length in Saccharomyces cerevisiae. *DNA Repair (Amst.)* **2,** 1041-64.

Matsuzaki, K., Shinohara, A. und Shinohara, M. (2008). Forkhead-associated domain of yeast Xrs2, a homolog of human Nbs1, promotes nonhomologous end joining through interaction with a ligase IV partner protein, Lif1. *Genetics* **179,** 213-25.

Mazzoni, C. und Falcone, C. (2008). Caspase-dependent apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1783,** 1320-7.

Melo, R. G., Leitao, A. C. und Padula, M. (2004). Role of OGG1 and NTG2 in the repair of oxidative DNA damage and mutagenesis induced by hydrogen peroxide in Saccharomyces cerevisiae: relationships with transition metals iron and copper. *Yeast* **21,** 991-1003.

Milne, G. T., Jin, S., Shannon, K. B. und Weaver, D. T. (1996). Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* **16,** 4189-98.

Mimitou, E. P. und Symington, L. S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* **455,** 770-4.

Minesinger, B. K. und Jinks-Robertson, S. (2005). Roles of RAD6 epistasis group members in spontaneous polzeta-dependent translesion synthesis in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **169,** 1939-55.

Moore, C. W., McKoy, J., Dardalhon, M., Davermann, D., Martinez, M. und Averbeck, D. (2000). DNA damage-inducible and RAD52-independent repair of DNA double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **154,** 1085-99.

Moreau, S., Ferguson, J. R. und Symington, L. S. (1999). The nuclease activity of Mre11 is required for meiosis but not for mating type switching, end joining, or telomere maintenance. *Mol. Cell. Biol.* **19,** 556-66.

Mörtl, S., Karras, G. I., Wismüller, T., Ahne, F. und Eckardt-Schupp, F. (2008). Regulation of double-stranded DNA gap repair by the RAD6 pathway. *DNA Repair (Amst)* **7,** 1893-906.

Nakada, D., Hirano, Y. und Sugimoto, K. (2004). Requirement of the Mre11 complex and exonuclease 1 for activation of the Mec1 signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* **24,** 10016-25.

Nakada, D., Matsumoto, K. und Sugimoto, K. (2003). ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. *Genes Dev.* **17,** 1957-62.

Obe, G., Pfeiffer, P., Savage, J. R., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P., Natarajan, A. T., Martinez-Lopez, W., Folle, G. A. und Drets, M. E. (2002). Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat. Res.* **504,** 17-36.

Opresko, P. L., Cheng, W. H., von Kobbe, C., Harrigan, J. A. und Bohr, V. A. (2003). Werner syndrome and the function of the Werner protein; what they can teach us about the molecular aging process. *Carcinogenesis* **24,** 791-802.

Owsianowski, E., Walter, D. und Fahrenkrog, B. (2008). Negative regulation of apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1783,** 1303-10.

Palmbos, P. L., Daley, J. M. und Wilson, T. E. (2005). Mutations of the Yku80 C terminus and Xrs2 FHA domain specifically block yeast nonhomologous end joining. *Mol. Cell. Biol.* **25,** 10782-90.

Palmbos, P. L., Wu, D., Daley, J. M. und Wilson, T. E. (2008). Recruitment of Saccharomyces cerevisiae Dnl4-Lif1 Complex to a Double-strand Break Requires Interactions with Yku80 and the Xrs2 FHA Domain. *Genetics*.

Paques, F. und Haber, J. E. (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63,** 349-404.

Paull, T. T. und Gellert, M. (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell* **1,** 969-79.

Paull, T. T. und Gellert, M. (1999). Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev.* **13,** 1276-88.

Pereira, C., Silva, R. D., Saraiva, L., Johansson, B., Sousa, M. J. und Corte-Real, M. (2008). Mitochondria-dependent apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1783,** 1286-302.

Perrone, G. G., Tan, S. X. und Dawes, I. W. (2008). Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1783,** 1354-68.

Pfeiffer, P., Goedecke, W., Kuhfittig-Kulle, S. und Obe, G. (2004). Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. *Cytogenet. Genome Res.* **104,** 7-13.

Pluth, J. M., Yamazaki, V., Cooper, B. A., Rydberg, B. E., Kirchgessner, C. U. und Cooper, P. K. (2008). DNA double-strand break and chromosomal rejoining defects with misrejoining in Nijmegen breakage syndrome cells. *DNA Repair (Amst)* **7,** 108-18.

Pohlit, W. und Heyder, I. R. (1977). Growth of cells on solid culture medium. II. Cell physiological data of stationary yeast cells and the initiation of cell cycle in nutrient free buffer solution. *Radiat Environ Biophys* **14,** 213-30.

Rai, R., Peng, G., Li, K. und Lin, S. Y. (2007). DNA damage response: the players, the network and the role in tumor suppression. *Cancer Genomics Proteomics* **4,** 99-106.

Raji, H. und Hartsuiker, E. (2006). Double-strand break repair and homologous recombination in Schizosaccharomyces pombe. *Yeast* **23,** 963-76.

Ramotar, D., Popoff, S. C., Gralla, E. B. und Demple, B. (1991). Cellular role of yeast Apn1 apurinic endonuclease/3'-diesterase: repair of oxidative and alkylation DNA damage and control of spontaneous mutation. *Mol Cell Biol* **11,** 4537-44.

Riballo, E., Kuhne, M., Rief, N., Doherty, A., Smith, G. C., Recio, M. J., Reis, C., Dahm, K., Fricke, A., Krempler, A., Parker, A. R., Jackson, S. P., Gennery, A., Jeggo, P. A. und Lobrich, M. (2004). A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol. Cell* **16,** 715-24.

Robert, T., Dervins, D., Fabre, F. und Gangloff, S. (2006). Mrc1 and Srs2 are major actors in the regulation of spontaneous crossover. *EMBO J.* **25,** 2837-46.

Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. und Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273,** 5858-68.

Sagan, D., Mörtl, S., Müller, I., Eckardt-Schupp, F. und Eichholtz-Wirth, H. (2007). Enhanced CD95-mediated apoptosis contributes to radiation hypersensitivity of NBS lymphoblasts. *Apoptosis* **12,** 753-67.

Sagan, D., Müller, R., Kröger, C., Hematulin, A., Mörtl, S. und Eckardt-Schupp, F. (2009). The DNA repair protein NBS1 influences the base excision repair pathway. *Carcinogenesis*.

Saleh-Gohari, N. und Helleday, T. (2004). Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic Acids Res.* **32,** 3683-8.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

San Filippo, J., Sung, P. und Klein, H. (2008). Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* **77,** 229-57.

Sanchez, Y., Desany, B. A., Jones, W. J., Liu, Q., Wang, B. und Elledge, S. J. (1996). Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science* **271,** 357-60.

Sander, M. und Ramotar, D. (1997). Partial purification of Pde1 from Saccharomyces cerevisiae: enzymatic redundancy for the repair of 3'-terminal DNA lesions and abasic sites in yeast. *Biochemistry* **36,** 6100-6.

Schiestl, R. H. und Gietz, R. D. (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* **16,** 339-46.

Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M. und Bertrand, R. (2007). DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. *J Zhejiang Univ Sci B* **8,** 377-97.

Severin, F. F. und Hyman, A. A. (2002). Pheromone induces programmed cell death in S. cerevisiae. *Curr Biol* **12,** R233-5.

Shima, H., Suzuki, M. und Shinohara, M. (2005). Isolation and characterization of novel xrs2 mutations in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **170,** 71-85.

Shrivastav, M., De Haro, L. P. und Nickoloff, J. A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* **18,** 134-47.

Shroff, R., Arbel-Eden, A., Pilch, D., Ira, G., Bonner, W. M., Petrini, J. H., Haber, J. E. und Lichten, M. (2004). Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Curr. Biol.* **14,** 1703-11.

Smith, S., Gupta, A., Kolodner, R. D. und Myung, K. (2005). Suppression of gross chromosomal rearrangements by the multiple functions of the Mre11-Rad50-Xrs2 complex in Saccharomyces cerevisiae. *DNA Repair (Amst)* **4,** 606-17.

Sonoda, E., Hochegger, H., Saberi, A., Taniguchi, Y. und Takeda, S. (2006). Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair (Amst)* **5,** 1021-9.

Steininger, S. (2005). Diplomarbeit, Neue Plasmidsysteme zur Analyse der Reparatur von Mikrodeletionen in *Saccharomyces cerevisiae*, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Steininger, S., Gomez-Paramio, I., Braselmann, H., Fellerhoff, B., Dittberner, D., Eckardt-Schupp, F. und Mörtl, S. (2008). Xrs2 facilitates crossovers during DNA double-strand gap repair in yeast. *DNA Repair (Amst)*.

Sterling, C. H. und Sweasy, J. B. (2006). DNA polymerase 4 of Saccharomyces cerevisiae is important for accurate repair of methyl-methanesulfonate-induced DNA damage. *Genetics* **172,** 89-98.

Symington, L. S. (2002). Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66,** 630-70, table of contents.

Symington, L. S., Kang, L. E. und Moreau, S. (2000). Alteration of gene conversion tract length and associated crossing over during plasmid gap repair in nuclease-deficient strains of Saccharomyces cerevisiae. *Nucleic Acids Res.* **28,** 4649-56.

Szostak, J. W., Orr-Weaver, T. L., Rothstein, R. J. und Stahl, F. W. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33,** 25-35.

Thoms, K. M., Kuschal, C. und Emmert, S. (2007). Lessons learned from DNA repair defective syndromes. *Exp Dermatol* **16,** 532-44.

Trujillo, K. M., Roh, D. H., Chen, L., Van Komen, S., Tomkinson, A. und Sung, P. (2003). Yeast xrs2 binds DNA and helps target rad50 and mre11 to DNA ends. *J. Biol. Chem.* **278,** 48957-64.

Trujillo, K. M. und Sung, P. (2001). DNA structure-specific nuclease activities in the Saccharomyces cerevisiae Rad50*Mre11 complex. *J. Biol. Chem.* **276,** 35458-64.

Tsubouchi, H. und Ogawa, H. (1998). A novel mre11 mutation impairs processing of double-strand breaks of DNA during both mitosis and meiosis. *Mol. Cell. Biol.* **18,** 260-8.

Tsukamoto, Y., Kato, J. und Ikeda, H. (1997). Budding yeast Rad50, Mre11, Xrs2, and Hdf1, but not Rad52, are involved in the formation of deletions on a dicentric plasmid. *Mol Gen Genet* **255,** 543-7.

Tsukamoto, Y., Mitsuoka, C., Terasawa, M., Ogawa, H. und Ogawa, T. (2005). Xrs2p regulates Mre11p translocation to the nucleus and plays a role in telomere elongation and meiotic recombination. *Mol. Biol. Cell* **16,** 597-608.

Tsukuda, T., Fleming, A. B., Nickoloff, J. A. und Osley, M. A. (2005). Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in Saccharomyces cerevisiae. *Nature* **438,** 379-83.

Tucker, C. L. und Fields, S. (2004). Quantitative genome-wide analysis of yeast deletion strain sensitivities to oxidative and chemical stress. *Comp Funct Genom* **5,** 216-224.

Ui, A., Seki, M., Ogiwara, H., Onodera, R., Fukushige, S., Onoda, F. und Enomoto, T. (2005). The ability of Sgs1 to interact with DNA topoisomerase III is essential for damage-induced recombination. *DNA Repair (Amst.)* **4,** 191-201.

Usui, T., Ogawa, H. und Petrini, J. H. (2001). A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex. *Mol. Cell* **7,** 1255-66.

Valencia, M., Bentele, M., Vaze, M. B., Herrmann, G., Kraus, E., Lee, S. E., Schar, P. und Haber, J. E. (2001). NEJ1 controls non-homologous end joining in Saccharomyces cerevisiae. *Nature* **414,** 666-9.

van Attikum, H. und Gasser, S. M. (2005). ATP-dependent chromatin remodeling and DNA double-strand break repair. *Cell Cycle* **4,** 1011-4.

Vazquez, M. V., Rojas, V. und Tercero, J. A. (2008). Multiple pathways cooperate to facilitate DNA replication fork progression through alkylated DNA. *DNA Repair (Amst)* **7,** 1693-704.

Veaute, X., Jeusset, J., Soustelle, C., Kowalczykowski, S. C., Le Cam, E. und Fabre, F. (2003). The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature* **423,** 309-12.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. und Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* **184,** 39-51.

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. und Berneman, Z. N. (2005). Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* **84,** 627-39.

Virgin, J. B. und Bailey, J. P. (1998). The M26 hotspot of Schizosaccharomyces pombe stimulates meiotic ectopic recombination and chromosomal rearrangements. *Genetics* **149,** 1191-204.

Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C. und Philippsen, P. (1997). Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast* **13,** 1065-75.

Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. und Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast* **10,** 1793-808.

Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S. J. und Qin, J. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* **14,** 927-39.

Wang, Z., Wu, X. und Friedberg, E. C. (1993). DNA repair synthesis during base excision repair in vitro is catalyzed by DNA polymerase epsilon and is influenced by DNA polymerases alpha and delta in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* **13,** 1051-8.

Wang, Z., Wu, X. und Friedberg, E. C. (1997). Molecular mechanism of base excision repair of uracil-containing DNA in yeast cell-free extracts. *J Biol Chem* **272,** 24064-71.

Williams, R. S., Bernstein, N., Lee, M. S., Rakovszky, M. L., Cui, D., Green, R., Weinfeld, M. und Glover, J. N. (2005). Structural basis for phosphorylation-dependent signaling in the DNA-damage response. *Biochem. Cell Biol.* **83,** 721-7.

Williams, R. S., Williams, J. S. und Tainer, J. A. (2007). Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochem Cell Biol* **85,** 509-20.

Wiltzius, J. J., Hohl, M., Fleming, J. C. und Petrini, J. H. (2005). The Rad50 hook domain is a critical determinant of Mre11 complex functions. *Nat Struct Mol Biol* **12,** 403-7.

Wu, D., Topper, L. M. und Wilson, T. E. (2008). Recruitment and dissociation of nonhomologous end joining proteins at a DNA double-strand break in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **178,** 1237-49.

Wu, X. und Wang, Z. (1999). Relationships between yeast Rad27 and Apn1 in response to apurinic/apyrimidinic (AP) sites in DNA. *Nucleic Acids Res* **27,** 956-62.

Wyatt, M. D. und Pittman, D. L. (2006). Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol* **19,** 1580-94.

Wysocki, R. und Kron, S. J. (2004). Yeast cell death during DNA damage arrest is independent of caspase or reactive oxygen species. *J Cell Biol* **166,** 311-6.

Yu, X., Chini, C. C., He, M., Mer, G. und Chen, J. (2003). The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science* **302,** 639-42.

Zhang, N. N., Dudgeon, D. D., Paliwal, S., Levchenko, A., Grote, E. und Cunningham, K. W. (2006a). Multiple signaling pathways regulate yeast cell death during the response to mating pheromones. *Mol Biol Cell* **17,** 3409-22.

Zhang, X. und Paull, T. T. (2005). The Mre11/Rad50/Xrs2 complex and non-homologous end-joining of incompatible ends in S. cerevisiae. *DNA Repair (Amst.)* **4,** 1281-94.

Zhang, Y., Zhou, J. und Lim, C. U. (2006b). The role of NBS1 in DNA double strand break repair, telomere stability, and cell cycle checkpoint control. *Cell Res* **16,** 45-54.

Zhu, Z., Chung, W. H., Shim, E. Y., Lee, S. E. und Ira, G. (2008). Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* **134,** 981-94.

7 Abkürzungsverzeichnis

µ-	Mikro- (10^{-6})
°C	Grad Celsius
3´-dRP-Rest	3´-α,β-ungesättigte Aldehyd-Ende
5´-dRP-Rest	5´-Deoxyriobophosphat-Ende
5-FOA	*5-Fluoroorotic Acid*
8-oxoG	8-oxo-7,8-Dihydroguanin
A	Adenin
A. gossypii	*Ashbya gossypii*
aa	Aminosäuren
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ARS	*autonomous replicating sequence*
ATP	Adenosin -5´- triphosphat
BER	Basenexcisionsreparatur
BIR	*Break-induced replication*
BisAA	Bisacrylamid
bp	Basenpaare
BRCT	BRCA1 *C-terminal domain*
BSA	Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
$CaCl_2$	Calciumchlorid
Can	Canavanine
CASY	*Cell Counter and Analyzer System*
CEN	Centromer
CPK	Creatinphosphokinase
dATP	2´-Desoxy-Adenosin-5´- Triphosphat
dCTP	2´-Desoxy-Cytidin-5´- Triphosphat
ddTTP	2´,3´-Didesoxy- Thymidin-5´-Triphosphat
dGTP	2´-Desoxy-Guanosin-5´- Triphosphat
DHE	Dihydroethidiumbromid
dHJ	*double Holliday junction*
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*)
dNTPs	2´-Desoxy-Nukleosid-5´-Triphosphat
ds	doppelsträngig
DSB	Doppelstrangbruch (*double strand break)*
DSBR-Modell	Doppelstrangbruch-Reparaturmodell
DTT	1,4-Dimercapto-2,3-butanediol
dTTP	2´-Desoxy-Thymidin-5´-Triphosphat
E. coli	*Escherichia coli*
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflußzytometer (*Fluorescent Activated Cell Scanner/Sorter*)
FHA	*forkhead-associated domain*
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
fw	*forward*
G	Guanin
g	Gramm

Gy	Gray
h	Stunde(n) (*hour(s)*)
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
his	Histidin
k-	Kilo- (10^3)
K_2HPO_4	Dikaliumhydrogenphosphat
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
KPO_4-Puffer	Kaliumphosphat-Puffer
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LHR	*Liquid Holding Recovery*
LiOAc	Lithiumacetat
LMP-Agarose	*Low Meltingpoint* Agarose
log.	logarithmisch
M	Molar
m	Meter
m-	Milli- (10^{-3})
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
MMR	*Mismatch*-Reparatur
MMS	Methylmethansulfonat
n-	Nano- (10^{-9})
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natronlauge
$NaPO_4$-Puffer	Natriumphosphat-Puffer
NER	Nukleotidexcisionsreparatur
NH_4Cl	Ammoniumchlorid
NHEJ	Nichthomologe Endenverknüpfung (*non homologous end joining*)
NLS	Natriumlauroylsarcosin
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	*Open Reading Frame*
ori	*Origin of Replication*
P	Phosphat
PBS	*Phosphate buffered saline*
PCI	Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1
PCR	Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
PEG_{3350}	Polyethylenglykol MW 3350
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
PI	Propidiumiodid
PNK	Polynukleotidkinase
PSI	*pound per square inch*

pv	Degradierungswert (*profile value*)
R	Resistenz, resistent
ss	einzelsträngig (*single-stranded*)
rev	*reverse*
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*)
rpm	Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*)
RT	Raumtemperatur
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SC	*synthetic complete*
SDS	Natriumlaurylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*)
SEC	Sorbitol EDTA Citrat
sec	Sekunde(n) (*second(s)*)
SMD	*synthetic medium dextrose*
SSB	Einzelstrangbruch (*single strand break)*
stat.	stationär
Sz. pombe	*Schizosaccharomyces pombe*
T	Thymin
T_A	Anlagerungstemperatur (*annealing temperature*)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TER	50µg/ml RNaseA in TE
T_M	Schmelztemperatur (*melting temperature*)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100®	Oktylphenylpoly-(ethylenglykolether)$_n$
trp	Tryptophan
U	Enzymeinheit (*unit*)
ÜN	über Nacht
ura	Uracil
V	Volt
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (*weight per volume*)
WT	Wildtyp
X g	X-fache Erdbeschleunigung
YEPD	*Yeast Extract Peptone Dextrose*
YNB	*Yeast Nitrogen Base*
YPAD	*Yeast Extract Peptone Adenine Dextrose*
z. B.	zum Beispiel

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei zahlreichen Personen bedanken, ohne deren tatkräftige Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein erster Dank geht an Frau Prof. Dr. Friederike Eckardt-Schupp, die es mir ermöglicht hat, diese Arbeit in ihrer Forschungsgruppe anfertigen zu können. Ihr außerordentliches Interesse und Engagement förderten stets den Fortgang der Arbeit. Ebenso stellten ihre organisatorischen Fähigkeiten eine große Hilfe dar.

Für die hervorragende Betreuung über den gesamten Zeitraum möchte ich mich bei Frau Dr. Simone Mörtl bedanken. Ihre hilfreichen Ratschläge und Beiträge waren eine wertvolle Unterstützung für diese Arbeit sowie für die Publikation.

Mein weiterer Dank gebührt den übrigen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe. Jeder stand mir stets mit fachlichem Rat und großer Hilfsbereitschaft zur Seite. Ein besonderes Dankeschön möchte ich Frau Klaudia Winkler aussprechen, die mir durch unzählige Tipps, Tricks und Gefälligkeiten das Laborleben erleichterte. Dr. Fred Ahne danke ich für die Herstellung der Proteinextrakte. Astrid Rickinger, Dr. Marita Angermeier und Dr. Daniel Sagan hatten stets ein offenes Ohr und erwiesen sich als hilfreiche Diskussionspartner.

Für die Möglichkeit, Apoptose-*Assays* in ihrem Labor durchführen zu können, möchte ich Prof. Dr. Frank Madeo und Christoph Ruckenstuhl von der Karl-Franzens-Universität in Graz meinen Dank aussprechen. Bei Dr. Miki Shinohara von der Hiroshima University in Japan bedanke ich mich für die Bereitstellung von Plasmiden, die mir die Konstruktion einiger Mutanten stark erleichterten.

Schließlich möchte ich mich noch bei Prof. Dr. Heinrich Leonhardt bedanken, der sich zur Erstellung des Zweitgutachtens bereit erklärt hat.

Lebenslauf

Name	Sylvia Steininger
Geburtsdatum	29.01.1981
Geburtsort	München

12/2005 - 01/2009	Promotion bei Frau Prof. Dr. Eckardt-Schupp am Institut für Strahlenbiologie, Helmholtz Zentrum München
03/2005 - 11/2005	Diplomarbeit bei Frau Prof. Dr. Eckardt-Schupp am Institut für Strahlenbiologie, GSF in Neuherberg
11/2005	studentische Hilfskraft an der Ludwig-Maximilians-Universität München
08/2003 - 01/2004	studentische Hilfskraft am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München
10/2000 - 11/2005	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
09/1991 - 06/2000	Maria-Ward-Gymnasium der Englischen Fräulein in München Abschluss mit allgemeiner Hochschulreife

Publikationen und Teilnahme an Fachtagungen

Publikationen

Xrs2 facilitates crossovers during DNA double-strand gap repair in yeast
S. Steininger, I. Gomez-Paramio, H. Braselmann, B. Fellerhoff, D. Dittberner, F. Eckardt-Schupp, S. Mörtl
DNA Repair 7 (2008) 1563–1577

A novel function for the MRX complex in base excision repair
S. Steininger, F. Ahne, K. Winkler, F. Eckardt-Schupp, S. Mörtl
(Manuskript in Vorbereitung)

Vorträge und Poster auf Fachtagungen

New Plasmid Systems for the Analysis of DNA Double Strand Break Repair in Yeast
S. Steininger, I. Gomez-Paramio, F. Ahne, F. Eckardt-Schupp, S. Mörtl
2nd Workshop on Recombination and Repair, Hamburg, 2005

A new role for *XRS2* in recombinational repair in yeast
S. Steininger, S. Mörtl, F. Eckardt-Schupp
DNA Repair 2006, 9th Biennual Meeting of the DGDR, Hamburg, 2006

Xrs2 facilitates crossovers during DNA double strand gap repair in yeast
S. Steininger, F. Eckardt-Schupp, S. Mörtl
10. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung (GBS), Mainz, 2007

A new role for *XRS2* in recombinational repair in yeast
S. Steininger, F. Eckardt-Schupp, S. Mörtl
2008 Yeast Genetics & Molecular Biology Meeting, Toronto, 2008

Xrs2 facilitates crossovers during DNA double-strand gap repair in yeast
S. Steininger, F. Eckardt-Schupp, S. Mörtl
DNA Repair 2008, 10th Biennual Meeting of the DGDR, Berlin, 2008

Multiple Functions of the Xrs2 protein for the maintenance of genomic integrity
S. Steininger, F. Ahne, S. Mörtl, F. Eckardt-Schupp
11. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung (GBS), Tübingen, 2008

Xrs2 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in base excision repair
S. Steininger, F. Ahne, S. Mörtl, F. Eckardt-Schupp
11. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung (GBS), Tübingen, 2008

Erklärung

Diese Arbeit wurde am Helmholtz Zentrum München im Institut für Strahlenbiologie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Friederike Eckardt-Schupp angefertigt.

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

München, den 26.01.2009

_____

Sylvia Steininger